

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5886194号
(P5886194)

(45) 発行日 平成28年3月16日(2016.3.16)

(24) 登録日 平成28年2月19日(2016.2.19)

(51) Int. Cl.	F I
C07K 14/11 (2006.01)	C07K 14/11 ZNA
C07K 16/10 (2006.01)	C07K 16/10
A61K 39/145 (2006.01)	A61K 39/145
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D
A61K 39/42 (2006.01)	A61K 39/395 S

請求項の数 15 (全 121 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-517927 (P2012-517927)
 (86) (22) 出願日 平成22年7月2日(2010.7.2)
 (65) 公表番号 特表2012-532117 (P2012-532117A)
 (43) 公表日 平成24年12月13日(2012.12.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/040978
 (87) 国際公開番号 W02011/003100
 (87) 国際公開日 平成23年1月6日(2011.1.6)
 審査請求日 平成25年6月28日(2013.6.28)
 (31) 優先権主張番号 61/222,889
 (32) 優先日 平成21年7月2日(2009.7.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 596060697
 マサチューセッツ インスティテュート
 オブ テクノロジー
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
 39ケンブリッジ, マサチューセッツ・ア
 ヴェニュー・77
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ジャヤラマン, アキラ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 452, ウォルサム, クロックタワー
 ドライブ 132, ユニット 311

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザ感染の診断および/または処置のための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

改変H1 HAインフルエンザ血球凝集素(「HA」)ポリペプチドバリエーションであって、そのアミノ酸配列が、A/カリフォルニア/04/2009株に由来するHA(配列番号46)である基準野生型H1 HAポリペプチドと少なくとも90%の同一性を示し、該改変H1 HAポリペプチドバリエーションのアミノ酸配列は、

(a) 野生型H3 HAの残基186に対応する位置の残基がProであり、野生型H3 HAの残基189に対応する位置の残基がThrであり、かつ、野生型H3 HAの残基227に対応する位置の残基がAlaであるか；または

(b) 野生型H3 HAの残基219に対応する残基がLysであり、

ここで、該改変H1 HAポリペプチドバリエーションが、野生型H1 HAポリペプチドと比較してアンブレラトポロジグリカンへの結合の増強を示す、

改変H1 HAポリペプチドバリエーション。

【請求項2】

前記改変H1 HAポリペプチドバリエーションが、野生型H1 HAポリペプチドと比較して少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、または少なくとも1000倍のアンブレラトポロジグリカンへの結合の増強を示すか、あるいは

前記改変H1 HAポリペプチドバリエーションが、コートポロジグリカンよりもむしろ

るアンブレラトポロジグリカンに優先的に結合するか、あるいは

前記改変 H 1 H A ポリペプチドバリエーションが、野生型 H 1 H A ポリペプチドと比較してインフルエンザウイルスにヒトへの感染性の増強を示させる、
請求項 1 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドバリエーション。

【請求項 3】

薬学的組成物として処方された請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドバリエーション。

【請求項 4】

前記薬学的組成物が、弱毒化生ウイルスを含むワクチン組成物であるか、またはウイルス様粒子を含むワクチン組成物であるか、またはサブユニットワクチンであるワクチン組成物である、請求項 3 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドバリエーション。

10

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドバリエーションに特異的に結合する抗体または抗体フラグメント。

【請求項 6】

前記抗体または抗体フラグメントが、前記改変 H 1 H A ポリペプチドバリエーションとアンブレラトポロジグリカンとの間の結合相互作用と競合する干渉剤である、請求項 5 に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 7】

薬学的組成物として処方された請求項 5 および 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または結合フラグメント。

20

【請求項 8】

前記薬学的組成物がワクチン組成物である、請求項 7 に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 9】

前記ワクチン組成物が弱毒化生ウイルスを含むか、または前記ワクチン組成物がウイルス様粒子を含むか、または前記ワクチン組成物がサブユニットワクチンであるか、またはアジュバントを含む、請求項 8 に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 10】

インフルエンザ感染症に罹患しているか罹患しやすい患者の処置、予防、診断、または層別化における使用のための組成物であって、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドバリエーションまたは請求項 5 および 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントを含む、組成物。

30

【請求項 11】

インフルエンザ感染症に罹患しているか罹患しやすい患者を層別化するための組成物であって、前記組成物は、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドバリエーションまたは請求項 5 および 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントを含み、

ここで、前記組成物は、集団中の各患者由来の血液と接触されることを特徴とし、

前記抗体または抗体フラグメントが患者の血液中の改変 H 1 H A ポリペプチドバリエーションに結合する場合、以下：

40

前記患者が、A / サウスカロライナ / 1 / 1918 または A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930 に対するワクチン接種の実施の際にインフルエンザのヒト結合または感染性の増強を示すインフルエンザ株から保護されるか、

前記患者が、ヒト結合または感染性の増強を示すインフルエンザ株による感染に対する感受性が低いか、

前記患者が事前に曝露されなかった患者よりもワクチン接種または処置の必要性が低いことを示す、組成物。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドバリエーションであって、そのアミノ酸配列

50

が、野生型 H3 HA 配列における位置に対応する、98、136、137、138、145、153、155、156、159、183、187、190、192、193、194、195、196、215、219、222、225、226、228、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸位置において、一つ以上の前記基準に対する配列置換をさらに含む、改変 H1 HA ポリペプチドバリエーション。

【請求項 13】

前記改変 H1 HA ポリペプチドバリエーションにおいて、
残基 145 に対応する位置の前記残基が Ser および Asn からなる群から選択される

請求項 12 に記載の改変 H1 HA ポリペプチドバリエーション。

10

【請求項 14】

前記改変 H1 HA ポリペプチドバリエーションにおいて、
残基 219 に対応する位置の前記残基が Lys である、

請求項 12 に記載の改変 H1 HA ポリペプチドバリエーション。

【請求項 15】

前記改変 H1 HA ポリペプチドバリエーションにおいて、

残基 225 に対応する位置の前記残基が Asn、Gly および Glu からなる群から選択される、

請求項 12 に記載の改変 H1 HA ポリペプチドバリエーション。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本願は、2009年7月2日に出願された米国仮特許出願第61/222,889号(「889出願」)への米国特許法第119条(e)項の下の優先権に関し、かつこの優先権を主張する。この889出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(政府支援)

本願発明は、国立衛生研究所の国立一般医科学研究所により与えられた合衆国政府支援(契約番号GM57073およびU54 GM62116)を得て成された。合衆国政府は本発明に一定の権利を有する。

30

【背景技術】

【0003】

発明の背景

2009年6月11日に、ブタ起源の遺伝子の固有の組み合わせを含む新規のインフルエンザ A (H1N1) ウイルス(以後、2009 A / H1N1 ウイルスという)の出現および世界的拡大に応え、世界保健機関は、世界的規模のパンデミックの警戒水準をフェーズ6(パンデミックフェーズ)に引き上げた(Garten et al., "Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A (H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans" Science, May 22, 2009, Science Express Online(本明細書中で参考として援用される))。この新規の菌株の出現を、メキシコのいくつかの地域でのインフルエンザ様疾病を有する患者数の増加ならびにそれに伴う入院数および死亡数の増加が報告された2009年3月~4月まで遡及して追跡することができる。2009年3月~6月19日中に、6大陸85ヶ国で44,000を超えるインフルエンザ2009 A / H1N1感染のヒト感染症例が検査で確認された。

40

【0004】

このウイルスの急激な発生を考慮すると、そのビルレンス、伝播性、およびその起源に関連する不確定要素が存在している。2009 H1N1 ウイルスの大流行に関するデータ

50

を解釈するために疫学的モデルを使用した最近の研究により、その伝播性が1918H1N1パンデミックについて見積もられた伝播性よりも低いことが示されている。2009H1N1ウイルスのヒト感染のほとんどの症例では、症状は比較的軽度であったが、150人超の死亡が報告されている。さらに、感染個体の相当数(約40%)は胃腸の窮迫および嘔吐を経験し、これは季節性インフルエンザで典型的に認められる比率より高い。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の概要

本発明は、H1N1インフルエンザウイルス感染症の処置、予防、および/または診断のための組成物および方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、重篤なヒト感染性を獲得したH1N1インフルエンザウイルス感染症の処置、予防、および/または診断のための組成物および方法を提供する。

10

【0006】

とりわけ、本発明は、H1N1インフルエンザ株と比較してヒト結合および/または感染性が増強したH1N1 HAバリエントを定義する。かかるバリエントを、とりわけ、H1N1ウイルス、特にヒト結合および/または感染性が増強されたバリエントによるヒト感染症を処置、軽減、および/または予防するためのワクチンおよび/または治療薬の成分として使用することができる。あるいはまたはさらに、かかるバリエントを、ヒト感染性が増強されたH1N1バリエントの発生および/または感染を検出するための系における標準として使用することができる。

20

【0007】

いくつかの態様では、本発明は、例えば、H1N1感染の検出で使用するためのH1N1 HAポリペプチドに特異的に結合する薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、ヒト結合および/または感染性が増強されたH1N1バリエントに特異的に結合する薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、ヒト感染性が増強されたH1N1バリエントとヒト感染性が増強していないH1N1バリエントとを区別する薬剤を提供する。

【0008】

いくつかの態様では、本発明は、H1N1 HAポリペプチドと1つ以上のグリカン(例えば、アンブレラ-トポロジ-グリカン)との間の結合相互作用を干渉(および/または競合)する薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、H1N1 HAポリペプチドと1つ以上の2-6シアリル化グリカンとの間の結合相互作用を干渉(および/または競合)する薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、H1N1 HAポリペプチドと1つ以上の6'SLN-LNグリカンとの間の結合相互作用を干渉(および/または競合)する薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、結合相互作用が干渉されるH1N1 HAポリペプチドは、ヒト結合および/または感染性が増強されたH1N1バリエントである。

30

【0009】

既に記述したように、いくつかの実施形態では、本発明は、H1N1インフルエンザの存在および/または感染を検出するための監視を行うための系を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、ヒト結合および/または感染性が増強されたH1N1インフルエンザバリエントの存在および/または感染を検出するための監視を行うための系を提供する。

40

【0010】

いくつかの実施形態では、本発明は、H1N1インフルエンザ株の感染に対する集団(例えば、ヒト集団)のワクチン接種および/または処置のためのストラテジーを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、ヒト結合および/または感染性が増強されたH1N1インフルエンザバリエントの感染に対する集団(例えば、ヒト集団)のワクチン接種および/または処置のためのストラテジーを提供する。

50

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、本発明は、患者集団の層別化（例えば、2009A/H1N1との類似性を示す1つ以上のウイルスに事前に曝露された被験体の同定）のためのストラテジーを提供する。この様式では、2009A/H1N1ウイルスの接触リスクが減少または増加し、そして/または2009A/H1N1との類似性を示す1つ以上のウイルスに対する以前の体液性免疫の欠如によって免疫応答が潜在的に遅延した患者集団を同定することができると思定される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 2 】

【 図 1 】 図 1 は、野生型 H A の例示的配列のアラインメントを示す図面である。配列を、NCBI インフルエンザウイルス配列データベースから得た (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>)。 10

【 0 0 1 3 】

【 化 1 】

H1_Av (配列番号: 1), H1_Hu1 (配列番号: 2), H1_Hu2 (配列番号: 3), H2_Av (配列番号: 4),
H2_Hu (配列番号: 5), H3_Av (配列番号: 6), H3_Hu1 (配列番号: 7), H3_Hu2 (配列番号: 8),
H4_Av (配列番号: 9), H5_Av1 (配列番号: 10), H5_Av2 (配列番号: 11), H6_Av (配列番号: 12)
H7_Av (配列番号: 13), H8_Av (配列番号: 14), H9_Av (配列番号: 15), H10_Av (配列番号: 16)
H11_Av (配列番号: 17), H12_Av (配列番号: 18), H13_Av (配列番号: 19), H14_Av (配列番号: 20) 20
H15_Av (配列番号: 21), H16_Av (配列番号: 22).

【 図 2 A 】 図 2 は、H A グリカン結合ドメインの配列アラインメントを示す図面である。灰色：シアル酸への結合に関与する保存アミノ酸。赤色：Neu5Ac₂₋₃/6Galモチーフへの結合に関与する特定のアミノ酸。黄色：Q226(137, 138)およびE190(186, 228)の位置決めに影響を及ぼすアミノ酸。緑色：Neu5Ac₂₋₃/6Galモチーフに結合した他のモノサッカリド（または修飾物）への結合に関与するアミノ酸。ASI30、APR34、ADU63、ADS97、およびViet04の配列を、その各結晶構造から得た。他の配列を、SwissProt (<http://us.expasy.org>) から得た。略語：ADA76、A/duck/Alberta/35/76 (H1N1) (配列番号23)；ASI30、A/ブタ/アイオワ/30 (H1N1) (配列番号24)；APR34、A/プエルトリコ/8/34 (H1N1) (配列番号25)；ASC18、A/サウスカロライナ/1/18 (H1N1) (配列番号26)；AT91、A/テキサス/36/91 (H1N1) (配列番号27)；ANY18、A/ニューヨーク/1/18 (H1N1) (配列番号28)；ADU63、A/アヒル/ウクライナ/1/63 (H3N8) (配列番号29)；AAI68、A/アイチ/2/68 (H3N2) (配列番号30)；AM99、A/モスクワ/10/99 (H3N2) (配列番号31)；ADS97、A/アヒル/シンガポール/3/97 (H5N3) (配列番号32)；Viet04、A/ベトナム/1203/2004 (H5N1) (配列番号33)。 30

【 図 2 B 】 図 2 は、H A グリカン結合ドメインの配列アラインメントを示す図面である。灰色：シアル酸への結合に関与する保存アミノ酸。赤色：Neu5Ac₂₋₃/6Galモチーフへの結合に関与する特定のアミノ酸。黄色：Q226(137, 138)およびE190(186, 228)の位置決めに影響を及ぼすアミノ酸。緑色：Neu5Ac₂₋₃/6Galモチーフに結合した他のモノサッカリド（または修飾物）への結合に関与するアミノ酸。ASI30、APR34、ADU63、ADS97、およびViet04の配列を、その各結晶構造から得た。他の配列を、SwissProt (<http://us.expasy.org>) から得た。略語：ADA76、A/duck/Alberta/35/76 (H1N1) (配列番号23)；ASI30、A/ブタ/アイオワ/30 (H1N1) (配列番号24)；APR34、A/プエルトリコ/8/34 (H1N1) (配列番号25)；ASC18、A/サウスカロライナ/1/18 (H1N1) (40
50

配列番号26); AT91、A/テキサス/36/91(H1N1)(配列番号27); ANY18、A/ニューヨーク/1/18(H1N1)(配列番号28); ADU63、A/アヒル/ウクライナ/1/63(H3N8)(配列番号29); AAI68、A/アイチ/2/68(H3N2)(配列番号30); AM99、A/モスクワ/10/99(H3N2)(配列番号31); ADS97、A/アヒル/シンガポール/3/97(H5N3)(配列番号32); Viet04、A/ベトナム/1203/2004(H5N1)(配列番号33)。

【図3】図3は、H1 HAに特徴的な保存されたサブシーケンスを示す配列アラインメントを示す図面である。図3Aは、図3Aがさらなる保存されたサブシーケンスの存在を示すことを除いて、図1A中に示した同一のアラインメントを示す。図3Bは、図3Aがさらなる保存されたサブシーケンスの存在を示すことを除いて、図1C中に示した同一のアラインメントを示す。

10

【図4A-1】図4(A)は、ヒト適合HA(SC_1_18、SolIs_3_06、Bris_50_07)と並記した2009A/H1N1 HA(CA_04_09)ならびにその変異形態(Mut_1)およびMut_2)の配列アラインメントを示す図面である。灰色で強調した残基は、2-6結合に直接または間接的に寄与する。赤色で示した残基は、2009A/H1N1 HA(CA_04_09)と比較してヒト結合および/または感染性が增強されたH1N1バリエーション中で変化した残基である。

【0014】

【化2】

20

CA_04_09 (配列番号:34). CA_04_09_Mut1 (配列番号:35). CA_04_09_Mut2 (配列番号:36). SC_1_18 (配列番号:37). SolIs_3_06 (配列番号:38). Bris_59_07 (配列番号:39).

図4(B)は、2009季節性株(アイチ_9_09)、2007~2008季節性株(Bris_59_07)、および「ブタインフルエンザ」株(Cal_04_09)由来のインフルエンザH1N1 HAの配列アラインメントを示す図面である。AAichi_9_09(配列番号40)=A/アイチ/9/2009; ABris_59_07(配列番号41)=A/ブリズベーン/59/2007; ACal_04_09(配列番号42)=A/カリフォルニア/04/2009。2-6結合に直接または間接的に関与する残基を灰色で強調している。図4(C)は、1918年パンデミック(SC_1_18)、1930ブタ単離体(SwIA_15_30)、および「ブタインフルエンザ」株(Cal_04_09)由来のインフルエンザH1N1 HAの配列アラインメントを示す図面である。SC_1_18(配列番号43)=A/サウスカロライナ/1/1918; SwIA_15_30(配列番号44)=A/ブタ/IA/15/1930; ACal_04_09(配列番号45)=A/カリフォルニア/04/2009。2-6結合に直接または間接的に関与する残基を灰色で強調している。

30

【図4A-2】図4(A)は、ヒト適合HA(SC_1_18、SolIs_3_06、Bris_50_07)と並記した2009A/H1N1 HA(CA_04_09)ならびにその変異形態(Mut_1)およびMut_2)の配列アラインメントを示す図面である。灰色で強調した残基は、2-6結合に直接または間接的に寄与する。赤色で示した残基は、2009A/H1N1 HA(CA_04_09)と比較してヒト結合および/または感染性が增強されたH1N1バリエーション中で変化した残基である。

40

【0015】

【化2】

CA_04_09 (配列番号:34). CA_04_09_Mut1 (配列番号:35). CA_04_09_Mut2 (配列番号:36). SC_1_18 (配列番号:37). SolIs_3_06 (配列番号:38). Bris_59_07 (配列番号:39).

図4(B)は、2009季節性株(アイチ_9_09)、2007~2008季節性株(

50

Bris_59_07)、および「ブタインフルエンザ」株(Cal_04_09)由来のインフルエンザH1N1 HAの配列アラインメントを示す図面である。A A i c h i_9_09(配列番号40) = A / アイチ / 9 / 2009; A B r i s_59_07(配列番号41) = A / プリズベーン / 59 / 2007; A C a l_04_09(配列番号42) = A / カリフォルニア / 04 / 2009。2 - 6結合に直接または間接的に関与する残基を灰色で強調している。図4(C)は、1918年パンデミック(SC_1_18)、1930ブタ単離体(SwIA_15_30)、および「ブタインフルエンザ」株(Cal_04_09)由来のインフルエンザH1N1 HAの配列アラインメントを示す図面である。SC_1_18(配列番号43) = A / サウスカロライナ / 1 / 1918; SwIA_15_30(配列番号44) = A / ブタ / IA / 15 / 1930; A C a l_04_09(配列番号45) = A / カリフォルニア / 04 / 2009。2 - 6結合に直接または間接的に関与する残基を灰色で強調している。

10

【図4B】図4(A)は、ヒト適合HA(SC_1_18、SolIs_3_06、Bris_50_07)と並記した2009A/H1N1 HA(CA_04_09)ならびにその変異形態(Mut_1)およびMut_2)の配列アラインメントを示す図面である。灰色で強調した残基は、2 - 6結合に直接または間接的に寄与する。赤色で示した残基は、2009A/H1N1 HA(CA_04_09)と比較してヒト結合および/または感染性が増強されたH1N1バリエーション中で変化した残基である。

【0016】

【化2】

20

CA_04_09(配列番号:34). CA_04_09_Mut1(配列番号:35). CA_04_09_Mut2(配列番号:36). SC_1_18(配列番号:37). SolIs_3_06(配列番号:38). Bris_59_07(配列番号:39).

図4(B)は、2009季節性株(アイチ_9_09)、2007~2008季節性株(Bris_59_07)、および「ブタインフルエンザ」株(Cal_04_09)由来のインフルエンザH1N1 HAの配列アラインメントを示す図面である。A A i c h i_9_09(配列番号40) = A / アイチ / 9 / 2009; A B r i s_59_07(配列番号41) = A / プリズベーン / 59 / 2007; A C a l_04_09(配列番号42) = A / カリフォルニア / 04 / 2009。2 - 6結合に直接または間接的に関与する残基を灰色で強調している。図4(C)は、1918年パンデミック(SC_1_18)、1930ブタ単離体(SwIA_15_30)、および「ブタインフルエンザ」株(Cal_04_09)由来のインフルエンザH1N1 HAの配列アラインメントを示す図面である。SC_1_18(配列番号43) = A / サウスカロライナ / 1 / 1918; SwIA_15_30(配列番号44) = A / ブタ / IA / 15 / 1930; A C a l_04_09(配列番号45) = A / カリフォルニア / 04 / 2009。2 - 6結合に直接または間接的に関与する残基を灰色で強調している。

30

【図4C】図4(A)は、ヒト適合HA(SC_1_18、SolIs_3_06、Bris_50_07)と並記した2009A/H1N1 HA(CA_04_09)ならびにその変異形態(Mut_1)およびMut_2)の配列アラインメントを示す図面である。灰色で強調した残基は、2 - 6結合に直接または間接的に寄与する。赤色で示した残基は、2009A/H1N1 HA(CA_04_09)と比較してヒト結合および/または感染性が増強されたH1N1バリエーション中で変化した残基である。

40

【0017】

【化2】

CA_04_09(配列番号:34). CA_04_09_Mut1(配列番号:35). CA_04_09_Mut2(配列番号:36). SC_1_18(配列番号:37). SolIs_3_06(配列番号:38). Bris_59_07(配列番号:39).

図4(B)は、2009季節性株(アイチ_9_09)、2007~2008季節性株(

50

B r i s _ 5 9 _ 0 7)、および「ブタインフルエンザ」株 (C a l _ 0 4 _ 0 9) 由来のインフルエンザ H 1 N 1 H A の配列アラインメントを示す図面である。 A A i c h i _ 9 _ 0 9 (配列番号 4 0) = A / アイチ / 9 / 2 0 0 9 ; A B r i s _ 5 9 _ 0 7 (配列番号 4 1) = A / プリズベーン / 5 9 / 2 0 0 7 ; A C a l _ 0 4 _ 0 9 (配列番号 4 2) = A / カリフォルニア / 0 4 / 2 0 0 9 。 2 - 6 結合に直接または間接的に関与する残基を灰色で強調している。図 4 (C) は、1 9 1 8 年パンデミック (S C _ 1 _ 1 8)、1 9 3 0 年ブタ単離体 (S w I A _ 1 5 _ 3 0)、および「ブタインフルエンザ」株 (C a l _ 0 4 _ 0 9) 由来のインフルエンザ H 1 N 1 H A の配列アラインメントを示す図面である。 S C _ 1 _ 1 8 (配列番号 4 3) = A / サウスカロライナ / 1 / 1 9 1 8 ; S w I A _ 1 5 _ 3 0 (配列番号 4 4) = A / ブタ / I A / 1 5 / 1 9 3 0 ; A C a l _ 0 4 _ 0 9 (配列番号 4 5) = A / カリフォルニア / 0 4 / 2 0 0 9 。 2 - 6 結合に直接または間接的に関与する残基を灰色で強調している。

【図 5 A】図 5 は、グリカン受容体の特異性を理解するためのフレームワークを示す図面である。 2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンは、異なるトポロジーを採用することができる。本発明によれば、H A ポリペプチドが一定のこれらのトポロジーに結合する能力は、H A ポリペプチドに異なる宿主 (例えば、ヒト) の感染を媒介する能力を付与する。この図のパネル A に示すように、本発明は、2 つの特に関連するトポロジー (「コーン」トポロジーおよび「アンブレラ」トポロジー) を定義する。コーントポロジーは 2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンが採用することができ、コアに結合した短鎖オリゴサッカリドまたは分岐オリゴサッカリドの典型である (それにもかかわらず、このトポロジーは一定の長鎖オリゴサッカリドが採用することができる)。アンブレラトポロジーは、2 - 6 結合グリカンが唯一採用することができ (おそらく、2 - 6 結合中に存在する余剰の C 5 - C 6 結合によって付与される高次構造の複数性の増加に起因する)、長鎖オリゴサッカリドまたは長鎖オリゴサッカリド分岐 (特にモチーフ N e u 5 A c 2 - 6 G a l 1 - 3 / 4 G l c N A c - を含む) を有する分岐グリカンが主に採用する。本明細書中に記載のように、H A ポリペプチドがアンブレラグリカントポロジーに結合する能力により、ヒト受容体への結合および / またはヒト感染を媒介する能力が付与される。この図のパネル B は、トリサッカリドモチーフ N e u 5 A c 2 - 3 G a l 1 - 3 / 4 G l c N A c および N e u 5 A c 2 - 6 G a l 1 - 4 G l c N A c のそれぞれのグリコシドねじれ角によって支配される 2 - 3 および 2 - 6 のトポロジーを詳細に示す。パラメータ () - トポロジーを特徴付けるためにこれらのトリサッカリドモチーフ中の N e u 5 A c の C 2 原子とそれに次ぐ G a l 糖および G l c N A c 糖の C 1 原子との間の角度を定義した。2 - 3 および 2 - 6 モチーフの輪郭と高次構造マップの重ね合わせは、2 - 3 モチーフが 1 0 0 % コーン様トポロジーを採用し、2 - 6 モチーフがコーン様およびアンブレラ様トポロジーの両方をサンプリングしたことを示す (パネル C)。2 - 3 および 2 - 6 によってサンプリングされたコーン様トポロジーでは、G l c N A c およびそれに次ぐ糖は、コーンに及ぶ領域に沿って存在する。H A のコーン様トポロジーとの相互作用は、主に付番した位置 (H 3 H A 付番に基づく) のアミノ酸の N e u 5 A c および G a l 糖との接触に関与する。他方では、2 - 6 に固有のアンブレラ様トポロジーでは、\ G l c N A c およびそれに次ぐ糖は H A 結合部位に向かって曲がっている (H A - 2 - 6 共結晶構造で認められるように)。より長い 2 - 6 オリゴサッカリド (例えば、少なくともテトラサッカリド) は、G l c N A c および N e u 5 A c のアセチル基の間の糖内ファンデルワールス接触によって安定化されるので、この高次構造を好むであろう。アンブレラ様トポロジーとの H A 相互作用は、N e u 5 A c および G a l 糖との接触に加えて、付番した位置 (H 3 H A 付番に基づく) のアミノ酸の G l c N A c およびそれに次ぐ糖との接触を含む。この図のパネル C は、2 - 3 および 2 - 6 によるコーン様およびアンブレラ様トポロジーの高次構造サンプリングを示す。セクション (A) ~ (D) は、それぞれ、N e u 5 A c 2 - 3 G a l 結合、N e u 5 A c 2 - 6 G a l 結合、G a l 1 - 3 G l c N A c 結合、および G a l 1 - 4 G l c N A c 結合の高次構造 (、) マップを示す。G l y c o M a p s D B (h t t p : /

10

20

30

40

50

/www.glycosciences.de/modeling/glycomapsdb/)から入手したこれらのマップを、MM3力場を使用したアブイニシオMDシミュレーションを使用して作成した。エネルギー分布を、赤(最高エネルギーを示す)から最低エネルギーを示す緑色までに色分けしている。囲った領域1~5は、HA-グリカン共結晶構造中の2-3および2-6オリゴサッカリドについて認められた()値を示す。この高次構造がゴーシュである2-3を有するA/アイチ/2/68 H3N2 HAの共結晶構造(富化領域2)を除いて、HA結合ポケット中でNeu5Ac2-3Galのトランス型の高次構造(富化領域1)が優勢である。他方では、HA結合ポケット中でNeu5Ac2-6Galのシス型高次構造(富化領域3)が優勢である。コーン様トポロジ-は富化領域1および2によってサンプリングされ、アンブレラ様トポロジ-は富化領域3によってサンプリングされる。セクション(E)~(F)は、それぞれ2-3モチーフおよび2-6モチーフによるコーン様およびアンブレラ様トポロジ-のサンプリングを示す。高次構造マップ中の赤色で標識した領域を、所与の値の組()についてのパラメータ(Neu5AcのC2原子とそれに次ぐGalおよびGlcNAc糖のC1原子との間の角度)を計算するための外側境界として使用した。エネルギーカットオフに基づいて、 $>110^\circ$ の値を使用してコーン様トポロジ-を特徴付け、 $<100^\circ$ を使用してアンブレラ様トポロジ-を特徴付けた。輪郭の高次構造エネルギーマップとの重ね合わせは、アンブレラ様トポロジ-を採用することがエネルギー的に不利であったので、2-3モチーフが100%コーン様トポロジ-を採用することを示した。他方では、2-6モチーフはコーン様およびアンブレラ様トポロジ-の両方をサンプリングし、このサンプリングを、Neu5Ac2-6Gal結合の角(O-C6-C5-H5)に基づいて分類した。

【図5B-1】図5は、グリカン受容体の特異性を理解するためのフレームワークを示す図面である。2-3-および/または2-6結合グリカンは、異なるトポロジ-を採用することができる。本発明によれば、HAポリペプチドが一定のこれらのトポロジ-に結合する能力は、HAポリペプチドに異なる宿主(例えば、ヒト)の感染を媒介する能力を付与する。この図のパネルAに示すように、本発明は、2つの特に関連するトポロジ-('コーン'トポロジ-および'アンブレラ'トポロジ-)を定義する。コーントポロジ-は2-3-および/または2-6結合グリカンが採用することができ、コアに結合した短鎖オリゴサッカリドまたは分岐オリゴサッカリドの典型である(それにもかかわらず、このトポロジ-は一定の長鎖オリゴサッカリドが採用することができる)。アンブレラトポロジ-は、2-6結合グリカンが唯一採用することができ(おそらく、2-6結合中に存在する余剰のC5-C6結合によって付与される高次構造の複数性の増加に起因する)、長鎖オリゴサッカリドまたは長鎖オリゴサッカリド分岐(特にモチーフNeu5Ac2-6Gal1-3/4GlcNAc-を含む)を有する分岐グリカンが主に採用する。本明細書中に記載のように、HAポリペプチドがアンブレラグリカントポロジ-に結合する能力により、ヒト受容体への結合および/またはヒト感染を媒介する能力が付与される。この図のパネルBは、トリサッカリドモチーフNeu5Ac2-3Gal1-3/4GlcNAcおよびNeu5Ac2-6Gal1-4GlcNAcのそれぞれのグリコシドねじれ角によって支配される2-3および2-6のトポロジ-を詳細に示す。パラメータ()-トポロジ-を特徴付けるためにこれらのトリサッカリドモチーフ中のNeu5AcのC2原子とそれに次ぐGal糖およびGlcNAc糖のC1原子との間の角度を定義した。2-3および2-6モチーフの輪郭と高次構造マップの重ね合わせは、2-3モチーフが100%コーン様トポロジ-を採用し、2-6モチーフがコーン様およびアンブレラ様トポロジ-の両方をサンプリングしたことを示す(パネルC)。2-3および2-6によってサンプリングされたコーン様トポロジ-では、GlcNAcおよびそれに次ぐ糖は、コーンに及ぶ領域に沿って存在する。HAのコーン様トポロジ-との相互作用は、主に付番した位置(H3 HA付番に基づく)のアミノ酸のNeu5AcおよびGal糖との接触に關与する。他方では、2-6に固有のアンブレラ様トポロジ-では、GlcNAcおよびそれに次ぐ糖はHA結合部位に向か

10

20

30

40

50

って曲がっている (HA - 2 - 6 共結晶構造で認められるように)。より長い 2 - 6 オリゴサッカリド (例えば、少なくともテトラサッカリド) は、GlcNAc および Neu5Ac のアセチル基の間の糖内ファンデルワールス接触によって安定化されるので、この高次構造を好むであろう。アンブレラ様トポロジ- との HA 相互作用は、Neu5Ac および Gal 糖との接触に加えて、付番した位置 (H3 HA 付番に基づく) のアミノ酸の GlcNAc およびそれに次ぐ糖との接触を含む。この図のパネル C は、2 - 3 および 2 - 6 によるコーン様およびアンブレラ様トポロジ- の高次構造サンプリングを示す。セクション (A) ~ (D) は、それぞれ、Neu5Ac 2 - 3 Gal 結合、Neu5Ac 2 - 6 Gal 結合、Gal 1 - 3 GlcNAc 結合、および Gal 1 - 4 GlcNAc 結合の高次構造 (、) マップを示す。GlycoMaps DB (<http://www.glycosciences.de/modeling/glycomapsdb/>) から入手したこれらのマップを、MM3 力場を使用したアブイニシオ MD シミュレーションを使用して作成した。エネルギー分布を、赤 (最高エネルギーを示す) から最低エネルギーを示す緑色までに色分けしている。囲った領域 1 ~ 5 は、HA - グリカン共結晶構造中の 2 - 3 および 2 - 6 オリゴサッカリドについて認められた (、) 値を示す。この高次構造がゴーシュである 2 - 3 を有する A / アイチ / 2 / 68 H3N2 HA の共結晶構造 (富化領域 2) を除いて、HA 結合ポケット中で Neu5Ac 2 - 3 Gal のトランス型の高次構造 (富化領域 1) が優勢である。他方では、HA 結合ポケット中で Neu5Ac 2 - 6 Gal のシス型高次構造 (富化領域 3) が優勢である。コーン様トポロジ- は富化領域 1 および 2 によってサンプリングされ、アンブレラ様トポロジ- は富化領域 3 によってサンプリングされる。セクション (E) ~ (F) は、それぞれ 2 - 3 モチーフおよび 2 - 6 モチーフによるコーン様およびアンブレラ様トポロジ- のサンプリングを示す。高次構造マップ中の赤色で標識した領域を、所与の値の組 (、) についての パラメータ (Neu5Ac の C2 原子とそれに次ぐ Gal および GlcNAc 糖の C1 原子との間の角度) を計算するための外側境界として使用した。エネルギーカットオフに基づいて、 $> 110^\circ$ の値を使用してコーン様トポロジ- を特徴付け、 $< 100^\circ$ を使用してアンブレラ様トポロジ- を特徴付けた。輪郭の高次構造エネルギーマップとの重ね合わせは、アンブレラ様トポロジ- を採用することがエネルギー的に不利であったので、2 - 3 モチーフが 100% コーン様トポロジ- を採用することを示した。他方では、2 - 6 モチーフはコーン様およびアンブレラ様トポロジ- の両方をサンプリングし、このサンプリングを、Neu5Ac 2 - 6 Gal 結合の 角 (O - C6 - C5 - H5) に基づいて分類した。

【図 5 B - 2】図 5 は、グリカン受容体の特異性を理解するためのフレームワークを示す図面である。2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンは、異なるトポロジ- を採用することができる。本発明によれば、HA ポリペプチドが一定のこれらのトポロジ- に結合する能力は、HA ポリペプチドに異なる宿主 (例えば、ヒト) の感染を媒介する能力を付与する。この図のパネル A に示すように、本発明は、2 つの特に関連するトポロジ- (「コーン」トポロジ- および「アンブレラ」トポロジ-) を定義する。コーントポロジ- は 2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンが採用することができ、コアに結合した短鎖オリゴサッカリドまたは分岐オリゴサッカリドの典型である (それにもかかわらず、このトポロジ- は一定の長鎖オリゴサッカリドが採用することができる)。アンブレラトポロジ- は、2 - 6 結合グリカンが唯一採用することができ (おそらく、2 - 6 結合中に存在する余剰の C5 - C6 結合によって付与される高次構造の複数性の増加に起因する)、長鎖オリゴサッカリドまたは長鎖オリゴサッカリド分岐 (特にモチーフ Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 3 / 4 GlcNAc - を含む) を有する分岐グリカンが主に採用する。本明細書中に記載のように、HA ポリペプチドがアンブレラグリカントポロジ- に結合する能力により、ヒト受容体への結合および / またはヒト感染を媒介する能力が付与される。この図のパネル B は、トリサッカリドモチーフ Neu5Ac 2 - 3 Gal 1 - 3 / 4 GlcNAc および Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 4 GlcNAc のそれぞれのグリコシドねじれ角によって支配される 2 - 3 および 2 - 6 のトポロジ- を

10

20

30

40

50

詳細に示す。パラメータ() - トポロジ-を特徴付けるためにこれらのトリサッカリドモチーフ中の Neu5Ac の C2 原子とそれに次ぐ Gal 糖および GlcNAc 糖の C1 原子との間の角度を定義した。 2 - 3 および 2 - 6 モチ-フの 輪郭と高次構造マップの重ね合わせは、 2 - 3 モチ-フが 100% コーン様トポロジ-を採用し、 2 - 6 モチ-フがコーン様およびアンブレラ様トポロジ-の両方をサンプリングしたことを示す(パネルC)。 2 - 3 および 2 - 6 によってサンプリングされたコーン様トポロジ-では、GlcNAc およびそれに次ぐ糖は、コーンに及ぶ領域に沿って存在する。HA のコーン様トポロジ-との相互作用は、主に付番した位置(H3 HA付番に基づく)のアミノ酸の Neu5Ac および Gal 糖との接触に参与する。他方では、 2 - 6 に固有のアンブレラ様トポロジ-では、\ GlcNAc およびそれに次ぐ糖は HA 結合部位に向かって曲がっている(HA - 2 - 6 共結晶構造で認められるように)。より長い 2 - 6 オリゴサッカリド(例えば、少なくともテトラサッカリド)は、GlcNAc および Neu5Ac のアセチル基の間の糖内ファンデルワールス接触によって安定化されるので、この高次構造を好むであろう。アンブレラ様トポロジ-との HA 相互作用は、Neu5Ac および Gal 糖との接触に加えて、付番した位置(H3 HA付番に基づく)のアミノ酸の GlcNAc およびそれに次ぐ糖との接触を含む。この図のパネルCは、 2 - 3 および 2 - 6 によるコーン様およびアンブレラ様トポロジ-の高次構造サンプリングを示す。セクション(A) ~ (D)は、それぞれ、Neu5Ac 2 - 3 Gal 結合、Neu5Ac 2 - 6 Gal 結合、Gal 1 - 3 GlcNAc 結合、および Gal 1 - 4 GlcNAc 結合の高次構造(、)マップを示す。GlycoMaps DB(<http://www.glycosciences.de/modeling/glycomapsdb/>)から入手したこれらのマップを、MM3力場を使用したアブイニシオMDシミュレーションを使用して作成した。エネルギー分布を、赤(最高エネルギーを示す)から最低エネルギーを示す緑色までに色分けしている。囲った領域1~5は、HA - グリカン共結晶構造中の 2 - 3 および 2 - 6 オリゴサッカリドについて認められた(、)値を示す。この高次構造がゴーシュである 2 - 3 を有する A / アイチ / 2 / 6 8 H 3 N 2 HA の共結晶構造(富化領域2)を除いて、HA 結合ポケット中で Neu5Ac 2 - 3 Gal のトランス型の高次構造(富化領域1)が優勢である。他方では、HA 結合ポケット中で Neu5Ac 2 - 6 Gal のシス型高次構造(富化領域3)が優勢である。コーン様トポロジ-は富化領域1および2によってサンプリングされ、アンブレラ様トポロジ-は富化領域3によってサンプリングされる。セクション(E) ~ (F)は、それぞれ 2 - 3 モチ-フおよび 2 - 6 モチ-フによるコーン様およびアンブレラ様トポロジ-のサンプリングを示す。高次構造マップ中の赤色で標識した領域を、所与の値の組(、)についての パラメータ(Neu5Ac の C2 原子とそれに次ぐ Gal および GlcNAc 糖の C1 原子との間の角度)を計算するための外側境界として使用した。エネルギーカットオフに基づいて、> 110° の値を使用してコーン様トポロジ-を特徴付け、< 100° を使用してアンブレラ様トポロジ-を特徴付けた。輪郭の高次構造エネルギーマップとの重ね合わせは、アンブレラ様トポロジ-を採用することがエネルギー的に不利であったので、 2 - 3 モチ-フが 100% コーン様トポロジ-を採用することを示した。他方では、 2 - 6 モチ-フはコーン様およびアンブレラ様トポロジ-の両方をサンプリングし、このサンプリングを、Neu5Ac 2 - 6 Gal 結合の 角(O - C6 - C5 - H5)に基づいて分類した。

【図5C - 1】図5は、グリカン受容体の特異性を理解するためのフレームワークを示す図面である。 2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンは、異なるトポロジ-を採用することができる。本発明によれば、HAポリペプチドが一定のこれらのトポロジ-に結合する能力は、HAポリペプチドに異なる宿主(例えば、ヒト)の感染を媒介する能力を付与する。この図のパネルAに示すように、本発明は、2つの特に関連するトポロジ-('コーン'トポロジ-および'アンブレラ'トポロジ-)を定義する。コーントポロジ-は 2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンが採用することができ、コアに結合した短鎖オリゴサッカリドまたは分岐オリゴサッカリドの典型である(それにもかかわら

10

20

30

40

50

ず、このトポロジーは一定の長鎖オリゴサッカリドが採用することができる)。アンブレラトポロジーは、2-6結合グリカンが唯一採用することができ(おそらく、2-6結合中に存在する余剰のC5-C6結合によって付与される高次構造の複数性の増加に起因する)、長鎖オリゴサッカリドまたは長鎖オリゴサッカリド分岐(特にモチーフNeu5Ac 2-6Gal 1-3/4GlcNAc-を含む)を有する分岐グリカンが主に採用する。本明細書中に記載のように、HAポリペプチドがアンブレラグリカントポロジーに結合する能力により、ヒト受容体への結合および/またはヒト感染を媒介する能力が付与される。この図のパネルBは、トリサッカリドモチーフNeu5Ac 2-3Gal 1-3/4GlcNAcおよびNeu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAcのそれぞれのグリコシドねじれ角によって支配される2-3および2-6のトポロジーを詳細に示す。パラメータ()-トポロジーを特徴付けるためにこれらのトリサッカリドモチーフ中のNeu5AcのC2原子とそれに次ぐGal糖およびGlcNAc糖のC1原子との間の角度を定義した。2-3および2-6モチーフの輪郭と高次構造マップの重ね合わせは、2-3モチーフが100%コーン様トポロジーを採用し、2-6モチーフがコーン様およびアンブレラ様トポロジーの両方をサンプリングしたことを示す(パネルC)。2-3および2-6によってサンプリングされたコーン様トポロジーでは、GlcNAcおよびそれに次ぐ糖は、コーンに及ぶ領域に沿って存在する。HAのコーン様トポロジーとの相互作用は、主に付番した位置(H3 HA付番に基づく)のアミノ酸のNeu5AcおよびGal糖との接触に関与する。他方では、2-6に固有のアンブレラ様トポロジーでは、GlcNAcおよびそれに次ぐ糖はHA結合部位に向かって曲がっている(HA-2-6共結晶構造で認められるように)。より長い2-6オリゴサッカリド(例えば、少なくともテトラサッカリド)は、GlcNAcおよびNeu5Acのアセチル基の間の糖内ファンデルワールス接触によって安定化されるので、この高次構造を好むであろう。アンブレラ様トポロジーとのHA相互作用は、Neu5AcおよびGal糖との接触に加えて、付番した位置(H3 HA付番に基づく)のアミノ酸のGlcNAcおよびそれに次ぐ糖との接触を含む。この図のパネルCは、2-3および2-6によるコーン様およびアンブレラ様トポロジーの高次構造サンプリングを示す。セクション(A)~(D)は、それぞれ、Neu5Ac 2-3Gal結合、Neu5Ac 2-6Gal結合、Gal 1-3GlcNAc結合、およびGal 1-4GlcNAc結合の高次構造(、)マップを示す。GlycoMaps DB(<http://www.glycosciences.de/modeling/glycomapsdb/>)から入手したこれらのマップを、MM3力場を使用したアブイニシオMDシミュレーションを使用して作成した。エネルギー分布を、赤(最高エネルギーを示す)から最低エネルギーを示す緑色までに色分けしている。囲った領域1~5は、HA-グリカン共結晶構造中の2-3および2-6オリゴサッカリドについて認められた(、)値を示す。この高次構造がゴーシュである2-3を有するA/アイチ/2/68 H3N2 HAの共結晶構造(富化領域2)を除いて、HA結合ポケット中でNeu5Ac 2-3Galのトランス型の高次構造(富化領域1)が優勢である。他方では、HA結合ポケット中でNeu5Ac 2-6Galのシス型高次構造(富化領域3)が優勢である。コーン様トポロジーは富化領域1および2によってサンプリングされ、アンブレラ様トポロジーは富化領域3によってサンプリングされる。セクション(E)~(F)は、それぞれ2-3モチーフおよび2-6モチーフによるコーン様およびアンブレラ様トポロジーのサンプリングを示す。高次構造マップ中の赤色で標識した領域を、所与の値の組(、)についてのパラメータ(Neu5AcのC2原子とそれに次ぐGalおよびGlcNAc糖のC1原子との間の角度)を計算するための外側境界として使用した。エネルギーカットオフに基づいて、 $> 110^\circ$ の値を使用してコーン様トポロジーを特徴付け、 $< 100^\circ$ を使用してアンブレラ様トポロジーを特徴付けた。輪郭の高次構造エネルギーマップとの重ね合わせは、アンブレラ様トポロジーを採用することがエネルギー的に不利であったので、2-3モチーフが100%コーン様トポロジーを採用することを示した。他方では、2-6モチーフはコーン様およびアンブレラ様トポロジーの両

方をサンプリングし、このサンプリングを、Neu5Ac 2-6Gal 結合の角 (O-C6-C5-H5) に基づいて分類した。

【図5C-2】図5は、グリカン受容体の特異性を理解するためのフレームワークを示す図面である。2-3-および/または2-6結合グリカンは、異なるトポロジを採用することができる。本発明によれば、HAポリペプチドが一定のこれらのトポロジに結合する能力は、HAポリペプチドに異なる宿主(例えば、ヒト)の感染を媒介する能力を付与する。この図のパネルAに示すように、本発明は、2つの特に関連するトポロジ(「コーン」トポロジおよび「アンブレラ」トポロジ)を定義する。コーントポロジは2-3-および/または2-6結合グリカンが採用することができ、コアに結合した短鎖オリゴサッカリドまたは分岐オリゴサッカリドの典型である(それにもかかわらず、このトポロジは一定の長鎖オリゴサッカリドが採用することができる)。アンブレラトポロジは、2-6結合グリカンが唯一採用することができ(おそらく、2-6結合中に存在する余剰のC5-C6結合によって付与される高次構造の複数性の増加に起因する)、長鎖オリゴサッカリドまたは長鎖オリゴサッカリド分岐(特にモチーフNeu5Ac 2-6Gal 1-3/4GlcNAc-を含む)を有する分岐グリカンが主に採用する。本明細書中に記載のように、HAポリペプチドがアンブレラグリカントポロジに結合する能力により、ヒト受容体への結合および/またはヒト感染を媒介する能力が付与される。この図のパネルBは、トリサッカリドモチーフNeu5Ac 2-3Gal 1-3/4GlcNAcおよびNeu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAcのそれぞれのグリコシドねじれ角によって支配される2-3および2-6のトポロジを詳細に示す。パラメータ()-トポロジを特徴付けるためにこれらのトリサッカリドモチーフ中のNeu5AcのC2原子とそれに次ぐGal糖およびGlcNAc糖のC1原子との間の角度を定義した。2-3および2-6モチーフの輪郭と高次構造マップの重ね合わせは、2-3モチーフが100%コーン様トポロジを採用し、2-6モチーフがコーン様およびアンブレラ様トポロジの両方をサンプリングしたことを示す(パネルC)。2-3および2-6によってサンプリングされたコーン様トポロジでは、GlcNAcおよびそれに次ぐ糖は、コーンに及ぶ領域に沿って存在する。HAのコーン様トポロジとの相互作用は、主に付番した位置(H3-HA付番に基づく)のアミノ酸のNeu5AcおよびGal糖との接触に関与する。他方では、2-6に固有のアンブレラ様トポロジでは、GlcNAcおよびそれに次ぐ糖はHA結合部位に向かって曲がっている(HA-2-6共結晶構造で認められるように)。より長い2-6オリゴサッカリド(例えば、少なくともテトラサッカリド)は、GlcNAcおよびNeu5Acのアセチル基の間の糖内ファンデルワールス接触によって安定化されるので、この高次構造を好むであろう。アンブレラ様トポロジとのHA相互作用は、Neu5AcおよびGal糖との接触に加えて、付番した位置(H3-HA付番に基づく)のアミノ酸のGlcNAcおよびそれに次ぐ糖との接触を含む。この図のパネルCは、2-3および2-6によるコーン様およびアンブレラ様トポロジの高次構造サンプリングを示す。セクション(A)~(D)は、それぞれ、Neu5Ac 2-3Gal 結合、Neu5Ac 2-6Gal 結合、Gal 1-3GlcNAc 結合、およびGal 1-4GlcNAc 結合の高次構造()マップを示す。GlycoMaps DB(<http://www.glycosciences.de/modeling/glycomapsdb/>)から入手したこれらのマップを、MM3力場を使用したアブイニシオMDシミュレーションを使用して作成した。エネルギー分布を、赤(最高エネルギーを示す)から最低エネルギーを示す緑色までに色分けしている。囲った領域1~5は、HA-グリカン共結晶構造中の2-3および2-6オリゴサッカリドについて認められた()値を示す。この高次構造がゴーシュである2-3を有するA/アイチ/2/68 H3N2 HAの共結晶構造(富化領域2)を除いて、HA結合ポケット中でNeu5Ac 2-3Galのトランス型の高次構造(富化領域1)が優勢である。他方では、HA結合ポケット中でNeu5Ac 2-6Galのシス型高次構造(富化領域3)が優勢である。コーン様トポロジは富化領域1および2によってサンプリングされ、アンブレラ様

10

20

30

40

50

トポロジーは富化領域 3 によってサンプリングされる。セクション (E) ~ (F) は、それぞれ 2 - 3 モチーフおよび 2 - 6 モチーフによるコーン様およびアンブレラ様トポロジーのサンプリングを示す。高次構造マップ中の赤色で標識した領域を、所与の値の組 (θ , ϕ) についてのパラメータ (Neu5Ac の C2 原子とそれに次ぐ Gal および GlcNAc 糖の C1 原子との間の角度) を計算するための外側境界として使用した。エネルギーカットオフに基づいて、 $\theta > 110^\circ$ の値を使用してコーン様トポロジーを特徴付け、 $\theta < 100^\circ$ を使用してアンブレラ様トポロジーを特徴付けた。輪郭の高次構造エネルギーマップとの重ね合わせは、アンブレラ様トポロジーを採用することがエネルギー的に不利であったので、2 - 3 モチーフが 100% コーン様トポロジーを採用することを示した。他方では、2 - 6 モチーフはコーン様およびアンブレラ様トポロジーの両方をサンプリングし、このサンプリングを、Neu5Ac 2 - 6 Gal 結合の角 (O - C6 - C5 - H5) に基づいて分類した。

【図 5 C - 3】図 5 は、グリカン受容体の特異性を理解するためのフレームワークを示す図面である。2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンは、異なるトポロジーを採用することができる。本発明によれば、HA ポリペプチドが一定のこれらのトポロジーに結合する能力は、HA ポリペプチドに異なる宿主 (例えば、ヒト) の感染を媒介する能力を付与する。この図のパネル A に示すように、本発明は、2 つの特に関連するトポロジー (「コーン」トポロジーおよび「アンブレラ」トポロジー) を定義する。コーントポロジーは 2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンが採用することができ、コアに結合した短鎖オリゴサッカリドまたは分岐オリゴサッカリドの典型である (それにもかかわらず、このトポロジーは一定の長鎖オリゴサッカリドが採用することができる)。アンブレラトポロジーは、2 - 6 結合グリカンが唯一採用することができ (おそらく、2 - 6 結合中に存在する余剰の C5 - C6 結合によって付与される高次構造の複数性の増加に起因する)、長鎖オリゴサッカリドまたは長鎖オリゴサッカリド分岐 (特にモチーフ Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 3 / 4 GlcNAc - を含む) を有する分岐グリカンが主に採用する。本明細書中に記載のように、HA ポリペプチドがアンブレラグリカントポロジーに結合する能力により、ヒト受容体への結合および / またはヒト感染を媒介する能力が付与される。この図のパネル B は、トリサッカリドモチーフ Neu5Ac 2 - 3 Gal 1 - 3 / 4 GlcNAc および Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 4 GlcNAc のそれぞれのグリコシドねじれ角によって支配される 2 - 3 および 2 - 6 のトポロジーを詳細に示す。パラメータ (θ , ϕ) - トポロジーを特徴付けるためにこれらのトリサッカリドモチーフ中の Neu5Ac の C2 原子とそれに次ぐ Gal 糖および GlcNAc 糖の C1 原子との間の角度を定義した。2 - 3 および 2 - 6 モチーフの輪郭と高次構造マップの重ね合わせは、2 - 3 モチーフが 100% コーン様トポロジーを採用し、2 - 6 モチーフがコーン様およびアンブレラ様トポロジーの両方をサンプリングしたことを示す (パネル C)。2 - 3 および 2 - 6 によってサンプリングされたコーン様トポロジーでは、GlcNAc およびそれに次ぐ糖は、コーンに及ぶ領域に沿って存在する。HA のコーン様トポロジーとの相互作用は、主に付番した位置 (H3 HA 付番に基づく) のアミノ酸の Neu5Ac および Gal 糖との接触に關与する。他方では、2 - 6 に固有のアンブレラ様トポロジーでは、GlcNAc およびそれに次ぐ糖は HA 結合部位に向かって曲がっている (HA - 2 - 6 共結晶構造で認められるように)。より長い 2 - 6 オリゴサッカリド (例えば、少なくともテトラサッカリド) は、GlcNAc および Neu5Ac のアセチル基の間の糖内ファンデルワールス接触によって安定化されるので、この高次構造を好むであろう。アンブレラ様トポロジーとの HA 相互作用は、Neu5Ac および Gal 糖との接触に加えて、付番した位置 (H3 HA 付番に基づく) のアミノ酸の GlcNAc およびそれに次ぐ糖との接触を含む。この図のパネル C は、2 - 3 および 2 - 6 によるコーン様およびアンブレラ様トポロジーの高次構造サンプリングを示す。セクション (A) ~ (D) は、それぞれ、Neu5Ac 2 - 3 Gal 結合、Neu5Ac 2 - 6 Gal 結合、Gal 1 - 3 GlcNAc 結合、および Gal 1 - 4 GlcNAc 結合の高次構造 (θ , ϕ) マップを示す。GlycoMaps DB (<http://glycomaps.org/>)

10

20

30

40

50

: / / www . glycosciences . de / modeling / glycoma
 psdb /) から入手したこれらのマップを、MM3力場を使用したアブイニシオMDシ
 ミュレーションを使用して作成した。エネルギー分布を、赤(最高エネルギーを示す)か
 ら最低エネルギーを示す緑色までに色分けしている。囲った領域1~5は、HA-グリカ
 ン共結晶構造中の2-3および2-6オリゴサッカリドについて認められた(、
) 値を示す。この高次構造がゴーシュである2-3を有するA/アイチ/2/68 H
 3 N 2 HAの共結晶構造(富化領域2)を除いて、HA結合ポケット中でNeu5Ac
 2-3Galのトランス型の高次構造(富化領域1)が優勢である。他方では、HA結
 合ポケット中でNeu5Ac 2-6Galのシス型高次構造(富化領域3)が優勢である。10
 コーン様トポロジ-は富化領域1および2によってサンプリングされ、アンブレラ様
 トポロジ-は富化領域3によってサンプリングされる。セクション(E)~(F)は、そ
 れぞれ2-3モチーフおよび2-6モチーフによるコーン様およびアンブレラ様トポ
 ロジ-のサンプリングを示す。高次構造マップ中の赤色で標識した領域を、所与の値の組
 (、) についてのパラメータ(Neu5AcのC2原子とそれに次ぐGalおよび
 GlcNAc糖のC1原子との間の角度)を計算するための外側境界として使用した。エ
 ネルギーカットオフに基づいて、 $> 110^\circ$ の値を使用してコーン様トポロジ-を特徴
 付け、 $< 100^\circ$ を使用してアンブレラ様トポロジ-を特徴付けた。輪郭の高次構造
 エネルギーマップとの重ね合わせは、アンブレラ様トポロジ-を採用することがエネル
 ギー的に不利であったので、2-3モチーフが100%コーン様トポロジ-を採用するこ
 とを示した。他方では、2-6モチーフはコーン様およびアンブレラ様トポロジ-の両
 方をサンプリングし、このサンプリングを、Neu5Ac 2-6Gal結合の角(O
 -C6-C5-H5)に基づいて分類した。20

【図5C-4】図5は、グリカン受容体の特異性を理解するためのフレームワークを示す
 図面である。2-3-および/または2-6結合グリカンは、異なるトポロジ-を採
 用することができる。本発明によれば、HAポリペプチドが一定のこれらのトポロジ-に
 結合する能力は、HAポリペプチドに異なる宿主(例えば、ヒト)の感染を媒介する能力
 を付与する。この図のパネルAに示すように、本発明は、2つの特に関連するトポロジ-
 (「コーン」トポロジ-および「アンブレラ」トポロジ-)を定義する。コーントポロジ-
 は2-3-および/または2-6結合グリカンが採用することができ、コアに結合
 した短鎖オリゴサッカリドまたは分岐オリゴサッカリドの典型である(それにもかかわら
 ず、このトポロジ-は一定の長鎖オリゴサッカリドが採用することができる)。アンブレ
 ラトポロジ-は、2-6結合グリカンが唯一採用することができ(おそらく、2-6
 結合中に存在する余剰のC5-C6結合によって付与される高次構造の複数性の増加に起
 因する)、長鎖オリゴサッカリドまたは長鎖オリゴサッカリド分岐(特にモチーフNeu
 5 Ac 2-6 Gal 1-3/4 GlcNAc-を含む)を有する分岐グリカンが主に
 採用する。本明細書中に記載のように、HAポリペプチドがアンブレラグリカントポロジ-
 に結合する能力により、ヒト受容体への結合および/またはヒト感染を媒介する能力が
 付与される。この図のパネルBは、トリサッカリドモチーフNeu5Ac 2-3Gal
 1-3/4 GlcNAcおよびNeu5Ac 2-6Gal 1-4 GlcNAcのそ
 れぞれのグリコシドねじれ角によって支配される2-3および2-6のトポロジ-を
 詳細に示す。パラメータ() -トポロジ-を特徴付けるためにこれらのトリサッカリド
 モチーフ中のNeu5AcのC2原子とそれに次ぐGal糖およびGlcNAc糖のC1
 原子との間の角度を定義した。2-3および2-6モチーフの輪郭と高次構造マッ
 プの重ね合わせは、2-3モチーフが100%コーン様トポロジ-を採用し、2-6
 モチーフがコーン様およびアンブレラ様トポロジ-の両方をサンプリングしたことを示す
 (パネルC)。2-3および2-6によってサンプリングされたコーン様トポロジ-
 では、GlcNAcおよびそれに次ぐ糖は、コーンに及ぶ領域に沿って存在する。HAの
 コーン様トポロジ-との相互作用は、主に付番した位置(H3 HA付番に基づく)のア
 ミノ酸のNeu5AcおよびGal糖との接触に關与する。他方では、2-6に固有の
 アンブレラ様トポロジ-では、\ GlcNAcおよびそれに次ぐ糖はHA結合部位に向か
 40 50

って曲がっている (HA - 2 - 6 共結晶構造で認められるように)。より長い 2 - 6 オリゴサッカリド (例えば、少なくともテトラサッカリド) は、GlcNAc および Neu5Ac のアセチル基の間の糖内ファンデルワールス接触によって安定化されるので、この高次構造を好むであろう。アンブレラ様トポロジ- との HA 相互作用は、Neu5Ac および Gal 糖との接触に加えて、付番した位置 (H3 HA 付番に基づく) のアミノ酸の GlcNAc およびそれに次ぐ糖との接触を含む。この図のパネル C は、2 - 3 および 2 - 6 によるコーン様およびアンブレラ様トポロジ- の高次構造サンプリングを示す。セクション (A) ~ (D) は、それぞれ、Neu5Ac 2 - 3 Gal 結合、Neu5Ac 2 - 6 Gal 結合、Gal 1 - 3 GlcNAc 結合、および Gal 1 - 4 GlcNAc 結合の高次構造 (、) マップを示す。GlycoMaps DB (<http://www.glycosciences.de/modeling/glycomapsdb/>) から入手したこれらのマップを、MM3 力場を使用したアブイニシオ MD シミュレーションを使用して作成した。エネルギー分布を、赤 (最高エネルギーを示す) から最低エネルギーを示す緑色までに色分けしている。囲った領域 1 ~ 5 は、HA - グリカン共結晶構造中の 2 - 3 および 2 - 6 オリゴサッカリドについて認められた (、) 値を示す。この高次構造がゴーシュである 2 - 3 を有する A / アイチ / 2 / 68 H3N2 HA の共結晶構造 (富化領域 2) を除いて、HA 結合ポケット中で Neu5Ac 2 - 3 Gal のトランス型の高次構造 (富化領域 1) が優勢である。他方では、HA 結合ポケット中で Neu5Ac 2 - 6 Gal のシス型高次構造 (富化領域 3) が優勢である。コーン様トポロジ- は富化領域 1 および 2 によってサンプリングされ、アンブレラ様トポロジ- は富化領域 3 によってサンプリングされる。セクション (E) ~ (F) は、それぞれ 2 - 3 モチーフおよび 2 - 6 モチーフによるコーン様およびアンブレラ様トポロジ- のサンプリングを示す。高次構造マップ中の赤色で標識した領域を、所与の値の組 (、) についての パラメータ (Neu5Ac の C2 原子とそれに次ぐ Gal および GlcNAc 糖の C1 原子との間の角度) を計算するための外側境界として使用した。エネルギーカットオフに基づいて、 $> 110^\circ$ の値を使用してコーン様トポロジ- を特徴付け、 $< 100^\circ$ を使用してアンブレラ様トポロジ- を特徴付けた。輪郭の高次構造エネルギーマップとの重ね合わせは、アンブレラ様トポロジ- を採用することがエネルギー的に不利であったので、2 - 3 モチーフが 100% コーン様トポロジ- を採用することを示した。他方では、2 - 6 モチーフはコーン様およびアンブレラ様トポロジ- の両方をサンプリングし、このサンプリングを、Neu5Ac 2 - 6 Gal 結合の 角 (O - C6 - C5 - H5) に基づいて分類した。

【図 5 C - 5】図 5 は、グリカン受容体の特異性を理解するためのフレームワークを示す図面である。2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンは、異なるトポロジ- を採用することができる。本発明によれば、HA ポリペプチドが一定のこれらのトポロジ- に結合する能力は、HA ポリペプチドに異なる宿主 (例えば、ヒト) の感染を媒介する能力を付与する。この図のパネル A に示すように、本発明は、2 つの特に関連するトポロジ- (「コーン」トポロジ- および「アンブレラ」トポロジ-) を定義する。コーントポロジ- は 2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンが採用することができ、コアに結合した短鎖オリゴサッカリドまたは分岐オリゴサッカリドの典型である (それにもかかわらず、このトポロジ- は一定の長鎖オリゴサッカリドが採用することができる)。アンブレラトポロジ- は、2 - 6 結合グリカンが唯一採用することができ (おそらく、2 - 6 結合中に存在する余剰の C5 - C6 結合によって付与される高次構造の複数性の増加に起因する)、長鎖オリゴサッカリドまたは長鎖オリゴサッカリド分岐 (特にモチーフ Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 3 / 4 GlcNAc - を含む) を有する分岐グリカンが主に採用する。本明細書中に記載のように、HA ポリペプチドがアンブレラグリカントポロジ- に結合する能力により、ヒト受容体への結合および / またはヒト感染を媒介する能力が付与される。この図のパネル B は、トリサッカリドモチーフ Neu5Ac 2 - 3 Gal 1 - 3 / 4 GlcNAc および Neu5Ac 2 - 6 Gal 1 - 4 GlcNAc のそれぞれのグリコシドねじれ角によって支配される 2 - 3 および 2 - 6 のトポロジ- を

10

20

30

40

50

詳細に示す。パラメータ() - トポロジ-を特徴付けるためにこれらのトリサッカリドモチーフ中の Neu5Ac の C2 原子とそれに次ぐ Gal 糖および GlcNAc 糖の C1 原子との間の角度を定義した。 2 - 3 および 2 - 6 モチ-フの 輪郭と高次構造マップの重ね合わせは、 2 - 3 モチ-フが 100% コーン様トポロジ-を採用し、 2 - 6 モチ-フがコーン様およびアンブレラ様トポロジ-の両方をサンプリングしたことを示す(パネルC)。 2 - 3 および 2 - 6 によってサンプリングされたコーン様トポロジ-では、GlcNAc およびそれに次ぐ糖は、コーンに及ぶ領域に沿って存在する。HA のコーン様トポロジ-との相互作用は、主に付番した位置(H3 HA付番に基づく)のアミノ酸の Neu5Ac および Gal 糖との接触に 関与する。他方では、 2 - 6 に固有のアンブレラ様トポロジ-では、\ GlcNAc およびそれに次ぐ糖は HA 結合部位に向かって曲がっている(HA - 2 - 6 共結晶構造で認められるように)。より長い 2 - 6 オリゴサッカリド(例えば、少なくともテトラサッカリド)は、GlcNAc および Neu5Ac のアセチル基の間の糖内ファンデルワールス接触によって安定化されるので、この高次構造を好むであろう。アンブレラ様トポロジ-との HA 相互作用は、Neu5Ac および Gal 糖との接触に加えて、付番した位置(H3 HA付番に基づく)のアミノ酸の GlcNAc およびそれに次ぐ糖との接触を含む。この図のパネルCは、 2 - 3 および 2 - 6 によるコーン様およびアンブレラ様トポロジ-の高次構造サンプリングを示す。セクション(A) ~ (D)は、それぞれ、Neu5Ac 2 - 3 Gal 結合、Neu5Ac 2 - 6 Gal 結合、Gal 1 - 3 GlcNAc 結合、および Gal 1 - 4 GlcNAc 結合の高次構造(、)マップを示す。GlycoMaps DB(<http://www.glycosciences.de/modeling/glycomapsdb/>)から入手したこれらのマップを、MM3力場を使用したアブイニシオMDシミュレーションを使用して作成した。エネルギー分布を、赤(最高エネルギーを示す)から最低エネルギーを示す緑色までに色分けしている。囲った領域1 ~ 5は、HA - グリカン共結晶構造中の 2 - 3 および 2 - 6 オリゴサッカリドについて認められた(、)値を示す。この高次構造がゴーシュである 2 - 3 を有する A / アイチ / 2 / 6 8 H 3 N 2 HA の共結晶構造(富化領域2)を除いて、HA 結合ポケット中で Neu5Ac 2 - 3 Gal のトランス型の高次構造(富化領域1)が優勢である。他方では、HA 結合ポケット中で Neu5Ac 2 - 6 Gal のシス型高次構造(富化領域3)が優勢である。コーン様トポロジ-は富化領域1および2によってサンプリングされ、アンブレラ様トポロジ-は富化領域3によってサンプリングされる。セクション(E) ~ (F)は、それぞれ 2 - 3 モチ-フおよび 2 - 6 モチ-フによるコーン様およびアンブレラ様トポロジ-のサンプリングを示す。高次構造マップ中の赤色で標識した領域を、所与の値の組(、)についての パラメータ(Neu5Ac の C2 原子とそれに次ぐ Gal および GlcNAc 糖の C1 原子との間の角度)を計算するための外側境界として使用した。エネルギーカットオフに基づいて、> 110° の値を使用してコーン様トポロジ-を特徴付け、< 100° を使用してアンブレラ様トポロジ-を特徴付けた。輪郭の高次構造エネルギーマップとの重ね合わせは、アンブレラ様トポロジ-を採用することがエネルギー的に不利であったので、 2 - 3 モチ-フが 100% コーン様トポロジ-を採用することを示した。他方では、 2 - 6 モチ-フはコーン様およびアンブレラ様トポロジ-の両方をサンプリングし、このサンプリングを、Neu5Ac 2 - 6 Gal 結合の 角(O - C6 - C5 - H5)に基づいて分類した。

【図5C - 6】図5は、グリカン受容体の特異性を理解するためのフレームワークを示す図面である。 2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンは、異なるトポロジ-を採用することができる。本発明によれば、HAポリペプチドが一定のこれらのトポロジ-に結合する能力は、HAポリペプチドに異なる宿主(例えば、ヒト)の感染を媒介する能力を付与する。この図のパネルAに示すように、本発明は、2つの特に関連するトポロジ-('コーン'トポロジ-および'アンブレラ'トポロジ-)を定義する。コーントポロジ-は 2 - 3 - および / または 2 - 6 結合グリカンが採用することができ、コアに結合した短鎖オリゴサッカリドまたは分岐オリゴサッカリドの典型である(それにもかかわら

10

20

30

40

50

ず、このトポロジーは一定の長鎖オリゴサッカリドが採用することができる)。アンブレラトポロジーは、2-6結合グリカンが唯一採用することができ(おそらく、2-6結合中に存在する余剰のC5-C6結合によって付与される高次構造の複数性の増加に起因する)、長鎖オリゴサッカリドまたは長鎖オリゴサッカリド分岐(特にモチーフNeu5Ac2-6Gal1-3/4GlcNAc-を含む)を有する分岐グリカンが主に採用する。本明細書中に記載のように、HAポリペプチドがアンブレラグリカントポロジーに結合する能力により、ヒト受容体への結合および/またはヒト感染を媒介する能力が付与される。この図のパネルBは、トリサッカリドモチーフNeu5Ac2-3Gal1-3/4GlcNAcおよびNeu5Ac2-6Gal1-4GlcNAcのそれぞれのグリコシドねじれ角によって支配される2-3および2-6のトポロジーを詳細に示す。パラメータ()-トポロジーを特徴付けるためにこれらのトリサッカリドモチーフ中のNeu5AcのC2原子とそれに次ぐGal糖およびGlcNAc糖のC1原子との間の角度を定義した。2-3および2-6モチーフの輪郭と高次構造マップの重ね合わせは、2-3モチーフが100%コーン様トポロジーを採用し、2-6モチーフがコーン様およびアンブレラ様トポロジーの両方をサンプリングしたことを示す(パネルC)。2-3および2-6によってサンプリングされたコーン様トポロジーでは、GlcNAcおよびそれに次ぐ糖は、コーンに及ぶ領域に沿って存在する。HAのコーン様トポロジーとの相互作用は、主に付番した位置(H3-HA付番に基づく)のアミノ酸のNeu5AcおよびGal糖との接触に関与する。他方では、2-6に固有のアンブレラ様トポロジーでは、GlcNAcおよびそれに次ぐ糖はHA結合部位に向かって曲がっている(HA-2-6共結晶構造で認められるように)。より長い2-6オリゴサッカリド(例えば、少なくともテトラサッカリド)は、GlcNAcおよびNeu5Acのアセチル基の間の糖内ファンデルワールス接触によって安定化されるので、この高次構造を好むであろう。アンブレラ様トポロジーとのHA相互作用は、Neu5AcおよびGal糖との接触に加えて、付番した位置(H3-HA付番に基づく)のアミノ酸のGlcNAcおよびそれに次ぐ糖との接触を含む。この図のパネルCは、2-3および2-6によるコーン様およびアンブレラ様トポロジーの高次構造サンプリングを示す。セクション(A)~(D)は、それぞれ、Neu5Ac2-3Gal結合、Neu5Ac2-6Gal結合、Gal1-3GlcNAc結合、およびGal1-4GlcNAc結合の高次構造(、)マップを示す。GlycoMaps DB(<http://www.glycosciences.de/modeling/glycomapsdb/>)から入手したこれらのマップを、MM3力場を使用したアブイニシオMDシミュレーションを使用して作成した。エネルギー分布を、赤(最高エネルギーを示す)から最低エネルギーを示す緑色までに色分けしている。囲った領域1~5は、HA-グリカン共結晶構造中の2-3および2-6オリゴサッカリドについて認められた(、)値を示す。この高次構造がゴーシュである2-3を有するA/アイチ/2/68-H3N2-HAの共結晶構造(富化領域2)を除いて、HA結合ポケット中でNeu5Ac2-3Galのトランス型の高次構造(富化領域1)が優勢である。他方では、HA結合ポケット中でNeu5Ac2-6Galのシス型高次構造(富化領域3)が優勢である。コーン様トポロジーは富化領域1および2によってサンプリングされ、アンブレラ様トポロジーは富化領域3によってサンプリングされる。セクション(E)~(F)は、それぞれ2-3モチーフおよび2-6モチーフによるコーン様およびアンブレラ様トポロジーのサンプリングを示す。高次構造マップ中の赤色で標識した領域を、所与の値の組(、)についてのパラメータ(Neu5AcのC2原子とそれに次ぐGalおよびGlcNAc糖のC1原子との間の角度)を計算するための外側境界として使用した。エネルギーカットオフに基づいて、 $> 110^\circ$ の値を使用してコーン様トポロジーを特徴付け、 $< 100^\circ$ を使用してアンブレラ様トポロジーを特徴付けた。輪郭の高次構造エネルギーマップとの重ね合わせは、アンブレラ様トポロジーを採用することがエネルギー的に不利であったので、2-3モチーフが100%コーン様トポロジーを採用することを示した。他方では、2-6モチーフはコーン様およびアンブレラ様トポロジーの両

方をサンプリングし、このサンプリングを、Neu5Ac₂₋₆Gal結合の角(O-C6-C5-H5)に基づいて分類した。

【図6】図6は、コーン対アンブレラグリカントポロジ-とのHA残基の相互作用を示す図面である。HA-グリカン共結晶の分析により、HA結合部位に対するNeu5Acの位置がほとんど不変であることが明らかとなる。Neu5Acとの接触は、高度に保存された残基(F98、S/T136、W153、H183、およびL/I194など)に關与する。他の糖との接触は、糖結合が2-3または2-6のいずれであるのかおよびグリカントポロジ-がコーンまたはアンブレラのいずれであるのかに応じて、異なる残基に關与する。例えば、コーントポロジ-では、主にNeu5AcおよびGal糖と接触する。E190およびQ226は、この結合において特に重要な役割を果たす。この図はまた、コーン構造への結合に關与し得る他の位置(例えば、137、145、186、187、193、222)を示す。場合によっては、異なる残基が異なるグリカン構造と異なる接触をすることができる。これらの位置中のアミノ酸型は、HAポリペプチドがグリカン構造中に異なる修飾および/または分岐パターンを有する受容体に結合する能力に影響を及ぼし得る。アンブレラトポロジ-では、Neu5AcおよびGalを越えて糖と接触する。この図は、アンブレラ構造への結合に關与し得る残基(例えば、137、145、156、159、186、187、189、190、192、193、196、222、225、226)を示す。場合によっては、異なる残基は、異なるグリカン構造と異なる接触をすることができる。これらの位置中のアミノ酸型は、HAポリペプチドがグリカン構造中に異なる修飾および/または分岐パターンを有する受容体に結合する能力に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、190位のD残基および/または225位のD残基は、アンブレラトポロジ-への結合に寄与する。

10

20

【図7】図7は、例示的なコーントポロジ-を示す図面である。この図は、コーントポロジ-を採用する一定の例示的な(しかし、包括的ではない)グリカン構造を示す。

【図8A-1】図8は、例示的なアンブレラトポロジ-を示す図面である。(A)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)NおよびO結合グリカン構造。(B)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)O結合グリカン構造。

【図8A-2】図8は、例示的なアンブレラトポロジ-を示す図面である。(A)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)NおよびO結合グリカン構造。(B)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)O結合グリカン構造。

30

【図8A-3】図8は、例示的なアンブレラトポロジ-を示す図面である。(A)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)NおよびO結合グリカン構造。(B)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)O結合グリカン構造。

【図8A-4】図8は、例示的なアンブレラトポロジ-を示す図面である。(A)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)NおよびO結合グリカン構造。(B)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)O結合グリカン構造。

40

【図8A-5】図8は、例示的なアンブレラトポロジ-を示す図面である。(A)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)NおよびO結合グリカン構造。(B)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)O結合グリカン構造。

【図8A-6】図8は、例示的なアンブレラトポロジ-を示す図面である。(A)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)NおよびO結合グリカン構造。(B)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)O結合グリカン構造。

【図8A-7】図8は、例示的なアンブレラトポロジ-を示す図面である。(A)アンブレラトポロジ-を採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)Nお

50

よびO結合グリカン構造。(B)アンブレラトポロジを採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)O結合グリカン構造。

【図8B】図8は、例示的なアンブレラトポロジを示す図面である。(A)アンブレラトポロジを採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)NおよびO結合グリカン構造。(B)アンブレラトポロジを採用することができる一定の例示的な(しかし、包括的ではない)O結合グリカン構造。

【図9A】図9は、CA/04(A)およびSC18(B)HAの用量依存性の直接受容体結合を示す図面である。代表的なビオチン化2-3および2-6シアリル化グリカン(説明文中に示す)を含むストレプトアビジンプレートアレイを、本アッセイのために使用した。LNはラクトサミン(Gal1-4GlcNAc)に対応し、3'SLNおよび6'SLNはそれぞれLNに連結したNeu5Ac2-3およびNeu5Ac2-6に対応する。本アッセイを、以前に記載のように(Srinivasan et al., Proc Natl Acad Sci USA 105:2800, 2008)、HAの多価提示を増強するための4:2:1の比率のHA:一次抗体:二次抗体の事前の複合体化によって、0.01~40µg/mlの全HA濃度範囲について行った。6'SLN-LNへの選択的結合パターンは、両HAで類似する。2µg/ml未満の濃度でCA/04HAについて検出可能な結合シグナルが認められないのに対して、SC18HAはこれらの濃度での実質的結合を示し、このことはCA/04HAよりも結合親和性が高くなることを示すことに留意のこと。

【図9B】図9は、CA/04(A)およびSC18(B)HAの用量依存性の直接受容体結合を示す図面である。代表的なビオチン化2-3および2-6シアリル化グリカン(説明文中に示す)を含むストレプトアビジンプレートアレイを、本アッセイのために使用した。LNはラクトサミン(Gal1-4GlcNAc)に対応し、3'SLNおよび6'SLNはそれぞれLNに連結したNeu5Ac2-3およびNeu5Ac2-6に対応する。本アッセイを、以前に記載のように(Srinivasan et al., Proc Natl Acad Sci USA 105:2800, 2008)、HAの多価提示を増強するための4:2:1の比率のHA:一次抗体:二次抗体の事前の複合体化によって、0.01~40µg/mlの全HA濃度範囲について行った。6'SLN-LNへの選択的結合パターンは、両HAで類似する。2µg/ml未満の濃度でCA/04HAについて検出可能な結合シグナルが認められないのに対して、SC18HAはこれらの濃度での実質的結合を示し、このことはCA/04HAよりも結合親和性が高くなることを示すことに留意のこと。

【図10】図10は、CA/04HAのヒト肺組織結合を示す図面である。上に、濃度20µg/mlでのCA/04HAのヒト気管組織切片の頂端面(白色矢印)への結合(赤色のヨウ化プロピジウム染色と比較して緑色)を示す。2-6シアリル化グリカンを優先的に発現することが公知の(18)気管組織の頂端面へのHAの結合に留意のこと。下に、濃度20µg/mlでのHAの肺胞組織切片への最小の結合を示す。HAの気管組織切片へのシアリル酸特異的結合を、0.2UのシアリダーゼA(Arthrobacter ureafaciensで組換え的に発現した)で予め処置した組織切片へのHAの最小の結合によって確認した。組換え的に発現したHAのヒト組織への結合を、以前に記載のように(Chandrasekaran, et al., Nat Biotechnol 26:107, 2008(本明細書中で参考として援用される))、HAの多価提示を増強するための4:2:1の比率のHA:一次抗体:二次抗体の事前の複合体化によって行った。

【図11】図11は、H1N1HAのグリカン結合残基を示す図面である。残基を、ネットワーク形成クラスターに組織化する。クラスターと接触する糖単位(図12中に示すように付番)を、最後の行に示す。2009H1N1HA中の固有のアミノ酸を赤色で強調している。ウイルス株についてのキー:SolIS_3_06(A/ソロモン諸島/3/06);Bris_59_07(A/ブリズベン/59/07);NewCal_20_99(A/ニューカレドニア/20/99);TX/15(A/テキサス/15/

10

20

30

40

50

2009); MX/4482 (A/メキシコ/4482/2009)。

【図12】図12は、2-6オリゴサッカリドに結合したCA/04 HAの構造モデルを示す図面である。CA/04 HAの2-6オリゴサッカリド(Neu5Ac2-6Gal1-4GlcNAc1-3Gal1-4Glc)との接触を、以前に記載のように(Soundararajan, et al., Nat Biotechnol 27, 510, 2009(本明細書中で参考として援用される))、構造モデルの構築によって分析した。CA/04 HAのグリカン結合部位をイラストで図中に示す。イラスト中、キーマミノ酸の側鎖を棒で示す(炭素原子:灰色;酸素原子:赤色;窒素原子:青色に色分け)。2-6オリゴサッカリドを棒で示し(炭素原子:緑色;酸素原子:赤色;窒素:青色に色分け)、非還元末端Neu5Ac-1から還元末端Glc-5まで青色で標識した。Ile219/Glu227組み合わせに起因する相互作用ネットワークの潜在的な不安定化を、赤色点線の円で強調している。

10

【図13】図13は、CA04 HAのRBSにおける不適合な相互作用の修正を示す図面である。(A)CA04 HAのRBSのヒト受容体との構造複合体(不適合のIle219-Glu227接触を赤色円中に強調した)。(B)Lys219(赤色で強調)がGlu227とイオニックに接触しているヒト受容体と複合体化したCA04M1のRBS。(C)ヒト受容体と複合体化したCA04M2のRBS。(D)ヒト受容体と複合体化したSC18 HAのRBS。CA04M2 HAのRBS中のIle219、Pro186、およびAla227との間の疎水性相互作用ならびにSer187、Thr189、およびAsp190との間の相互作用は、SC18 HA中の類似残基間の相互作用に類似する。構造複合体を、キーマミノ酸の側鎖を含むイラストとして示したRBSと共に立体的に示す。置換されたアミノ酸を赤色で標識している。ヒト受容体の棒表示を、炭素原子と共に橙色で示す。

20

【図14】図14は、グリカンアレイで使用したグリカンの命名法を示す図面である。

【図15A】図15は、CA04M1およびCA04M2 HAのグリカン受容体結合性を示す図面である。(A)CA04M1の用量依存性直接グリカンアレイ結合。(B)CA04M2の用量依存性直接グリカンアレイ結合。(C)CA04、CA04M1、CA04M2、およびSC18 HAの6'SLN-LNへの結合曲線。実験データ(「データ」を使用して示した不連続の目印)を、実施例4に記載のように作成した理論上の結合曲線(「モデル」を使用して示した線)と共に示す。SC18 HAのK_d'はおよそ6 pMであり(CA04M2 HAと同一範囲内)、それ故、同一ラベルを使用して示す。(D)CA04、CA04M1、およびCA04M2 HAのヒト気管組織結合(赤色のヨウ化プロピジウムと比較して緑色で示したHAの染色)。気管組織切片の頂端面を、白色矢印を使用して示す。HAの気管組織切片へのシアル酸特異的結合を、シアリダーゼA(Arthrobacter ureafaciens由来)ならびにトリ受容体およびヒト受容体の両方に由来する末端シアル酸を切断する酵素を使用した組織切片の事前の処置に際しての染色の喪失によって確認した。

30

【図15B】図15は、CA04M1およびCA04M2 HAのグリカン受容体結合性を示す図面である。(A)CA04M1の用量依存性直接グリカンアレイ結合。(B)CA04M2の用量依存性直接グリカンアレイ結合。(C)CA04、CA04M1、CA04M2、およびSC18 HAの6'SLN-LNへの結合曲線。実験データ(「データ」を使用して示した不連続の目印)を、実施例4に記載のように作成した理論上の結合曲線(「モデル」を使用して示した線)と共に示す。SC18 HAのK_d'はおよそ6 pMであり(CA04M2 HAと同一範囲内)、それ故、同一ラベルを使用して示す。(D)CA04、CA04M1、およびCA04M2 HAのヒト気管組織結合(赤色のヨウ化プロピジウムと比較して緑色で示したHAの染色)。気管組織切片の頂端面を、白色矢印を使用して示す。HAの気管組織切片へのシアル酸特異的結合を、シアリダーゼA(Arthrobacter ureafaciens由来)ならびにトリ受容体およびヒト受容体の両方に由来する末端シアル酸を切断する酵素を使用した組織切片の事前の処置に際しての染色の喪失によって確認した。

40

50

【図15C】図15は、CA04M1およびCA04M2 HAのグリカン受容体結合性を示す図面である。(A)CA04M1の用量依存性直接グリカンアレイ結合。(B)CA04M2の用量依存性直接グリカンアレイ結合。(C)CA04、CA04M1、CA04M2、およびSC18 HAの6'SLN-LNへの結合曲線。実験データ(「データ」を使用して示した不連続の目印)を、実施例4に記載のように作成した理論上の結合曲線(「モデル」を使用して示した線)と共に示す。SC18 HAの K_d' はおよそ6 pMであり(CA04M2 HAと同一範囲内)、それ故、同一ラベルを使用して示す。(D)CA04、CA04M1、およびCA04M2 HAのヒト気管組織結合(赤色のヨウ化プロピジウムと比較して緑色で示したHAの染色)。気管組織切片の頂端面を、白色矢印を使用して示す。HAの気管組織切片へのシアル酸特異的結合を、シアリダーゼA (Arthrobacter ureafaciens由来)ならびにトリ受容体およびヒト受容体の両方に由来する末端シアル酸を切断する酵素を使用した組織切片の事前の処置に際しての染色の喪失によって確認した。

10

【図15D】図15は、CA04M1およびCA04M2 HAのグリカン受容体結合性を示す図面である。(A)CA04M1の用量依存性直接グリカンアレイ結合。(B)CA04M2の用量依存性直接グリカンアレイ結合。(C)CA04、CA04M1、CA04M2、およびSC18 HAの6'SLN-LNへの結合曲線。実験データ(「データ」を使用して示した不連続の目印)を、実施例4に記載のように作成した理論上の結合曲線(「モデル」を使用して示した線)と共に示す。SC18 HAの K_d' はおよそ6 pMであり(CA04M2 HAと同一範囲内)、それ故、同一ラベルを使用して示す。(D)CA04、CA04M1、およびCA04M2 HAのヒト気管組織結合(赤色のヨウ化プロピジウムと比較して緑色で示したHAの染色)。気管組織切片の頂端面を、白色矢印を使用して示す。HAの気管組織切片へのシアル酸特異的結合を、シアリダーゼA (Arthrobacter ureafaciens由来)ならびにトリ受容体およびヒト受容体の両方に由来する末端シアル酸を切断する酵素を使用した組織切片の事前の処置に際しての染色の喪失によって確認した。

20

【図16-1】図16は、天然バリエーションCA04M3(Asp225Glu)、CA04M4(Asp225Asn)、およびCA04M5(Asp225Gly)HAと比較したCA04 HAの用量依存性直接グリカンアレイ結合を示す図面である。 K_d' を使用して定量した結合強度と共に、これらのHAの代表的なヒト受容体(6'SLN-LN)への結合曲線も下のパネルに示す。CA04M3およびCA04M4が同一のCA04のヒト受容体結合特異性を示すにもかかわらず、結合強度はCA04M4 > CA04 > CA04M3 HAである。他方では、CA04M5は、劇的に低いシグナル値でのヒト受容体への用量依存性結合を示し、トリ受容体についても同様である。これらの所見は、225位の側鎖の長さ(極性と比較した場合)がヒト受容体結合に影響を及ぼし得ることを示唆している。

30

【図16-2】図16は、天然バリエーションCA04M3(Asp225Glu)、CA04M4(Asp225Asn)、およびCA04M5(Asp225Gly)HAと比較したCA04 HAの用量依存性直接グリカンアレイ結合を示す図面である。 K_d' を使用して定量した結合強度と共に、これらのHAの代表的なヒト受容体(6'SLN-LN)への結合曲線も下のパネルに示す。CA04M3およびCA04M4が同一のCA04のヒト受容体結合特異性を示すにもかかわらず、結合強度はCA04M4 > CA04 > CA04M3 HAである。他方では、CA04M5は、劇的に低いシグナル値でのヒト受容体への用量依存性結合を示し、トリ受容体についても同様である。これらの所見は、225位の側鎖の長さ(極性と比較した場合)がヒト受容体結合に影響を及ぼし得ることを示唆している。

40

【図16-3】図16は、天然バリエーションCA04M3(Asp225Glu)、CA04M4(Asp225Asn)、およびCA04M5(Asp225Gly)HAと比較したCA04 HAの用量依存性直接グリカンアレイ結合を示す図面である。 K_d' を使用して定量した結合強度と共に、これらのHAの代表的なヒト受容体(6'SLN-LN)

50

）への結合曲線も下のパネルに示す。CA04M3およびCA04M4が同一のCA04のヒト受容体結合特異性を示すにもかかわらず、結合強度はCA04M4 > CA04 > CA04M3 HAである。他方では、CA04M5は、劇的に低いシグナル値でのヒト受容体への用量依存性結合を示し、トリ受容体についても同様である。これらの所見は、225位の側鎖の長さ（極性と比較した場合）がヒト受容体結合に影響を及ぼし得ることを示唆している。

【図16-4】図16は、天然バリエーションCA04M3 (Asp225Glu)、CA04M4 (Asp225Asn)、およびCA04M5 (Asp225Gly) HAと比較したCA04 HAの用量依存性直接グリカンアレイ結合を示す図面である。K_d'を使用して定量した結合強度と共に、これらのHAの代表的なヒト受容体(6'SLN-LN)への結合曲線も下のパネルに示す。CA04M3およびCA04M4が同一のCA04のヒト受容体結合特異性を示すにもかかわらず、結合強度はCA04M4 > CA04 > CA04M3 HAである。他方では、CA04M5は、劇的に低いシグナル値でのヒト受容体への用量依存性結合を示し、トリ受容体についても同様である。これらの所見は、225位の側鎖の長さ（極性と比較した場合）がヒト受容体結合に影響を及ぼし得ることを示唆している。

10

【図16-5】図16は、天然バリエーションCA04M3 (Asp225Glu)、CA04M4 (Asp225Asn)、およびCA04M5 (Asp225Gly) HAと比較したCA04 HAの用量依存性直接グリカンアレイ結合を示す図面である。K_d'を使用して定量した結合強度と共に、これらのHAの代表的なヒト受容体(6'SLN-LN)への結合曲線も下のパネルに示す。CA04M3およびCA04M4が同一のCA04のヒト受容体結合特異性を示すにもかかわらず、結合強度はCA04M4 > CA04 > CA04M3 HAである。他方では、CA04M5は、劇的に低いシグナル値でのヒト受容体への用量依存性結合を示し、トリ受容体についても同様である。これらの所見は、225位の側鎖の長さ（極性と比較した場合）がヒト受容体結合に影響を及ぼし得ることを示唆している。

20

【発明を実施するための形態】

【0018】

HA配列エレメントの説明

HA配列エレメント1

30

HA配列エレメント1は、天然インフルエンザ単離体で見出された多数のHAタンパク質の残基97~185（基準としてH3 HAを使用して残基の位置を割り当てる場合）におよそ対応する配列エレメントである。この配列エレメントは以下の基本構造を有する：

C(Y/F)PX₁CX₂WX₃WX₄HHP（式中、
 X₁はおよそ30~45アミノ酸長であり、
 X₂はおよそ5~20アミノ酸長であり、
 X₃はおよそ25~30アミノ酸長であり、
 X₄はおよそ2アミノ酸長である）。

【0019】

40

いくつかの実施形態では、X₁は、約35~45、または約35~43、または約35、36、37、38、38、40、41、42、または43アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、X₂は、約9~15、または約9~14、または約9、10、11、12、13、または14アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、X₃は、約26~28、または約26、27、または28アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、X₄は配列(G/A)(I/V)を有する。いくつかの実施形態では、X₄は配列GIを有し、いくつかの実施形態では、X₄は配列GVを有し、いくつかの実施形態では、X₄は配列AIを有し、いくつかの実施形態では、X₄は配列AVを有する。いくつかの実施形態では、HA配列エレメント1はジスルフィド結合を含む。いくつかの実施形態では、このジスルフィド結合は、97位および139位（本明細書中で使用した基準H3付番方式に

50

基づく)に対応する残基を架橋する。

【0020】

いくつかの実施形態では、特にH1ポリペプチドでは、 X_1 は約43アミノ酸長であり、そして/または X_2 は約13アミノ酸長であり、そして/または X_3 は約26アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、特にH1ポリペプチドでは、HA配列エレメント1は以下の構造を有する：

CYPX_{1A}T(A/T)(A/S)CX₂WX₃WX₄HHP(式中、
 X_{1A} はおよそ27~42、またはおよそ32~42、またはおよそ32~40、またはおよそ26~41、またはおよそ31~41、またはおよそ31~39、またはおよそ31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40アミノ酸長であり、 $X_2 \sim X_4$ は上記の通りである)。

10

【0021】

いくつかの実施形態では、特にH1ポリペプチドでは、HA配列エレメント1は以下の構造を有する：

CYPX_{1A}T(A/T)(A/S)CX₂W(I/L)(T/V)X_{3A}WX₄HHP(式中、

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

X_{3A} はおよそ23~28、またはおよそ24~26、またはおよそ24、25、または26アミノ酸長であり、 X_2 および X_4 は上記の通りである)。

20

【0022】

いくつかの実施形態では、特にH1ポリペプチドでは、HA配列エレメント1は以下の配列を含む：

QLSSISSFEK

(典型的には X_1 内(X_{1A} 内が含まれる)で、特に X_1 の約残基12から始まる(例えば、図1~3に示す通り))。

【0023】

いくつかの実施形態では、特にH3ポリペプチドでは、 X_1 は約39アミノ酸長であり、そして/または X_2 は約13アミノ酸長であり、そして/または X_3 は約26アミノ酸長である。

30

【0024】

いくつかの実施形態では、特にH3ポリペプチドでは、HA配列エレメント1は以下の構造を有する：

CYPX_{1A}S(S/N)(A/S)CX₂WX₃WX₄HHP(式中、

X_{1A} はおよそ27~42、またはおよそ32~42、またはおよそ32~40、またはおよそ23~38、またはおよそ28~38、またはおよそ28~36、またはおよそ28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40アミノ酸長であり、 $X_2 \sim X_4$ は上記の通りである)。

【0025】

いくつかの実施形態では、特にH3ポリペプチドでは、HA配列エレメント1は以下の構造を有する：

CYPX_{1A}S(S/N)(A/S)CX₂WL(T/H)X_{3A}WX₄HHP(式中、

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

X_{3A} はおよそ23~28、またはおよそ24~26、またはおよそ24、25、または26アミノ酸長であり、 X_2 および X_4 は上記の通りである)。

40

【0026】

50

いくつかの実施形態では、特にH3ポリペプチドでは、HA配列エレメント1は以下の配列を含む：

(L/I)(V/I)ASSGTLEF

(典型的にはX₁内(X_{1A}内が含まれる)で、特にX₁の約残基12から始まる(例えば、図1および2に示す通り))。

【0027】

いくつかの実施形態では、特にH5ポリペプチドでは、X₁は約42アミノ酸長であり、そして/またはX₂は約13アミノ酸長であり、そして/またはX₃は約26アミノ酸長である。

【0028】

いくつかの実施形態では、特にH5ポリペプチドでは、HA配列エレメント1は以下の構造を有する：

CYPX_{1A}SSACX₂WX₃WX₄HHP(式中、

X_{1A}はおよそ27~42、またはおよそ32~42、またはおよそ32~40、またはおよそ23~38、またはおよそ28~38、またはおよそ28~36、またはおよそ28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40アミノ酸長であり、X₂~X₄は上記の通りである)。

【0029】

いくつかの実施形態では、特にH5ポリペプチドでは、HA配列エレメント1は以下の構造を有する：

CYPX_{1A}SSACX₂WLIX_{3A}WX₄HHP(式中、

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

X_{3A}はおよそ23~28、またはおよそ24~26、またはおよそ24、25、または26アミノ酸長であり、X₂およびX₄は上記の通りである)。

【0030】

いくつかの実施形態では、特にH5ポリペプチドでは、HA配列エレメント1は、配列：

NDAAEXX(K/R)

によって(すなわち、残基186~193に対応する位置で)伸長される。

【0031】

いくつかの実施形態では、特にH5ポリペプチドでは、HA配列エレメント1は以下の配列を含む：

YEELKHLXSXNHFEK

(典型的にはX₁内で、特にX₁の約残基6から始まる(例えば、図1および2に示す通り))。

HA配列エレメント2

HA配列エレメント2は、天然インフルエンザ単離体で見出された多数のHAタンパク質の残基324~340(H3 HAに基づく付番方式を再度使用する)におよそ対応する配列エレメントである。この配列エレメントは、以下の基本構造を有する：

GAIAGFIE

いくつかの実施形態では、HA配列エレメント2は以下の配列を有する：

PX₁GAIAGFIE(式中、

X₁はおよそ4~14アミノ酸長、または約8~12アミノ酸長、または約12、11、10、9、または8アミノ酸長である)。いくつかの実施形態では、この配列エレメントは、HA0切断部位を提供し、それにより、HA1およびHA2が産生される。

【0032】

いくつかの実施形態では、特にH1ポリペプチドでは、HA配列エレメント2は以下の構造を有する：

10

20

30

40

50

PS (I / V) QSRX_{1A}GAIAGFIE (式中、
X_{1A} はおよそ 3 アミノ酸長であり、いくつかの実施形態では、X_{1A} は G (L / I) F である) 。

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、特に H 3 ポリペプチドでは、HA 配列エレメント 2 は以下の構造を有する：

PXKXTRX_{1A}GAIAGFIE (式中、
X_{1A} はおよそ 3 アミノ酸長であり、いくつかの実施形態では、X_{1A} は G (L / I) F である) 。

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、特に H 5 ポリペプチドでは、HA 配列エレメント 2 は以下の構造を有する：

PQRXXXRXRX_{1A}GAIAGFIE (式中、
X_{1A} はおよそ 3 アミノ酸長であり、いくつかの実施形態では、X_{1A} は G (L / I) F である) 。

定義

親和性：当該分野で公知のように、「親和性」は、特定のリガンド（例えば、HA ポリペプチド）のそのパートナー（例えば、HA 受容体）への結合強度の基準である。いくつかの実施形態では、親和性は、一方の実体の他方の実体への結合の強度をいう。親和性を、異なる方法で測定することができる。

【 0 0 3 5 】

アミノ酸：本明細書中で使用する場合、用語「アミノ酸」は、その最も広義で、ポリペプチド鎖に組み込むことができる任意の化合物および/または物質をいう。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造 H₂N - C (H) (R) - COOH を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は合成アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸は D - アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸は L - アミノ酸である。「標準アミノ酸」は、天然に存在するペプチド中で一般に見出される 20 種の標準的な L - アミノ酸のいずれかをいう。「非標準アミノ酸」は、合成されるか天然供給源から得られるかと無関係に、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸をいう。本明細書中で使用する場合、「合成アミノ酸」は、化学修飾されたアミノ酸（塩、アミノ酸誘導体（アミドなど）、置換物、および/または化学反応および/または生合成によって修飾されたものが含まれるが、これらに制限されない）を含む。アミノ酸（ペプチド中のカルボキシ - および/またはアミノ末端アミノ酸が含まれる）を、メチル化、アミド化、アセチル化、保護基、および/またはその活性に悪影響を及ぼすことなくペプチドの循環半減期を変化させることができる他の化学基との置換によって修飾することができる。アミノ酸は、ジスルフィド結合に関与し得る。アミノ酸は、1 つ以上の翻訳後修飾（1 つ以上の化学実体（例えば、メチル基、酢酸基、アセチル基、リン酸基、ホルミル部分、イソプレノイド基、硫酸基、ポリエチレングリコール部分、脂質部分、炭水化物部分、ビオチン部分など）との関連など）を含むことができる。用語「アミノ酸」を「アミノ酸残基」と交換可能に使用し、遊離アミノ酸および/またはペプチドのアミノ酸残基をいうことができる。アミノ酸が遊離アミノ酸またはペプチドの残基をいうかどうかは本用語を使用した文脈から明らかであろう。

【 0 0 3 6 】

動物：本明細書中で使用する場合、用語「動物」は、動物界の任意のメンバーをいう。いくつかの実施形態では、「動物」は、いずれかの性および任意の発達段階のヒトをいう。いくつかの実施形態では、「動物」は、任意の発達段階の非ヒト動物をいう。一定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、および/またはブタ）である。いくつかの実施形態では、動物には、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類、および/または蠕虫類が含まれるが、これらに限定されない。一定の実施形態では、動物は、インフルエ

10

20

30

40

50

ンザによる感染に罹患しやすい。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子改変動物、および/またはクローンであり得る。

【0037】

およそ：本明細書中で使用する場合、用語「およそ」または「約」は、1つ以上の目的の値に適用する場合、記述した基準値に類似の値をいう。一定の実施形態では、用語「およそ」または「約」は、特に明記しないか、文脈から明らかでない限り、いずれかの方向（より多いか少ない）で記述した基準値の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満に入る値の範囲をいう（かかる数字が可能な値の100%を超える場合を除く）。

10

【0038】

結合：用語「結合」は、本明細書中で使用する場合、典型的には、薬剤間の非共有結合をいうと理解されるであろう。本明細書中の多数の実施形態では、結合を、特定のグリカン（例えば、アンブレラトポロジグリカンまたはコートポロジグリカン）に関して扱う。かかる結合を種々の文脈のいずれかで評価することができることが当業者に認識されるであろう。いくつかの実施形態では、結合を、遊離グリカンに関して評価する。いくつかの実施形態では、結合を、キャリアに結合した（例えば、共有結合した）グリカンに関して評価する。いくつかのかかる実施形態では、キャリアはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、結合を、HA受容体に結合したグリカンに関して評価する。かかる実施形態では、受容体結合またはグリカン結合に対する基準を得ることができる。いくつかの実施形態では、結合は、結合剤がその環境下でその標的結合パートナーと他の潜在的な結合パートナーとを区別するという点で特異的である。

20

【0039】

結合剤：一般に、用語「結合剤」を、本明細書中で、目的の薬剤に結合する任意の実体をいうために使用する。例えば、HA結合剤は、本明細書中に記載のように、1つ以上のHAポリペプチド（および/またはそのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分）に結合する。結合剤は、任意の化学型の結合剤であり得る。いくつかの実施形態では、結合剤はポリペプチド（例えば、抗体または抗体フラグメントが含まれる）である。いくつかの実施形態では、結合剤は小分子である。いくつかの実施形態では、結合剤は核酸である。いくつかの実施形態では、結合剤はアプタマーである。いくつかの実施形態では、結合剤はポリマーであり、いくつかの実施形態では、結合剤は非高分子である。いくつかの実施形態では、結合剤は炭水化物である。いくつかの実施形態では、結合剤はレクチンである。いくつかの実施形態では、H1-HA結合剤はH1-HAポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、結合剤はヒト結合および/または感染性が增强されたH1-HAポリペプチドバリエーションに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書中に提供した結合剤はアンブレラトポロジ遮断薬である。いくつかの実施形態では、本明細書中に提供した結合剤は、アンブレラトポロジ特異的遮断薬である。

30

【0040】

生物学的に活性な：本明細書中で使用する場合、句「生物学的に活性な」は、生体システム、特に生物中で活性を有する任意の薬剤の特徴をいう。例えば、生物に投与した場合にその生物に生物学的影響を及ぼす薬剤を生物学的に活性と見なす。特定の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドが生物学的に活性である場合、タンパク質またはポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を共有するタンパク質またはポリペプチドの一部を、典型的には、「生物学的に活性な」部分という。

40

【0041】

特徴的部分：本明細書中で使用する場合、句であるタンパク質またはポリペプチドの「特徴的部分」は、アミノ酸の連続的ストレッチまたは一連のアミノ酸の連続的ストレッチ（共にタンパク質またはポリペプチドの特徴である）を含む部分である。それぞれのかかる連続的ストレッチは、一般に、少なくとも2つのアミノ酸を含むであろう。さらに、当業者は、典型的には少なくとも5、10、15、20、またはそれを超えるアミノ酸がタ

50

ンパク質の特徴であることが必要であると認識するであろう。一般に、特徴的部分は、上記で特定した配列同一性に加えて、関連するインタクトなタンパク質と少なくとも1つの機能的特徴を共有する部分である。

【0042】

特徴的配列：「特徴的配列」は、ポリペプチドまたは核酸ファミリーの全てのメンバーで見出される配列である。したがって、当業者は、ファミリーのメンバーを定義するために使用することができる。

【0043】

コートポロジー：句「コートポロジー」を、本明細書中で、一定のグリカン、特にHA受容体上のグリカンによって採用される三次元配置をいうために使用する。図5および7に示すように、コートポロジーは2-3シアリル化グリカンまたは2-6シアリル化グリカンが採用することができるが、いくつかの長鎖オリゴヌクレオチドもこの高次構造を採用することができるが、これは短鎖オリゴヌクレオチドの典型である。コートポロジーは、およそ-60、60、または180の(C1-C2-O-C3/C6)値によって与えられた最小エネルギー高次構造の3つの領域をサンプリングし、且つ(C2-O-C3/C6-H3/C5)は-60~60をサンプリングするNeu5Ac-2-3Gal結合のグリコシドねじれ角によって特徴付けられる。図7は、コートポロジーを採用するグリカンの一定の代表例(しかし、包括的ではない)を示す。

10

【0044】

~に対応する：本明細書中で使用する場合、用語「~に対応する」を、しばしば、HAポリペプチド中のアミノ酸残基の位置/同一性を指定するために使用する。当業者は、簡潔にするために、190位の残基「に対応する」アミノ酸は、例えば、実際には特定のアミノ酸鎖中の190番目のアミノ酸である必要はなく、むしろ、野生型H3-HA中の190で見出される残基に対応するように、標準的な付番方式(野生型H3-HAに基づく)を本明細書中で使用する(例えば、図1~4に示す)ことを認識するであろう。当業者は、対応するアミノ酸の同定方法を容易に認識する。

20

【0045】

分離度の除去：本明細書中で使用する場合、「分離度が除去された」アミノ酸は、グリカン結合に間接的な影響を及ぼすHAアミノ酸である。例えば、1分離度が除去されたアミノ酸は、以下のいずれかが可能である：(1)直接結合アミノ酸と相互作用すること、および/または(2)そうなければ、直接結合アミノ酸が宿主細胞のHA受容体と関連するグリカンと相互作用する能力に影響を及ぼすこと。かかる1分離度が除去されたアミノ酸は、グリカン自体に直接結合してもしなくてもよい。2分離度が除去されたアミノ酸は、(1)1分離度が除去されたアミノ酸と相互作用し、そして/または(2)そうでなければ、1分離度が除去されたアミノ酸が直接結合アミノ酸などと相互作用する能力に影響を及ぼす。

30

【0046】

直接結合アミノ酸：本明細書中で使用する場合、句「直接結合アミノ酸」は、宿主細胞のHA受容体に関連する1つ以上のグリカンと直接相互作用するHAポリペプチドアミノ酸をいう。

40

【0047】

改変：用語「改変」は、本明細書中で使用する場合、そのアミノ酸配列がヒトによって選択されたポリペプチドを説明している。例えば、改変HAポリペプチドは、天然インフルエンザ単離体で見出されるHAポリペプチドのアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、改変HAポリペプチドは、NCBIデータベース中に含まれるHAポリペプチドのアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を有する。

【0048】

ヒト結合および/または感染性増強バリエーションHA：本明細書中で使用する場合、句「ヒト結合および/または感染性増強バリエーションHA」は、ヒト上皮組織で見出されるHA受容体、特に2-6シアリル化グリカンを有するヒトHA受容体に結合するHAポリペ

50

プチドの（例えば、H1 HAポリペプチドの）バージョンをいう。いくつかの実施形態では、ヒト結合および/または感染性増強バリエーションHAは、アンブレラトポロジグリカンに結合する。いくつかの実施形態では、ヒト結合および/または感染性増強バリエーションHAは2-6シアリル化グリカンに結合する。いくつかの実施形態では、ヒト結合および/または感染性増強バリエーションHAは長鎖2-6シアリル化グリカンに結合する。いくつかの実施形態では、ヒト結合および/または感染性増強バリエーションHAは6'SLN-LNグリカンに結合する。いくつかの実施形態では、「ヒト結合の増強」は、例えば、バリエーションHAポリペプチドがその同族野生型HAポリペプチド（例えば、対照H1 HAポリペプチド株（表1中に提供した株など））で認められる結合と比較して結合の増加を示すことを意味する。いくつかの実施形態では、「ヒト結合の増強」は、例えば、バリエーションHAポリペプチドが、その同族野生型HAポリペプチド（例えば、対照H1 HAポリペプチド株（表1中に提供した株など））で認められる結合と比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、または少なくとも1000倍の結合の増加を示すことを意味する。いくつかの実施形態では、「感染性の増強」は、例えば、バリエーションHAポリペプチドを有するインフルエンザがその同族野生型HAポリペプチド（例えば、対照H1 HAポリペプチド株（表1中に提供した株など））を使用して認められる感染性と比較して被験体の感染性の増加を示すことを意味する。いくつかの実施形態では、「感染性の増強」は、例えば、その同族野生型HAポリペプチド（例えば、対照H1 HAポリペプチド株（表1中に提供した株など））を使用して認められる感染性と比較して、バリエーションHAポリペプチドを有するインフルエンザが少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、または少なくとも1000倍の被験体の感染性の増加を示すことを意味する。いくつかの実施形態では、「ヒト結合の増強」は、その同族野生型HAポリペプチド（例えば、対照H1 HAポリペプチド株（表1中に提供した株など））を使用して認められるヒト結合と比較して、バリエーションH1 HAポリペプチドがインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918、2009A/H1N1（例えば、A/CA/4/2009）、およびA/ブタ/アイオワ/15/1930のうち1つ以上に存在するH1 HAと実質的に同程度に増加する結合を示すことを意味する。いくつかの実施形態では、「感染性の増強」は、その同族野生型HAポリペプチド（例えば、対照H1 HAポリペプチド株（表1中に提供した株など））を使用して認められる感染性と比較して、バリエーションH1 HAポリペプチドを有するインフルエンザがインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918、2009A/H1N1（例えば、A/CA/4/2009）、およびA/ブタ/アイオワ/15/1930のうち1つ以上に存在するH1 HAと実質的に同程度に増加する感染性を示すことを意味する。一般に、本明細書中に記載のヒト結合増強H1 HAポリペプチドは、2009A/H1N1（例えば、表1を参照のこと）で見出されるH1 HAポリペプチドと比較して、アンブレラ-トポロジグリカンへの結合の増強（例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、または少なくとも1000倍の結合の増加）および/またはコーン-トポロジグリカンと比較したアンブレラ-トポロジグリカンへの結合における区別の増強（例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、または少なくとも1000倍の結合の増強）を示す。いくつかの実施形態では、ヒト結合増強H1 HAは、2009A/H1N1（例えば、表1を参照のこと）で見出されるH1 HAポリペプチドと比較した場合の2-6シアリル化された（例え

10

20

30

40

50

ば、長鎖 - 2 - 6シアリル化された)、例えば、6' S L N - L Nグリカンへの結合の増加を示す。当業者に認識されるように、かかる結合および/または感染性の増強を、種々のアッセイ(例えば、本明細書中に記載のアッセイが含まれる)のいずれかを使用して評価することができる。

【0049】

H1ポリペプチド:「H1ポリペプチド」は、この用語を本明細書中で使用する場合、そのアミノ酸配列がH1に特徴的であり、且つH1が他のHAサブタイプと区別される少なくとも1つの配列エレメントを含むHAポリペプチドである。代表的なかかる配列エレメントを、アラインメント(例えば、図1~4に示すアラインメントなど)によって決定することができ、例えば、HA配列エレメントのH1特異的实施形態に関して本明細書中に記載の配列エレメントが含まれる。

10

【0050】

H3ポリペプチド:「H3ポリペプチド」は、この用語を本明細書中で使用する場合、そのアミノ酸配列がH3に特徴的であり、且つH3が他のHAサブタイプと区別される少なくとも1つの配列エレメントを含むHAポリペプチドである。代表的なかかる配列エレメントを、アラインメント(例えば、図1および2に示すアラインメントなど)によって決定することができ、例えば、HA配列エレメントのH3特異的实施形態に関して本明細書中に記載の配列エレメントが含まれる。

【0051】

H5ポリペプチド:「H5ポリペプチド」は、この用語を本明細書中で使用する場合、そのアミノ酸配列がH5に特徴的であり、且つH5が他のHAサブタイプと区別される少なくとも1つの配列エレメントを含むHAポリペプチドである。代表的なかかる配列エレメントを、アラインメント(例えば、図1および2に示すアラインメントなど)によって決定することができ、例えば、HA配列エレメントのH5特異的实施形態に関して本明細書中に記載の配列エレメントが含まれる。

20

【0052】

血球凝集素(HA)ポリペプチド:本明細書中で使用する場合、用語「血球凝集素ポリペプチド」(または「HAポリペプチド」)は、そのアミノ酸配列が少なくとも1つのHAの特徴的配列を含むポリペプチドをいう。インフルエンザ単離体由来の広範な種々のHA配列は当該分野で公知であり、実際、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)はデータベースを維持しており(www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/flu.html)、本出願の出願日の時点で9796のHA配列を含んでいた。当業者は、このデータベースを参照して、一般にHAポリペプチド、および/または特定のHAポリペプチド(例えば、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、またはH16ポリペプチド)、または特定の宿主(例えば、トリ、ラクダ、イヌ、ネコ、ジャコウネコ、環境、ウマ、ヒト、ヒョウ、ミンク、マウス、アシカ、プナテン(stone martin)、ブタ、トラ、クジラなど)の感染を媒介するHAに特徴的な配列を容易に同定することができる。例えば、いくつかの実施形態では、HAポリペプチドは、インフルエンザウイルスの天然単離体で見出されるHAタンパク質の約残基97と185との間、324と340との間、96と100との間、および/または130~230で見出される1つ以上の特徴的な配列エレメントを含む。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドは、本明細書中で定義のHA配列エレメント1および2の少なくとも1つを含むアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドは、いくつかの実施形態では約100~約200、または約125~約175、または約125~約160、または約125~約150、または約129~約139、または約129、約130、約131、約132、約133、約134、約135、約136、約137、約138、または約139個のアミノ酸で相互に隔てられたHA配列エレメント1および2を含むアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドは、グリカン結合に関与する領域96~100および/または130~230内の位置に残基を含むアミノ酸配列を有する。例え

30

40

50

ば、多数のHAポリペプチドは、1つ以上の以下の残基を含む：Tyr 98、Ser / Thr 136、Trp 153、His 183、およびLeu / Ile 194。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドは、これらの残基の少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、または少なくとも5個全てを含む。

【0053】

同一性：本明細書中で使用する場合、用語「同一性」は、高分子間（例えば、核酸分子間（例えば、DNA分子および/またはRNA分子間）および/またはポリペプチド分子間の全体的な関連性をいう。2つの核酸配列の同一率の計算を、例えば、最適に比較するための2つの配列のアラインメントによって行うことができる（例えば、最適なアラインメントのために第1および第2の核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較のために非同一致配列を無視することができる）。一定の実施形態では、比較のためにアラインメントした配列の長さは、基準配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または実質的に100%である。次いで、対応するヌクレオチド位置のヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置を第2の配列中の対応する位置と同一のヌクレオチドが占める場合、分子はその位置で同一である。2配列間の同一率は、2配列の最適なアラインメントのために導入される必要があるギャップ数および各ギャップの長さを考慮して、配列が共有する同一の位置の数の関数である。配列の比較および2配列間の同一率の決定を、数学アルゴリズムを使用して行うことができる。

【0054】

干渉剤：本明細書中で使用する場合、用語「干渉剤」は、本明細書中に記載の指定の標的（例えば、特定のHAポリペプチドおよび/または特定のグリカン（アンブレラ-トポロジ-グリカンなど））に結合する任意の実体をいう。干渉剤は、任意の化学型の干渉剤であり得る。いくつかの実施形態では、干渉剤はポリペプチド（例えば、抗体または抗体フラグメントが含まれる）であり、いくつかのかかる実施形態では、干渉剤はHAポリペプチドであり、他の実施形態では、干渉剤はそのアミノ酸配列がHA特徴的配列を含まないポリペプチド（すなわち、「非HAポリペプチド」）である。いくつかの実施形態では、干渉剤は小分子である。いくつかの実施形態では、干渉剤は核酸である。いくつかの実施形態では、干渉剤はアプタマーである。いくつかの実施形態では、干渉剤はポリマーであり、いくつかの実施形態では、干渉剤は非高分子である。いくつかの実施形態では、干渉剤は炭水化物である。いくつかの実施形態では、干渉剤はレクチンである。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の干渉剤は1つ以上のHAポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤はH1 HAポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、ヒト結合および/または感染性が増強されたH1 HAポリペプチドバリエーションに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の干渉剤は、アンブレラ様トポロジ-を有するシアリル化グリカンに結合する。一定の実施形態では、干渉剤は、高い親和性および/または特異性を有するアンブレラ-トポロジ-グリカンに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、コーン-トポロジ-グリカンと比較して、アンブレラ-トポロジ-グリカンへの結合を優先する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、血球凝集素と血球凝集素受容体上のグリカンへの結合を競合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、血球凝集素とアンブレラ-トポロジ-グリカンへの結合を競合する。いくつかの実施形態では、本明細書中に提供した干渉剤はアンブレラトポロジ-遮断薬である。いくつかの実施形態では、本明細書中に提供した干渉剤はアンブレラトポロジ-特異的遮断薬である。いくつかの実施形態では、干渉剤は、アンブレラトポロジ-グリカン模倣物に結合する。

【0055】

単離された：用語「単離された」は、本明細書中で使用する場合、(i)最初に産生された時に（天然か実験的設定かは無関係）関連した成分の少なくともいくつかから分離されているか、(ii)ヒトの手によって産生された薬剤または実体をいう。単離された薬

10

20

30

40

50

剤または実体を、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、またはそれを超える最初に関連した他の成分から分離することができる。いくつかの実施形態では、単離された薬剤は、純度が90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%超である。いくつかの実施形態では、単離した物質および/または実体の純度の計算には、賦形剤（例えば、緩衝液、溶媒、水など）を含まない。

【0056】

結合特異的遮断薬（LSBA）：本明細書中で使用する場合、用語「結合特異的遮断薬」は、2-6シアリル化グリカンを含むHA受容体に結合する薬剤をいう。いくつかの実施形態では、LSBAは、2-3シアリル化グリカンを含むHA受容体の親和性の少なくとも約40%、約50%、または約75%で2-6シアリル化グリカンを含むHA受容体に選択的に結合する。いくつかの実施形態では、LSBAは、2-3シアリル化グリカンを含むHA受容体の親和性の少なくとも約2%、約4%、約5%、または約10倍大きい親和性で、2-6シアリル化グリカンを含むHA受容体に選択的に結合する。いくつかの実施形態では、LSBAは、2-3シアリル化グリカンの親和性の少なくとも50%、100%、150%、または200%の親和性である2-6シアリル化グリカンに対する親和性を有する。いくつかの実施形態では、LSBAは、血球凝集素とHA受容体への結合を競合し得る。例えば、LSBAは、結合の特徴（例えば、2-6シアリル化グリカンまたは2-3シアリル化グリカン）に基づいてインフルエンザウイルス粒子（例えば、ヒトまたはトリインフルエンザウイルス）のHA受容体への結合を選択的に阻害することができる。いくつかの実施形態では、LSBAはポリペプチドである。いくつかのかかる実施形態では、LSBAポリペプチドは、天然に存在するポリペプチドのアミノ酸配列と実質的に同一であるか実質的に相同であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、LSBAポリペプチドはHAポリペプチドである。いくつかの実施形態では、LSBAポリペプチドは、天然に存在するHAポリペプチドまたはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、LSBAポリペプチドは、HAポリペプチドのアミノ酸配列に関連しないアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、LSBAポリペプチドは、抗体またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、LSBAポリペプチドはレクチン（例えば、SNA-1）である。いくつかの実施形態では、LSBAはポリペプチドではない。いくつかの実施形態では、LSBAは小分子である。いくつかの実施形態では、LSBAは核酸である。

【0057】

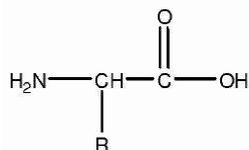
長鎖オリゴサッカリド：本開示のために、オリゴサッカリドを、典型的には、少なくとも4個のサッカリド残基を有する少なくとも1つの直鎖を含む場合、「長鎖」と見なす。

【0058】

非天然アミノ酸：句「非天然アミノ酸」は、アミノ酸の化学構造（すなわち、

【0059】

【化3】



）を有し、したがって、少なくとも2つのペプチド結合に関与することができるが、天然で見出されるR基とは異なるR基を有する実体をいう。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、水素よりもむしろ第2のR基を有することもでき、そして/またはアミノ部分またはカルボン酸部分上に1つ以上の他の置換基を有することができる。

【0060】

ポリペプチド：「ポリペプチド」は、一般的に言えば、相互にペプチド結合によって結

10

20

30

40

50

合した少なくとも2つの一連のアミノ酸の鎖である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、それぞれが少なくとも1つのペプチド結合によって他と結合した少なくとも3～5個のアミノ酸を含むことができる。当業者は、ポリペプチドが時折「非天然」アミノ酸または任意選択的にポリペプチド鎖に組み込むことができる他の実体を含むことを認識するであろう。

【0061】

優先的に：本明細書中で使用する場合、第1の実体が基準実体より第2の実体への結合の増強を示す場合、第1の実体は、基準実体と比較して第2の実体に「優先的に」結合する。いくつかの実施形態では、第1の実体は、基準実体の約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約50倍、約100倍、約500倍、または約1000倍の結合親和性で第2の実体に結合するであろう。

10

【0062】

純粋な：本明細書中で使用する場合、他の成分を実質的に含まない場合、薬剤または実体は、「純粋」である。例えば、約90%を超える特定の薬剤または実体を含む調製物を典型的には純粋な調製物と見なす。いくつかの実施形態では、薬剤または実体は、少なくとも純度91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%である。

【0063】

短鎖オリゴサッカリド：本開示のために、4個未満または確実に3個未満の残基を任意の直鎖中に有する場合、オリゴサッカリドを、典型的には、「短鎖」と見なす。

20

【0064】

特異性：当該分野で公知のように、「特異性」は、特定のリガンド（例えば、HAポリペプチド）がその結合パートナー（例えば、ヒトHA受容体、特にヒト上気道HA受容体）を他の潜在的な結合パートナー（例えば、トリHA受容体）と区別する能力の基準である。

【0065】

実質的相同性：句「実質的相同性」を、本明細書中で、アミノ酸配列間または核酸配列間の比較をいうために使用する。当業者に認識されるように、対応する位置に相同な残基を含む場合、2つの配列を、一般に、「実質的に相同である」と見なす。相同な残基は同一の残基であり得る。あるいは、相同な残基は、適切に類似する構造および/または機能的特徴を有する同一でない残基であり得る。例えば、当業者に周知のように、一定のアミノ酸を、典型的には、「疎水性」または「親水性」アミノ酸および/または「極性」または「非極性」の側鎖を有するアミノ酸として分類する。一方のアミノ酸の同型の他方のアミノ酸への置換を、しばしば、「相同的」置換と見なすことができる。典型的なアミノ酸分類を以下にまとめる。

30

アラニン	A l a	A	非極性	中性	1 . 8
アルギニン	A r g	R	極性	正電荷	- 4 . 5
アスパラギン	A s n	N	極性	中性	- 3 . 5
アスパラギン酸	A s p	D	極性	負電荷	- 3 . 5
システイン	C y s	C	非極性	中性	2 . 5
グルタミン酸	G l u	E	極性	負電荷	- 3 . 5
グルタミン	G l n	Q	極性	中性	- 3 . 5
グリシン	G l y	G	非極性	中性	- 0 . 4
ヒスチジン	H i s	H	極性	正電荷	- 3 . 2
イソロイシン	I l e	I	非極性	中性	4 . 5
ロイシン	L e u	L	非極性	中性	3 . 8
リジン	L y s	K	極性	正電荷	- 3 . 9
メチオニン	M e t	M	非極性	中性	1 . 9
フェニルアラニン	P h e	F	非極性	中性	2 . 8

40

50

プロリン	Pro	P	非極性	中性	- 1 . 6
セリン	Ser	S	極性	中性	- 0 . 8
トレオニン	Thr	T	極性	中性	- 0 . 7
トリプトファン	Trp	W	非極性	中性	- 0 . 9
チロシン	Tyr	Y	極性	中性	- 1 . 3
バリン	Val	V	非極性	中性	4 . 2

多義アミノ酸		3文字	1文字	
アスパラギンまたはアスパラギン酸	Asx		B	
グルタミンまたはグルタミン酸	Glx		Z	
ロイシンまたはイソロイシン	Xle		J	
不特定または未知のアミノ酸	Xaa		X	

当該分野で周知のように、アミノ酸または核酸配列を、種々のアルゴリズム（市販のコンピュータプログラムで利用可能なアルゴリズム（ヌクレオチド配列用のBLASTNならびにアミノ酸配列用のBLASTP、gapped BLAST、およびPSI-BLASTなど）が含まれる）のいずれかを使用して比較することができる。例示的なかかるプログラムは、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215 (3): 403 - 410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; および Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999（その全てが本明細書中で参考として援用される）に記載されている。相同配列の同定に加えて、上記のプログラムにより、典型的には、相同性の指標が得られる。いくつかの実施形態では、2つの配列は、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを超えるその対応する残基が残基の関連ストレッチと相同である場合、実質的に相同であると見なされる。いくつかの実施形態では、関連ストレッチは完全な配列である。いくつかの実施形態では、関連ストレッチは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、またはそれを超える残基である。

【0066】

実質的同一性：句「実質的同一性」を、本明細書中で、アミノ酸配列間または核酸配列間の比較をいうために使用する。当業者に認識されるように、2つの配列は、一般に、対応する位置に同一の残基を含む場合、「実質的に同一」であると見なされる。当該分野で周知のように、アミノ酸または核酸配列を、種々のアルゴリズム（市販のコンピュータプログラムで利用可能なアルゴリズム（ヌクレオチド配列用のBLASTNならびにアミノ酸配列用のBLASTP、gapped BLAST、およびPSI-BLASTなど）が含まれる）のいずれかを使用して比較することができる。例示的なかかるプログラムは、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215 (3): 403 - 410, 19

10

20

30

40

50

90; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; および Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999 (その全てが本明細書中で参考として援用される)に記載されている。同一配列の同定に加えて、上記のプログラムにより、典型的には、同一性の指標が得られる。いくつかの実施形態では、2つの配列は、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを超えるその対応する残基が残基の関連ストレッチと同一である場合、実質的に同一であると見なされる。いくつかの実施形態では、関連ストレッチは完全な配列である。いくつかの実施形態では、関連ストレッチは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、またはそれを超える残基である。

10

20

【0067】

～に罹患する：疾患、障害、および/または容態（例えば、インフルエンザ感染症）「に罹患し」ている個体は、疾患、障害、および/または容態と診断されており、そして/またはその1つ以上の症状を示す。

【0068】

～に罹患しやすい：疾患、障害、および/または容態（例えば、インフルエンザ感染症）「に罹患しやすい」個体は、疾患、障害、および/または容態と診断されていない。いくつかの実施形態では、疾患、障害、および/または容態に罹患しやすい個体は、疾患、障害、および/または容態の症状を示し得る。いくつかの実施形態では、疾患、障害、および/または容態に罹患しやすい個体は、疾患、障害、および/または容態の症状を示さないかもしれない。いくつかの実施形態では、疾患、障害、および/または容態に罹患しやすい個体は、疾患、障害、および/または容態を発症するであろう。いくつかの実施形態では、疾患、障害、および/または容態に罹患しやすい個体は、疾患、障害、および/または容態を発症しないであろう。

30

【0069】

治療薬：本明細書中で使用する場合、句「治療薬」は、被験体に投与した場合に治療効果を有し、そして/または所望の生物学および/または薬理学的効果を誘発する任意の薬剤をいう。いくつかの実施形態では、治療薬は、インフルエンザ感染症の緩和、改善、低減、阻害、予防、その発症の遅延、その重症度の低減、および/またはその1つ以上の症状または特徴の発生の低減のために使用することができる任意の物質である。

40

【0070】

治療有効量：本明細書中で使用する場合、用語「治療有効量」は、疾患、障害、および/または容態（例えば、インフルエンザ感染症）に罹患しているか罹患しやすい被験体に投与した場合に疾患、障害、および/または容態の処置、診断、予防、および/またはその発症の遅延に十分な本発明の組成物の量を意味する。

【0071】

処置：本明細書中で使用する場合、用語「処置 (treat)」、「処置 (treatment)」、または「処置 (treating)」は、疾患、障害、および/または容態（例えば、インフルエンザ感染症）の部分的または完全な緩和、改善、軽減、阻害、予

50

防、その発症の遅延、その重症度の低減、および/またはその1つ以上の症状または特徴の発生の軽減のために使用される任意の方法をいう。疾患、障害、および/または容態の徴候を示さない被験体に処置 (t r e a t m e n t) を施すことができる。いくつかの実施形態では、疾患、障害、および/または容態に関連する病態の発症リスクの軽減のために、疾患、障害、および/または容態の初期徴候のみを示す被験体に処置 (t r e a t m e n t) を施すことができる。

【 0 0 7 2 】

アンブレラトポロジ- : 句「アンブレラトポロジ-」を、本明細書中で、一定のグリカン、特にHA受容体上に結合したグリカンによって採用される三次元配置をいうために使用する。本発明は、アンブレラトポロジ-グリカンへの結合がヒト宿主の感染を媒介するHAタンパク質に特徴的であるという認識を含む。図5に示すように、アンブレラトポロジ-は、典型的には2-6シリアル化グリカンのみによって採用され、長鎖(例えば、テトラサッカリドを超える)オリゴサッカリドの典型である。いくつかの実施形態では、アンブレラ-トポロジ-グリカンは、図5A中に示した構造(右のパネル)と実質的に類似する三次元構造を示すグリカンである。いくつかの実施形態では、アンブレラ-トポロジ-グリカンは、図5B-2(右のパネル)および図6(右のパネル)に示すアミノ酸残基を介してHAポリペプチドに接触するグリカンである。いくつかの実施形態では、アンブレラ-トポロジ-グリカンは、図5B-2(右のパネル)に示すアミノ酸結合ポケットと接触し、そして/または特異的に結合することができるグリカンである。いくつかの実施形態では、グリカン構造トポロジ-を、S i a の C₂と、G a l の C₁と、G l c N A c の C₁との間の角度として定義したパラメータに基づいて分類する。 < 1 0 0 ° の値は、2-3および短鎖2-6グリカンによって採用されるコーン様トポロジ-を示す。 > 1 1 0 ° の値は、アンブレラ様トポロジ-(長鎖2-6グリカンによって採用されるトポロジ-など)(図6)を示す。アンブレラトポロジ-の例を、N e u 5 A c 2-6 G a l 結合の角およそ60によって示す。図8は、アンブレラトポロジ-を採用することができるグリカンの一定の代表的な(しかし、包括的ではない)例を示す。図8中に示す長鎖2-6モチーフは、生物学的N結合グリカン、O結合グリカン、および糖脂質の一部として見出された長鎖(例えば、少なくともトリサッカリド)に非還元末端で連結したN e u 5 A c 2-6を含む。ボックスで囲んだ挿入図は、HAと高親和性で結合する生物学的グリカンの一部として見出されるアンブレラ-トポロジ-長鎖2-6グリカン部分の例を示す。いくつかの実施形態では、アンブレラ-トポロジ-グリカン(例えば、ある部位)は、短鎖2-6(例えば、単一のラクトサミン)分枝よりも高い比率で長鎖(例えば、複数のラクトサミン単位)2-6オリゴサッカリド分枝を含む。いくつかの実施形態では、アンブレラ-トポロジ-グリカン(例えば、ある部位)は、短い2-6(例えば、単一のラクトサミン)分枝よりも約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約20倍、約50倍、または約50倍を超える長鎖2-6オリゴサッカリド分枝を含む。一定の実施形態では、アンブレラ-トポロジ-グリカンおよび/またはグリカンドコイとのHA相互作用の固有の特徴は、非還元末端にシアル酸(SA)および/またはSAアナログを含むグリカンとのHA接触である。いくつかの実施形態では、オリゴサッカリドの鎖長は、少なくともトリサッカリド(SAまたはSAアナログ以外)である。いくつかの実施形態では、図5Aおよび5B-2(右側のパネル)中に示した付番した残基の組み合わせは、アンブレラ様トポロジ-との接触に関与する。一定の実施形態では、アンブレラトポロジ-グリカンは、以下の形態のオリゴサッカリドである。

N e u 5 A c 2-6 S u g 1 - S u g 2 - S u g 3

(式中、

(a) N e u 5 A c 2-6は、典型的には(しかし、必須ではない)、非還元末端に存在する。

(b) S u g 1 :

(i) または 立体配置(頻繁には、N結合およびO結合伸長については、ならびに糖タンパク質にO結合したG a l N A c - の場合は) のヘキソース(頻繁には、G

10

20

30

40

50

a l または G l c) またはヘキソサミン (G l c N A c または G a l N A c) であり、
 (i i) N e u 5 A c 2 - 6 以外の糖は、いかなる S u g 1 の非還元位置にも結合せず (S u g 1 が糖タンパク質に O 結合した G a l N A c - である場合を除く)、そして / または

(i i i) 非糖部分 (硫酸、リン酸、グアニジウム、アミン、N - アセチルなど) を、
 S u g 1 の非還元位置 (典型的には 6 位) に結合することができる (例えば、H A との接触を改善するため) 。

(c) S u g 2 および / または S u g 3 は、

(i) または 立体配置 (頻繁には、) のヘキソース (頻繁には、G a l または G l c) またはヘキソサミン (G l c N A c または G a l N A c) であり、そして / または
 (i i) 糖 (F u c など) または非糖部分 (硫酸、リン酸、グアニジウム、アミン、N - アセチルなど) を S u g 2、S u g 3、および / または S u g 4 の非還元位置に結合することができる。

(d) N e u 5 A c 2 - 6 結合から離れたオリゴサッカリド中の任意の 2 つの糖の間の結合は、1 - 2、1 - 3、1 - 4、および / または 1 - 6 (典型的には、1 - 3 または 1 - 4) であり得る。そして / または

(e) N e u 5 A c 2 - 6 が G a l N A c に結合し、これが糖タンパク質に O 結合し、さらなる糖が G a l N A c の非還元末端に結合した構造 (例えば、

(i) N e u 5 A c 2 - 6 (N e u 5 A c 2 - 3 G a l 1 - 3) G a l N A c

(i i) N e u 5 A c 2 - 6 (G a l 1 - 3) G a l N A c)) 。

【 0 0 7 3 】

アンブレラトポロギー遮断薬 (U T B A) : 本明細書中で使用する場合、用語「アンブレラトポロギー遮断薬」は、アンブレラトポロギーグリカンを有する H A 受容体に結合する薬剤をいう。いくつかの実施形態では、U T B A は、ヒト上気道中に見出されるアンブレラトポロギーグリカンを有する H A 受容体に結合する。U B T A は、アンブレラトポロギーグリカンおよび / またはコートポロギーグリカンのいずれかに結合することができる。いくつかの実施形態では、U T B A は、コートポロギーグリカンに対する親和性の 5 0、1 0 0、1 5 0、または 2 0 0 % でアンブレラトポロギーグリカンに選択的に結合する。いくつかの実施形態では、U T B A は、コートポロギーグリカンに対する親和性の 5 0 ~ 1 5 0 % でアンブレラトポロギーグリカンに選択的に結合する。いくつかの実施形態では、U T B A は、コートポロギーグリカンとほぼ同一の親和性でアンブレラトポロギーグリカンに結合する。例えば、いくつかの実施形態では、U T B A は、コートポロギーグリカン (例えば、3 ' S L N - L N) への結合の約 5 0 ~ 2 0 0 %、5 0 ~ 1 5 0 %、またはほぼ同一の親和性でアンブレラトポロギーグリカン (例えば、6 ' S L N - L N) に結合する。いくつかの実施形態では、U T B A は、受容体のグリカントポロギー (例えば、アンブレラまたはコーン) に基づいて、インフルエンザウイルス粒子 (例えば、ヒトまたはトリインフルエンザウイルス) の H A 受容体への結合を選択的に阻害する。いくつかの実施形態では、U T B A はポリペプチドである。いくつかのかかる実施形態では、U T B A ポリペプチドは、天然に存在するポリペプチドのアミノ酸配列と実質的に同一であるか実質的に相同なアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、U T B A ポリペプチドは H A ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、U T B A ポリペプチドは天然に存在する H A ポリペプチドまたはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、U T B A ポリペプチドは、H A ポリペプチドのアミノ酸配列に関連しないアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、U T B A ポリペプチドは抗体またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、U T B A ポリペプチドはレクチン (例えば、S N A - 1) である。いくつかの実施形態では、U T B A はポリペプチドではない。いくつかの実施形態では、U T B A は小分子である。いくつかの実施形態では、U T B A は核酸である。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

アンブレラトポロジューグリカン模倣物：「アンブレラトポロジューグリカン模倣物」は、本明細書中に記載の結合剤に結合するアンブレラトポロジューグリカン以外の薬剤である。いくつかの実施形態では、アンブレラトポロジューグリカン模倣物は、HAポリペプチドに結合する薬剤である。いくつかのかかる実施形態では、アンブレラトポロジューグリカン模倣物は、残基136、137、145、153、155、156、159、186、187、189、190、192、193、194、196、222、225、226、228、およびその組み合わせからなる群から選択されるHAポリペプチド残基と相互作用する薬剤である。いくつかのかかる実施形態では、アンブレラトポロジューグリカン模倣物は、残基からなる群から選択されるHAポリペプチド残基と相互作用する薬剤である。いくつかのかかる実施形態では、アンブレラトポロジューグリカン模倣物は、残基156、159、189、192、193、196、およびその組み合わせからなる群から選択されるHAポリペプチド残基と相互作用する薬剤である。いくつかのかかる実施形態では、アンブレラトポロジューグリカン模倣物は、残基186、187、189、190、およびその組み合わせからなる群から選択されるHAポリペプチド残基と相互作用する薬剤である。いくつかのかかる実施形態では、アンブレラトポロジューグリカン模倣物は、残基137、145、190、226、228、およびその組み合わせからなる群から選択されるHAポリペプチド残基と相互作用する薬剤である。いくつかのかかる実施形態では、アンブレラトポロジューグリカン模倣物は、残基190、222、225、226、およびその組み合わせからなる群から選択されるHAポリペプチド残基と相互作用する薬剤である。いくつかのかかる実施形態では、アンブレラトポロジューグリカン模倣物は、残基136、153、155、194、およびその組み合わせからなる群から選択されるHAポリペプチド残基と相互作用する薬剤である。いくつかのかかる実施形態では、アンブレラトポロジューグリカン模倣物は、残基222、225、および226からなる群から選択されるHAポリペプチド残基と相互作用する薬剤である。いくつかのかかる実施形態では、アンブレラトポロジューグリカン模倣物は、残基190、192、193、および225からなる群から選択されるHAポリペプチド残基と相互作用する薬剤である。いくつかのかかる実施形態では、アンブレラトポロジューグリカン模倣物は、残基186、193、および222からなる群から選択されるHAポリペプチド残基と相互作用する薬剤である。上記のアミノ酸位置がH3 HA付番方式に基づくことに留意のこと。一定の実施形態では、HAトポロジューグリカン模倣物は、アンブレラトポロジューグリカンとHAポリペプチドとの相互作用を競合する薬剤である。

【 0 0 7 5 】

アンブレラトポロジュー特異的遮断薬 (UTSBA)：本明細書中で使用する場合、用語「アンブレラトポロジュー特異的遮断薬」は、ヒト上気道中に見出されるアンブレラトポロジューグリカンを有するHA受容体に結合する薬剤をいう。UTSBAは、アンブレラトポロジューグリカンHAに選択的に結合する。例えば、UTSBAは、コートポロジューグリカン(例えば、3'SLN-LN)への結合よりも少なくとも約2、4、5、または10倍の親和性でアンブレラトポロジューグリカン(例えば、6'SLN-LN)に結合する。典型的には、UTSBAのアンブレラトポロジューグリカンに対する親和性は、1nM超である。典型的には、UTSBAのコートポロジューグリカンに対する親和性は、アンブレラトポロジューグリカンのヒト適合HA(SC18、Mos99、Tx91など)および2-6結合植物レクチン(SNA-Iなど)への結合親和性の少なくとも2~3桁小さい。用量依存性直接結合アッセイによって測定した場合のUTSBAの結合親和性は、典型的には少なくとも1nMであろう。典型的には、UTSBAのコートポロジューグリカンに対する親和性は、コートポロジューグリカンのトリHA(Viet0405、Av18など)への結合親和性よりほぼ1~3桁小さい。いくつかの実施形態では、グリカントポロジュー(例えば、アンブレラまたはコーン)に基づいて、UTSBAは、インフルエンザ

10

20

30

40

50

ウイルス粒子（例えば、ヒトまたはトリインフルエンザウイルス）のHA受容体（例えば、H1、H2、もしくはH3またはヒト適合H5、H7、もしくはH9）への結合を選択的に阻害する。いくつかの実施形態では、UTSBAはポリペプチドである。いくつかのかかる実施形態では、UTSBAポリペプチドは、天然に存在するポリペプチドのアミノ酸配列と実質的に同一であるか実質的に相同であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、UTSBAポリペプチドはHAポリペプチドである。いくつかの実施形態では、UTSBAポリペプチドは天然に存在するHAポリペプチドまたはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、UTSBAポリペプチドは、HAポリペプチドのアミノ酸配列に関連しないアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、UTSBAポリペプチドは抗体またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、UTSBAポリペプチドはレクチン（例えば、SNA-1）である。いくつかの実施形態では、UTSBAはポリペプチドではない。いくつかの実施形態では、UTSBAは小分子である。いくつかの実施形態では、UTSBAは核酸である。

10

【0076】

ワクチン接種：本明細書中で使用する場合、用語「ワクチン接種」は、例えば、疾患原因因子に対して免疫応答を生じさせることを意図する組成物の投与をいう。本発明の目的のために、ワクチン接種を、疾患原因因子への曝露前、曝露中、および/または曝露後、一定の実施形態では、因子への曝露前、曝露中、および/または曝露直後に施すことができる。いくつかの実施形態では、ワクチン接種は、ワクチン接種組成物の適切な間隔での複数の投与を含む。

20

【0077】

バリエーション：本明細書中で使用する場合、用語「バリエーション」は、目的の特定のポリペプチド（例えば、HAポリペプチド）とその配列が比較される「親」ポリペプチドとの間の関係を説明する相対語である。特定の位置での少数の配列の変化を別にすれば、目的のポリペプチドが親のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する場合、目的のポリペプチドは親ポリペプチドの「バリエーション」であると見なされる。典型的には、親と比較してバリエーション中の残基の20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満が置換されている。いくつかの実施形態では、バリエーションは、親と比較して10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個の置換された残基を有する。しばしば、バリエーションは、非常に少数（例えば、5、4、3、2、または1個未満）の置換された機能的残基（すなわち、特定の生物学的活性に関与する残基）を有する。さらに、親と比較して、バリエーションは、典型的には、せいぜい5、4、3、2、または1個の付加または欠失を有し、しばしば、付加や欠失を持たない。さらに、任意の付加または欠失は、典型的には、約25、20、19、18、17、16、15、14、13、10、9、8、7、6個未満であり、一般に、約5、4、3、または2残基未満である。いくつかの実施形態では、親ポリペプチドは、天然に見出されるポリペプチドである。例えば、親HAポリペプチドは、インフルエンザウイルスの天然（例えば、野生型）の単離体（例えば、野生型HA）中に見出されるポリペプチドである。いくつかの実施形態では、H1 HA親ポリペプチドは、表1に示した任意のインフルエンザ株のH1ポリペプチド特性に対応し得る。いくつかの実施形態では、バリエーションH1 HAポリペプチドは、表1に示した任意のインフルエンザ株の1つ以上のH1ポリペプチド特性と比較して、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、50、100個、または100個を超える置換、欠失、および/または付加を有する。

30

40

【0078】

ベクター：本明細書中で使用する場合、「ベクター」は、連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子をいう。いくつかの実施形態では、ベクターは、宿主細胞（真核細胞または原核細胞など）中に連結された核酸の染色体外の複製および/または発現が可能である。作動可能に連結された遺伝子の発現を指示することができるベクターを、本明細書中で「発現ベクター」という。

【0079】

50

野生型：当該分野で理解されるように、句「野生型」は、一般に、天然で見出されるようなタンパク質または核酸の通常の形態をいう。例えば、野生型HAポリペプチドは、インフルエンザウイルスの天然の単離体で見出される。種々の異なる野生型HA配列を、NCBIインフルエンザウイルス配列データベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>)中に見出すことができる。

【0080】

本発明の一定の特定の実施形態の詳細な説明

とりわけ、本発明は、H1N1インフルエンザ株で見出されるH1ポリペプチド（例えば、表1を参照のこと）と比較してヒト結合および/または感染性が増強されたH1N1 HAバリエーションを定義する。かかるバリエーションを、とりわけ、H1N1ウイルス、特にヒト結合および/または感染性が増強されたバリエーションによるヒト感染症を処置、軽減、および/または予防するためのワクチンおよび/または治療薬の成分として使用することができる。あるいはまたはさらに、かかるバリエーションを、ヒト感染性が増強されたH1N1バリエーションの発生および/または感染の検出のための系における標準として使用することができる。

10

【0081】

いくつかの態様では、本発明は、例えば、H1N1感染の検出で使用するためのH1N1 HAポリペプチドに特異的に結合する薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、ヒト感染性が増強されたH1N1バリエーションに特異的に結合する薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、ヒト感染性が増強されたH1N1バリエーションとヒト感染性が増強されていないH1N1バリエーションとを区別する薬剤を提供する。

20

【0082】

いくつかの態様では、本発明は、H1N1 HAポリペプチドと1つ以上のグリカン（例えば、アンブレラ-トポロジーグリカン）との間の結合相互作用を干渉する（そして/または競合する）薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、H1N1 HAポリペプチドと1つ以上の2-6シアリル化グリカンとの間の結合相互作用を干渉する（そして/または競合する）薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、H1N1 HAポリペプチドと1つ以上の6'SLN-LNグリカンとの間の結合相互作用を干渉する（そして/または競合する）薬剤を提供する。いくつかの実施形態では、その結合相互作用が干渉されるH1N1 HAポリペプチドは、ヒト感染性が増強されたH1N1バリエーションである。

30

【0083】

血球凝集素(HA)

インフルエンザウイルスは、ウイルス粒子の膜内に包埋した2つの糖タンパク質（血球凝集素(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)）を含む脂質膜エンベロープによって特徴づけられるRNAウイルスである。16種の公知のHAサブタイプおよび9種のNAサブタイプが存在し、異なるインフルエンザ株を、株のHAおよびNAサブタイプの数に基づいて命名する。アミノ酸配列同一性および結晶構造の比較に基づいて、HAサブタイプは、2つの主要な群および4つのより小さなクレードに分類されている。異なるHAサブタイプは、必ずしも高いアミノ酸配列同一性を共有しないが、異なるHAサブタイプの全体的な三次元構造は相互に類似しており、分類のために使用することができるいくつかのわずかな相違を有する。例えば、中心の-ヘリックスに対する膜遠位サブドメインの特定の方向は、HAサブタイプを決定するために一般に使用される1つの構造的な特徴である(Russell et al., *Virology*, 325:287, 2004)。

40

【0084】

HAは、H1~H16と呼ばれる16種のサブタイプのうちの1つのホモトリマーとして膜内に存在する。今までのところ、これらのサブタイプのうちのわずか3種(H1、H2、およびH3)のみがヒト感染に適應するようになっている。ヒト感染に適應しているHA（例えば、パンデミックH1N1(1918)およびH3N2(1967-68)イ

50

ンフルエンザサブタイプ由来のHA)の報告された1つの特徴は、2-3シアリル化グリカンに優先的に結合するそのトリ前駆体と比較した2-6シアリル化グリカンに優先的に結合する能力である(Skehel & Wiley, *Annu Rev Biochem*, 69:531, 2000; Rogers, & Paulson, *Virology*, 127:361, 1983; Rogers et al., *Nature*, 304:76, 1983; Sauter et al., *Biochemistry*, 31:9609, 1992; Connor et al., *Virology*, 205:17, 1994; Tumpey et al., *Science*, 310:77, 2005(その全てが本明細書中で参考として援用される))。しかし、本発明者らは、ヒト宿主への感染能力が特定の結合のグリカンへの結合とあまり相関せず、特定のトポロジーのグリカンへの結合との相関がより高いことを発見した(例えば、米国特許出願公開第2009/0269342号、同第2010/0004195号、および同第2010/0125043号(その全てが本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。したがって、本発明者らは、ヒト感染を媒介するHAがアンブレラトポロジーグリカンに結合し、しばしば、(コーン-トポロジーグリカンが2-6シアリル化グリカンであり得るか、含み得るにもかかわらず)コーントポロジーグリカンよりもアンブレラトポロジーグリカンの優先を示すことを証明している。

【0085】

(2-3および2-6結合の両方の)シアリル化オリゴサッカリドに結合したH1(ヒトおよびブタ)、H3(トリ)、およびH5(トリ)サブタイプ由来のHAのいくつかの結晶構造が利用可能であり、HAのこれらのグリカンとの明確な相互作用に関する特異的アミノ酸に関する分子的洞察を提供する(Eisen et al., *Virology*, 232:19, 1997; Ha et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:11181, 2001; Ha et al., *Virology*, 309:209, 2003; Gambelin et al., *Science*, 303:1838, 2004; Stevens et al., *Science*, 303:1866, 2004; Russell et al., *Glycoconj J* 23:85, 2006; Stevens et al., *Science*, 312:404, 2006(その全てが本明細書中で参考として援用される))。

【0086】

例えば、単独または2-3または2-6シアリル化オリゴサッカリドに結合したH5(A/アヒル/シンガポール/3/97)の結晶構造により、結合したグリカンと直接相互作用する一定のアミノ酸が同定され、1つ以上の分離度が除去されたアミノ酸も同定される(Stevens et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11181, 2001(本明細書中で参考として援用される))。場合によっては、これらの残基の高次構造は、結合状態と非結合状態とで異なる。例えば、Glu190、Lys193、およびGln226は全て直接結合相互作用に参与し、結合状態と非結合状態とで異なる高次構造を有する。Glu190の近位のAsn186の高次構造もまた、結合状態と非結合状態とで有意に異なる。

【0087】

HAポリペプチド

本発明は、HAポリペプチドを提供する。本明細書中で使用する場合、用語「HAポリペプチド」は、HAポリペプチドのフラグメント、HAポリペプチドの一部(例えば、特徴的部分)、および/またはHAポリペプチドのバリエーションを含むと理解される。HAポリペプチドフラグメント、HAポリペプチドの一部、およびバリエーションHAポリペプチドを、以下に「HAポリペプチドの一部および/またはフラグメント」および「バリエーションHAポリペプチド」と表題をつけた小節中により詳細に記載している。

【0088】

本発明は、特に、HA H1ポリペプチドを提供する。本明細書中で使用する場合、用語「H1ポリペプチド」は、H1ポリペプチドのフラグメント、H1ポリペプチドの一部

10

20

30

40

50

(例えば、特徴的部分)、および/またはH1バリエーションであるポリペプチドを含むと理解される。H1ポリペプチドフラグメント、H1ポリペプチドの一部、およびH1バリエーションポリペプチドを、以下に「HAポリペプチドの一部および/またはフラグメント」および「バリエーションHAポリペプチド」と表題をつけた小節中により詳細に記載している。

【0089】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチドは、アンブレラトポロジグリカンに関して指定の結合特性を有する単離HAポリペプチドである。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドは、アンブレラトポロジグリカンに関して指定の結合特性を有する改変HAポリペプチドである。

【0090】

いくつかの実施形態では、指定の結合特性を有する提供したHAポリペプチドはH1ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、提供したHAポリペプチドは、基準H1HAポリペプチドと比較してヒト結合および/または感染性が增强されたH1HAバリエーションポリペプチドである。いくつかの実施形態では、かかるH1HAバリエーションポリペプチドを改変する。いくつかの実施形態では、かかるH1HAバリエーションポリペプチドを、環境下で見出されたインフルエンザ株から単離する。ヒト結合および/または感染性が增强された例示的なH1HAバリエーションポリペプチドには、インフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918、2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)、A/ブタ/アイオワ/15/1930中に存在するH1HAポリペプチド(例えば、そのフラグメントおよび/またはその特徴的部分)が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ヒト結合および/または感染性が增强されたH1HAバリエーションポリペプチド(インフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918、2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)、およびA/ブタ/アイオワ/15/1930中に存在するH1HAポリペプチドなど)を、さらにより增强されたヒト結合および/または感染性を示すように改変する。いくつかの実施形態では、ヒト結合および/または感染性が增强されたH1HAポリペプチドは、インフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918、2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)、A/ブタ/アイオワ/15/1930中で見出されたH1ポリペプチドを特異的に排除する。

【0091】

いくつかの実施形態では、基準H1HAポリペプチドには、表1中に示す1つ以上の株由来のHAタンパク質が含まれる。いくつかの実施形態では、基準H1HAポリペプチドには、GISAIDインフルエンザポータルデータベース(<http://platform.gisaid.org/dante-cms/live/struktur.jdante?aid=1131>)および/またはNCBIFluデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>)の一方または両方に列挙された2009A/H1N1「ブタインフルエンザ」単離体中に見出される任意のH1HAが含まれる。

表1：2009A/H1N1中で見出された例示的なH1HAポリペプチドの配列

【0092】

10

20

30

40

【表 1】

株	H1 HA 配列
A/カリフォルニア /04/2009	MKA I L V V L L Y T F A T A N A D T L C I G Y H A N N S T D T V D T V L E K N V T V T H S V N L L E D K H N G K L C K L R G V A P L H L G K C N I A G W I L G N P E C E S L S T A S S W S Y I V E T P S S D N G T C Y P G D F I D Y E E L R E Q L S S V S F E R F E I F P K T S S W P N H D S N K G V T A A C P H A G A K S F Y K N L I W L V K K G N S Y P K L S K S Y I N D K G K E V L V L W G I H H P S T S A D Q Q S L Y Q N A D T Y V F V G S S R Y S K K F K P E I A I R P K V R D Q E G R M N Y Y W T L V E P G D K I T F E A T G N L V V P R Y A F A M E R N A G S G I I I S D T P V H D C N T T C Q T P K G A I N T S L P F Q N I H P I T I G K C P K Y V K S T K L R L A T G L R N I P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y G Y H H Q N E Q G S G Y A A D L K S T Q N A I D E I T N K V N S V I E K M N T Q F T A V G K E F N H L E K R I E N L N K K V D D G F L D I W T Y N A E L L V L L E N E R T L D Y H D S N V K N L Y E K V R S Q L K N N A K E I G N G C F E F Y H K D N T C M E S V K N G T Y D Y P K Y S E E A K L N R E E I D G V K L E S T R I Y Q I L A I Y S T V A S S L V L V V S L G A I S F W M C S N G S L Q C R I C I (配列番号 46)
A/テキサス/15/09	MKA I L V V L L Y T F A T A N A D T L C I G Y H A N N S T D T V D T V L E K N V T V T H S V N L L E D K H N G K L C K L R G V A P L H L G K C N I A G W I L G N P E C E S L S T A S S W S Y I V E T S S S D N G T C Y P G D F I D Y E E L R E Q L S S M S S F E R F E I F P K T S S W P N H D S N K G V T A A C P H A G A K S F Y K N L I W L V K K G N S Y P K L S K S Y I N D K G K E V L V L W G I H H P S T S A D Q Q S L Y Q N A D A Y V F V G S S R Y S K K L K P E I A I R P K V R D Q E G R M N Y Y W T L V E P G D K I T F E A T G N L V V P R Y A F A M E R N A G S G I I I S D T P V H D C N T T C Q T P K G A I N T S L P F Q N I H P I T I G K C P K Y V K S T K L R L A T G L R N V P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y G Y H H Q N E Q G S G Y A A D L K S T Q N A I D E I T N K V N S V I E K M N T Q F T A V G K E F N H L E K R I E N L N K K V D D G F L D I W T Y N A E L L V L L E N E R T L D Y H D S N V K N L Y E K V R S Q L K N N A K E I G N G C F E F Y H K D N T C M E S V K N G T Y D Y P K Y S E E A K L N R E E I D G V K L E S T R I Y Q I L A I Y S T V A S S L V L V V S L G A I S F W M C S N G S L Q C R I C I (配列番号 47)
A/メキシコ/4482/09	MKA I L V V L L Y T F A T A N A D T L C I G Y H A N N S T D T V D T V L E K N V T V T H S V N L L E D K H N G K L C K L R G V A P L H L G K C N I A G W I L G N P E C E S L S T A S S W S Y I V E T S S S D N G T C Y P G D F I D Y E E L R E Q L S S V S F E R F E I F P K T S S W P N H D S N K G V T A A C P H A G A K S F Y K N L I W L V K K G N S Y P K L S K S Y I N D K G K E V L V L W G I H H P S T S A D Q Q S L Y Q N A D A Y V F V G S S R Y S K K F K P E I A I R P K V R D Q E G R M N Y Y W T L V E P G D K I T F E A T G N L V V P R Y A F A M E R N A G S G I I I S D T P V H D C N T T C Q T P K G A I N T S L P F Q N I H P I T I G K C P K Y V K S T K L R L A T G L R N V P S I Q S R G L F G A I A G F I E G G W T G M V D G W Y G Y H H Q N E Q G S G Y A A D L K S T Q N A I D E I T N K V N S V I E K M N T Q F T A V G K E F N H L E K R I E N L N K K V D D G F L D I W T Y N A E L L V L L E N E R T L D Y H D S N V K N L Y E K V R S Q L K N N A K E I G N G C F E F Y H K D N T C M E S V K N G T Y D Y P K Y S E E A K L N R E E I D G V K L E S T R I Y Q I L A I Y S T V A S S L V L V V S L G A I S F W M C S N G S L Q C R I C I (配列番号 48)

10

20

30

インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918 および A / ブタ / アイオワ / 1
5 / 1930 中に見出される H1 HA ポリペプチドの配列を、表 2 中に示す。

表 2 : パンデミック H1 インフルエンザ株由来の例示的な H1 HA ポリペプチドの配列
【 0 0 9 3 】

40

【表 2】

株	H1 HA 配列
A/サウスカロライナ /1/1918	MEARLLVLLCAFAATNADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHN GKLCCKLKG IAPLQLGKCN IAGWLLGNPECDLLL TASSWSY I VETSNSENGT CYPG DFIDYEELREQLSSVSSFEKFE I FPKTSSWPNHETTKGVTAACSYAGASSFYRNL LWLTKKGSSYPKLSKSYVNNKGKEVLVLWGVHHPPTGTDQQSLYQNADAYVSVGS SKYNRRFTPE I AARPVKVRDQAGRMNYYWTLLEPGDT I TFEATGNL I APWYAFALN RGS GSG I I TSDAPVHDCNTKCQTPHGA I NSSLPFQNIHPVT I GECPKYVRSTKLR MATGLRN I PSI QSRGLFGA I AGF I EGGWTGM I DGWYGYHHQNEQSGYAADQKST QNA I DG I TNKVNSV I EKMNTQFTAVGKEFNLERRIENLNKKVDDGFLDIWYNA ELLVLENER T LDFHDSNVRNLYEKVKSQKNNAKE I GNGCFEFYHKCDDACMES VRNGTYDYPKYSEESKLNREE I DGVKLESMGVYQ I LA I YSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI (配列番号 49)
A/ブタ/IA/15/1930	MKA ILLVLLCAFAATNADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHN GKLCRLGG IAPLQLGKCN IAGXXLGNPECDLLLT VSSWSY I VETSNSDNGT CYPG DFIDYEELREQLSSVSSFEKFE I FPKTSSWPNHETTRGVTAACPYAGASSFYRNL LWL VKKENSYPKLSKSYVNNKGKEVLVLWGVHHPPTSTDQQSLYQNADAYVSVGS SKYDRRFTPE I AARPVKVRGQAGRMNYYWTLLEPGDT I TFEATGNL VAPRYAFALN RGSESG I I TSDAPVHDCDTCQTPHGA I NSSLPFQNIHPVT I GECPKYVKSTKLR MVTGLRN I PSI QSRGLFGA I AGF I EGGWTGL I DGWYGYHHQNGQSGYAADQKST QNA I DG I TNKVNSV I EKMNTQFTVVGKEFNLERRIKLNKKVDDGFLDVWYNA EMLVLENER T LDFHDSNVKNLYEKARSQLRNNAKE I GNGCFEFYHKCDDACMES VRNGTYDYPKYSEESKLNREE I DGVKLESMVYQ I LA I YSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI (配列番号 50)

10

20

いくつかの実施形態では、HAポリペプチド（例えば、H1ポリペプチド）は、インフルエンザワクチンの開発および/または調製に有用である。いくつかの実施形態では、HAポリペプチド（例えば、H1ポリペプチド）は、インフルエンザ治療薬の開発および/または調製に有用である。いくつかの実施形態では、HAポリペプチド（例えば、H1ポリペプチド）は、インフルエンザの診断に有用な試薬の開発および/もしくは調製ならびに/または患者がH1 HAインフルエンザウイルスに感染しているかどうかの決定に有用である。いくつかの実施形態では、HAポリペプチド（例えば、H1ポリペプチド）は、潜在的なパンデミックH1 HAインフルエンザウイルスの出現の監視に有用である。治療方法、予防方法、および診断方法を、「H1含有インフルエンザの検出」および「処置」と表題をつけた節中により詳細に記載している。

30

【0094】

バリエーションHAポリペプチド

一定の実施形態では、提供したHAポリペプチド（例えば、H1ポリペプチド）は、少数の特定の配列の変化を別にすればそのアミノ酸配列が親HAのアミノ酸配列と同一であるという点で、親HAポリペプチドのバリエーションである。いくつかの実施形態では、親HAは、インフルエンザウイルスの天然の単離体中に見出されるHAポリペプチド（例えば、野生型HAポリペプチド）である。いくつかの実施形態では、親HAは、表1に記載のHAのうちの一つである。以下の「HAポリペプチドの一部および/またはフラグメント」と表題をつけた節に記載のように、本明細書中に記載の任意の一部および/またはフラグメントは、HAポリペプチドのフラグメントおよび/または特徴的部分であり得る。

40

【0095】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーションは、その対応する親HAポリペプチドと異なるグリカン結合特性を有する。いくつかの実施形態では、HAバリエーションポリペプチドは、その同族親HAポリペプチドよりも高いアンブレラグリカン（例えば、コーングリカンと比較して）に対する親和性および/または特異性を有する。一定の実施形

50

態では、かかるH Aポリペプチドバリエーションは、改変バリエーションである。

【0096】

いくつかの実施形態では、H Aバリエーションポリペプチドは、その同族親H Aポリペプチドよりも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超えるアンブレラグリカン（例えば、コーングリカンと比較して）に対する親和性および/または特異性を有する。いくつかの実施形態では、H Aバリエーションポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスは、その同族親H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスよりも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える増強されたヒト感染性を有する。

10

【0097】

いくつかの実施形態では、グリカン結合特性が変化したH Aポリペプチドバリエーションは、グリカン結合部位内またはグリカン結合部位に影響を及ぼす残基の配列変化を有する。いくつかの実施形態では、かかる置換は、結合したグリカンと直接相互作用するアミノ酸の置換であり、他の実施形態では、かかる置換は、1分離度が除去されたアミノ酸が、（1）直接結合アミノ酸と相互作用するか、（2）そうでなければ、直接結合アミノ酸がグリカンと相互作用する能力に影響を及ぼすが、グリカン自体と直接相互作用しないか、（3）そうでなければ、直接結合アミノ酸がグリカンと相互作用し、且つグリカン自体と直接相互作用もするという点で、結合したグリカンと相互作用するアミノ酸から1分離度が除去されたアミノ酸の置換である。H Aポリペプチドバリエーションは、1つ以上の直接結合アミノ酸の置換、1つ以上の第1の分離度 - アミノ酸の置換、1つ以上の第2の分離度 - アミノ酸の置換、またはこれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、H Aポリペプチドバリエーションは、1つ以上のアミノ酸のさらにより高い分離度との置換を含むことができる。

20

【0098】

いくつかの実施形態では、グリカン結合特性が変化したH Aポリペプチドバリエーションは、Neu5AcおよびGalを越えて糖と接触する残基の配列変化を有する（例えば、図6を参照のこと）。

【0099】

いくつかの実施形態では、H Aポリペプチドバリエーションは、野生型親H Aと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を有する。一定の実施形態では、H Aポリペプチドバリエーションは、同族野生型親H Aと比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または20を超えるアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、H Aポリペプチドバリエーションは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、または少なくとも500個の野生型アミノ酸残基によって分離された1つ以上のアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、かかるアミノ酸置換の約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%がグリカン結合部位内に存在する。いくつかの実施形態では、かかるアミノ酸置換の少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%がグリカン結合部位内に存在する。

30

40

【0100】

いくつかの実施形態では、H Aポリペプチドバリエーションは、野生型親H Aと比較して少なくとも1つのアミノ酸の付加および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、H Aポリペプチドバリエーションは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または20を超える残基の付加および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、H Aポリペプチドバリエーションは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくと

50

も10、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、または少なくとも500個の野生型アミノ酸残基によって分離された残基の1つ以上の付加および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、かかるアミノ酸の付加および/または欠失の約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%がグリカン結合部位内に存在する。いくつかの実施形態では、かかるアミノ酸の付加および/または欠失の少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%がグリカン結合部位内に存在する。

【0101】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーションは、同族野生型親HAと約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%同一である。

【0102】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーションは、同族野生型親HAの約10、約20、約30、約40、約50、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、または約550個のアミノ酸の連続ストレッチと約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%同一である。

【0103】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーションは、残基98、136、137、138、145、153、155、156、159、183、186、187、189、190、192、193、194、195、196、215、219、222、225、226、227、および228のうちの一つ以上に対応する位置に配列の置換、付加、および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーションは、残基156、159、189、192、193、および196のうちの一つ以上に対応する位置および/または残基186、187、189、および190のうちの一つ以上に対応する位置および/または残基190、222、225、および226のうちの一つ以上に対応する位置および/または残基137、145、190、226、および228のうちの一つ以上に対応する位置に配列の置換、付加、および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーションは、残基190、225、226、および228のうちの一つ以上に対応する位置に配列の置換、付加、および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、残基145、186、189、219、および/または227のうちの一つ以上に対応する配列の置換、付加、および/または欠失を有する。

【0104】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較してグリカンに直接結合するポリペプチド領域中に存在するアミノ酸から選択される残基(残基136、145(例えば、Lys145)、153、155、156、183、186、189、190、192、193、194、196、215、222、225、226、および/または227が含まれるが、これらに限定されない)に、一つ以上のアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較してグリカンに直接結合するポリペプチド領域に隣接して存在するアミノ酸から選択される残基(残基Ala/Thr137、Ala/Ser138、Pro/Ser186、Ser/Thr/Asn187、Ala/Thr189、Ile/Lys219、Glu/Ala227、および/またはLys222が含まれるが、これらに限定されない)に、一つ以上のアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、グリカンに直接結合するポリペプチド領域に隣接して存在するアミ

10

20

30

40

50

ノ酸は、グリカンに直接結合するポリペプチド領域中に存在するアミノ酸がHAポリペプチドと受容体との間の相互作用を媒介する能力に影響を及ぼす。少数であるが例を挙げると、いくつかの実施形態では、Ala/Thr137および/またはAla/Ser138は、Thr/Ser136および/またはGln226に影響を及ぼし、Pro/Ser186、Ser/Thr/Asn187、および/またはAla/Thr189はAsp190に影響を及ぼし、Ile/Lys219および/またはGlu/Ala227はPro/Ser186に影響を及ぼし、Glu227はLys222に影響を及ぼし、そして/またはLys222はAsp225に影響を及ぼす。

【0105】

一定の実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較して、1分離度が除去されたアミノ酸が、(1)直接結合アミノ酸と相互作用するか、(2)そうでなければ、直接結合アミノ酸がグリカンと相互作用する能力に影響を及ぼすが、グリカン自体と直接相互作用しないか、(3)そうでなければ、直接結合アミノ酸がグリカンと相互作用し、且つグリカン自体と直接相互作用もするという点で、結合したグリカンと相互作用するアミノ酸から1分離度が除去されたアミノ酸から選択される残基に1つ以上のアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する(残基Ala/Thr137、Ala/Ser138、Pro/Ser186、Ser/Thr/Asn187、Ala/Thr189、Ile/Lys219、Glu/Ala227、および/またはLys222が含まれるが、これらに限定されない)。

【0106】

一定の実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較して残基145にアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する。一定の実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較して残基186にアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する。一定の実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較して残基189にアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する。一定の実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較して残基219にアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する。一定の実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較して残基227にアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する。

【0107】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較して、145、186、189、219、および227から選択される残基に1つ以上のアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較して、残基186、189、および227に1つ以上のアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較して、残基186、189、225、および227に1つ以上のアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1ポリペプチドバリエーションは、野生型親HAと比較して、残基219および225に1つ以上のアミノ酸の置換、付加、および/または欠失を有する。

【0108】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1バリエーションは、以下のアミノ酸置換のうちの1つ以上を有する：Lys145Ser、Lys145Asn、Ile219Lys、Ser186Pro、Ala189Thr、Gly227Ala。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーション、特にH1バリエーションは、以下のアミノ酸置換のうちの1つ以上を有する：Lys145Ser、Lys145Asn、Ile219Lys、Ser186Pro、Ala189Thr、Asp225Glu、A

10

20

30

40

50

s p 2 2 5 A s n、またはA s p 2 2 5 G l y、および/またはG l y 2 2 7 A l a。いくつかの実施形態では、H Aポリペプチドバリエーションは、アミノ酸145位、186位、189位、219位、および/または227位のうちの1つ以上に少なくとも1つの付加および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、H Aポリペプチドバリエーションは、アミノ酸145位、186位、189位、219位、225位、および/または227位のうちの1つ以上に少なくとも1つの付加および/または欠失を有する。いくつかの実施形態では、H Aポリペプチドバリエーションは、アミノ酸137位、156位、186位、187位、189位、190位、193位、225位、226位、227位、および/または228位のうちの1つ以上に少なくとも1つの付加および/または欠失を有する。

【0109】

10

いくつかの実施形態では、H Aポリペプチドバリエーション、特にH1バリエーションは、以下のアミノ酸置換組のうちの1つ以上を有する。

【0110】

I l e 2 1 9 L y s
 S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、G l u 2 2 7 A l a
 S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r
 S e r 1 8 6 P r o、G l u 2 2 7 A l a
 A l a 1 8 9 T h r、G l u 2 2 7 A l a
 I l e 2 1 9 L y s、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、G l u 2 2 7 A l a
 I l e 2 1 9 L y s、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r
 I l e 2 1 9 L y s、S e r 1 8 6 P r o
 I l e 2 1 9 L y s、S e r 1 8 6 P r o、G l u 2 2 7 A l a
 I l e 2 1 9 L y s、G l u 2 2 7 A l a
 I l e 2 1 9 L y s、A l a 1 8 9 T h r、G l u 2 2 7 A l a
 I l e 2 1 9 L y s、G l u 2 2 7 A l a
 L y s 1 4 5 S e rまたはL y s 1 4 5 A s n
 L y s 1 4 5 S e rまたはL y s 1 4 5 A s n、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、G l u 2 2 7 A l a
 L y s 1 4 5 S e rまたはL y s 1 4 5 A s n、I l e 2 1 9 L y s
 A s p 2 2 5 A s n、I l e 2 1 9 L y s
 A s p 2 2 5 A s n、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、G l u 2 2 7 A l a
 A s p 2 2 5 G l y、I l e 2 1 9 L y s
 A s p 2 2 5 G l y、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、G l u 2 2 7 A l a
 A s p 2 2 5 G l u、I l e 2 1 9 L y s
 A s p 2 2 5 G l u、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、G l u 2 2 7 A l a

20

いくつかのかかる実施形態では、アンブレラグリカンに対するバリエーションの親和性および/または特異性が増加されるように、H Aポリペプチドは野生型H Aと比較して少なくとも1つのさらなる置換を有する。言い換えれば、H Aポリペプチドは、本段落中に列挙した1つ以上の任意のアミノ酸置換組および1つ以上のさらなるアミノ酸置換を含むことができる。少数であるが例を挙げると、H Aポリペプチドは、例えば、98位、136位、137位、138位、145位、153位、155位、156位、159位、183位、186位、187位、189位、190位、192位、193位、194位、195位、196位、215位、219位、222位、225位、226位、227位、および228位、および/またはその組み合わせに、本段落中に列挙した1つ以上の任意のアミノ酸置換組および1つ以上のさらなるアミノ酸置換を含むことができる。

30

40

【0111】

いくつかの実施形態では、H Aポリペプチドは、本節に記載の任意のアミノ酸位置および/またはアミノ酸位置組の少なくとも1つの付加および/または欠失を有する。

【0112】

いくつかの実施形態では、H Aポリペプチド(H Aポリペプチドバリエーションが含まれる

50

)は、S145、N145、L219、P186、T189、および/またはA227を含む配列を有する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチド(HAポリペプチドバリエーションが含まれる)は、D190、D225、L226、および/またはS228を含む配列を有する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドは、D190およびD225を含む配列を有し、いくつかの実施形態では、HAポリペプチドは、L226およびS228を含む配列を有する。

【0113】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチドバリエーションは、親HA、特に親野生型HAと比較して開いた結合部位を有する。

【0114】

HAポリペプチドの一部および/またはフラグメント

本発明は、HAポリペプチドおよびこれをコードする核酸の特徴的部分を提供する。一般に、特徴的部分は、共にHAポリペプチドの特徴を示すアミノ酸の連続ストレッチまたはアミノ酸の連続ストレッチの集団を含む部分である。かかる各連続ストレッチは、一般に、少なくとも2つのアミノ酸を含むであろう。さらに、当業者は、典型的には、少なくとも5、10、15、20、またはそれを超えるアミノ酸がHAポリペプチドの特徴を示すために必要であると認識するであろう。一般に、特徴的部分は、上記指定の配列同一性に加えて、関連するインタクトなHAポリペプチドと少なくとも1つの機能的特徴を共有する部分である。いくつかの実施形態では、HAポリペプチドの特徴的部分は、関連する全長HAポリペプチドとグリカン結合特性を共有する。

【0115】

「バリエーションHAポリペプチド」と表題をつけた上の節中に記載のように、本明細書中に記載の任意の部分および/またはフラグメントは、バリエーションHAポリペプチド部分および/またはフラグメントであり得る。

【0116】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチドフラグメントおよび/またはHAポリペプチドの特徴的部分は、同族野生型親HAの約10、約20、約30、約40、約50、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、または約550アミノ酸の連続ストレッチに対応する。いくつかの実施形態では、かかる連続ストレッチは、非HAポリペプチド配列内という状況で、連続ストレッチの5'末端、3'末端、または5'末端および3'末端の両方に存在する。いくつかの実施形態では、非HAポリペプチド配列は、約1アミノ酸長、約2アミノ酸長、約3アミノ酸長、約4アミノ酸長、約5アミノ酸長、約6アミノ酸長、約7アミノ酸長、約8アミノ酸長、約9アミノ酸長、約10アミノ酸長、約15アミノ酸長、約20アミノ酸長、約25アミノ酸長、約50アミノ酸長、約75アミノ酸長、約100アミノ酸長、約250アミノ酸長、約500アミノ酸長、約750アミノ酸長、約1000アミノ酸長、約2000アミノ酸長、約3000アミノ酸長、約4000アミノ酸長、約5000アミノ酸長、約6000アミノ酸長、約7000アミノ酸長、約8000アミノ酸長、約9000アミノ酸長、約10,000アミノ酸長、または約10,000アミノ酸長超である。

【0117】

いくつかの実施形態では、2つ以上のHAポリペプチド、そのフラグメント、および/またはその特徴的部分(例えば、それぞれ、同族野生型親HAの約10、約20、約30、約40、約50、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、または約550個のアミノ酸の連続ストレッチに対応するもの)を、共にタンデムに融合する。いくつかの実施形態では、タンデムHAポリペプチドは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、100、または100個を超えるHAポリペプチド、そのフラグメント、および/またはその特徴的部分を含む。いくつかの実施形態では、かかるタンデム融合物中の各HAポリペプチド、そのフラグメント、および/またはその特徴的部分は、非HAポリペプチドリンカーによって相互にフラグメントおよび/または部分から分離されている。

10

20

30

40

50

【0118】

非HAポリペプチド

いくつかの実施形態では、本発明は、そのアミノ酸配列が特徴的なHA配列を含まないポリペプチドを提供する。かかるポリペプチドを、本明細書中で、「非HAポリペプチド」という。いくつかの実施形態では、非HAポリペプチドは、事前に選択された（例えば、合理的デザイン（例えば、基準配列と比較した戦略的アミノ酸変化（付加、欠失、および/または置換）の導入が含まれる）による）アミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、非HAポリペプチドは、確率論的に決定される（例えば、本明細書中に定義の望ましい結合特性に基づいて同定される）アミノ酸配列を有する。非HAポリペプチドは、本明細書中に記載の結合剤、干渉剤などであり得る。

10

【0119】

ポリペプチドの産生

ポリペプチド（例えば、HAポリペプチドおよび/または非HAポリペプチド）、そのバリエーション、そのフラグメント、および/またはその特徴的部分（および/またはこれらのいずれかをコードする核酸）を、任意の利用可能な手段によって産生することができる。

【0120】

ポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）を、例えば、ポリペプチドコード核酸を発現するように改変された宿主細胞系の利用によって産生することができる。

20

【0121】

任意の系を使用して、ポリペプチド（バリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）を産生することができる（卵、バキュロウイルス、植物、酵母、メイディン・ダービーイヌ腎臓細胞（MDCK）、またはペロ（アフリカミドリザル腎臓）細胞など）。あるいはまたはさらに、ポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）を、組換え技術を使用して（発現ベクターの使用（Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL Press, 1989（本明細書中で参考として援用される））などによる）細胞中に発現させることができる。

30

【0122】

あるいはまたはさらに、ポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）を、合成手段によって産生することができる。

【0123】

あるいはまたはさらに、ポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）、特にHAポリペプチドを、インタクトなウイルス中という状況（そうでなければ、野生型、弱毒化型、死菌型など）で産生することができる。ポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）を、ウイルス様粒子中という状況で産生することができる。

【0124】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）を、インフルエンザウイルスから単離および/または精製することができる。例えば、ウイルスを、卵（孵化鶏卵など）中で成長させることができ、この場合、採取した物質は典型的には尿膜腔液である。あるいはまたはさらに、インフルエンザウイルスは、ウイルスを成長させるための組織培養を使用した任意の方法によって誘導することができる。ウイルス成長に適切な細胞基質には、例えば、イヌ腎臓細胞（MDCKまたはMDCKのクローン由来の細胞、MDCK様細胞など）、サル腎臓細胞（AGMK細胞（ペロ細胞が含まれる）、連続細胞株としての培養上皮細胞、293T細胞、BK-21細胞、CV-1細胞など）、または商業的供給源（例えば、ATCC, Rockville, Md.）から容易に利用可能なワクチンを目的としたインフルエンザウイルス産生に適切な任意の他の哺乳動物細胞型が含まれる。適切な細胞基質には、ヒト

40

50

細胞（MRC-5細胞など）も含まれる。適切な細胞基質は細胞株に制限されず、例えば、初代細胞（ニワトリ胚線維芽細胞など）も含まれる。

【0125】

ポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）を、アンブレラ-トポロジ-グリカンに結合することができるポリペプチドのスクリーニングおよび/または選択が容易に可能な条件下で、ポリペプチド（単独または複合体の一部（ウイルス粒子またはウイルスの一部が含まれる））を産生する細胞または生物の培養によって生成、同定、単離、および/または産生することができることが当業者に認識されるであろう。一例であるが、いくつかの実施形態では、アンブレラトポロジ-グリカン（例えば、特定の特異性および/または親和性を有する）に結合するバリエーションが明らかになり、そして/または好む条件下で一連のポリペプチド（例えば、HAバリエーションポリペプチド）を産生および/または研究するのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、かかる一連のポリペプチド（例えば、HAバリエーションポリペプチド）は、自然界の進化に起因する。いくつかの実施形態では、かかる一連のポリペプチド（例えば、HAバリエーションポリペプチド）は、改変に起因する。いくつかの実施形態では、かかる一連のポリペプチド（例えば、HAバリエーションポリペプチド）は、改変と自然進化との組み合わせに起因する。

10

【0126】

核酸

一定の実施形態では、本発明は、HAポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）をコードする核酸を提供する。他の実施形態では、本発明は、HAポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）をコードする核酸に相補的な核酸を提供する。

20

【0127】

他の実施形態では、本発明は、HAポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）をコードする核酸とハイブリッド形成する核酸分子を提供する。かかる核酸を、例えば、プライマーまたはプローブとして使用することができる。少数であるが例を挙げると、かかる核酸を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）におけるプライマーとして、ハイブリッド形成（*in situ*ハイブリッド形成が含まれる）のためのプローブとして、および/または逆転写-PCR（RT-PCR）のためのプライマーとして使用することができる。

30

【0128】

一定の実施形態では、核酸はDNAまたはRNAであり得、一本鎖または二本鎖であり得る。いくつかの実施形態では、核酸は1つ以上の非天然ヌクレオチドを含むことができ、他の実施形態では、核酸は天然のヌクレオチドのみを含む。

【0129】

HAポリペプチド結合剤

本発明は、HAポリペプチド結合剤を提供する。いくつかの実施形態では、結合剤は、本明細書中に記載の1つ以上のHAポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）に結合する実体である。HAポリペプチド結合剤は、任意の化学型であり得る。いくつかの実施形態では、結合剤はポリペプチド（例えば、抗体または抗体フラグメントが含まれる）である。いくつかの実施形態では、かかる結合剤は小分子である。いくつかの実施形態では、かかる結合剤は核酸である。いくつかの実施形態では、かかる結合剤はアプタマーである。いくつかの実施形態では、結合剤はポリマーであり、いくつかの実施形態では、HAポリペプチド結合剤は非高分子である。いくつかの実施形態では、結合剤は炭水化物である。いくつかの実施形態では、HAポリペプチド結合剤はレクチンである。

40

【0130】

いくつかの実施形態では、結合剤は、H1 HAポリペプチド（そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分が含まれる）に結合する。いくつかの実施形態では

50

、結合剤は、ヒト結合および/または感染性が增強されたH1 HAポリペプチドバリエーション（例えば、そのフラグメントおよび/または特徴的部分）に結合する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチド結合剤は、同族親H1 HAポリペプチドへの結合よりも高い親和性でH1 HAポリペプチドバリエーションに結合する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチド結合剤は、同族親H1 HAポリペプチドへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超えて高い親和性で、H1 HAポリペプチドが增強されたヒト結合バリエーションに結合する。いくつかの実施形態では、HAポリペプチド結合剤は、その同族親HAポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超えて高い親和性でH1 HAポリペプチドが增強されたヒト結合バリエーションを発現するインフルエンザウイルスに結合する。

10

【0131】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチド結合剤は、アンブレラ-トポロジグリカンの構造および/または三次元特性を模倣する実体である。いくつかの実施形態では、かかる結合剤は、アンブレラ-トポロジグリカンであるか、これを含む。いくつかの実施形態では、かかる結合剤は、コーン-トポロジグリカンよりもアンブレラ-トポロジグリカンに密接に類似する実体である。

【0132】

いくつかの実施形態では、結合剤がHAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に結合する場合、HAポリペプチドは、HA受容体への結合を遮断される。したがって、いくつかの実施形態では、HAポリペプチド結合剤は、「HAポリペプチド干渉剤」と表題をつけた下記の節に記載のように、「干渉剤」として機能することもできる。

20

【0133】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチド結合剤は、特定のHAポリペプチド（例えば、そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分）に優先的に結合する。例えば、いくつかの実施形態では、結合剤は、非H1 HAポリペプチドと比較してH1 HAポリペプチドに優先的に結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、非H1 HAポリペプチドへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性でH1 HAポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、1つ以上の以下の変異：Lys145Ser、Lys145Asn、Ile219Lys、Ser186Pro、Ala189Thr、および/またはGlu227Alaを有するH1 HAポリペプチドに、1つ以上のこれらの変異を持たないH1 HAポリペプチドへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、Ile219Lys変異を有するH1 HAポリペプチドに、その変異を持たないH1 HAポリペプチドへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、Ser186Pro、Ala189Thr、およびGlu227Ala変異を有するH1 HAポリペプチドに、これらの変異を持たないH1 HAポリペプチドよりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、Lys145SerまたはLys145Asn変異を有するH1 HAポリペプチドに、これらの変異を持たないH1 HAポリペプチドへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、Lys145Ser / Lys145Asn、Ser186Pro、Ala189Thr、および

30

40

50

G l u 2 2 7 A l a 変異を有する H 1 H A ポリペプチドに、これらの変異を持たない H 1 H A ポリペプチドへの結合よりも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1000 倍、または 1000 倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、L y s 1 4 5 S e r / L y s 1 4 5 A s n、および I l e 2 1 9 L y s 変異を有する H 1 H A ポリペプチドに、これらの変異を持たない H 1 H A ポリペプチドへの結合よりも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1000 倍、または 1000 倍を超える親和性で結合する。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、結合剤は、H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、非 H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、15 倍、20 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1000 倍、または 1000 倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、1 つ以上の以下の変異：I l e 2 1 9 L y s、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、および/または G l u 2 2 7 A l a を有する H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、1 つ以上のこれらの変異を持たない H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1000 倍、または 1000 倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、I l e 2 1 9 L y s 変異を有する H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、その変異を持たない H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1000 倍、または 1000 倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、および G l u 2 2 7 A l a 変異を有する H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、これらの変異を持たない H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1000 倍、または 1000 倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、L y s 1 4 5 S e r または L y s 1 4 5 A s n 変異を有する H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、これらの変異を持たない H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1000 倍、または 1000 倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、L y s 1 4 5 S e r / L y s 1 4 5 A s n、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、および G l u 2 2 7 A l a 変異を有する H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、これらの変異を持たない H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1000 倍、または 1000 倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、L y s 1 4 5 S e r / L y s 1 4 5 A s n、および I l e 2 1 9 L y s 変異を有する H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、これらの変異を持たない H 1 H A ポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、500 倍、1000 倍、または 1000 倍を超える親和性で結合する。

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態では、被験体に投与した場合、結合剤は、被験体内に存在する（例えば、被験体の血液内、粘膜組織内などに存在する）少なくとも約 10%、約 15%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、またはそれを超える H A ポリペプチドに結合する。

10

20

30

40

50

【0136】

一定の実施形態では、HAポリペプチドへの結合剤の結合親和性を、一定範囲の濃度にならびにわたって評価する。かかる戦略は、特に多価結合アッセイにおいて、単一濃度分析よりも有意に多い情報を提供する。いくつかの実施形態では、例えば、結合剤の結合親和性を、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、または10倍超にわたる範囲の濃度で評価する。

【0137】

いくつかの実施形態では、H1 HAポリペプチド（例えば、そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分）に優先的に結合する結合剤は、種々の診断および/または監視方法（以下の「H1含有インフルエンザの検出」と呼ばれる節に記載の方法が含まれるが、これらに限定されない）に有用である。

10

【0138】

HAポリペプチド干渉剤

本発明は干渉剤を提供する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、本明細書中に記載の指定の標的（例えば、特定のHAポリペプチドおよび/または特定のグリカン（アンブレラ-トポロジ-グリカンなど））に結合する実体である。干渉剤は、任意の化学型であり得る。いくつかの実施形態では、干渉剤はポリペプチド（例えば、抗体または抗体フラグメントが含まれる）であり、いくつかのかかる実施形態では、干渉剤はHAポリペプチドであり、他の実施形態では、干渉剤は、そのアミノ酸配列がHA特徴的配列を含まないポリペプチド（すなわち、「非HAポリペプチド」）である。いくつかの実施形態では、干渉剤は小分子である。いくつかの実施形態では、干渉剤は核酸である。いくつかの実施形態では、干渉剤はアプタマーである。いくつかの実施形態では、干渉剤はポリマーであり、いくつかの実施形態では、干渉剤は非高分子である。いくつかの実施形態では、干渉剤は炭水化物である。いくつかの実施形態では、干渉剤はレクチンである。

20

【0139】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の干渉剤は、1つ以上のHAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤はH1 HAポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、ヒト結合および/または感染性が增强されたH1 HAポリペプチドバリエーションに結合する。

30

【0140】

いくつかの実施形態では、干渉剤は、アンブレラ-トポロジ-グリカン（例えば、HA受容体上の）とHAポリペプチド（例えば、H1 HAポリペプチド）（そのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）が含まれる）への結合を競合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、アンブレラ-トポロジ-グリカンがHAポリペプチドに結合するよりも高い親和性でHAポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、アンブレラ-トポロジ-グリカンがHAポリペプチドに結合するよりも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性でHAポリペプチドに結合する。

【0141】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の干渉剤は、アンブレラ様トポロジ-を有するシアリル化グリカン（例えば、HA受容体上の）に結合する。一定の実施形態では、干渉剤は、高い親和性を有するアンブレラ-トポロジ-グリカンに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、コーン-トポロジ-グリカンと比較して、アンブレラ-トポロジ-グリカンへの結合を優先する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、HAとHA受容体上のグリカンへの結合を競合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、HAとアンブレラ-トポロジ-グリカンへの結合を競合する。いくつかの実施形態では、本明細書中に提供した干渉剤はアンブレラ-トポロジ-遮断薬である。いくつかの実施形態では、本明細書中に提供した干渉剤はアンブレラ-トポロジ-特異的遮断薬である。いくつかの実施形態では、干渉剤はアンブレラ-トポロジ-グリカン模倣物に結合する。

40

50

【0142】

いくつかの実施形態では、干渉剤は、HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）とアンブレラトポロジグリカン（例えば、HA受容体上の）への結合と競合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、HAポリペプチドがアンブレラトポロジグリカンに結合するよりも高い親和性でアンブレラトポロジグリカンに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、アンブレラトポロジグリカンに、HAポリペプチドがアンブレラトポロジグリカンに結合するよりも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。

【0143】

一定の実施形態では、干渉剤の結合親和性を、一定範囲の濃度にわたって評価する。かかる戦略は、特に多価結合アッセイにおいて、単一濃度分析よりも有意に多い情報を提供する。いくつかの実施形態では、例えば、干渉剤の結合親和性を、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、または10倍超にわたる範囲の濃度で評価する。

【0144】

いくつかの実施形態では、干渉剤の標的への結合は、HAポリペプチドがHA受容体に結合する能力を干渉する。いくつかの実施形態では、干渉剤の標的への結合により、HAポリペプチドのHA受容体への結合を約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%、約99%、または約100%減少させる。いくつかの実施形態では、例えば、干渉剤がHAポリペプチドのHA受容体への結合能力を遮断するので、干渉剤はインフルエンザ感染症の処置および/または予防に有用である。

【0145】

いくつかの特定の干渉剤型を、以下でより詳細に考察する。

グリカンに結合する干渉剤

いくつかの実施形態では、干渉剤（例えば、HAポリペプチド、LSBA、UTBA、UTSBAなど）は、アンブレラグリカン（および/またはアンブレラトポロジグリカン模倣物）（HA受容体に存在するものなど）に結合する。一定の実施形態では、干渉剤は、高親和性でアンブレラトポロジグリカン（および/またはアンブレラトポロジグリカン模倣物）に結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、コートポロジグリカンへの結合よりも高い親和性でアンブレラトポロジグリカンに結合する。一定の実施形態では、干渉剤は、しばしば高い親和性および/または特異性で複数の異なるアンブレラトポロジグリカンに結合する。

【0146】

いくつかの実施形態では、干渉剤は、高親和性でアンブレラトポロジグリカン（例えば、長鎖 2 - 6シアリル化グリカン（例えば、Neu5Ac 2 - 6Gal 1 - 4GlcNAc 1 - 3Gal 1 - 4GlcNAc - など））に結合する。例えば、いくつかの実施形態では、干渉剤は、ヒトへの感染を媒介する野生型HA（例えば、H1N1 HAまたはH3N2 HA）で認められる親和性に匹敵する親和性でアンブレラトポロジグリカンに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、ヒトへの感染を媒介する野生型HAのための条件に匹敵する条件下で認められた親和性の少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の親和性でアンブレラトポロジグリカンに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、ヒトへの感染を媒介する野生型HAに匹敵する条件下で認められた親和性より高い親和性でアンブレラグリカンに結合する。いくつかの実施形態では、例示的な干渉剤には、LSBA、UTBA、および/またはUTSBAが含まれる。

【0147】

一定の実施形態では、多価グリカンアレイ結合アッセイ（本明細書中に記載のものなど）で飽和シグナルを示すので、干渉剤は高い親和性を示す。いくつかの実施形態では、か

10

20

30

40

50

かる研究において約400000以上（例えば、約500000、600000、700000、800000超など）のシグナルを示す場合、干渉剤は高親和性を示す。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の干渉剤は、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、またはそれを超える濃度範囲にわたって、いくつかの実施形態では、10倍以上もの濃度範囲にわたってアンブレラグリカンへの飽和結合を示す。

【0148】

さらに、いくつかの実施形態では、干渉剤は、コートポロジグリカンへの結合よりも強くアンブレラトポロジグリカン（および/またはアンブレラトポロジグリカン模倣物）に結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、コートポロジグリカンへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性でアンブレラトポロジグリカンに結合する。

10

【0149】

いくつかの実施形態では、干渉剤は2-6シアリル化グリカンに結合し、いくつかの実施形態では、干渉剤は2-6シアリル化グリカンに優先的に結合する。一定の実施形態では、干渉剤は、複数の異なる2-6シアリル化グリカンに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、2-3シアリル化グリカンに結合することができず、他の実施形態では、干渉剤2-3シアリル化グリカンに結合することができる。

【0150】

いくつかの実施形態では、干渉剤は、ヒト上気道の上皮細胞上に見出される受容体に結合する。一定の実施形態では、干渉剤は、気管支および/または気管内のHA受容体に結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は肺深部中の受容体に結合することができず、他の実施形態では、干渉剤は肺深部中の受容体に結合することができる。

20

【0151】

いくつかの実施形態では、干渉剤は、ヒト上気道組織（例えば、上皮細胞）中のHA受容体上に見出されるグリカンの少なくとも約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、またはそれを超えたグリカンに結合する。

【0152】

いくつかの実施形態では、干渉剤は、図8に示す1つ以上のグリカンに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、図8に示す複数のグリカンに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、高い親和性および/または特異性で図8に示すグリカンに結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、図7に示すグリカンへの結合と比較して図8に示すグリカンに優先的に結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、以下の形態のオリゴサッカリドに結合する：

30

Neu5Ac₂₋₆Sug1-Sug2-Sug3

（式中、

1. Neu5Ac₂₋₆は常にまたはほとんど常に非還元末端に存在する。

2. Sug1：

40

a. または立体配置（頻繁には、N結合およびO結合伸長については、ならびに糖タンパク質にO結合したGalNAc-の場合には）のヘキソース（頻繁には、GalまたはGlc）またはヘキソサミン（GlcNAcまたはGalNAc）であり、

b. Neu5Ac₂₋₆以外の糖がSug1の非還元位置のいずれにも結合すべきではなく（Sug1が糖タンパク質にO結合するGalNAc-である場合を除く）、そして/または

c. 非糖部分（硫酸、リン酸、グアニジウム、アミン、N-アセチルなど）を、HAとの接触を改善するためにSug1の非還元位置（典型的には、6位）に結合することができる。

3. Sug2および/またはSug3：

50

a . または 立体配置 (頻繁には、) のヘキソース (頻繁には、Gal または Glc) またはヘキソサミン (GlcNAc または GalNAc)、および / または
 b . 糖 (Fuc など) または非糖部分 (硫酸、リン酸、グアニジウム、アミン、N - アセチルなど) を Sug 2、Sug 3、および / または Sug 4 の非還元位置に結合することができる。

4 . Neu5Ac 2 - 6 結合から離れたオリゴサッカリド中の任意の 2 つの糖の間の結合は、1 - 2、1 - 3、1 - 4、および / または 1 - 6 (典型的には、1 - 3 または 1 - 4) であり得る。そして / または

5 . Neu5Ac 2 - 6 が GalNAc に結合し、これが糖タンパク質に O 結合し、さらなる糖が GalNAc の非還元末端に結合した構造 (例えば、

i . Neu5Ac 2 - 6 (Neu5Ac 2 - 3 Gal 1 - 3) GalNAc -
 ii . Neu5Ac 2 - 6 (Gal 1 - 3) GalNAc -)) 。

【 0 1 5 3 】

本発明は、指定の結合特異性を有する干渉剤を提供し、アンブレラグリカンに関して指定の結合特性を有する干渉剤も提供する。

【 0 1 5 4 】

HA 受容体

いくつかの実施形態では、干渉剤は、HA 受容体 (例えば、そのフラグメントおよび / または特徴的部分) であるかこれを含む実体である。HA は、糖タンパク質受容体への結合によって細胞表面と相互作用する。HA (例えば、H1 - HA ポリペプチドならびに / またはそのバリエーション、フラグメントおよび / もしくは特徴的部分) の HA 受容体への結合は、主に HA 受容体上の N 結合グリカンによって媒介される。具体的には、インフルエンザウイルス粒子表面上の HA は、細胞宿主表面上の HA 受容体に会合するシアリル化グリカンを認識する。認識および結合後、宿主細胞はウイルス細胞を貪食し、ウイルスは周辺細胞に分布すべきより多数のウイルス粒子を複製および産生することができる。例示的な HA - グリカン相互作用のいくつかの結晶構造が同定されており、表 3 に示す。

【 0 1 5 5 】

表 3 : HA - グリカン複合体の結晶構造

【 0 1 5 6 】

10

20

【表 3】

略語 (PDB ID)	ウイルス株	グリカン (座標割り当てあり)	
ASI30_H1_23 (1RV0)	A/ブタ/アイオワ/30 (H1N1)	Neu5Ac	
ASI30_H1_26 (1RVT)	A/ブタ/アイオワ/30 (H1N1)	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc	
APR34_H1_23 (1RVX)	A/プエルトリコ/8/34 (H1N1)	Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc	
APR34_H1_26 (1RVZ)	A/プエルトリコ/8/34 (H1N1)	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc	
ADU63_H3_23 (1MQM)	A/アヒル/ウクライナ/1/63 (H3N8)	Neu5Ac α 3Gal	10
ADU63_H3_26 (1MQN)	A/アヒル/ウクライナ/1/63 (H3N8)	Neu5Ac α 6Gal	
AAI68_H3_23 (1HGG)	A/アイチ/2/68 (H3N2)	Neu5Ac α 3Gal β 4Glc	
ADS97_H5_23 (1JSN)	A/アヒル/シンガポール/3/97 (H5N3)	Neu5Ac α 3Gal β 3GlcNAc	
ADS97_H5_26 (1JSO)	A/アヒル/シンガポール/3/97 (H5N3)	Neu5Ac	20
Viet04_H5 (2FK0)	A/ベトナム/1203/2004 (H5N1)		

HA - 2 - 6 シアリル化グリカン複合体を、ASI30_H1_26 および APR34_H1_26 (H1) 上への ADU63_H3 および ADS97_H5 の HA1 サブユニットならびに Viet04_H5 の CA トレースの重ね合わせによって生成した。2 - 6 シアリル化グリカンをも有するヒト A / アイチ / 2 / 68 (H3N2) の構造複合体が公開されているが (Eisen et al., 1997, *Virology*, 232:19)、その座標はタンパク質データベースで利用できなかった。SARF2 (<http://123d.ncifcrf.gov/sarf2.html>) プログラムを使用して、重ね合わせのための異なる HA1 サブユニットの構造アラインメントを得た。

【0157】

HA 受容体は受容体の HA 結合部位付近の 2 - 3 または 2 - 6 シアリル化グリカンのいずれかによって修飾され、受容体結合グリカンの結合型は受容体の HA 結合部位の高次構造に影響を及ぼし、したがって、異なる HA に対する受容体の特異性に影響を及ぼすことができる。

【0158】

例えばトリ HA のグリカン結合ポケットは狭い。本発明によれば、このポケットは、2 - 3 シアリル化グリカンのトランス高次構造および / または コーン - トポロジエーグリカン (2 - 3 または 2 - 6 結合のいずれであろうと) に結合する。

【0159】

トリ組織、同様にヒトの肺深部および胃腸 (GI) 管組織中の HA 受容体は、2 - 3 シアリル化グリカン結合によって特徴づけられ、さらに (本発明によれば)、主に コーン - トポロジエーを採用するグリカン (2 - 3 シアリル化および / または 2 - 6 シアリル化グリカンが含まれる) によって特徴づけられる。かかる コーン - トポロジエーグリカンを有する HA 受容体を、本明細書中で CTHAr ということができる。

【0160】

対照的に、気管支および上気道の気管中のヒト HA 受容体は、2 - 6 シアリル化グリカンによって修飾される。2 - 3 モチーフと異なり、2 - 6 モチーフは、C6 - C5 結合に起因するさらなる高次構造自由度を有する (Russell et al., Gl

10

20

30

40

50

y c o c o n j J 23 : 85 , 2006 (本明細書中で参考として援用される))。かかる 2 - 6シアル化グリカンに結合するHAは、この高次構造の自由さから生じる構造の多様性に適応するためのさらなる開いた結合ポケットを有する。さらに、本発明によれば、HAは、アンブレラトポロジ-中のグリカン(例えば、2 - 6シアル化グリカン)に結合する必要がある得、特に、ヒト上気道組織への感染を有効に媒介するために、強い親和性および/または特異性でかかるアンブレラトポロジ-グリカンに結合する必要がある得。アンブレラ-トポロジ-グリカンを有するHA受容体を、本明細書中で、UTHArとすることができる。

【0161】

これらの空間的に制限されたグリコシル化プロフィールの結果として、ヒトは、通常、多数の野生型ブタHA(例えば、ブタH1)を含むウイルスに感染しない。具体的には、ウイルスに遭遇する可能性が最も高いヒト気道部分(すなわち、気管および気管支)がコーングリカン(例えば、2 - 3シアル化グリカンおよび/または短鎖グリカン)を有する受容体を欠き、且つ野生型ブタHAが典型的にはコーングリカン(例えば、2 - 3シアル化グリカンおよび/または短鎖グリカン)と会合した受容体に主にまたは排他的に結合するので、ヒトがブタウイルスに感染するようになるのは稀である。アンブレラグリカン(例えば、長鎖2 - 6シアル化グリカン)を有する肺深部および/または胃腸管受容体に接近することができるウイルスと十分に密接に接触した場合のみ、ヒトは感染するようになる。

【0162】

レクチン

いくつかの実施形態では、本発明によって提供される結合剤はレクチンである。レクチンは、可溶性炭水化物または複合糖質(例えば、糖ペプチドまたは糖脂質)の一部である炭水化物部分に結合することができる糖結合タンパク質である。レクチンは、典型的には、一定の動物細胞を凝集させ、そして/または特定の糖部分の認識によって複合糖質を沈殿させる。例えば、SNA-1は、2 - 6シアル酸に対して高親和性を有するレクチンである。さらに別の例として、polyporus squamosusレクチン(PSL1aおよびPSL1b)は、アスパラギン結合糖タンパク質のNeu5Ac₂, 6Gal₁, 4Glc / GlcNAcトリサッカリド配列を含むシアル化複合糖質の結合に対して高い親和性を有する。結合剤として作用することができるレクチンの非限定的な例には、SNA-1、SNA-1'、PSL1a、PSL1b、およびこれらから誘導されたポリペプチドが含まれる。

【0163】

例示的なレクチンのアミノ酸配列を以下に示す。

【0164】

Sambucus Nigraレクチン1 (Genbank受入番号U27122)

:

【0165】

【化4】

MRLVAKLLYLAVLAICGLGIHGALTHPRVTPPVYPSVSNLTGADTYEPFLRALQEK
VILGNHTAFDLPVLNPESQVSDSNRFVLVPLTNPSGDTVTLAIDVVNLYVVAFSSNGK
SYFFSGSTAVQRDNLFVDTTQEELNFTGNYTSLERQVGFGRVYIPLGPKSLDQAISL
RTYTLTAGDTKPLARGLLVVIQMVSEAAARFRYIELRIRTSITDASEFTPDLLMLSMEN
NWSSMSSEIQQAQPGGIFAGVVQLRDERNNSIEVTNFRRLFELTYIAVLLYGCAPVTS
SSYSNNAIDAQIIKMPVFRGGEYEVKVCVVEVTRRISGWDGLCVDVRYGHYIDGNPV
QLRPCGNECNQLWTFRTDGTIRWLKCLTASSVMIYDCNTVPPEATKWVVSIDGTI
TNPHSGLVLTAPQAAEGTALSLENNIHAARQGWTVGDVEPLVTFIVGYKQMCLREN
GENNFVWLEDCVLNRVQQEWALYGDGTIRVNSNRSLCVTSEDHEPSDLIVILKCEGS
GNQRWVFNTNGTISNPNKLLMDVAQRDVSLRKIILYRPTGNPNQQWITTTTHPA
(配列番号: 51)

10

20

30

40

50

Sambucus Nigraレクチン1' (Genbank受入番号U66191)

:

【0166】

【化5】

MKVVATILYLVLVLAICGLGIHGAHPHTHSAPPTVYPSVSFNLTEANSNEYRHFLQELRG
KVILGSHRAFDLPVLNPESKVSDDSRFVLVRLTNPSRKKVTLAIDVVTFYVVAFAQN
DRSYFFSGSSEVQRENLFVDTTQEDLNFKGDYTSLEHQVGFGRVYIPLGPKSLAQSS
SLSTYKSSAGDNKRLARLLVVIQMVSEAAFRYIQLRIQASITDAKEFTPDLLMLSM
ENKWSSMSSEIQQAQPGGAFAQVVKLLDQRNHPIDVTNFRRLFQLTSVAVLLHGCPT
VTKMPAYIIKMPVFNGGEDEERCSSVEEVTRRIGGRDGFCAEVKNGDEKDGTPVQLS
SCGEQSNQQWTFSTDGTIQSLGKCLTSSSVMIYNCKVVPPESTKWVVSIDGTITNPR
SGLVLTAPKAAEGTLVSLEKNVHAARQGWIVGNVEPLVTFIVGYEQMCLETNPGNN
DVSLGDCSVKSASKVDQKWALYGDGTIRVNNDRSLCVTSEGKSSNEPIIILKCLGWA
NQRWVFNTDGTISNPD SKLVMHVDQNDVPLRKIILSHPSGTSNQQWIASTHPA (配列
番号: 52)

10

Polyporous squamosusレクチン1a (UniProt Q75WT9)

【0167】

【化6】

MSFQGHGIYYIASAYVANTRLALSEDSSANKSPDVISSDAVDPLNNLWLEIPVGEAD
TYTVRNAFAGSYMDLAGHAATDGTAIIGYRPTGGDNQKWIISQINDVWIKSKETGT
FVLLNGDGGGTGTVVGWQNITNNTSQNWTFQKLSQTGANVHATLLACPALRQDF
KSYLSDGLYLVLTRDQISSIWQASGLGSPWRSEIFDCDDFATVFKGAVAKWGNENF
KANGFALLCGLMFGSKSSGAHAYNWFVERGNFSTVTFEPQNGTYSANAWDYKAY
FGLF (配列番号: 53)

20

Polyporous squamosusレクチン1b (UniProt Q75WT8)

【0168】

【化7】

MSFEGHGIYHIPHAHVANIRMALANRSGSQNGTPVIAWDSNNDAFDHMWLVEPTGE
ADTYTIHNVSTGTYMDVTASAVADNTPIIGYQRTGNDNQKWIRQVQTDGGDRPWK
IQCKATGTFATLYSGGSGTAIVGWRLVNSNGNQDWVVFQKLSQTSVNVHATLLACG
ATVGQDFKNYLYDGLYLVLPRDRISAIWKASGLGETARRDGIYDSDEFAMTFKSAA
ATWGKENFKADGFAILCGMMFGTKASTNRHAYNWWVERGSFSTVTFEPQNGTYS
DDAWGYKAYFGLF (配列番号: 54)

30

HAポリペプチドに結合する干渉剤

いくつかの実施形態では、干渉剤は、HAポリペプチド(ならびに/またはそのバリア
ント、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)(本明細書中に記載の任意のHAポ
リペプチドなど)に結合する実体である。いくつかの実施形態では、干渉剤は、H1
HAポリペプチド(ならびに/またはそのバリアント、フラグメント、および/もしくは特
徴的部分)に結合する実体である。いくつかの実施形態では、干渉剤は、非H1
HAポリペプチドへの結合よりも高い親和性でH1
HAポリペプチドに結合する。いくつか
の実施形態では、干渉剤は、非H1
HAポリペプチドへの結合よりも2倍、3倍、4倍、
5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、100
0倍、または1000倍を超える親和性でH1
HAポリペプチドに結合する。いくつか
の実施形態では、干渉剤は、1つ以上の以下の変異: Ile219Lys、Ser186
Pro、Ala189Thr、および/またはGlu227Alaを有するH1
HAポリペプチドに、1つ以上のこれらの変異を持たないH1
HAポリペプチドへの結合より
も2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100
倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実

40

50

施形態では、干渉剤は、I l e 2 1 9 L y s 変異を有するH 1 H Aポリペプチドに、その変異を持たないH 1 H Aポリペプチドへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、およびG l u 2 2 7 A l a 変異を有するH 1 H Aポリペプチドに、これらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、L y s 1 4 5 S e r またはL y s 1 4 5 A s n 変異を有するH 1 H Aポリペプチドに、これらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、L y s 1 4 5 S e r / L y s 1 4 5 A s n、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、およびG l u 2 2 7 A l a 変異を有するH 1 H Aポリペプチドに、これらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、L y s 1 4 5 S e r / L y s 1 4 5 A s n、およびI l e 2 1 9 L y s 変異を有するH 1 H Aポリペプチドに、これらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。

【 0 1 6 9 】

いくつかの実施形態では、干渉剤は、H 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、非H 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、1つ以上の以下の変異：I l e 2 1 9 L y s、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、および/またはG l u 2 2 7 A l a を有するH 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、1つ以上のこれらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、I l e 2 1 9 L y s 変異を有するH 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、その変異を持たないH 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、およびG l u 2 2 7 A l a 変異を有するH 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、これらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、L y s 1 4 5 S e r またはL y s 1 4 5 A s n 変異を有するH 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、これらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、L y s 1 4 5 S e r / L y s 1 4 5 A s n、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、およびG l u 2 2 7 A l a 変異を有するH 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、これらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7

10

20

30

40

50

倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。いくつかの実施形態では、干渉剤は、Lys145Ser/Lys145AsnおよびIle219Lys変異を有するH1 HAポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスに、これらの変異を持たないH1 HAポリペプチドを発現するインフルエンザウイルスへの結合よりも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、または1000倍を超える親和性で結合する。

【0170】

本明細書中に記載の1つ以上の結合優先度を有する干渉剤は、インフルエンザ（例えば、H1 HAインフルエンザ）の処置および/または予防のための治療薬として有用であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の1つ以上の結合優先度を有する干渉剤は、1つ以上のLys145Ser、Lys145Asn、Ile219Lys、Ser186Pro、Ala189Thr、および/またはGlu227Ala変異を有するH1 HAポリペプチドを発現するインフルエンザの処置および/または予防のための治療薬として有用であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の1つ以上の結合優先度を有する干渉剤は、Ile219Lys変異を有するH1 HAポリペプチドを発現するインフルエンザの処置および/または予防のための治療薬として有用であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の1つ以上の結合優先度を有する干渉剤は、Lys145SerまたはLys145Asn変異を有するH1 HAポリペプチドを発現するインフルエンザの処置および/または予防のための治療薬として有用であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の1つ以上の結合優先度を有する干渉剤は、Lys145Ser/Lys145Asn、Ser186Pro、Ala189Thr、およびGlu227Ala変異を有するH1 HAポリペプチドを発現するインフルエンザの処置および/または予防のための治療薬として有用であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の1つ以上の結合優先度を有する干渉剤は、Lys145Ser/Lys145AsnおよびIle219Lys変異を有するH1 HAポリペプチドを発現するインフルエンザの処置および/または予防のための治療薬として有用であり得る。

【0171】

いくつかの実施形態では、被験体に投与した場合、干渉剤は、被験体に存在する（例えば、被験体の血液内、粘膜組織内などに存在する）少なくとも約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、またはそれを超えるHAポリペプチド（例えば、ヒト結合および/または感染性が增强されたH1ポリペプチドおよび/またはH1ポリペプチドバリエーション）に結合する。

【0172】

アプタマー

いくつかの実施形態では、本発明で提供した結合剤はアプタマーである。アプタマー干渉剤は、アンブレラトポロジグリカンおよび/またはHAポリペプチド（例えば、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分））への結合によって機能することができる。

【0173】

アプタマーは、特異的分子標的（例えば、アンブレラトポロジグリカンおよび/またはHAポリペプチド、そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分）に強く結合する核酸（例えば、RNA、DNA）から構成される高分子である。特定のアプタマーを、直鎖ヌクレオチド配列によって説明することができ、典型的には、約15~60ヌクレオチド長である。いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、アプタマ

10

20

30

40

50

一中のヌクレオチド鎖が分子を複雑な三次元形状に折り畳む分子内相互作用を形成し、この三次元形状によってアプタマーがその標的分子の表面に強固に結合することが可能となると予想される。全ての可能なヌクレオチド配列の範囲内に存在する分子形状の異常な多様性を考慮して、豊富な分子標的（タンパク質および小分子が含まれる）のためのアプタマーを得ることができる。高特異性に加えて、アプタマーは、その標的に非常に高い親和性（例えば、タンパク質に対してピコモルから低ナノモルの範囲の親和性）を有する。アプタマーは化学的に安定であり、活性を喪失することなくボイルまたは凍結することができる。アプタマーは合成分子であるので、アプタマーは、種々の修飾を受けることができ、それにより、特定の適用のためにその機能を最適化することができる。例えば、アプタマーを、*in vivo*適用で使用するために血中の酵素による分解に対するその感受性が劇的に軽減されるように修飾することができる。さらに、アプタマーを、その生体内分布または血漿滞留時間が変化するように修飾することができる。

10

【0174】

アンブレラトポロジグリカン（および/またはアンブレラトポロジグリカン模倣物）に結合することができるアプタマーの選択を、当該分野で公知の方法によって行うことができる。例えば、アプタマーを、SELEX法（試験管内進化法）（Tuerk, C., and Gold, L., *Science* 249: 505-510 (1990)（本明細書中で参考として援用される））を使用して選択することができる。SELEX法では、核酸分子の巨大ライブラリー（例えば、 10^{15} 個の異なる分子）を産生し、そして/または標的分子（例えば、アンブレラトポロジグリカンおよび/またはHAポリペプチド、そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分）を使用してスクリーニングする。標的分子を、ヌクレオチド配列ライブラリーと一定期間インキュベートする。次いで、当該分野で公知のいくつかの方法を使用して、混合物中の非結合分子からアプタマー標的分子を物理的に単離し、非結合分子を破棄することができる。次いで、標的分子に対して最高の親和性を有するアプタマーを標的分子から精製によって取り出し、酵素的に増幅させて標的分子に結合することができるアプタマーが実質的に富化された分子の新規のライブラリーを産生することができる。次いで、富化ライブラリーを使用して、新規の選択、分配、および増幅サイクルを開始することができる。この反復的な選択、分配、および増幅過程の5~15サイクル後、ライブラリーを、標的分子に強固に結合する少数のアプタマーに減少させる。次いで、混合物中の各分子を、単離し、そのヌクレオチド配列を決定し、結合親和性および特異性に関するその性質を測定し、比較することができる。次いで、単離したアプタマーを、標的結合および/またはアプタマー構造に寄与しないいかなるヌクレオチドも排除されるようにさらに精製し、それにより、そのコア結合ドメインに短縮されたアプタマーを産生することができる。アプタマーテクノロジーの概説についてのJayasena, S. D. *Clin. Chem.* 45: 1628-1650 (1999)（その技術全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

20

30

【0175】

抗体

いくつかの実施形態では、干渉剤は、アンブレラトポロジグリカンおよび/またはHAポリペプチド（例えば、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分））を認識する抗体である。

40

【0176】

抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得、当業者に公知の種々の技術のいずれかによって調製することができる（例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。例えば、抗体を、細胞培養技術（モノクローナル抗体の生成または組換え抗体を産生させるための適切な細菌または哺乳動物の細胞宿主への抗体遺伝子のトランスフェクションが含まれる）によって産生することができる。

【0177】

50

本発明に適切な抗体には、任意のアンプレトポロジグリカンエピトープに免疫特異的に結合する抗体または抗体のフラグメントが含まれる。本明細書中で使用する場合、用語「抗体」には、指定のタンパク質またはペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的反応性を示す免疫グロブリンおよびそのフラグメントが含まれることを意図する。適切な抗体には、ヒト抗体、霊長類化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、抱合抗体（すなわち、他のタンパク質、放射性標識、細胞毒素に抱合または融合した抗体）、小モジュール免疫医薬（「SMIPs（商標）」）、単鎖抗体、ラクダ抗体、および抗体フラグメントが含まれるが、これらに制限されない。本明細書中で使用する場合、用語「抗体」には、インタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単ドメイン抗体（例えば、サメ単ドメイン抗体（例えば、IgNARまたはそのフラグメント））、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成された多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体フラグメント（所望の生物学的活性を示す限り）も含まれる。本明細書中で使用される抗体ポリペプチドは、任意の型のもの（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM）であり得る。

【0178】

本明細書中で使用する場合、「抗体フラグメント」には、インタクトな抗体の一部（例えば、抗体の抗原結合領域または可変領域など）が含まれる。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、一本鎖抗体分子、ならびに抗体フラグメントから形成した多特異性抗体が含まれる。用語「抗体フラグメント」には、特異的抗原に結合して複合体を形成することによって抗体のように作用する任意の合成または遺伝子改変タンパク質も含まれる。例えば、抗体フラグメントには、単離されたフラグメント、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」フラグメント、軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリンカーによって接続された組換え単鎖ポリペプチド分子（「ScFvタンパク質」）、および超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位が含まれる。

【0179】

抗体を、当該分野で周知の方法を使用して生成することができる。例えば、抗体産生のためのプロトコールは、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (1988) によって記載されている。典型的には、抗体を、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ラクダ、ラマ、サメ、または他の適切な宿主中で生成することができる。あるいは、抗体をニワトリ中で作製し、IgY分子を産生することができる（Schade et al., (1996) *ALTEX* 13(5): 80-85（本明細書中で参考として援用される））。いくつかの実施形態では、本発明に適切な抗体は、ヒトより下等な霊長類の抗体である。例えば、ヒヒ中での治療的に有用な抗体の一般的な惹起技術は、例えば、Goldenberg et al. の国際特許公開第WO91/11465号（1991；本明細書中で参考として援用される）およびLosman et al., *Int. J. Cancer* 46: 310（1990；本明細書中で参考として援用される）中に見出すことができる。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体を、ハイブリドーマ法を使用して調製することができる（Milstein and Cuello, (1983) *Nature* 305(5934): 537-40（本明細書中で参考として援用される））。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体を、組換え法によって作製することもできる（米国特許第4,166,452号, 1979（本明細書中で参考として援用される））。

【0180】

いくつかの実施形態では、本発明に適切な抗体には、ヒト化抗体またはヒト抗体が含まれ得る。非ヒト抗体のヒト化形態は、キメラIg、Ig鎖、または非ヒトIg由来の最小配列を含むフラグメント（Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体の他の抗原結合サブシーケンスなど）である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源から導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基を、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから取り出した「移入」残基という。ヒト化を、げっ歯類相

10

20

30

40

50

補性決定領域 (C D R) または C D R 配列へのヒト抗体の対応する配列の置換によって行う (R i e c h m a n n e t a l . , N a t u r e 3 3 2 (6 1 6 2) : 3 2 3 - 7 , 1 9 8 8 ; V e r h o e y e n e t a l . , S c i e n c e . 2 3 9 (4 8 4 7) : 1 5 3 4 - 6 , 1 9 8 8 (本明細書中で参考として援用される)) 。かかる「ヒト化」抗体は、実質的により少ないインタクトなヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列に置換されたキメラ抗体 (米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号 , 1 9 8 9 (本明細書中で参考として援用される)) である。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの C D R 残基およびおそらくいくつかの F R 残基がげっ歯類抗体中の類似の部位由来の残基に置換されたヒト抗体である。ヒト化抗体には、レシピエントの C D R 由来の残基が所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種 (ドナー抗体) (マウス、ラット、またはウサギなど) の C D R 由来の残基に置換されたヒト I g (レシピエント抗体) が含まれる。場合によっては、対応する非ヒト残基とヒト I g の F v フレームワーク残基を置換する。ヒト化抗体は、レシピエント抗体や移入された C D R またはフレームワーク配列で見出されない残基を含むことができる。一般に、ヒト化抗体は実質的に全ての少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変ドメインを含み、C D R 領域の全てでないにしてもほとんどが非ヒト I g の C D R 領域に対応し、且つ F R 領域の全てでないにしてもほとんどがヒト I g コンセンサス配列の F R 領域である。ヒト化抗体はまた、任意選択的に、I g 定常領域 (F c) 、典型的にはヒト I g の定常領域の少なくとも一部を含む (R i e c h m a n n e t a l . , N a t u r e 3 3 2 (6 1 6 2) : 3 2 3 - 7 , 1 9 8 8 ; V e r h o e y e n e t a l . , S c i e n c e . 2 3 9 (4 8 4 7) : 1 5 3 4 - 6 , 1 9 8 8 (その全てが本明細書中で参考として援用される)) 。

【 0 1 8 1 】

ヒト抗体を、種々の技術 (ファージディスプレイライブラリー (H o o g e n b o o m e t a l . , M o l I m m u n o l . (1 9 9 1) 2 8 (9) : 1 0 2 7 - 3 7 ; M a r k s e t a l . , J M o l B i o l . (1 9 9 1) 2 2 2 (3) : 5 8 1 - 9 7 (その全てが本明細書中で参考として援用される)) およびヒトモノクローナル抗体の調製 (R e i s f e l d a n d S e l l , 1 9 8 5 , C a n c e r S u r v . 4 (1) : 2 7 1 - 9 0 (本明細書中で参考として援用される)) が含まれる) を使用して産生することもできる。同様に、内因性 I g 遺伝子が部分的または完全に不活化されたトランスジェニック動物へのヒト I g 遺伝子の導入を活用して、ヒト抗体を合成することができる。攻撃誘発の際、ヒト抗体産生が認められ、これはあらゆる点において (遺伝子再構成、アセンブリ、および抗体レパートリーが含まれる) ヒトで認められるものと酷似している (F i s h w i l d e t a l . , H i g h - a v i d i t y h u m a n I g G k a p p a m o n o c l o n a l a n t i b o d i e s f r o m a n o v e l s t r a i n o f m i n i l o c u s t r a n s g e n i c m i c e , N a t B i o t e c h n o l . 1 9 9 6 J u l y ; 1 4 (7) : 8 4 5 - 5 1 ; L o n b e r g e t a l . , A n t i g e n - s p e c i f i c h u m a n a n t i b o d i e s f r o m m i c e c o m p r i s i n g f o u r d i s t i n c t g e n e t i c m o d i f i c a t i o n s , N a t u r e 1 9 9 4 A p r i l 2 8 ; 3 6 8 (6 4 7 4) : 8 5 6 - 9 ; L o n b e r g a n d H u s z a r , H u m a n a n t i b o d i e s f r o m t r a n s g e n i c m i c e , I n t . R e v . I m m u n o l . 1 9 9 5 ; 1 3 (1) : 6 5 - 9 3 ; M a r k s e t a l . , B y - p a s s i n g i m m u n i z a t i o n : b u i l d i n g h i g h a f f i n i t y h u m a n a n t i b o d i e s b y c h a i n s h u f f l i n g . B i o t e c h n o l o g y (N Y) . 1 9 9 2 J u l y ; 1 0 (7) : 7 7 9 - 8 3 (その全てが本明細書中で参考として援用される)) 。

【 0 1 8 2 】

動物モデルにおける干渉剤の試験

本発明は、動物宿主における干渉剤 (例えば、H A ポリペプチド、L S B A 、 U S B A 、 U T S B A 、 アンブレラ - トポロジググリカンなど) の試験方法を提供する。本明細書

10

20

30

40

50

中で使用する場合、「動物宿主」には、インフルエンザ研究に適切な任意の動物モデルが含まれる。例えば、本発明に適切な動物宿主は、任意の哺乳動物宿主（霊長類、フェレット、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、げっ歯類（マウス、ハムスター、ウサギ、およびラットなど）が含まれる）であり得る。一定の実施形態では、本発明のために使用した動物宿主はフェレットである。特に、いくつかの実施形態では、動物宿主は、干渉剤（任意選択的に、組成物中）の投与前にウイルスの曝露または感染に対してナイーブである。いくつかの実施形態では、動物宿主を、干渉剤の投与前または同時にウイルスを接種するか、ウイルスに感染させるか、そうでなければウイルスに曝露する。本発明の実施で使用される動物宿主を、当該分野で公知の任意の方法によってウイルスを接種するか、ウイルスに感染させるか、そうでなければウイルスに曝露することができる。いくつかの実施形態では、動物宿主を、鼻腔内でウイルスを接種するか、ウイルスに感染させるか、そうでなければウイルスに曝露することができる。

10

【0183】

いくつかの実施形態では、適切な動物宿主は、ヒト気道で見出された分布と類似のアンブレラトポロジ-グリカン対コートポロジ-グリカンおよび/または 2 - 6 グリカン対 2 - 3 グリカンの分布を有し得る。例えば、ヒトにおけるインフルエンザウイルスに原因する疾患のモデルとして使用する場合に、動物宿主としてのフェレットはマウスより代表的であり得ると予想される（Tumpey, et al. Science (2007) 315; 655 - 659（本明細書中で参考として援用される））。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、本発明は、フェレットは、マウスがヒトに類似するよりもヒト気道に類似の気道中のグリカンの分布を有し得るという考えを含む。

20

【0184】

ナイーブおよび/または接種した動物を、種々の研究のいずれかのために使用することができる。例えば、かかる動物モデルを、当該分野で公知のウイルス伝播研究のために使用することができる。ウイルス伝播研究におけるフェレットの使用がヒトにおけるウイルス伝播についての信頼できる予測因子として役立つことが意図される。例えば、接種した動物（例えば、フェレット）からナイーブ動物へのウイルスインフルエンザの空気伝播は当該分野で公知である（Tumpey, et al. Science (2007) 315; 655 - 659（本明細書中で参考として援用される））。ウイルス伝播研究を使用して、干渉剤ポリペプチド（例えば、HAポリペプチド）を試験することができる。例えば、干渉剤を、動物宿主におけるウイルス結合および/または感染性の遮断における前記干渉剤の有効性を決定するために、ウイルス伝播研究の前、間、または後に適切な動物宿主に投与することができる。動物宿主におけるウイルス伝播研究から収集した情報を使用して、ヒト宿主におけるウイルス結合および/または感染性の遮断における干渉剤の有効性を予測することができる。

30

【0185】

H1含有インフルエンザの検出

本発明は、インフルエンザ検出のための系、組成物、および方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、特定のHAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、上記で「HAポリペプチド結合剤」と表題をつけた節にさらに詳述するように、結合剤は、非H1 HAポリペプチドと比較してH1 HAポリペプチドに優先的に結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、親H1 HAポリペプチド（例えば、表1に見出される親H1 HAインフルエンザ株）と比較してヒト結合および/または感染性が增强されたH1 HAポリペプチドに優先的に結合する。

40

【0186】

いくつかの実施形態では、結合剤は、1つ以上の以下の変異：Lys145Ser、Lys145Asn、Ile219Lys、Ser186Pro、Ala189Thr、および/またはGlu227Alaを有するH1 HAポリペプチドに、1つ以上のこれらの変異を持たないH1 HAポリペプチドと比較して優先的に結合する。いくつかの実施

50

形態では、結合剤は、I l e 2 1 9 L y s 変異を有するH 1 H Aポリペプチドに、その変異を持たないH 1 H Aポリペプチドと比較して優先的に結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、およびG l u 2 2 7 A l a 変異を有するH 1 H Aポリペプチドに、これらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドと比較して優先的に結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、L y s 1 4 5 S e rまたはL y s 1 4 5 A s n 変異を有するH 1 H Aポリペプチドに、これらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドと比較して優先的に結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、L y s 1 4 5 S e r / L y s 1 4 5 A s n、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、およびG l u 2 2 7 A l a 変異を有するH 1 H Aポリペプチドに、これらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドと比較して優先的に結合する。いくつかの実施形態では、結合剤は、L y s 1 4 5 S e r / L y s 1 4 5 A s n およびI l e 2 1 9 L y s 変異を有するH 1 H Aポリペプチドに、これらの変異を持たないH 1 H Aポリペプチドと比較して優先的に結合する。

10

【0187】

いくつかの実施形態では、H 1 H Aポリペプチド（例えば、そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分）に優先的に結合する結合剤は、種々の診断方法および/または監視方法に有用である。例えば、特定のH Aポリペプチド（H 1 H Aポリペプチドなど）（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、患者がインフルエンザウイルスに感染し、そして/またはインフルエンザウイルス感染症に罹患しているかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H 1 H Aポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、患者がH 1 インフルエンザウイルスに感染し、そして/またはH 1 インフルエンザウイルス感染症に罹患しているかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H 1 H Aポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、患者がH 1 ポリペプチドが増強されたヒト結合および/または感染性を示すという点で特徴づけられたH 1 インフルエンザウイルスに感染し、そして/またはH 1 インフルエンザウイルス感染症に罹患しているかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、特定のH 1 H Aポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤を使用して、患者がH 1 ポリペプチドが1つ以上の以下の変異：L y s 1 4 5 S e r、L y s 1 4 5 A s n、I l e 2 1 9 L y s、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、および/またはG l u 2 2 7 A l a を有するという点で特徴づけられたH 1 インフルエンザウイルスに感染し、そして/またはH 1 インフルエンザウイルス感染症に罹患しているかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H 1 H Aポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、患者がH 1 ポリペプチドがI l e 2 1 9 L y s 変異を有するという点で特徴づけられたH 1 インフルエンザウイルスに感染し、そして/またはH 1 インフルエンザウイルス感染症に罹患しているかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H 1 H Aポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、患者がH 1 ポリペプチドがS e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、および/またはG l u 2 2 7 A l a 変異を有するという点で特徴づけられたH 1 インフルエンザウイルスに感染し、そして/またはH 1 インフルエンザウイルス感染症に罹患しているかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H 1 H Aポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、患者がH 1 ポリペプチドがL y s 1 4 5 S e r またはL y s 1 4 5 A s n 変異を有するという点で特徴づけられたH 1 インフルエンザウイルスに感染し、そして/またはH 1 インフルエンザウイルス感染症に罹患しているかどうかを決定するこ

20

30

40

50

とができる。いくつかの実施形態では、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、患者がH1ポリペプチドがLys145Ser/Lys145Asn、Ser186Pro、Ala189Thr、およびGlu227Ala変異を有するという点で特徴づけられたH1インフルエンザウイルスに感染し、そして/またはH1インフルエンザウイルス感染症に罹患しているかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、患者がH1ポリペプチドがLys145Ser/Lys145Asn、およびIle219Lys変異を有するという点で特徴づけられたH1インフルエンザウイルスに感染し、そして/またはH1インフルエンザウイルス感染症に罹患しているかどうかを決定することができる。

10

【0188】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチド（H1 HAポリペプチドなど）（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、サンプルがインフルエンザウイルスを含むかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、サンプルがH1インフルエンザウイルスを含むかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、サンプルがH1ポリペプチドが増強されたヒト結合および/または感染性を示すという点で特徴づけられたH1インフルエンザウイルスを含むかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、特定のH1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤を使用して、サンプルがそのH1ポリペプチドが1つ以上の以下の変異：Lys145Ser、Lys145Asn、Ile219Lys、Ser186Pro、Ala189Thr、および/またはGlu227Alaを有するという点で特徴づけられるH1インフルエンザウイルスを含むかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、サンプルがH1ポリペプチドがIle219Lys変異を有するという点で特徴づけられたH1インフルエンザウイルスを含むかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、サンプルがH1ポリペプチドがSer186Pro、Ala189Thr、および/またはGlu227Ala変異を有するという点で特徴づけられたH1インフルエンザウイルスを含むかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、サンプルがH1ポリペプチドがLys145SerまたはLys145Asn変異を有するという点で特徴づけられたH1インフルエンザウイルスを含むかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、サンプルがH1ポリペプチドがLys145Ser/Lys145Asn、Ser186Pro、Ala189Thr、およびGlu227Ala変異を有するという点で特徴づけられたH1インフルエンザウイルスを含むかどうかを決定することができる。いくつかの実施形態では、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）に優先的に結合する結合剤をアッセイで使用して、サンプルがH1ポリペプチドがLys145Ser/Lys145AsnおよびIle219Lys変

20

30

40

50

異を有するという点で特徴づけられたH1インフルエンザウイルスを含むかどうかを決定することができる。

【0189】

本発明は、病理学的サンプル（血液、血清／血漿、末梢血単核球／末梢血リンパ球（PBM C / P B L）、痰、尿、糞便、咽頭スワブ、皮膚変性スワブ、脳脊髄液、頸管スミア、膿汁サンプル、食品マトリックス、および身体の種々の部分（脳、脾臓、および肝臓など）由来の組織が含まれるが、これらに限定されない）中のHAポリペプチド（例えば、そのフラグメントおよび／または特徴的部分）を検出するためのHAポリペプチド結合剤を使用した系、組成物、および方法を提供する。本発明はまた、環境サンプル（土壌、水、およびフローラが含まれるが、これらに限定されない）中のHAポリペプチドを検出する

10

【0190】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチドの検出方法は、病理学的サンプルおよび／または環境サンプルを準備する工程、サンプルをHAポリペプチド結合剤と接触させる工程、およびHAポリペプチド結合剤がネガティブコントロール結合剤と比較してサンプルに結合するかどうかを決定する工程を含む。いくつかの実施形態では、かかる方法は、接触工程の前にサンプルを処理する工程（例えば、1つ以上の精製工程にサンプルを供すること）を含む。いくつかの実施形態では、提供したHAポリペプチド結合剤を、検出可能な部分（例えば、蛍光標識、放射性標識、化学発光標識など）で標識する。いくつかの実

20

【0191】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチド結合剤は、アンブレラトポロジューグリカン（アンブレラトポロジューグリカン模倣物が含まれる）であるか、これを含む。かかる実施形態では、グリカンをグリカンアレイに固定し、接触工程はグリカンアレイをサンプルと共にインキュベートすることを含む。

【0192】

いくつかの実施形態では、HAポリペプチド結合剤は、抗体（本明細書中に記載の抗体フラグメントが含まれる）であるか、これを含む。かかる実施形態では、抗体をビーズに固定し、接触工程は免疫沈降を行うことを含む。

30

【0193】

HAポリペプチドに結合する抗体を、ウイルス中和試験で使用することもできる。この試験では、サンプルを目的のHAポリペプチドに特異的な抗体で処置し、そして非処置サンプルと比較した培養細胞への感染能力を試験する。このサンプル中のウイルスがかかるHAポリペプチドを含む場合、抗体はウイルスを中和し、ウイルスの培養細胞への感染を防止するであろう。あるいはまたはさらに、かかる抗体を、HA阻害試験で使用することもできる。この試験では、HAタンパク質を所与のサンプルから単離し、特定のHAポリペプチドまたはHAポリペプチド組に特異的な抗体で処置し、非処置サンプルと比較した赤血球の凝集能力を試験する。サンプル中のウイルスがかかるHAポリペプチドを含む場合、抗体はHAポリペプチド活性を中和し、赤血球の凝集を防止するであろう（Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, CSHL Press, 1988; www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_NCS_2002_5/en/index.html; www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html）。

40

【0194】

50

いくつかの実施形態では、かかる薬剤は、特定のHAポリペプチドをコードするヌクレオチドに特異的に結合し、RT-PCRまたは*in situ*ハイブリッド形成によってかかるHAポリペプチドを特異的に検出するために使用することができる核酸を含むことができる(www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_NCS_2002_5/en/index.html; www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html)。一定の実施形態では、サンプルから単離された核酸を検出前に増幅させる。一定の実施形態では、診断試薬を検出可能に標識することができる。

【0195】

キット

本発明は、本発明の治療方法、予防方法、および/または診断方法の実施に有用な試薬を含むキットを提供する。キットの内容には、HAポリペプチド、HAポリペプチド結合剤、HAポリペプチド干渉剤、そのフラグメント、そのバリエーション、および/またはその特徴的部分が含まれるが、これらに限定されない。キットは、HAポリペプチド、HAポリペプチド結合剤、HAポリペプチド干渉剤、そのフラグメント、そのバリエーション、および/またはその特徴的部分をコードする核酸(例えば、発現プラスミド)を含むことができる。哺乳動物細胞株をキットと共に含めることもできる(ペロ細胞株およびMDCK細胞株が含まれるが、これらに限定されない)。

【0196】

一定の実施形態では、本発明で用いるキットは、基準サンプル、サンプル処理のための説明書、試験実施方法、結果の解釈のための説明書、試験実施に必要な緩衝液および/または他の試薬を含むことができる。一定の実施形態では、キットは抗体群を含むことができる。

【0197】

本発明のいくつかの実施形態では、グリカンアレイを、以下で考察するように、診断薬および/またはキットとして使用することができる。

【0198】

一定の実施形態では、グリカンアレイおよび/またはキットを使用して、複数の用量(例えば、本明細書中に記載)でのHAポリペプチドのアンプレラグリカンへの結合を評価するための用量応答研究を行う。かかる研究は、試験したHAポリペプチドの結合特性に関する特に有益な洞察を提供し、特異的結合を評価するのに特に有用である。この型の用量応答結合研究は、多くの状況で有用に適用されている。一例に過ぎないが、この研究は、関連するHAポリペプチドバリエーション系列における結合特性の進化の追跡(系列が自然進化、意図的改変、またはこれら2つの組み合わせによって生成されるかどうか)で有用であり得る。

【0199】

一定の実施形態では、グリカンアレイおよび/またはキットを使用して、所望の結合特性を有する結合剤(例えば、HAポリペプチドおよび/またはHAポリペプチドバリエーション)を誘導、同定、および/または選択する。例えば、いくつかの実施形態では、グリカンアレイおよび/またはキットを使用して、ポリペプチド結合剤(例えば、HAポリペプチド)集団に進化的圧力(例えば、スクリーニング圧および/または淘汰圧)をかける。

【0200】

いくつかの実施形態では、キットは使用説明書を含む。

【0201】

グリカンアレイ

公知の特異的なグリカン-グリカン結合タンパク質(GBP)相互作用の現在の知識を急速に拡大するために、the Consortium for Functional Glycomics(CFG; www.functionalglycomics.org) (国際的共同研究構想)は、いくつかのグリカン構造を含むグリカンアレイを開発

10

20

30

40

50

しており、新規のグリカンリガンド特異性についてのGBPの高処理スクリーニングが可能になった。グリカンアレイは1価および多価のグリカンモチーフ（すなわち、ポリアクリルアミド骨格に結合した）の両方を含み、各アレイは低濃度（10 μM）および高濃度（100 μM）の264個のグリカンおよび各濃度についての6個のスポットを含む（<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoreh5.shtml>を参照のこと）。

【0202】

アレイは、主に、生理学的に多様なN-およびO結合グリカンを捕捉する合成グリカンを含む。合成グリカンに加えて、異なる哺乳動物糖タンパク質由来のN結合グリカン混合物もアレイ上に示される。

10

【0203】

本明細書中で使用する場合、グリカン「アレイ」は、任意選択的に固体支持体上に固定された1つ以上のグリカン組をいう。いくつかの実施形態では、「アレイ」は、物理的に間隙を介して分離された2つ以上の位置に系統的な配置またはパターンとして存在する一連のグリカンである。典型的には、グリカンアレイは、少なくとも4、8、16、24、48、96、または数百もしくは数千の個別の位置を有するであろう。一般に、グリカンアレイは、種々の形式のうちのいずれかを有し得る。生体分子に適用可能な種々の異なるアレイ形式は、当該分野で公知である。例えば、膨大な数のタンパク質および/または核酸アレイが周知である。当業者は、本発明のグリカンアレイに適切な標準的アレイ形式を直ちに認識するであろう。

20

【0204】

いくつかの実施形態では、グリカンアレイは、「マイクロアレイ」形式で存在する。マイクロアレイは、典型的には、50～200ミクロン以下の距離で分離され、ナノモルからマイクロモル範囲またはナノグラムからピコグラムの範囲でサンプルが固定されるサンプル位置を有することができる。当該分野で公知のアレイ形式には、例えば、各個別のサンプル位置が例えば10ミクロンの尺度を有する形式が含まれる。

【0205】

いくつかの実施形態では、グリカンアレイは、支持体上に空間的に固定された複数のグリカンを含む。本発明は、支持体上に整列されたグリカン分子を提供する。本明細書中で使用する場合、「支持体」は、グリカン分子の整列に使用するのに適切な任意の材料をいう。当業者に認識されるように、広範な種々の材料のいずれかを使用することができる。少数であるが例を挙げると、本発明で有用であり得る支持体材料には、疎水性膜（例えば、ニトロセルロース、PVDF、またはナイロン膜）が含まれる。かかる膜は当該分野で周知であり、例えば、Bio-Rad, Heme1 Hempstead, UKから入手することができる。

30

【0206】

いくつかの実施形態では、グリカンが整列される支持体は、金属酸化物を含むことができる。適切な金属酸化物には、酸化チタン、酸化タンタル、および酸化アルミニウムが含まれるが、これらに限定されない。かかる材料の例を、Sigma-Aldrich Company Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset, BH12 4QH UKから入手することができる。いくつかの実施形態では、かかる支持体は、金属酸化物ゲルであるか、これを含む。いくつかの実施形態では、かかる支持体は、シリカゲルまたは酸化アルミニウムゲル（かかる材料の例を、例えば、Merck KGaA, Darmstadt, Germanyから入手することができる）であるか、これを含む。

40

【0207】

本発明のいくつかの実施形態では、グリカンアレイを、通常の使用中にサイズまたは形状の変化に抵抗することができる支持体上に固定する。例えば、支持体は、グリカンを整列させるために使用するのに適切な成分材料でコーティングしたスライドガラスであり得

50

る。また、いくつかの複合材料は、支持体に所望の固体性を与えることができる。

【0208】

本明細書中で証明されるように、アレイは、異なるHAポリペプチドおよびその結合特性の同定および/または特徴付けに有用である。一定の実施形態では、HAポリペプチドをかかるとアレイ上で試験して、アンブレラトポロジグリカン（例えば、2-6シアリル化グリカン、特にアンブレラトポロジで整列した長鎖2-6シアリル化グリカン）への結合能力を評価する。

【0209】

実際に、本発明は、HAポリペプチドの結合能力を特徴付けるために、そして/または例えば、ヒト結合HAポリペプチド（例えば、上記のH1 HAポリペプチド）を検出するための診断薬として使用することができる1つ以上のアンブレラトポロジグリカン、アンブレラトポロジグリカンの模倣物、2-6シアリル化グリカン、および2-3シアリル化グリカンであるか、これらを含むHAポリペプチド結合剤のアレイを提供する。当業者に明確であるように、かかるアレイは、任意のHAポリペプチド（例えば、研究者によってデザインおよび/または調製されたHAポリペプチドに加えて、天然インフルエンザ単離体中に見出されるHAポリペプチドが含まれる）の特徴付けまたは検出に有用である。

【0210】

いくつかの実施形態では、かかるアレイは、代表的には、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれを超えるヒトHA受容体、特にヒト上気道HA受容体上に見出されるグリカン（例えば、アンブレラグリカン、しばしば、2-6シアリル化グリカン、特に長鎖2-6シアリル化グリカンであろう）を含む。いくつかの実施形態では、アレイは、図5~8に示すグリカン構造のいくつかまたは全てを含む。いくつかの実施形態では、アレイは、これらの示したグリカンの少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれを超える%を含む。

【0211】

本発明は、グリカンアレイを使用してHAタンパク質を同定または特徴付ける方法を提供する。いくつかの実施形態では、例えば、かかる方法は、(1)HAポリペプチドを含むサンプルを準備する工程、(2)サンプルをグリカンアレイと接触させる工程、および(3)アレイ上の1つ以上のグリカンへのHAポリペプチドの結合を検出する工程を含む。

【0212】

本発明のグリカンアレイと接触させるべきHAポリペプチドを含むサンプルに適切な供給源には、病理学的サンプルおよび/または環境サンプル（上記のものなど）が含まれるが、これらに限定されない。

【0213】

グリカンアレイへのHAポリペプチド結合のアッセイに適切な広範な種々の検出系は当該分野で公知である。例えば、HAポリペプチドを、アレイとの接触前または接触後に検出可能に標識し（直接または間接的）、次いで、結合を局在化した標識の検出によって検出することができる。いくつかの実施形態では、スキャニングデバイスを使用して、アレイ上の特定の位置を試験することができる。

【0214】

あるいはまたはさらに、整列したグリカンへの結合を、例えば、熱量測定検出系、蛍光検出系、または放射性検出系、他の標識方法、または標識を必要としない他の方法を使用して測定することができる。一般に、蛍光検出は、典型的には、蛍光分子を用いたアレイの直接探索および蛍光シグナルのモニタリングを含む。あるいはまたはさらに、アレイを、間接的な蛍光検出（この場合、蛍光標識したストレプトアビジンの結合についての試験

10

20

30

40

50

による)のために(例えば、ビオチンを用いて)タグ化した分子を使用して探索することができる。あるいはまたはさらに、蛍光消光法を使用することができる。この方法では、整列したグリカンに蛍光標識し、試験分子(異なるフルオロフォアで標識してもしなくてもよい)を用いて探索する。かかる実施形態では、アレイへの結合は整列したグリカンから放射された蛍光を抑制するように作用し、したがって、蛍光放射の喪失によって結合を検出する。あるいはまたはさらに、整列したグリカンを、放射性物質の存在下で成長させた(放射性標識されたプローブが得られる)生体組織サンプルを用いて探索することができる。かかる実施形態における結合を、放射線放射の測定によって検出することができる。

【0215】

10

かかる方法は、HAポリペプチドによるグリカンアレイへの結合および/または結合範囲の事実を決定するのに有用である。本発明のいくつかの実施形態では、かかる方法をさらに使用して、グリカン-HAポリペプチド相互作用を干渉するか、そうでなければ変化させる薬剤を同定および/または特徴付けることができる。

【0216】

下記の方法は、炭水化物と相互作用することができると考えられる分子が実際に相互作用することができるかどうかを同定するか、分子が予想外に炭水化物と相互作用する能力を有するかどうかを同定するのに有用であり得る。

【0217】

本発明は、例えば、試験サンプル中の特定の薬剤を検出するためのアレイの使用法を提供する。例えば、かかる方法は、(1)グリカンアレイを試験サンプル(例えば、HAポリペプチド(例えば、H1-HAポリペプチド)を含むと考えられるサンプル)と接触させる工程、および(2)試験サンプル中の任意の薬剤のアレイへの結合を検出する工程を含むことができる。

20

【0218】

アレイへの結合を使用して、例えば、結合剤とグリカンとの間の相互作用の動態を決定することができる。例えば、相互作用動態の決定方法は、(1)グリカンアレイを試験される分子と接触させる工程、および(2)結合剤と整列したグリカンとの間の相互作用の動態を測定する工程を含むことができる。

【0219】

30

結合剤のアレイ中の任意のグリカンとの相互作用の動態を、例えば、上で詳述した比色分析シグナルまたは蛍光シグナルの実時間変化によって測定することができる。かかる方法は、例えば、特定の結合剤が特異的炭水化物と異なる結合剤の同一の炭水化物との相互作用よりも高い結合度で相互作用することができるかどうかの決定において特に有用であり得る。

【0220】

勿論、HAポリペプチドによるグリカン結合をアレイ形式自体に存在しないグリカンサンプルまたは供給源に対して評価することができることと認識されるであろう。例えば、HAポリペプチドを、組織サンプルおよび/または細胞株に結合させてそのグリカン結合特性を評価することができる。適切な細胞株には、例えば、任意の種々の哺乳動物細胞株、特にアンブレラトポロジーグリカン(例えば、少なくともそのいくつかは2-6シアリル化グリカン、特に長鎖2-6シアリル化グリカンであり得る)を含むHA受容体を発現する細胞株が含まれる。いくつかの実施形態では、使用される細胞株は、アンブレラトポロジーを有する個別のグリカンを発現する。いくつかの実施形態では、使用される細胞株は多様なグリカンを発現する。いくつかの実施形態では、細胞株を臨床単離体から得、いくつかの実施形態では、細胞株を所望のグリカンの分布および/または蔓延を有するように維持または操作する。いくつかの実施形態では、組織サンプルおよび/または細胞株は、哺乳動物上気道の上皮細胞に特徴的なグリカンを発現する。

40

【0221】

処置

50

本発明は、インフルエンザ感染症の処置（例えば、緩和、改善、低減、その発症の遅延、その進行の阻害、その重症度の軽減、および/またはその1つ以上の症状または特徴の発生の軽減）および/または予防のための系、組成物、および方法を提供する。いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤（本明細書中に記載のものなど）を、種々の治療目的（例えば、インフルエンザ感染症の処置および/またはインフルエンザ感染に対して被験体を免疫化するためのワクチンの開発）のために使用することができる。

【0222】

本発明は、インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918 および/または A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930 の感染症を首尾よく予防し、その発症を遅延させ、そして/または処置するワクチンおよび/または治療薬がインフルエンザ株 2009 A / H1N1（例えば、A / CA / 4 / 2009）の感染症を首尾よく予防し、その発症を遅延させ、そして/または処置することができるという認識を含む。インフルエンザ株 2009 A / H1N1（例えば、A / CA / 4 / 2009）の感染症を首尾よく予防し、その発症を遅延させ、そして/または処置するワクチンおよび/または治療薬は、インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918 および/または A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930 の感染を首尾よく予防し、その発症を遅延させ、そして/または処置することができる。したがって、いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物（以下の節中に記載のものなど）は、インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918、A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930、および/または 2009 A / H1N1（例えば、A / CA / 4 / 2009）のうちの一つ以上を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物は、インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918 および A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930 を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物は、インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918 および 2009 A / H1N1（例えば、A / CA / 4 / 2009）を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物は、インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918 を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物は、インフルエンザ株 A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930 を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物は、インフルエンザ株 2009 A / H1N1（例えば、A / CA / 4 / 2009）を含む。

【0223】

いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物（以下の節中に記載のものなど）は、インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918、A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930、および/または 2009 A / H1N1（例えば、A / CA / 4 / 2009）のうちの一つ以上に存在する一つ以上の H1 HA ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物は、インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918 および A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930 中に存在する H1 HA ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物は、インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918 および 2009 A / H1N1（例えば、A / CA / 4 / 2009）中に存在する H1 HA ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物は、インフルエンザ株 A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930 および 2009 A / H1N1（例えば、A / CA / 4 / 2009）中に存在する H1 HA ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物は、インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918 中に存在する H1 HA ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物は、インフルエンザ株 A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930 中に存在する H1 HA ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンおよび/または治療組成物は、インフルエンザ株 2009 A / H1N1（例えば、A / CA / 4 / 2009）中に存在する H1 HA ポリペプチドを含む。

【0224】

いくつかの実施形態では、ワクチン接種および/または処置方法(以下の節中に記載のものなど)は、インフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918および/またはA/プタ/アイオワ/15/1930への事前の曝露に基づいた患者集団の層別化を含む。かかる方法は、患者が、インフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918および/またはA/プタ/アイオワ/15/1930の一方または両方に事前に曝露されていたかどうかを決定する工程を含む。種々の方法のいずれかを使用して、個体がインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918および/またはA/プタ/アイオワ/15/1930の一方または両方に事前に曝露されていたかどうかを決定することができる。少数であるが例を挙げると、白血球を患者から単離し、これを分析して任意の1918および/または1930陽性B細胞が存在するかどうかを決定することができる。あるいはまたはさらに、疫学的方法を使用して、特定の患者が1918株および/または1930株に曝露されているか曝露されていない確率を決定することができる。

10

【0225】

いくつかの実施形態では、患者がインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918および/またはA/プタ/アイオワ/15/1930の一方または両方に事前に曝露されていたことが決定された場合、その患者に、より低い濃度、より低い効力、および/またはより低い頻度で2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)ワクチンおよび/または治療薬を投与することができる。患者がインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918および/またはA/プタ/アイオワ/15/1930の一方または両方に事前に曝露されていないことが決定された場合、その患者に、より高い濃度、より高い効力、および/またはより頻繁に2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)ワクチンおよび/または治療薬を投与することができる。

20

【0226】

いくつかの実施形態では、患者がインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918および/またはA/プタ/アイオワ/15/1930の一方または両方に事前に曝露されていたことが決定された場合、その患者に、A/サウスカロライナ/1/1918および/またはA/プタ/アイオワ/15/1930に対する防御が証明されたワクチン組成物を使用してワクチン接種することができる。いくつかの実施形態では、患者がインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918および/またはA/プタ/アイオワ/15/1930の一方または両方に事前に曝露されていないことが決定された場合、その患者を、A/サウスカロライナ/1/1918および/またはA/プタ/アイオワ/15/1930に対する治療効果が証明された治療組成物を使用して処置することができる。

30

【0227】

A. ワクチン接種

いくつかの実施形態では、本発明の干渉剤および/または結合剤(例えば、HAポリペプチドならびに/またはそのフラグメント、バリエント、および/もしくは特徴的部分に結合する実体、アンブレラ-トポロジ-グリカンに結合する実体)を、予防的適用のために使用することができる。いくつかの実施形態では、予防的適用は、インフルエンザ感染症の予防、その進行の阻害、および/またはその発症の遅延のための系および方法を含む。

40

【0228】

いくつかの実施形態では、インフルエンザワクチンを使用して、インフルエンザによる感染症を予防し、そして/またはその発症を遅延する。いくつかの実施形態では、ワクチン接種を特定のHAポリペプチドに合わせて作製する。例えば、ワクチン組成物は、H1HAポリペプチドならびに/またはそのバリエント、フラグメント、および/もしくは特徴的部分を含むことができる。いくつかの実施形態では、ワクチン組成物が未変性の高次構造を有し、防御反応(例えば、補体活性化、ウイルス中和など)を媒介し、そして/または強い抗体応答を誘導することができる抗原を含むことが望ましい。

【0229】

50

いくつかの実施形態では、干渉剤を、受動免疫化（すなわち、抗体を被験体に投与する免疫化）のために使用することができる。いくつかの実施形態では、受動免疫化のためのインフルエンザワクチンは、抗体干渉剤（本明細書中に記載のものなど）を含むことができる。いくつかの実施形態では、抗体が妊娠中に母親から胎児に移動する場合に受動免疫化が起こる。いくつかの実施形態では、抗体を個体に直接投与する（例えば、注射、経口などによる）。

【0230】

本発明は、能動免疫化（すなわち、微生物、タンパク質、ペプチド、エピトープ、ミモトープなどを被験体に投与する免疫化）のためのインフルエンザワクチンを提供する。いくつかの実施形態では、インフルエンザワクチンは、本明細書中に記載の1つ以上の干渉剤および/または結合剤を含むことができる。

10

【0231】

いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）（例えば、本明細書中に（例えば、「HAポリペプチド」と表題をつけた節中に）記載のHAポリペプチド、バリエーション、フラグメント、特徴的部分、および/またはその組み合わせのうちのいずれか）を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、H1 HAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、1つ以上の以下の変異：I l e 2 1 9 L y s、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、および/またはG l u 2 2 7 A l aを有するH1 HAポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、I l e 2 1 9 L y s変異を有するH1 HAポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、アミノ酸219位に変異（例えば、I l e 2 1 9 L y s）を有し、且つ98、136、137、138、145、153、155、156、159、183、186、187、189、190、192、193、194、195、196、215、219、222、225、226、227、および228からなる群から選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つのさらなるアミノ酸置換を有するH1 HAポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、およびG l u 2 2 7 A l a変異を有するH1 HAポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、アミノ酸186、189、および227位に変異（例えば、S e r 1 8 6 P r o、A l a 1 8 9 T h r、およびG l u 2 2 7 A l a）を有し、且つ98、136、137、138、145、153、155、156、159、183、186、187、189、190、192、193、194、195、196、215、219、222、225、226、227、および228からなる群から選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つのさらなるアミノ酸置換を有するH1 HAポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、本明細書中に記載の1つ以上の任意のHA H1ポリペプチドを含む、生きている活性ウイルス粒子、本明細書中に記載の1つ以上の任意のHA H1ポリペプチドを含む弱毒化生ウイルス粒子、本明細書中に記載の1つ以上の任意のHA H1ポリペプチドを含むウイルス様粒子（VLP）、本明細書中に記載の1つ以上の任意のHA H1ポリペプチドを含むサブユニットワクチン、および/またはその組み合わせを含む。

20

30

40

【0232】

いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）ならびに少なくとも1つのインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918、A/ブタ/アイオワ/15/1930、および/または2009A/H1N1（例えば、A/CA/4/2009）を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分）ならびにインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918およびA/ブタ/アイオワ/15/1930を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド（ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴

50

的部分)ならびにインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918および2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド(ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)ならびにインフルエンザ株A/プタ/アイオワ/15/1930および2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド(ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)およびインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド(ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)およびインフルエンザ株A/プタ/アイオワ/15/1930を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド(ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)およびインフルエンザ株2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)を含む。

10

【0233】

いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド(ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)およびインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918、A/プタ/アイオワ/15/1930、および/または2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)のうち少なくとも1つ中に存在する少なくとも1つのH1 HAポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド(ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)ならびにインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918およびA/プタ/アイオワ/15/1930中に存在するH1 HAポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド(ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)ならびにインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918および2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)中に存在するH1 HAポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド(ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)ならびにインフルエンザ株A/プタ/アイオワ/15/1930および2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)中に存在するH1 HAポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド(ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)ならびにインフルエンザ株A/サウスカロライナ/1/1918中に存在するH1 HAポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド(ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)およびインフルエンザ株A/プタ/アイオワ/15/1930中に存在するH1 HAポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、少なくとも1つのHAポリペプチド(ならびに/またはそのバリエーション、フラグメント、および/もしくは特徴的部分)およびインフルエンザ株2009A/H1N1(例えば、A/CA/4/2009)中に存在するH1 HAポリペプチドを含む。

20

30

40

【0234】

いくつかの実施形態では、ワクチン組成物は、少なくとも1つのアジュバントを含む。任意のアジュバントを、本発明にしたがって使用することができる。多数のアジュバントが公知であり、多数のかかる化合物の有用な概要は国立衛生研究所によって準備されており、インターネット上(www.niaid.nih.gov/d aids/vaccine/pdf/compendium.pdf)で見出すことができる。Allison(1998, Dev. Biol. Stand., 92:3-11(本明細書中で参考として援用される))、Unkeless et al.(1998, Annu. Rev. Immunol., 6:251-281(本明細書中で参考として援用される))、および

50

Phillips et al. (1992, Vaccine, 10:151-158 (本明細書中で参考として援用される))も参照のこと。何百もの異なるアジュバントが当該分野で公知であり、本発明の実施で使用することができる。本発明で使用することができる例示的なアジュバントには、サイトカイン、アルミニウム塩(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムなど; Baylor et al., Vaccine, 20: S18, 2002 (本明細書中で参考として援用される))、ゲル型アジュバント(例えば、リン酸カルシウムなど); 微生物アジュバント(例えば、CpGモチーフを含む免疫調節DNA配列; 内毒素(モノホスホリル脂質Aなど)(Ribi et al., 1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407, 1986 (本明細書中で参考として援用される)); 外毒素(コレラ毒素、E. coli 易熱性毒素、および百日咳毒素など); ムラミルジペプチドなど); 油乳剤および乳化剤ベースのアジュバント(例えば、フロイントアジュバント、MF59 [Novartis], SAFなど); 粒子アジュバント(例えば、リボソーム、生分解性マイクロファイアなど); 合成アジュバント(例えば、非イオン性ブロックコポリマー、ムラミルジペプチドアナログ、ポリホスファゼン、合成ポリヌクレオチドなど); および/またはその組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。他の例示的なアジュバントには、いくつかのポリマー(例えば、ポリホスファゼン; 米国特許第5,500,161号(本明細書中で参考として援用される)に記載)、Q57、サポニン(例えば、QS21、Ghochikyan et al., Vaccine, 24:2275, 2006 (本明細書中で参考として援用される))、スクアレン、テトラクロロデカオキシド、CPG7909 (Cooper et al., Vaccine, 22:3136, 2004 (本明細書中で参考として援用される))、ポリ[ジ(カルボキシラトフェノキシ)ホスファゼン] (PCCP; Payne et al., Vaccine, 16:92, 1998 (本明細書中で参考として援用される))、インターフェロン- (Cao et al., Vaccine, 10:238, 1992 (本明細書中で参考として援用される))、ブロックコポリマーP1205 (CRL1005; Katz et al., Vaccine, 18:2177, 2000 (本明細書中で参考として援用される))、インターロイキン-2 (IL-2; Mbwuike et al., Vaccine, 8:347, 1990 (本明細書中で参考として援用される))、ポリメチルメタクリレート (PMMA; Kreuter et al., J. Pharm. Sci., 70:367, 1981 (本明細書中で参考として援用される))などが含まれる。

【0235】

B. 治療

本発明は、インフルエンザ感染症に罹患し、罹患しやすく、そして/または症状を示す患者を処置するための系および方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、インフルエンザ感染症に罹患し、罹患しやすく、そして/または症状を示す患者の層別化に有用な系および方法を提供する。

【0236】

いくつかの実施形態では、本発明の干渉剤および/または結合剤(例えば、HAポリペプチドならびに/またはそのフラグメント、バリエーション、および/もしくは特徴的部分に結合する実体、アンブレラ-トポロジ-グリカンに結合する実体)を、治療的適応のために使用することができる。

【0237】

いくつかの実施形態では、治療的適応は、治療有効量の少なくとも1つの本発明の干渉剤および/または結合剤を必要とする被験体に投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤の被験体への投与により、インフルエンザ感染症を緩和し、改善し、低減し、その発症を遅延し、その進行を阻害し、その重症度を軽減し、そして/または1つまたは複数のその徴候、症状、および/または特徴の発生を軽減することができる。

10

20

30

40

50

【0238】

いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤の投与により、被験体中に循環しているインフルエンザビリオン（例えば、新規の細胞に感染することができるインフルエンザビリオン）のレベルが軽減される。いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤の投与により、被験体中に循環しているインフルエンザビリオンのレベルを、非処置コントロールと比較して約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、または約100%軽減させる。

【0239】

いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤を *in vitro* で使用して被験体中のウイルス負荷を軽減することができる。身体の構成要素（特にインフルエンザに感染した患者の身体の構成要素）のウイルス負荷の軽減のために、患者の血液を、インフルエンザビリオンの捕捉のために表面または固体支持体に結合した干渉剤および/または結合剤を含むデバイスに通過させる（例えば、米国特許第5,698,390号および同第4,692,411号（その両方が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。文献中に見出される種々の他のデバイスを本抗体と共に使用して類似の結果を得ることができる。身体の構成要素は、体液（例えば、血液、血清など）、組織、および器官（肝臓など）などであり得る。

10

【0240】

いくつかの実施形態では、「被験体中のインフルエンザビリオンの循環レベル」は、被験体中のビリオンの絶対循環数をいう。いくつかの実施形態では、「被験体中のインフルエンザビリオンの循環レベル」は、被験体の血液の単位体積（例えば、ミリリットル、リットルなど）あたりのビリオン数をいう。いくつかの実施形態では、「被験体中のインフルエンザビリオンの循環レベル」はウイルス負荷という。

20

【0241】

いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤の投与により、HA受容体へのウイルスの結合が阻害される。いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤の投与により、少なくとも1つのHA受容体へのウイルスの結合が、非処置コントロールと比較して約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約50倍、約100倍、約500倍、約1000倍、約10,000倍、または約10,000倍を超えて阻害される。

30

【0242】

いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤の投与により、被験体中のインフルエンザビリオンが死滅および/または不活化される。いくつかの実施形態では、インフルエンザ抗体の投与により、非処置コントロールと比較して被験体中のインフルエンザビリオンの約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、または約100%が死滅および/または不活化される。

【0243】

いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤の投与により、標的細胞とのウイルス媒介融合が阻害される。いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤の投与により、標的細胞とのウイルス媒介融合が、非処置コントロールと比較して約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約50倍、約100倍、約500倍、約1000倍、約10,000倍、または約10,000倍を超えて阻害される。

40

【0244】

いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤の投与により、ウイルス侵入に関連する1つ以上のタンパク質の高次構造の変化が阻害される。いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤の投与により、ウイルス侵入に関連する1つ以上のタンパク質の高次構造の変化が、非処置コントロールと比較して約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約50倍、約100倍、約500倍、約1000倍、約10,000倍、または約10,000倍を超えて阻害される。

50

【0245】

いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤の投与により、HAポリペプチドおよび/またはHA受容体の高次構造が変化する。例えば、投与された干渉剤および/または結合剤は、HAポリペプチドおよび/またはHA受容体に結合し、それにより、HAポリペプチドおよび/またはHA受容体の相互に認識および/または相互作用する能力を立体的に遮断することができる。いくつかの実施形態では、投与された干渉剤および/または結合剤は、HAポリペプチドおよび/またはHA受容体に結合し、それにより、HAポリペプチドおよび/またはHA受容体が相互に認識できなくするような方法でHAポリペプチドおよび/またはHA受容体の三次元高次構造を変化させることができる。

【0246】

いくつかの実施形態では、処置および/またはワクチン接種レジメンを、特に、処置および/またはワクチン接種される個体に合わせて作製する。上記のように、本発明は、患者がH1 HAインフルエンザまたは非H1 HAインフルエンザに感染するかどうかを決定するのに有用な系、組成物、および方法を提供する。かかる方法を使用して、患者を処置および/またはワクチン接種カテゴリーに層別化することができる。いくつかの実施形態では、処置および/またはワクチン接種を処置および/またはワクチン接種される特定の個体に合わせて作製するので、かかる方法は有利であり得る。1つの特定の例であるが、患者がH1 HAインフルエンザ感染群に分類される場合、H1 HAインフルエンザの処置に有用な治療を患者に施すことができ、H1 HAインフルエンザ処置に有用でない治療を施さないであろう。これにより、必要としない治療薬の投与に由来する有害反応のリスクが回避または軽減される。かかる方法により、かかる処置および/またはワクチン接種から利益が得られないかもしれない患者の処置および/またはワクチン接種の経費が削除される。

【0247】

C. 薬学的組成物

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書中に記載の干渉剤および/または結合剤を含む薬学的組成物を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、干渉剤および/または結合剤ポリペプチド(例えば、HAポリペプチド、HAポリペプチドに結合するポリペプチド、そのバリエーション、および/またはそのフラグメント)、かかるポリペプチドをコードする核酸、かかるポリペプチドまたは核酸の特徴的か生物学的に活性なフラグメント、かかるポリペプチドまたはフラグメントに結合し、そして/またはこれと競合する抗体、かかるポリペプチドまたはこれに結合するグリカンと相互作用するか、これと競合する小分子などを薬学的組成物中に含める。いくつかの実施形態では、ポリペプチドではない(例えば、小分子、アンブレラトポロジグリカンおよびその模倣物、炭水化物、アプタマー、ポリマー、核酸などである)干渉剤および/または結合剤を薬学的組成物中に含める。

【0248】

本発明は、かかる薬学的組成物の投与によるインフルエンザ感染症の処置および/または予防を含む。いくつかの実施形態では、薬学的組成物を、インフルエンザ感染症に罹患しているか罹患しやすい被験体に投与する。いくつかの実施形態では、被験体がインフルエンザ感染症に一般に関連する1つ以上の症状を示す場合、被験体をインフルエンザ感染症に罹患していると見なす。いくつかの実施形態では、被験体は、インフルエンザウイルスに曝露されていたことが知られているか、曝露されていたと考えられる。いくつかの実施形態では、被験体がインフルエンザウイルスに曝露されていたことが知られているか曝露されていたと考えられる場合、被験体をインフルエンザ感染症に罹患しやすいと見なす。いくつかの実施形態では、被験体がインフルエンザウイルスに感染していたことが知られているか疑われる他の個体と接触している場合、および/または被験体がインフルエンザ感染症が流行していることが知られているか流行していると考えられる場所に存在しているか存在していた場合、被験体はインフルエンザウイルスに曝露されていたことが知られているか、曝露されていたと考えられる。

10

20

30

40

50

【 0 2 4 9 】

いくつかの実施形態では、インフルエンザ感染症に罹患しているか罹患しやすい被験体を、薬学的組成物の投与前、投与中、または投与後に H A ポリペプチドを認識する抗体について試験する。いくつかの実施形態では、かかる抗体を有する被験体に、H A ポリペプチドを含む薬学的組成物を投与しない。いくつかの実施形態では、薬学的組成物および/または結合剤の適切な用量を、かかる抗体の検出（またはその欠如）に基づいて選択する。

【 0 2 5 0 】

いくつかの実施形態では、処置および/またはワクチン接種のための特定の被験体、投与のための特定の結合剤または組成物、および/または投与のための特定の用量またはレジメンの選択を、例えば、書面、印刷物、または電子記憶形態に記録する。

10

【 0 2 5 1 】

本明細書中に提供した組成物を、1つ以上のインフルエンザ感染症の症状の発症前または発症後に投与することができる。

【 0 2 5 2 】

本発明は、本明細書中に記載の H A ポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤の投与によるインフルエンザ感染症の処置および/または予防（例えば、ワクチン接種）を含む。いくつかの実施形態では、本発明のインフルエンザ感染症の処置を、ワクチン投与によって行う。現在まで、インフルエンザワクチンの開発において多数の成果が得られているが、さらなる改良の余地がある。本発明は、H A ポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤を含むワクチンを提供する。少数であるが例を挙げると、ワクチンは、アンブレラグリカン（例えば、2 - 6 結合アンブレラグリカン（例えば、長鎖 2 - 6 シアリル化グリカンなど））に結合する干渉剤、H A ポリペプチドに結合する結合剤、および/またはその組み合わせを含むことができる。いくつかの実施形態では、組成物は、非アンブレラトポロジグリカンに優先的に結合する薬剤を実質的に含まない。いくつかのかかる実施形態では、薬学的組成物は、せいぜい 5 0 %、4 0 %、3 0 %、2 0 %、1 0 %、5 %、または 1 % のアンブレラトポロジグリカン以外の H A 受容体グリカンに結合する薬剤を含む。

20

【 0 2 5 3 】

いくつかの実施形態では、本発明は、ワクチンおよびこれらのワクチンのヒト被験体（例えば、インフルエンザ感染症に罹患しているか罹患しやすい個体）への投与を提供する。一定の実施形態では、ワクチンは、1つ以上の以下を含む組成物である：（1）不活化ウイルス、（2）弱毒化インフルエンザウイルス（例えば、複製欠損ウイルス）、（3）干渉剤（例えば、H A ポリペプチド、L S B A、U T B A、U T B S A など）、（4）干渉剤ポリペプチド（例えば、H A ポリペプチド）および/またはその特徴的または生物学的に活性な部分をコードする核酸、（5）干渉剤ポリペプチド（例えば、H A ポリペプチド）またはその特徴的または生物学的に活性な部分をコードする D N A ベクター、（6）結合剤（例えば、H A ポリペプチドに結合する実体）、（7）結合剤ポリペプチドおよび/またはその特徴的または生物学的に活性な部分をコードする核酸、（8）結合剤ポリペプチドおよび/またはその特徴的または生物学的に活性な部分をコードする D N A ベクター、（9）発現系（例えば、抗原として使用すべき 1 つ以上の H A ポリペプチドを発現する細胞）、および/または（10）ウイルス様粒子。

30

40

【 0 2 5 4 】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明は、不活化インフルエンザワクチンを提供する。一定の実施形態では、不活化インフルエンザワクチンは、以下の 3 つの抗原調製物型のうちの 1 つを含む：不活化全ウイルス、精製されたウイルス粒子を界面活性剤または脂質エンベロープを可溶化するための他の試薬で破壊したサブピリオン（「スプリット」ワクチン）または精製 H A ポリペプチド（「サブユニット」ワクチン）。一定の実施形態では、ウイルスを、ホルムアルデヒド、 β -プロピオラクトン、エーテル、界面活性剤含有エーテル（ツウィーン - 8 0 など）、セチルトリメチルアンモニウムブロミド（C T

50

AB)、およびトリトンN101、デオキシコール酸ナトリウム、およびトリ(n-ブチル)ホスファートでの処置によって不活化することができる。尿膜腔液(卵内で産生されたウイルス由来)の清澄化の前後に不活化が起こり得、ビリオンを遠心分離によって単離および精製する(Nicholson et al., eds., Textbook of Influenza, Blackwell Science, Malden, MA, 1998(本明細書中で参考として援用される))。ワクチンの効力を評価するために、一元放射免疫拡散(SRD)試験を使用することができる(Schild et al., Bull. World Health Organ., 52:43-50 & 223-31, 1975; Mostow et al., J. Clin. Microbiol., 2:531, 1975(本明細書中で参考として援用される))。

10

【0255】

いくつかの実施形態では、本発明は、ワクチンに有用なウイルス様粒子(VLP)を提供する。一般に、VLPは、アセンブリした場合に未変性ウイルスの高次構造を模倣するタンパク質抗原の複数のコピーを含む。いくつかの実施形態では、VLPは、強いT細胞および/またはB細胞免疫応答を誘発することができる高次構造エピトープを提示するインフルエンザウイルス表面タンパク質(例えば、本発明のHAポリペプチド)の反復的高密度ディスプレイを含む。VLPがいかなるウイルス遺伝子材料も含まないので、VLPはワクチン組成物中の弱毒化ウイルスよりも安全であり得る。VLPを、種々の細胞培養系(哺乳動物細胞株、昆虫細胞株、酵母、植物細胞などが含まれる)で産生することができる。VLPの一般的な考察については、例えば、公開されたPCT出願WO02/000885、WO05/020889、WO06/108226、WO07/130327、WO07/130330、WO08/005777、WO08/040060、WO08/054535、WO08/061243、WO08/094197、WO08/094200、WO08/148104、WO09/009876、WO09/012489、WO10/006452、および米国特許出願公開第2005/0009008号(それらの全てが本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

20

【0256】

いくつかの実施形態では、本発明のVLPは、リボパーティクルと呼ばれる特殊化VLPである。一般に、リボパーティクルは、高濃度の目的の高次構造的にインタクトな膜タンパク質を含むように改変された安定で高度に精製された均一なVLPである。いくつかの実施形態では、本発明のリボパーティクルは、インフルエンザエンベロープタンパク質および/または他のインフルエンザ抗原を含む。

30

【0257】

本発明は弱毒化生インフルエンザワクチンも提供し、弱毒化方法は当該分野で周知である。一定の実施形態では、逆遺伝学(部位特異的変異誘発など)の使用によって弱毒化する。

【0258】

いくつかの実施形態では、ワクチンで用いるインフルエンザウイルスを、卵(例えば、有胚ニワトリ卵)中で成長させる。この場合、採取した材料は尿膜腔液である。あるいはまたはさらに、インフルエンザウイルスは、ウイルスを成長させるための組織培養を使用した任意の方法から誘導することができる。ウイルス成長に適切な細胞基質には、例えば、イヌ腎臓細胞(MDCKまたはMDCKのクローン由来の細胞、MDCK様細胞など)、サル腎臓細胞(AGMK細胞(ベロ細胞が含まれる))、連続細胞株としての培養上皮細胞、293T細胞、BK-21細胞、CV-1細胞など)、または商業的供給源(例えば、ATCC、Rockville, Md.)から容易に利用可能なワクチンを目的としたインフルエンザウイルス産生に適切な任意の他の哺乳動物細胞型(上気道の上皮細胞が含まれる)が含まれる。適切な細胞基質には、ヒト細胞(MRC-5細胞など)も含まれる。適切な細胞基質は細胞株に制限されず、例えば、初代細胞(ニワトリ胚線維芽細胞など)も含まれる。

40

【0259】

50

いくつかの実施形態では、ワクチンは、1つ以上のアジュバントをさらに含む。任意のアジュバントを、本発明に従って使用することができる。多数のアジュバントが公知であり、多数のかかる化合物の有用な概要は国立衛生研究所によって準備されており、インターネット上 (www.niaid.nih.gov/d aids/vaccine/pdf/compendium.pdf) で見出すことができる。Allison (1998, Dev. Biol. Stand., 92:3-11 (本明細書中で参考として援用される)), Unkeless et al. (1998, Annu. Rev. Immunol., 6:251-281 (本明細書中で参考として援用される)), および Phillips et al. (1992, Vaccine, 10:151-158 (本明細書中で参考として援用される)) も参照のこと。何百もの異なるアジュバントが当該分野で公知であり、本発明の実施で使用することができる。例えば、アルミニウム塩 (例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムなど、Baylor et al., Vaccine, 20:S18, 2002) およびモノホスホリル脂質A (MPL; Ribic et al., (1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407, 1986) を、ヒトワクチンにおけるアジュバントとして使用することができる。あるいはまたはさらに、本発明にしたがって使用することができる例示的アジュバントには、サイトカイン、リン酸カルシウム、微生物アジュバント (例えば、CpGモチーフを含む免疫調節DNA配列; 内毒素 (モノホスホリル脂質Aなど) (Ribic et al., 1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407, 1986 (本明細書中で参考として援用される)); 外毒素 (コレラ毒素、E. coli 易熱性毒素、および百日咳毒素など); ムラミルジペプチドなど); 油乳剤および乳化剤ベースのアジュバント (例えば、フロイントアジュバント、SAFなど); 粒子アジュバント (例えば、リボソーム、生分解性ミクروسフィアなど); 合成アジュバント (例えば、非イオン性ブロックコポリマー、ムラミルジペプチドアナログ、ポリホスファゼン、合成ポリヌクレオチドなど); ポリマー (例えば、ポリホスファゼン; 米国特許第5,500,161号 (本明細書中で参考として援用される) に記載)、Q57、スクアレン、および/またはテトラクロロデカオキシドが含まれる。

【0260】

あるいはまたはさらに、新規の化合物は、現在、ヒトワクチン中のアジュバント (MF59 (Chiron Corp., <http://www.chiron.com/investors/pressreleases/2005/051028.html>), CPG 7909 (Cooper et al., Vaccine, 22:3136, 2004 (本明細書中で参考として援用される)), およびサポニン (QS21など) (Ghochikyan et al., Vaccine, 24:2275, 2006 (本明細書中で参考として援用される)) など) として試験されている。

【0261】

さらに、インフルエンザワクチンの免疫原性を増強するためのいくつかのアジュバントは当該分野で公知である (ポリ [ジ (カルボキシラトフェノキシ) ホスファゼン] (PCCP; Payne et al., Vaccine, 16:92, 1998 (本明細書中で参考として援用される)), インターフェロン- (Cao et al., Vaccine, 10:238, 1992 (本明細書中で参考として援用される)), ブロックコポリマー P1205 (CRL1005; Katz et al., Vaccine, .18:2177, 2000 (本明細書中で参考として援用される)), インターロイキン-2 (IL-2; Mbwuikie et al., Vaccine, 8:347, 1990 (本明細書中で参考として援用される)), およびポリメチルメタクリレート (PMMA; Kreuter et al., J. Pharm. Sci., 70:367, 1981 (本明細書中で参考として援用される)) など)。

【0262】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物はアジュバントを含まない（例えば、提供した組成物は本質的にアジュバントを含まない）。いくつかの実施形態では、薬学的組成物はミョウバンアジュバントを含まない（例えば、提供した組成物は本質的にミョウバンを含まない）。

【0263】

本発明は、ウイルス感染症の処置および/またはワクチン接種で有用な他の治療組成物を提供する。いくつかの実施形態では、処置および/またはワクチン接種を、HAポリペプチドの発現または活性を干渉する薬剤の投与によって行う。

【0264】

いくつかの実施形態では、本発明は、提供したポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤に関連する抗体または他の薬剤を含む薬学的組成物を提供する。例えば、本発明は、特定のHAポリペプチド（例えば、アンブレラグリカンに結合するHAポリペプチド）、核酸（RNAiのために使用することができるHA配列に相補的な核酸配列など）、HA受容体への結合を競合するグリカン、グリカン-HAポリペプチド相互作用を競合する小分子または糖模倣物（glycomimetic）、または任意のその組み合わせを含むウイルス粒子を認識する抗体を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、多様な構造を有する異なる薬剤集団を使用する。いくつかの実施形態では、治療組成物は、1つ以上の多価薬剤を含む。いくつかの実施形態では、処置は、曝露直後または曝露の疑いがある場合の緊急投与を含む。

【0265】

一般に、薬学的組成物は、無菌の生体適合キャリア（滅菌水、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、またはデキストロス溶液が含まれるが、これらに限定されない）などの1つ以上の不活性薬剤に加えて治療薬を含むであろう。あるいはまたはさらに、組成物は、薬学的に許容され得る賦形剤（本明細書中で使用する場合、所望の粒子投薬形態に適切な任意および全ての溶媒、分散媒、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散液または懸濁液の助剤、崩壊剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、防腐剤、緩衝剤、固体結合剤、造粒剤、潤滑剤、着色剤、甘味剤、香味物質、および香料などが含まれる）を含むことができる。Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A.R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006（本明細書中で参考として援用される））は、薬学的組成物の処方で使用される種々の賦形剤およびその公知の調製技術を開示している。任意の従来の賦形剤媒質が物質またはその誘導体に不適合である場合（任意の望ましくない生物学的影響を生じるか、薬学的組成物の任意の他の成分と有害な様式で相互作用することなどによる）を除き、その使用は、本発明の範囲内であることが意図される。

【0266】

一定の実施形態では、薬学的組成物は、脂質小胞、生物利用可能および/または生体適合性および/または生分解性のマトリックス、または他の微粒子をカプセル化するか、捕捉するか、結合した治療薬を含むであろう。

【0267】

いくつかの実施形態では、提供した薬学的組成物は、凝集されないHAポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤を含むであろう。例えば、いくつかの実施形態では、乾燥重量または数で1%、2%、5%、10%、20%、または30%未満のHAポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤が凝集物中に存在する。

【0268】

いくつかの実施形態では、提供した薬学的組成物は、変性されていないHAポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤を含むであろう。例えば、いくつかの実施形態では、乾燥重量または数で1%、2%、5%、10%、20%、または30%未満の投与したHAポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤が変性されている。

【0269】

いくつかの実施形態では、提供した薬学的組成物は、不活性でないHAポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤を含むであろう。例えば、いくつかの実施形態では、乾燥重量または数で1%、2%、5%、10%、20%、または30%未満の投与したHAポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤が不活性である。

【0270】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物を、提供したHAポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤の免疫原性を軽減するように処方する。例えば、いくつかの実施形態では、提供したHAポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤を、その免疫原性をマスクする薬剤（ポリエチレングリコールおよび/またはカルボキシメチルセルロースなど）に関連させる（例えば、結合する）。いくつかの実施形態では、提供したHAポリペプチド、干渉剤、および/または結合剤は、免疫原性を軽減するさらなるグリコシル化を有する。

10

【0271】

経口および非経口投与のための液体投薬形態には、薬学的に許容され得る乳濁液、マイクログロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、および/またはエリキシルが含まれるが、これらに限定されない。有効成分に加えて、液体投薬形態は、当該分野で一般に使用される不活性希釈剤（例えば、水または他の溶媒、溶解補助剤および乳化剤（エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実油、アメリカホドイモ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルピタンの脂肪酸エステルなど）、およびその混合物など）を含むことができる。不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、アジュバント（湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、甘味料、香味物質、および/または香料など）を含むことができる。非経口投与のための一定の実施形態では、組成物を、溶解補助剤（クレモフォール（登録商標）、アルコール、油、変性油、グリコール、ポリソルベート、シクロデキストリン、ポリマー、および/またはその組み合わせなど）と混合する。

20

【0272】

直腸または膣投与のための組成物は、典型的には、周囲温度で固体であるが、体温で液体であり、したがって、直腸または膣腔内で融解し、有効成分を放出する適切な非刺激性の賦形剤（カカオバター、ポリエチレングリコール、または坐剤用ワックスなど）との組成物の混合によって調製することができる坐剤である。

30

【0273】

経口投与のための固体投薬形態には、カプセル、錠剤、丸薬、粉末、および顆粒が含まれる。かかる固体投薬形態では、有効成分を、少なくとも1つの不活性な薬学的に許容され得る賦形剤（クエン酸ナトリウムまたは第二リン酸カルシウムおよび/または充填剤またはエキステンダー（例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、およびケイ酸）、結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、スクロース、およびアカシア）、湿潤剤（例えば、グリセロール）、崩壊剤（例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプン、タピオカデンプン、アルギン酸、一定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウム）、溶液遅延剤（例えば、パラフィン）、吸収促進剤（例えば、第四級アンモニウム化合物）、湿潤薬（例えば、セチルアルコールおよびグリセロールモノステアレート）、吸収剤（例えば、カオリンおよびベントナイトクレイ）、および潤滑剤（例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム）、およびその混合物など）と混合する。カプセル、錠剤、および丸薬の場合、投薬形態は緩衝剤を含むことができる。

40

【0274】

本発明の化合物の局所および/または経皮投与のための投薬形態には、軟膏、ペースト

50

、クリーム、ローション、ゲル、粉末、溶液、スプレー、吸入剤、および/またはパッチが含まれ得る。一般に、有効成分を、無菌条件下で薬学的に許容され得る賦形剤および/または任意の必要な防腐剤および/または必要であり得る緩衝液と混合する。さらに、本発明は、しばしば身体への化合物の送達を調節するという付加価値を有する経皮貼布の使用を意図する。かかる投薬形態を、例えば、適切な媒質への化合物の溶解および/または分配によって調製することができる。あるいはまたはさらに、速度調節膜の準備および/またはポリマーマトリックスおよび/またはゲル中の化合物の分散のいずれかによって速度を調節することができる。

【0275】

処方物および医薬品の製造における一般的考察は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995 (本明細書中で参考として援用される) 中に見出すことができる。

【0276】

本発明は、薬学的組成物の投与のためのキットを提供する。例えば、いくつかの実施形態では、本発明は、少なくとも1用量のHAポリペプチド、HAポリペプチド結合剤、HAポリペプチド干渉剤、そのフラグメント、そのバリエーション、および/またはその特徴的部分を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、最初の単位用量およびその後の単位用量の結合剤を含むキットを提供する。いくつかのかかる実施形態では、最初の単位用量がその後の単位用量より多いか、2つの用量が等しい。

【0277】

いくつかの実施形態では、キットは、送達デバイス(例えば、吸入器)の少なくとも1つの構成要素を含む。いくつかのかかる実施形態では、本発明は、送達デバイス(例えば、吸入器)の少なくとも1つの構成要素および一定量のHAポリペプチド、HAポリペプチド結合剤、HAポリペプチド干渉剤、そのフラグメント、そのバリエーション、および/またはその特徴的部分を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは使用説明書を含む。

【0278】

D. 投与

薬学的組成物を、必要とする任意の被験体(例えば、任意の動物)(ヒトが含まれる)に投与することができる。薬学的組成物を、単独または1つ以上の他の治療薬(ワクチンおよび/または抗体が含まれるが、これらに限定されない)との組み合わせのいずれかで投与することができる。「~と組み合わせる」は、これらの送達方法が本発明の範囲内であるにもかかわらず、薬剤を同時に投与しなければならないことや、同時送達のために処方しなければならないことを意味することを意図しない。一般に、各薬剤を、その薬剤のために決定した用量および時間において投与するであろう。さらに、本発明は、その生物学的利用能を改善することができるか、その代謝を軽減または改変することができるか、その排泄を阻害することができるか、体内でのその分布を改変することができる薬剤と組み合わせた薬学的組成物の送達を含む。本発明の薬学的組成物を必要とする任意の被験体(例えば、任意の動物)の処置および/またはワクチン接種のために使用することができるにもかかわらず、これらを、最も好ましくは、ヒトの処置および/またはワクチン接種で使用する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物および/または結合剤を、1つ以上の抗ウイルス薬(例えば、オセルタミビル(タミフル)、ザナミビル(レレザ)など)および/またはシアリダーゼと組み合わせる。

【0279】

薬学的組成物を、処置および/またはワクチン接種に有効な任意の投与量および任意の投与経路を使用して投与することができる。正確な必要量は、被験体の種、年齢、および全身状態、感染の重症度、特定の組成物、その投与様式、およびその活性様式などに応じて患者ごとに異なるであろう。薬学的組成物を、典型的には、それぞれ投与を容易にし、投薬量を均一にするために投薬単位形態で処方する。しかし、本発明の組成物の1日総使

10

20

30

40

50

用量が健全な医学的判断の範囲内で担当医によって決定されると理解されるであろう。特定の被験体または生物に特異的な治療有効用量は、種々の要因（処置および/またはワクチン接種される障害および障害の重症度；使用される特異的ワクチン組成物の活性；投与後の組成物の半減期；被験体の年齢、体重、全身健康、性別、食事；使用される特異的化合物の投与時間、投与経路、および排泄率；処置の持続時間；使用される特異的化合物と組み合わせてか同時に使用される薬物などの要因；ならびに当該医学分野で周知の類似の要因が含まれる）に依存するであろう。

【0280】

本発明の薬学的組成物を、任意の経路で投与することができる。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物を、種々の経路（経口（PO）、静脈内（IV）、筋肉内（IM）、動脈内、髄内、髄腔内、皮下（SQ）、脳室内、経皮、皮膚間、皮内、直腸（PR）、膣、腹腔内（IP）、胃内（IG）、局所（例えば、粉末、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、および/または液滴）、粘膜、鼻腔内、口内、経腸、硝子体、舌下；気管内点滴注入、気管支点滴注入、および/または吸入；口腔噴霧剤、鼻内噴霧、および/またはエアロゾル、および/または門脈カテーテルが含まれる）によって投与する。

10

【0281】

一般に、最も適切な投与経路は、種々の要因（投与される薬剤の性質（例えば、投与時のその安定性）、被験体の状態（例えば、被験体が特定の投与様式に耐えることができるかどうか）など）に依存するであろう。特定の実施形態では、薬学的組成物を鼻腔内投与することができる。特定の実施形態では、薬学的組成物を気管内点滴注入によって投与することができる。特定の実施形態では、薬学的組成物を気管支点滴注入によって投与することができる。特定の実施形態では、薬学的組成物を吸入によって投与することができる。特定の実施形態では、薬学的組成物を鼻内噴霧として投与することができる。特定の実施形態では、薬学的組成物を粘膜投与することができる。特定の実施形態では、薬学的組成物を経口投与することができる。特定の実施形態では、薬学的組成物を静脈内注射によって投与することができる。特定の実施形態では、薬学的組成物を筋肉内注射によって投与することができる。特定の実施形態では、薬学的組成物を皮下注射によって投与することができる。現在、経口もしくは鼻内噴霧またはエアロゾル経路（例えば、吸入による）が、肺および呼吸器系に治療薬を直接送達するために最も一般的に使用されている。しかし、本発明は、薬物送達科学であり得る進歩を考慮した任意の適切な経路による薬学的組成物の送達を含む。

20

30

【0282】

いくつかの実施形態では、吸入またはエアロゾル送達のための調製物は、複数の粒子を含む。いくつかの実施形態では、かかる調製物の平均粒径は、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13ミクロンである。いくつかの実施形態では、吸入またはエアロゾル送達のための調製物を、乾燥粉末として処方する。いくつかの実施形態では、吸入またはエアロゾル送達のための調製物を、湿式粉体（例えば、湿潤剤の含有による）として処方する。いくつかの実施形態では、湿潤剤は、水、生理食塩水、または生理学的pHの他の液体からなる群から選択される。

【0283】

いくつかの実施形態では、組成物を、液滴として鼻または口腔に投与する。いくつかの実施形態では、用量は、複数の液滴（例えば、1～100、1～50、1～20、1～10、1～5など）を含むことができる。

40

【0284】

いくつかの実施形態では、組成物を、定量の薬学的組成物を送達させるデバイスを使用して投与する。

【0285】

薬学的組成物を、所望の結果を達成するのに適切な任意の用量で投与することができる。いくつかの実施形態では、所望の結果は、インフルエンザ感染の強度、重症度、および/または頻度の軽減、および/またはその1つ以上の症状の発生の遅延である。

50

【0286】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物を、インフルエンザHAとアンブレラトポロジ-グリカンへの結合を競合するのに有効な用量のHAポリペプチド（例えば、そのバリエーション、フラグメント、および/または特徴的部分）が投与されるように処方する。いくつかの実施形態では、インフルエンザHAによるかかる結合は、1つ以上の用量の組成物の投与後にかかる投与を行わないレベルと比較して減少する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物を、組成物を投与された被験体中（例えば、被験体の気道中）に存在する少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または99%を超えるHA結合部位（例えば、アンブレラトポロジ-グリカンを含むHA結合部位）を飽和させるのに有効なHAポリペプチドの用量が投与されるように処方する。

10

【0287】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物を、HA受容体と（例えば、インフルエンザウイルス粒子の表面上の）HAポリペプチドへの結合を競合するのに有効な用量の干渉剤（例えば、アンブレラトポロジ-グリカン模倣物）が投与されるように処方する。いくつかの実施形態では、インフルエンザHAポリペプチドのHA受容体への結合は、1つ以上の用量の組成物の投与後にかかる投与を行わないレベルと比較して減少する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物を、組成物を投与された被験体中（例えば、被験体の気道中）に存在する少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または99%を超えるHA結合部位（例えば、アンブレラトポロジ-グリカンを含むHA結合部位）を飽和させるのに有効な干渉剤の用量が投与されるように処方する。

20

30

【0288】

一定の実施形態では、薬学的組成物を、所望の治療効果を得るために被験体体重において1日あたり約0.001mg/kg～約100mg/kg、約0.01mg/kg～約50mg/kg、約0.1mg/kg～約40mg/kg、約0.5mg/kg～約30mg/kg、約0.01mg/kg～約10mg/kg、約0.1mg/kg～約10mg/kg、または約1mg/kg～約25mg/kgの治療薬を送達させるのに十分な投薬レベルで投与することができる。所望の投薬量を、被験体に1回のみ送達させることができる。所望の投薬量を、1日3回超、1日3回、1日2回、1日1回、1日おき、3日おき、毎週、2週間毎、3週間毎、4週間毎、2ヶ月毎、6ヶ月毎、12ヶ月毎、2年毎、3年毎、4年毎、5年毎、10年毎、または20年毎に送達させることができる。一定の実施形態では、所望の投薬量を、複数回の投与（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15回、またはそれを超える投与）を使用して送達させることができる。

40

【0289】

本発明の組成物を併用療法で使用することができると認識されるであろう。組み合わせレジメンで使用するための治療（例えば、治療薬または手順）の特定の組み合わせは、所望の治療薬および/または手順の適合性ならびに達成すべき所望の治療効果を考慮するであろう。使用した治療により、同一の目的のための所望の効果を達成することができる（例えば、インフルエンザ感染症の処置、予防、および/または発症の遅延に有用な薬剤をインフルエンザ感染症の処置、予防、および/または発症の遅延に有用な別の薬剤と同

50

時に投与することができる)、異なる効果(例えば、任意の有害作用の調節)を達成することができることと認識されるであろう。本発明は、その生物学的利用能を改善し、その代謝を軽減および/または改変し、その排泄を阻害し、そして/または体内のその分布を改変することができる薬剤と組み合わせた薬学的組成物の送達を含む。

【0290】

本発明の薬学的組成物を、単独または1つ以上の他の治療薬と組み合わせて投与することができる。「~と組み合わせて」は、これらの送達方法が本発明の範囲内であるにもかかわらず、薬剤を同時に投与しなければならないこと、および/または同時送達のために処方しなければならないことを意味することを意図しない。組成物を、1つ以上の所望の他の治療薬または医学的手順と同時、前、または後に投与することができる。組み合わせ
10
中で使用される治療活性剤を単一の組成物中で共に投与することができるか、異なる組成物中で個別に投与することができることと認識されるであろう。一般に、各薬剤を、その薬剤のために決定した用量および/または日程で投与するであろう。

【0291】

一般に、組み合わせて使用される薬剤を、薬剤が個別に使用されるレベルを超えないレベルで使用すると予想される。いくつかの実施形態では、組み合わせ中で使用されるレベルは、個別で使用されるレベルより低いであろう。

【0292】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物を、1つ以上の抗ウイルス薬(例えば、オセルタミビル(タミフル)、ザナミビル(レレザ)など)および/またはシアリダーゼと組み
20
合わせて投与する。

【実施例】

【0293】

実施例1: 2009A/H1N1 HAのグリカン結合特異性

本発明者らは、主にブタに感染する2009A/H1N1 HAのグリカン結合特異性を特徴付け、H1 HAの変異形態(季節性およびパンデミックのインフルエンザAのH1N1ウイルスの両方に由来するHAに特徴的な効率的なヒト-ヒト空気伝播のためにヒトに
30
適応するであろう)を同定した。いくつかの2009A/H1N1株が単離および配列決定されているにもかかわらず、これらの間にはいくつかの遺伝子内変異が存在する。したがって、本発明者らは、代表的な2009A/H1N1ウイルス(すなわち、A/カリフォルニア/0409(以後CA/04という))由来のHAを使用した。

【0294】

材料と方法

CA/04血球凝集素のヒト呼吸器組織への結合

ホルマリン固定し、パラフィン包埋した正常なヒト気管組織切片およびヒト肺胞組織切片を、それぞれUS BiologicalおよびUS Biomaxから購入した。組織切片を脱パラフィンし、再水和し、1%BSAを含むPBSにて室温(RT)で30分
40
間プレブロックした。HA-抗体プレ複合体を、20μg/mlの組換えCA/04 HAタンパク質の一次抗体(マウス抗6xHisタグ、Abcam)および二次抗体(Alexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG、Molecular Probes)とそれぞれ4:2:1の比率にて氷上で20分間インキュベートすることによって生成した。組織結合研究を、組織切片の希釈したHA-抗体複合体との室温で3時間のインキュベーションによって行った。細胞核を視覚化するために、切片を、ヨウ化プロビジウム(Invitrogen; TBST中1:100)にて室温で20分間対比染色した。シアリダーゼ前処置の場合、組織切片を、タンパク質とのインキュベーションの前に0.2単位のシアリダーゼA(Arthrobacter ureafaciens由来の組換え体、Prozyme)と37で3時間インキュベートした。次いで、切片を洗浄し、Zeiss LSM510レーザー走査型共焦点顕微鏡下で観察した。

CA/04 HAの用量依存性直接受容体結合

組換え的に発現したCa/04 HAの受容体特異性を、2-3および2-6シア
50

リル化グリカンの両方を含む一連のグリカンを使用して調査した。ストレプトアビジンコーティングした高結合能の384ウェルプレート(Pierce)のウェルを、50 μ lの2.4 μ Mビオチン化グリカンと4で一晚インキュベートした。含まれるグリカンは3'-SLN、3'-SLN-LN、3'SLN-LN-LN、6'-SLN、および6'SLN-LN(LNはラクトサミン(Gal1-4GlcNAc)に対応し、3'SLNおよび6'SLNはそれぞれLNに結合したNeu5Ac2-3およびNeu5Ac2-6に対応する)であり、その供給源要求プログラムによってConsortium of Functional Glycomics(www.functionalglycomics.org)から入手した。HA複合体の保存液を、適量のHAタンパク質、一次抗体(マウス抗6xHisタグIgG、Abcam)および二次抗体(HRP
10 抱合ヤギ抗マウスIgG、Santa Cruz Biotechnology)とそれぞれ4:2:1の比率にて氷上で20分間インキュベートすることによって調製した。適量の予め複合体化したストックHAを、1%BSAを含む250 μ lのPBSで希釈した。50 μ lの予め複合体化したHAをグリカンコーティングした各ウェルに添加し、室温で2時間インキュベートし、その後にPBST(PBS+0.1%ツウィーン-20)で3回洗浄し、PBSで3回洗浄した。結合シグナルを、製造者の説明書に従ってAmplex Redペルオキシダーゼアッセイ(Invitrogen)を使用してHRP活性に基づいて決定した。適切なネガティブコントロールを含めた。

【0295】

結果

2009A/H1N1 HAのグリカン結合性

見かけ上の結合定数 K_d' を使用して、ビオチン-ストレプトアビジン(streptavidin)ベースのグリカンアレイプラットフォーム上の代表的なヒト受容体およびトリ受容体へのHAの用量依存性結合を定量した(Srinivasan et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105:2800-05(本明細書中で参考として援用される))。パラメータ K_d' を、多価結合についてのヒル式を使用した結合データ(HA濃度範囲にわたる)のフィッティングによって計算することができる(Srinivasan et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105:2800-05(本明細書中で参考として援用される))。三量体HA単位は、3つのHA単量体(単量体あたり1つのRB
30 Sを有する)から構成される。ストレプトアビジンプレートアレイのウェル中のビオチン化グリカンの空間的配置は、三量体HA単位中の3つのHA単量体のうちのたった1つに結合することを好む。したがって、HA-グリカン相互作用における多価性を特異的に増強するために、以前に記載のように、組換えHAを一次抗体および二次抗体と4:2:1(HA:一次:二次)の比率で予め複合体化した(Srinivasan et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105:2800-05;およびStevens et al., 2006, Nat. Rev. Microbiol., 4:857-64(その両方が本明細書中で参考として援用される))。アレイプラットフォーム上のグリカンと比較したプレ複合体中の4つの三量体HA単位の同一の空間配置は異なるHAを通してアビディティ効果を均一にし、それ故、異なるHAの
40 グリカン結合強度の間で定量的に比較することが可能である。

【0296】

2009A/H1N1 HAのグリカン結合性を、用量依存性直接受容体結合アッセイ(Srinivasan et al., 2008, Proc Natl Acad Sci U S A, 105:2800-5(本明細書中で参考として援用される))およびヒト肺組織結合アッセイ(Chandrasekaran et al., 2008, Nat Biotechnol, 26:107-13(本明細書中で参考として援用される))を使用して試験した。これらのアッセイを、以前に記載のように可溶性タンパク質を産生するようにデザインされた構築物を使用して組換え発現したCA/04 HAを使用して行った(Chandrasekaran et al., 2008, Nat Bi
50

o t e c h n o l , 2 6 : 1 0 7 - 1 3 (本明細書中で参考として援用される)) 。直接グリカン受容体結合アッセイでは、C A / 0 4 H A は、単一の 2 - 6 グリカン (6 ' S L N - L N) のみへの用量依存性結合および 2 - 3 グリカンへの最小結合のみを示した (図 9 A) 。 C a l / 0 4 H A の結合パターンが 1 9 1 8 パンデミックインフルエンザ A ウイルス (A / サウスカロライナ / 1 / 1 9 1 8 ; または S C 1 8) 由来の H A の結合パターンと類似している一方で、C A / 0 4 H A の結合親和性は S C 1 8 H A の結合親和性より低い (図 9 B) 。

【 0 2 9 7 】

C A / 0 4 H A の組織結合の試験は、C A / 0 4 H A がヒト気管 (代表的な上気道の) 組織切片の頂端面に均一に結合することを示す (図 1 0) 。この結合パターンは、気管組織の頂面上の 2 - 6 シアリル化グリカンの支配的分布 (C h a n d r a s e k a r a n e t a l . , 2 0 0 8 , N a t B i o t e c h n o l , 2 6 : 1 0 7 - 1 3 (本明細書中で参考として援用される)) および直接結合アッセイにおける C A / 0 4 H A の 2 - 6 結合と関連する。C A / 0 4 が肺胞へのいくらかの結合を示すにもかかわらず、この結合は気管結合ほど強くなく、直接結合アッセイで認められた最小の 2 - 3 結合と一致する。

【 0 2 9 8 】

上記データに基づいて、A / 2 0 0 9 H 1 N 1 H A がパンデミック S C 1 8 H A の類似の結合選択性を有する一方で、その 2 - 6 結合親和性は S C 1 8 H A の親和性より実質的に低いことが明らかである。空気伝播効率 (例えば、ヒトにおけるインフルエンザ A ウイルス伝播のために確立された動物モデルであるフェレット動物モデルを使用) がウイルス H A の 2 - 6 結合親和性と関連することが以前に証明されていた (T u m p e y e t a l . , 2 0 0 7 , S c i e n c e , 3 1 5 : 6 5 5 - 5 9 (本明細書中で参考として援用される)) 。実際に、効率的に伝播する S C 1 8 ウイルスの H A 中の単一アミノ酸変異により、非効率に伝播するウイルス (N Y 1 8) が得られた。N Y 1 8 H A の 2 - 6 結合親和性は、S C 1 8 H A の親和性よりも実質的に低かった (S r i n i v a s a n e t a l . , 2 0 0 8 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 1 0 5 : 2 8 0 0 - 5 (本明細書中で参考として援用される)) 。類似の様式では、S C 1 8 H A よりも実質的に低い C A / 0 4 H A の 2 - 6 結合親和性は、このウイルスが効率的なヒト - ヒト空気伝播のためのヒト宿主への適応が依然として完全でなかったことを示す。この結論と一致して、C A 0 4 H A のより低いヒト受容体結合強度は、高伝播性 S C 1 8 と比較して、フェレットにおいて認められたより低い C A 0 4 ウイルスの伝播効率と関連した (例えば、T u m p e y e t a l . , 2 0 0 7 , S c i e n c e , 3 1 5 : 6 5 5 - 5 9 ; および M a i n e s e t a l . , 2 0 0 9 , S c i e n c e , 3 2 5 : 4 8 4 - 8 7 (その両方が本明細書中で参考として援用される) を参照のこと) 。マウスにおいても類似の結果が得られた (M a i n e s e t a l . , 2 0 0 9 , S c i e n c e , 3 2 5 : 4 8 4 - 8 7 (本明細書中で参考として援用される)) 。

【 0 2 9 9 】

2 0 0 9 A / H 1 N 1 H A の構造分析

本研究で使用した 2 0 0 9 A (H 1 N 1) H A の受容体結合部位 (R B S) (S o u n d a r a r a j a n e t a l . , 2 0 0 9 , N a t B i o t e c h n o l , 2 7 : 5 1 0 - 3 (本明細書中で参考として援用される)) ならびに S C 1 8 および最近の季節性インフルエンザ H 1 N 1 ウイルス由来の受容体結合部位を比較した (図 1 1) 。C A / 0 4 H A と S C 1 8 H A との間の結合パターンの類似性は、A s p 1 9 0 および A s p 2 2 5 (2 - 6 グリカンと最適に接触するヒト適応 H 1 N 1 H A の「顕著な特徴のある」アミノ酸である) を含むこれらの H A の間の「類似または相似」R B S 残基の大部分から潜在的に生じ得る。S C 1 8 と C A / 0 4 H A との間の R B S の相違は、1 4 5 位、1 8 6 位、1 8 9 位、2 1 9 位、および 2 2 7 位で起こる。C A / 0 4 H A は、シアリ酸のためのさらなる係留接触が得られる固有の L y s 1 4 5 を有する (S o u n d a

10

20

30

40

50

r a r a j a n e t a l . , 2 0 0 9 , N a t B i o t e c h n o l , 2 7 : 5 1 0 - 3 (本 明 細 書 中 で 参 考 と し て 援 用 さ れ る) 。 A s p 1 9 0 と の 相 互 作 用 ネットワークが形成されるように186、187、189の残基を配置する(Soundararajan et al., 2009, Nat Biotechnol, 27:510-3 (本明細書中で参考として援用される))。SC18 HAの場合、このネットワークは、Thr187、Thr189、およびAsp190の酸素原子を含む(Srinivasan et al., 2008, Proc Natl Acad Sci U S A, 105:2800-5; およびGamblin et al., 2004, Science, 303, 1838-42 (その両方が本明細書中で参考として援用される))。類似の様式で、CA/04 HAの場合、Ser186、Thr187、およびAsp190の酸素原子は、このネットワークを潜在的に形成することができる。残基219および227は、同様に、残基186の配向に影響を及ぼす。残基219および227の比較(図11)により、両アミノ酸のいずれかが疎水性であるか(Ala219およびAla227など)(SC18 HAで認められるように)、これらが荷電残基(Lys219およびGlu227など)である(季節性インフルエンザHAで認められるように)ことが明らかとなる。本発明は、2009A(H1N1)HAが完全に疎水性ではなく、完全に荷電もされていない相互作用組が得られるIle219とGlu227との固有の組み合わせを有するという認識を含む。この組み合わせは、186、219、および227の残基の疎水性またはイオン性のネットワークを不安定化し、それにより、2-6シアリル化グリカンとの最適な接触を破壊することができる(図12)。2009A(H1N1)HAのRBSの分析により、類似の結合パターンにもかかわらずSC18 HAと比較してCA/04 HAの2-6結合親和性が低いことに対する説明が得られる。(図9)。

【0300】

構造分析(図12)により、2009A/H1N1 HAに固有のRBS中のアミノ酸の組み合わせに起因するより低い親和性が説明される。本発明は、RBS中の変異によって2-6グリカンとの最適な接触のためのAsp190の配置の問題を解決することができ、それ故、2-6結合に対する親和性が増加し得るという認識を含む。本発明によれば、この問題を解決すると考えられる変異の可能な組み合わせには、以下が含まれる。

・Ile219 Lys:これは、残基219位、222位、225位、227位間の相互作用ネットワークを実質的に(完全でないにしても)イオン性にし、次いで、Asp190との相互作用を得るためにSer186が配置され、次いで、2-6と接触させるためにAsp190を配置するであろう。変異HA中の相互作用ネットワークのこの部分は、最近の季節性インフルエンザH1N1 HAで認められる部分に類似する。

・Ser186 Pro/Ala189 Thr/Glu227 Ala:これは、残基186位、219位、および227位間の相互作用ネットワークを疎水性にし、変異HA中のThr189がThr187と共にAsp190との相互作用を得るために配置され、次いで2-6と接触させるためにAsp190を配置するであろう。変異HA中の相互作用ネットワークのこの部分は、SC18で認められる部分に類似する。

【0301】

上で列挙した変異の両組み合わせにより、いかなる最近の季節性インフルエンザH1N1 HAおよびSC18 HAとも異なる固有のHAが得られる。

【0302】

考察

2009年の初期に、新規のH1N1インフルエンザウイルス株(2009H1N1という)は、北米トリプルリアソータントブタH1ウイルスが起源であった。このウイルスによって提起された世界的な健康の脅威により、その後WHOはこの株をパンデミックと分類した(WHO, 2009, Weekly Epid. Rec., 84:249-57 (本明細書中で参考として援用される))。鍵となる2009H1N1インフルエンザウイルスタンパク質の大規模な配列および構造分析に基づいて、本発明者らは、ウイルスの性質(ウイルス血球凝集素(HA)のグリカン-受容体結合、薬物耐性、ビルレンス、お

よび伝播性が含まれる)を調査した(例えば、Results above Soundararajan et al., 2009, Nat. Biotechnol., 27: 510-13(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。CA/04 HAが2-6グリカンに優先的に結合する(2-3グリカンと対照的)ことが証明された上記の実施例1に示す結果と対照的に、Childs et al.(2009, Nat. Biotechnol., 27: 797-99(本明細書中で参考として援用される))は、その後脂質ベースのグリカンアレイプラットフォームの文脈で2009H1N1ウイルスが2-3-(トリ受容体)および2-6-(ヒト受容体)結合シアリル化グリカンの両方に結合したことを報告した。

【0303】

グリカンアレイプラットフォーム上の全ウイルスの分析は、Childs et al.によって報告されるように、HAのグリカン受容体結合部位(RBS)中のアミノ酸置換から生じる結合のわずかな相違を理解するためのいくつかの課題を示す。例えば、1つの一般的に使用されているウイルス力価の測定方法は、ウイルスが赤血球(RBC)を凝集する能力(RBC表面上のシアリル化グリカン受容体へのウイルスHAの結合によって媒介される性質)に基づく。しかし、グリカン-受容体結合性が変化した変異株を相互または基準野生型(WT)株と比較するためにこの方法を使用すると、ウイルスのWTおよび変異形態の同一の赤血球凝集力価が同数のウイルス粒子に対応しないかもしれないという事実によって複雑になる。直接標識したウイルスの使用(Kumari et al., 2007, Virol. J., 4: 42(本明細書中で参考として援用される))またはChilds et al.によって報告された等濃度のウイルスタンパク質に基づいたウイルス力価の調整(例えば、ゲル電気泳動を使用)によって、この問題を一定範囲に回避することができる。

【0304】

実施例1に示したデータおよび結論後に公開された研究は、(典型的には、高いウイルス濃度またはHA濃度での)定性的特徴に注目している。これらの研究を、アレイ上の最大数のグリカンについて結合シグナルを認めることができるようにデザインした(例えば、Childs et al., 2009, Nat. Biotechnol., 27: 797-99; およびHua et al., 2010, PLoS Currents: Influenza(その両方が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。これらの研究は、所与のHAまたはウイルスに結合するトリ受容体およびヒト受容体数の漠然とした考えを提供しているが、HA-グリカン相互作用の結合強度(または親和性)を定量および比較するのに適切ではない。対照的に、本発明者らは、HA濃度範囲にわたる結合を分析するアッセイのデザインおよびアビディティおよび/または協同性の影響を考慮することによる飽和へのアプローチの測定によって定量的情報を得た。

【0305】

まとめると、本発明者らは、2009H1N1のHA-グリカン受容体結合性を特徴付けた。本発明者らは、代表的な2009H1N1ウイルス(A/カリフォルニア/04/09または「CA04」)由来のHAがグリカンアレイプラットフォームおよびヒト上皮上のヒト受容体に特異的に結合し、トリ受容体への観察可能な結合は示さないことを証明した(上記の結果およびMaines et al., 2009, Science, 325: 484-87(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。しかし、CA04 HAのヒト受容体への結合強度は、プロトタイプ1918H1N1パンデミックであるA/サウスカロライナ/1/1918(「SC18」)由来のHAの結合強度より実質的に低かった(上記の結果およびMaines et al., 2009, Science, 325: 484-87(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。CA04 HAのより低いヒト受容体結合強度は、フェレットにおける高伝播性SC18(Tumpey et al., 2007, Science, 315: 655-59(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)と比較して、観察されたCA04ウイルスのより低い伝播効率と相関していた(上記の結果およびMaines et

10

20

30

40

50

al., 2009, Science, 325: 484-87 (本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。CA04 HAによるトリ受容体への観察可能な結合の欠如は、最近の2009 H1N1 HAのグリカンマイクロアレイ分析(Hua et al., 2010, PLoS Currents: Influenza (本明細書中で参考として援用される))と一致するが、全ウイルスを使用したChilds et al.による報告における所見と対照的である。いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、これらの相違は、HAの提示の相違(例えば、全ウイルス上と比較した組換えタンパク質)および異なるアレイプラットフォーム中のグリカン受容体に起因し得る(Childs et al.を参照のこと)。

【0306】

実施例2: 2009 A/H1N1単離体と1918および1930パンデミック株単離体との比較

1918年および1930年に、その親株と比較してヒト感染性が増強されたH1インフルエンザウイルス株が出現した。これらの各株は、ヒトにおいてインフルエンザ感染症のパンデミックを引き起こした。

【0307】

本発明者らは、A/サウスカロライナ/1/1918株およびA/ブタ/アイオワ/15/1930株の結合および/または配列の特徴を代表的な2009 A/H1N1株であるA/カリフォルニア/0409(CA/04)と比較した。本発明は、他の2009 A/H1N1株について類似の結果が得られるであろうという認識を含む。本発明は、2009 A/H1N1がA/サウスカロライナ/1/1918株およびA/ブタ/アイオワ/15/1930株の両方、特に1918株と有意に類似することを証明している(図4A~C)。この所見は、とりわけ、(1)A/サウスカロライナ/1/1918株およびA/ブタ/アイオワ/15/1930株、特に1918株に対する免疫化によって2009 A/H1N1に対するいくつかの交差反応性防御を得ることができ、そして/または(2)A/サウスカロライナ/1/1918株およびA/ブタ/アイオワ/15/1930株、特に1918株に事前に曝露された個体が、(a)感染に対してより低い罹患しやすきことができ、したがって、事前に曝露されていない個体よりもワクチン接種および/または処置の必要性が低いことを証明することができ、(b)より低い濃度、より低い効力、および/またはより低い投薬頻度でのワクチンおよび/または治療組成物が必要であり得、そして/または(c)以前の曝露によって初回刺激を受け、おそらく首尾の良いワクチン接種を達成することができることを意味する。

【0308】

実施例3: H1 HAポリペプチドの結合特性

当業者は、本明細書を読んだ後、本明細書中に記載の技術を使用して任意の供給源由来のH1ポリペプチドの結合特性を分析または決定することができることを認識するであろう。以下の表4は、種々の株由来の種々のH1 HAポリペプチドの配列を提供する。表4に示したいくつかの配列は、HA1領域(例えば、グリカン受容体結合部位の全部または一部を含む)に対応する。多数のさらなるH1 HAポリペプチド配列を、公共データベース(GISAIDインフルエンザポータルデータベース(<http://platform.gisaid.org/dante-cms/live/struktur.jdante?aid=1131>))および/またはNCBI FLUデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>)が含まれるが、これらに限定されない)からアクセスすることができる。

表4: 例示的なH1 HAポリペプチドの配列

【0309】

10

20

30

40

【表4 - 1】

株	H1 HA配列
A/アイチ/8/09 (HA1のみ)	DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLNSHNGKLCLLKGIAPLQ LGNCVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGHFAEYEELR EQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVTGVSASC SHNGESSFYRNLLWLTGK NGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIAAQKTYHTENAYVSVVSSH YSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRI NYWTLLEPGDTIIFEANGNLAPRYAFA LSRFGSGIINSNAPMDKCDAKCQTPQGA INSSLPFQNVHPVTIGECKPYV RSAKLRMVTGLRNIPSIQSR (配列番号55)
A/アイチ/9/2009 (HA1のみ)	DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLNSHNGKLCLLKGIAPLQ LGNCVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGHFAEYEELR EQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVTGVSASC SHNGEN SFYRNLLWLTGK NGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIAQKALYHTENAYVSVVSSH YSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRI NYWTLLEPGDTIIFEANGNLAPRYAFA LSRFGSGIINSNAPMDKCDAKCQTPQGA INSSLPFQNVHPVTIGECKPYV RSAKLRMVTGLRNIPSIQSR (配列番号56)
A/アイチ/37/09 (HA1のみ)	DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLNSHNGKLCLLKGIAPLQ LGNCVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGHFAEYEELR EQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVTGVSASC SHNGEN SFYRNLLWLTGK NGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIAQKTYHTENAYVSVVSSH YSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRI NYWPLLEPGDTIIFEANGNLAPRYAFA LSRFGSGIINSNAPMDKCDAKCQTPQGA INSSLPFQNVHPVTIGECKPYV RSAKLRMVTGLRNIPSIQSR (配列番号57)
A/ブリズベーン/59/2007 (HA1のみ)	DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLNSHNGKLCLLKGIAPLQ LGNCVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCYPGHFAEYEELR EQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVTGVSASC SHNGESSFYRNLLWLTGK NGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQKALYHTENAYVSVVSSH YSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRI NYWTLLEPGDTIIFEANGNLAPRYAFA LSRFGSGIINSNAPMDKCDAKCQTPQGA INSSLPFQNVHPVTIGECKPYV RSAKLRMVTGLRNIPSIQSR (配列番号58)

10

20

30

【0310】

【表 4 - 2】

株	H1 HA配列	
A/ワシントン/1/09	MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL NSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNP ENGTCPYGFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASCS HNGESSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIVXQ KTLYRTENAYVSVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDT IIFEANGNLAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDKCDAKCQTPQGAINSSL PFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAAGFIEGGW TGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTA VGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVK NLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTY (配列番号 59)	10
A/カンタベリー/106/2004	MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL DSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVEKPNP ENGTCPYGFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHTVTGVSASCS HNGKSSFYKNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQ KALYHTENAYVSVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDT IIFEANGNLAPRYAFALSRGFGSGIINSNAPMDECDAKCQTPQGAINSSL PFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAAGFIEGGW TGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTA VGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVK NLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGTYDYPKYSEESK LNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQC RICI (配列番号60)	20
A/ニューヨーク/212/2001	MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL DSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNP ENGTCPYGFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKGSSWPNHTVTGVSASCS HNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSMSYVNNKEKEVLVLWGVHPPNIGDQ RALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDT IIFEANGNLAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDAKCQTPQGAINSSL PFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAAGFIEGGW TGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTA VGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVK NLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVKNGTYDYPKYSEESK LNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQC RICI (配列番号61)	30

【 0 3 1 1 】

【表4 - 3】

株	H1 HA配列
A/ニューヨーク/307/2001	KAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGTAPLQLGNCSAGWILGNPECESLFSKESWSYIAETPNPK NGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKDSSWPNHVTGKGTASCS HNGKSSFYKNLLWLTEKNGLYPNLSKSYVNKKGKEVLVLWGVHHPNSMGDQ RAIYHKENAYVSVLSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDT IIFEANGNLAPWYAFALSRGFGSGIISNASMGECDAKQTPQGAINSSL PFQNVHPVTIGECKPYVRSTKLRMVTGLRNVPSIQSRGLFGAAGFIEGGW TGMIDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSIEKMNTQFTA VGKEFNRLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVK DLYEKVKTLKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYPKYSKESK LNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGASFWMCNGLSLQC RICAL (配列番号62)
A/台湾/117/1996	MKAKLLVLLCAFTATYADTICIGHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLE DSHNGKLCRLKGTAPLQLGNCSVAGWILGNPECESLFSKESWSYIAETPNP ENGTCPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGKGTASC SHNGKSSFYKNLLWLTGKNGLYPNLSKSYVNHKEKEVLVLWGVHHPNIRD QRAIYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGD TIIFEANGNLAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMGECDAKQTPQGAINSS LPFQNVHPVTIGECKPYVRSTKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAAGFIEGG WTGMIDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGI (配列番号63)
A/ブラジル/099/01	DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCLLKGIAPLQ LGNCVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCPGYFADYEELR EQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGVSASCSHNGKSSFYRNLWLTGK NGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHPNIGDQRALYHTENAYVSVSSH YSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLAPRYAFA LSRGFGSGIITSNAPMDECDKQTPQGAINSSLPFQNVHPITIGECKPYV RSAKLRMVTGLRNIPSIQS (配列番号64)

10

20

30

これらの株の結合特性を、例えば、アンブレラ - トポロジグリカンおよび / またはコーン - トポロジグリカンに関して評価することができる。結合特性を、例えば、2 - 6シアル化グリカンおよび / または 2 - 3シアル化グリカンに関して評価することができる。いくつかの実施形態では、結合特性を、少なくとも長鎖 2 - 6シアル化グリカン (例えば、6'SLN - LNグリカン) に関して評価する。

【0312】

当業者は、本明細書を読んだ後、適切なグリカン結合特性および / または適切なヒト感染性 (例えば、ヒトパンデミック感染性ではない) を示す表4に列挙した任意のH1ポリペプチドを、「増強された」ヒト結合H1 HAポリペプチドと比較する基準として使用することができることを認識するであろう。同程度に、適切なグリカン結合特性 (例えば、コーン - トポロジグリカンと比較したアンブレラ - トポロジグリカンへの広範な結合および / またはアンブレラ - トポロジグリカンの優先性) および / または適切なヒト感染性 (例えば、ヒトパンデミック感染性) を示す表4に列挙した任意のH1ポリペプチドを、特定のH1 HAポリペプチド (例えば、特定のH1 HAポリペプチドバリエーション) の「増強された」ヒト結合を確認するための比較因子として使用することができる。

40

【0313】

実施例4：変異した2009H1N1インフルエンザAウイルスHAの受容体結合特性材料と方法

HAのクローニング、バキュロウイルス合成、発現、および精製

簡潔に述べれば、それぞれWTまたは変異HA遺伝子を有する組換えバキュロウイルス

50

を使用して、BD Baculogold Max-XP SFM (BD Biosciences, San Jose, CA) 中で培養された Sf9 細胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA) の懸濁培養物を感染させた (MOI = 1)。感染をモニタリングし、感染 3 ~ 4 日後に馴化培地を採取した。採取した馴化培地由来の可溶性 HA を、ニッケルアフィニティークロマトグラフィ (HisTrap HP カラム, GE Healthcare, Piscataway, NJ) を使用して精製した。HA を含む溶離画分をプールし、濃縮し、100 KMWCO スピンカラム (Millipore, Billerica, MA) を使用して 1 x PBS (pH 8.0) (Gibco) と緩衝液を交換した。精製したタンパク質を、BCA 法 (Pierce) を使用して定量した。

CA/04 および変異体の相同性ベースの構造モデリング

SWISS-MODEL ウェブベースの自動化相同性モデリングプラットフォーム (<http://swissmodel.expasy.org/>) を使用して、CA04、CA04M1、および CA04M2 の相同性構造モデルを構築した。SWISS-MODEL によって選択されたテンプレート構造は、2009H1N1 HA の最近解決された結晶構造 (PDB ID: 3LZG) であった。HA-ヒト受容体複合体の出発ポーズを、ヒト受容体を有する 1918H1N1 HA の共結晶構造 (PDB ID: 2WRG) でのモデリングした HA 構造の重ね合わせによって得た。出発構造複合体を、エネルギー最小化 (500 工程の最急降下およびその後の 500 工程の共役勾配) に供した。AMBER 力場を使用して、電位および電荷を割り当てた。AMBER のデフォルトバージョンは、Insight II 分子モデリングスイート (Accelrys, San Diego, CA) のディスクパーモジュールを使用して得たものであった。

組換え WT および変異 CA04 HA のヒト気管組織切片への結合

パラフィン処理したヒト気管 (US Biological) 組織切片を脱パラフィンし、再水和し、1% BSA を含む PBS と 30 分間インキュベートして非特異的結合を防止した。HA を、一次抗体 (マウス抗 6 x His タグ, Abcam) および二次抗体 (Alexa fluor 488 ヤギ抗マウス, Invitrogen) とそれぞれ 4 : 2 : 1 のモル比率にて氷上で 20 分間予め複合体化した。組織結合を、予め複合体化した HA の 1% BSA-PBS での希釈によって異なる HA 濃度にわたって行った。次いで、組織切片を、HA-抗体複合体と室温 (RT) で 3 時間インキュベートした。組織切片を、ヨウ化プロピジウム (Invitrogen; TBS-T 中 1 : 100) によって対比染色した。組織切片をマウントし、次いで、共焦点顕微鏡下 (Zeiss LSM 510 レーザ走査型共焦点顕微鏡法) で観察した。シアリダーゼ前処置の場合、組織切片を、タンパク質とのインキュベーションの前に 0.2 単位のシアリダーゼ A (*Arthrobacter ureafaciens* 由来の組換え体, Prozyme) と 37 °C で 3 時間インキュベートした。この酵素は、Neu5Ac₂3Gal および Neu5Ac₂6Gal モチーフの両方から末端 Neu5Ac を切断することを証明している。

【0314】

WT および変異 CA04 HA の用量依存性直接結合

多価 HA-グリカン相互作用を調査するために、以前に記載のように (Srinivasan et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105: 2800-05 (本明細書中で参考として援用される))、ストレプトアビジンプレートアレイは、代表的なピオチン化₂3 および₂6 シアリル化グリカンを含んでいた (図 14)。3' SLN、3' SLN-LN、3' SLN-LN-LN は代表的なトリ受容体である。6' SLN および 6' SLN-LN は代表的なヒト受容体である。ピオチン化グリカンを、その供給源要求プログラムによって Consortium of Functional Glycomics から入手した。ストレプトアビジンコーティングした高結合容量 384 ウェルプレート (Pierce) を、ウェルを 50 μl の 2.4 μM ピオチン化グリカンと 4 °C で一晩インキュベートすることによって各ウェルの全容量に負荷した。過剰なグリカンを、PBS での十分な洗浄によって除去した。三量体 HA 単位は、3 つの HA 単量体 (それ故、3 つの RBS、各単量体について 1 つ) から

10

20

30

40

50

構成される。ストレプトアビジンプレートアレイのウェル中のビオチン化グリカンの空間配置は、三量体HA単位中の3つのHA単量体のうちのたった1つに結合することを好む。したがって、HA - グリカン相互作用における多価性を特異的に増強するために、組換えHAタンパク質を一次抗体および二次抗体と4 : 2 : 1 (HA : 一次 : 二次)の比率で予め複合体化した。全てのHAについてのプレ複合体中の4つの三量体HA単位の同一の空間配置により、そのグリカン結合親和性の間の比較が可能である。

【0315】

適量のヒスチジンタグ化HAタンパク質、一次抗体(マウス抗6xHisタグIgG)および二次抗体(HRP抱合ヤギ抗マウスIgG(Santacruz Biotechnology))をそれぞれ4 : 2 : 1の比率で含む保存液を氷上で20分間インキュベートした。適量の予め複合体化した保存HAを、1%BSAを含むPBSを用いて250μlに希釈した。50μlの予め複合体化したHAを、グリカンコーティングした各ウェルに添加し、室温で2時間インキュベートし、その後上記洗浄工程を行った。結合シグナルを、製造者の説明書に従ってAmplex Redペルオキシダーゼアッセイ(Invitrogen, CA)を使用してHRP活性に基づいて決定した。実験を三連で行った。最小結合シグナルは、ネガティブコントロールで認められた(予め複合体化した単位のグリカンを含まないウェルへの結合および抗体のみのグリカンを含むウェルへの結合が含まれる)。H2 HA - グリカン結合についての結合パラメータ、協同性(n)、および見かけ上の結合定数(K_d')を、平均シグナル値(三連の分析由来)およびHA濃度のヒル式の線形化形態:

【0316】

【化8】

$$\log\left(\frac{y}{1-y}\right) = n * \log([HA]) - \log(K_d')$$

(式中、yは飽和度(平均結合シグナル/観察された最大結合シグナル)である)へのフィッティングによって計算した。ヒル式:

【0317】

【化9】

$$y = \frac{[HA]^n}{[HA]^n + K_d'}$$

(nおよびK_d'パラメータの組について)を使用して計算した理論値yを種々の濃度のHAに対してプロットして、図15Dおよび図16中に代表的なヒト受容体(6'SLN-LN)についての結合曲線を得た。

【0318】

結果

CA04M1(Ile219 Lys)およびCA04M2(Ser186 Pro+Ala189 Thr+Glu227 Ala)

実施例1では、CA04のRBSの配列および構造を、高伝播性ヒト適応H1N1 HAと比較した。実施例1では、本発明者らは、CA04 HA中のIle219(疎水性)とGlu227(イオン性)との間の残基間相互作用の不適合がヒト受容体とのその最適な接触を潜在的に破壊し、それにより、結合強度の低下を担うと予想した(図13A)(Maines et al., 2009, Science, 325:484-87(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。いかなる1つの特定の理論にも拘束されることを望まないが、この不適合は、RBS中のAsp225に変異を獲得したにもかかわらず、天然バリエーションがヒト受容体結合強度を実質的に改善する能力がないことを説明することができる。実施例1で説明するように、本発明者らは、この不適合の組み合わせの修正によって2009H1N1 HAのヒト受容体結合強度が改善されると洞察した。実施例1に示すように、CA04 HAのRBSの構造分析により、この不適合の2

10

20

30

40

50

つの可能な修正方法が示された。第1の可能性は、Lys 219 - Glu 227相互作用をイオン性にすると考えられる単一のIle 219 Lys変異(CA04M1)(図13B)(季節性H1N1インフルエンザウイルスのRBSで認められるものに類似する)に関連していた(Maines et al., 2009, Science, 325: 484 - 87(本明細書中で参考として援用される))。第2の可能性は、相互作用を疎水性にすると考えられる3つのアミノ酸変化(Ser 186 Pro/Ala 189 Thr/Glu 227 Ala(CA04M2))(図13C)(SC18 HAのRBSで認められるもの(図13D)に類似する)に関連していた。本発明者らは、CA04M1変異体およびCA04M2変異体の組換え発現および用量依存性グリカンアレイ分析を使用したこれら(その予め複合体化した状態での)の分析によるその各グリカン受容体結合強度の定量によって実施例1に記載の予想が正確であることを確認した。

10

【0319】

CA04M1およびCA04M2は、アレイ上での両方の代表的なヒト受容体(6'SLNおよび6'SLN-LN;図14)の特異的結合を示した(20~40µg/mlのより高い濃度でトリ受容体への最小結合シグナルのみが認められた)(図15A、B)。6'SLN-LNへのCA04M1(K_d '約50ピコモル(pM))およびCA04M2(K_d '約6pM)の結合強度は、CA04 HA(および225位での天然バリエーション)よりも有意に高く、SC18 HAと同一範囲にある(図15C)。CA04、CA04M1、およびCA04M2 HAのヒト受容体結合強度の相違はまた、ヒト気管組織切片の頂端面(ヒト受容体を主に発現し、呼吸器液滴による有効なウイルス伝播のための標的である)のその染色を反映していた(例えば、Srinivasan et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105: 2800 - 05; および Chandrasekaran et al., 2008, Nat. Biotechnol., 26: 107 - 13(その両方が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。CA04 HAと比較して、CA04M1およびCA04M2の両HAは、ヒト気管組織切片の頂端面のより強い染色を示す(図15D)。したがって、実施例1で予想されるように、CA04M1およびCA04M2の両HAは、ヒトHA受容体結合強度を改善した。

20

【0320】

Childs et al.によって記載された定性的結合アッセイと対照的に、本発明者らは、WTおよび変異体のHAの相対グリカン受容結合強度の相違を定量することができる組換えHAを使用して用量依存性結合アッセイを行った。かかるアッセイを使用して、本発明者らは、WT HAと比較して有意により高いヒト受容体結合強度を有するCA04 HAの変異体(CA04M1およびCA04M2)を証明した。これらの結果により、実施例1に示した予想(すなわち、2009H1N1 HAのRBS中の不適合な分子相互作用の修正によってそのヒト受容体結合強度が実質的に増加すること)が確認された。本発明は、定性的結合アッセイがおそらくこれらの変異の同定に失敗したであろうという認識を含む。

30

【0321】

本発明は、増加したヒト受容体結合強度を示す変異体2009H1N1 HAがおそらく2009H1N1株のヒト伝播の増強を促進しそうであるという認識を含む。実際に、ヒト受容体結合強度は、1918パンデミックH1N1ウイルスのヒト-ヒト伝播性と関連することが示されている(Srinivasan et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105: 2800 - 05; および Tumpey et al., 2007, Science, 315: 655 - 59(その両方が本明細書中で参考として援用される))。さらに、本発明は、かかる変異体HAが本明細書中に記載のワクチンおよび/または治療薬の産生に有用であり得るという認識を含む。CA04M3(Asp 225 Glu)、CA04M4(Asp 225 Asn)、およびCA04M5(Asp 225 Gly)

40

2009H1N1ウイルスの最近の単離体はHAのRBSに変異を獲得しており、した

50

がって、より高い病原性および伝播性を示す株の潜在的進化に関する懸念が生じている (Melidou et al., May 20, 2010, Virus Res. (本明細書中で参考として援用される))。特に、ヒト受容体結合に關与する Asp225 (Srinivasan et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105:2800-05 (本明細書中で参考として援用される)) が Glu、Asn、または Gly に変異している。血球凝集素 (HA) のグリカン受容体結合部位 (RBS) 中のかかる変異のモニタリングは、2009 H1N1 ウイルスのヒト-ヒト伝播性に及ぼすその影響を評価するのに有用であり得る。225 変異体の結合特異性の定性的評価は、その結合性が WT HA に類似することを示した (Hua et al., 2010, PLoS Currents: Influenza (本明細書中で参考として援用される))。対照的に、本発明者らは、用量依存性グリカンアレイ結合分析を使用したヒト受容体結合強度に及ぼす CA04 HA の状況で生成された Asp225 変異の影響についての定量的分析を行った (図16)。

【0322】

本発明者らの分析は、代表的なヒト受容体への結合特異性 (6' SLN-LN; 図14) が Asp225 Glu (CA04M3) と Asp225 Asn (CA04M4) 変異体との間で同一であり、これは以前の研究で得られた結果と一致することを証明している (Hua et al., 2010, PLoS Currents: Influenza (本明細書中で参考として援用される))。しかし、そのヒト受容体結合強度は異なっていた (CA04M4 (K_d ' 約 0.7 ナノモル (nM)) > CA04 (K_d ' 約 1 nM) >> CA04M3 (K_d ' 約 7 nM))。Asp225 Gly (CA04M5) 変異体は劇的に減少したヒト受容体への用量依存性結合を示し、これはトリ受容体にも結合した。CA04M5 変異体の代表的なトリ受容体への結合は、以前の研究と一致する (Hua et al., 2010, PLoS Currents: Influenza (本明細書中で参考として援用される))。実施例1および Maines et al. (2009, Science, 325:484-87 (その両方が本明細書中で参考として援用される)) に記載のようにフェレットおよびマウスにおいて伝播研究を行い、これらの結果を確認する。まとめると、225 位に天然のアミノ酸置換を有する変異体は、WT HA よりも実質的に改善されたヒト受容体結合強度を示さない。

【0323】

等価物

当業者は、日常の実験しか使用せずに、本明細書中に記載の本発明の特定の実施形態の多数の等価物を認識するか確認することができる。本発明の範囲は、上記説明に制限されることを意図せず、むしろ、以下の特許請求の範囲に記載の通りである。

【0324】

本発明は、例えば以下を提供する。

(項目1) 野生型 H1 HA ポリペプチドと比較してアンブレラ-トポロジ-グリカンへの結合の増強を示す、改変 H1 HA ポリペプチド。

(項目2) 前記改変ポリペプチドが、野生型 H1 HA ポリペプチドと比較して少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、または少なくとも1000倍のアンブレラ-トポロジ-グリカンへの結合の増強を示す、項目1に記載の改変ポリペプチド。

(項目3) 野生型 H1 HA ポリペプチドと比較してインフルエンザウイルスのヒトへの感染性の増強を引き起こす改変 H1 HA ポリペプチド。

(項目4) 前記改変ポリペプチドが、野生型 H1 HA ポリペプチドと比較してインフルエンザウイルスの少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、または少なくとも1000倍のヒトへの感染性の増強を引き起こす、項目3に記載の改変ポリペプチド。

(項目5) A / サウスカロライナ / 1 / 1918 または A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930 によって示される、インフルエンザウイルスの類似レベルのヒトへの感染性を引き起こす改変 H1 HA ポリペプチド。

(項目6) インフルエンザ株 A / サウスカロライナ / 1 / 1918 または A / ブタ / アイオワ / 15 / 1930 中に存在する H1 HA ポリペプチドと類似レベルのアムブレラトポロジグリカンへの結合を示す改変 H1 HA ポリペプチド。

(項目7) コントポロジグリカンよりもむしろアムブレラトポロジグリカンに優先的に結合する改変 H1 HA ポリペプチド。

(項目8) H1 HA ポリペプチドバリエーションであって、その同族親 H1 HA ポリペプチドと比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個のアミノ酸の置換、挿入、または欠失を含む、H1 HA ポリペプチドバリエーション。

10

(項目9) 前記ポリペプチドバリエーションが、その同族親 H1 HA ポリペプチドと比較してアムブレラ - トポロジグリカンへの結合の増強を示す、項目8に記載のポリペプチドバリエーション。

(項目10) 前記ポリペプチドバリエーションがその同族親 H1 HA ポリペプチドと比較してインフルエンザウイルスのヒトへの感染性の増強を引き起こす、項目8に記載のポリペプチドバリエーション。

(項目11) 219、186、189、および227からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸位置に変異を含む H1 HA ポリペプチドバリエーション。

(項目12) Lys145Ser、Lys145Asn、Ile219Lys、Ser186Pro、Ala189Thr、およびGlu227Alaからなる群から選択される変異を含む H1 HA ポリペプチドバリエーション。

20

(項目13) Ile219Lys 変異を含む H1 HA ポリペプチドバリエーション。

(項目14) アミノ酸225位に変異をさらに含む、項目13に記載の H1 HA ポリペプチドバリエーション。

(項目15) Ser186Pro、Ala189Thr、およびGlu227Ala 変異を含む H1 HA ポリペプチドバリエーション。

(項目16) アミノ酸225位に変異をさらに含む、項目15に記載の H1 HA ポリペプチドバリエーション。

(項目17) 項目1~9のいずれか1項に記載の改変 H1 HA ポリペプチドまたは項目10~16のいずれか1項に記載の H1 HA ポリペプチドバリエーションに特異的に結合する結合剤。

30

(項目18) 項目17に記載の結合剤を試験 H1 HA ポリペプチドと接触させる工程および前記結合剤が前記試験ポリペプチドに結合するかどうかを決定する工程を含む方法。

(項目19) H1 HA ポリペプチドとアムブレラトポロジグリカンとの間の結合相互作用を競合する干渉剤。

(項目20) 前記干渉剤が野生型 H1 HA ポリペプチドと比較してアムブレラ - トポロジグリカンへの結合の増強を示す H1 HA ポリペプチドバリエーションである、項目19に記載の干渉剤。

40

(項目21) 前記干渉剤が、野生型 H1 HA ポリペプチドと比較してインフルエンザウイルスのヒトへの感染性の増強を引き起こす H1 HA ポリペプチドバリエーションである、項目19に記載の干渉剤。

(項目22) 改変 H1 HA ポリペプチド、H1 HA ポリペプチドバリエーション、結合剤、および干渉剤からなる群から選択される実体を含む薬学的組成物。

(項目23) 患者集団を層別化する方法であって、

患者集団を準備する工程、

前記集団中の各患者由来の血液を結合剤と接触させる工程、

前記結合剤が各患者の血液中の H1 HA ポリペプチドに結合するかどうかを決定する工程、および

50

前記結合剤が患者の血液中のH1 HAポリペプチドに結合する場合、以下：

前記患者が、A/サウスカロライナ/1/1918またはA/ブタ/アイオワ/15/1930に対するワクチン接種の実施の際にインフルエンザのヒト結合または感染性の増強を示すインフルエンザ株から保護されるか、

前記患者が、ヒト結合または感染性の増強を示すインフルエンザ株による感染に対しより罹患しにくいのか、

前記患者が事前に曝露されなかった患者よりもワクチン接種または処置の必要性が低いことを示す、

と決定される工程

を含む、方法。

10

(項目24) H1 HAポリペプチドバリエーションを含む組成物の投与によるインフルエンザ感染症の処置方法であって、前記バリエーションは、その同族野生型H1 HAポリペプチドと比較してアンブレラ-トポロジーグリカンへの結合の増強を示す、方法。

(項目25) 前記野生型H1 HAが2009A/H1N1単離体中に見出される、項目1~6のいずれか1項に記載の改変H1 HAポリペプチド。

(項目26) 前記野生型H1 HAを表1中に示す、項目1~6のいずれか1項に記載の改変H1 HAポリペプチド。

(項目27) 改変H1 HAポリペプチドが2009A/H1N1単離体中に見出されるH1 HA基準ポリペプチドと実質的に同一のアミノ酸配列を有する、項目7~9のいずれか1項に記載の改変H1 HAポリペプチド。

20

(項目28) 改変H1 HAポリペプチドが表1上のH1 HA基準ポリペプチドと実質的に同一のアミノ酸配列を有する、項目7~9のいずれか1項に記載の改変H1 HAポリペプチド。

(項目29) 前記改変HAポリペプチドは、前記改変ポリペプチドが前記基準H1 HAポリペプチドと比較して1~10個のアミノ酸置換を有することを除いて、H1 HA基準ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有する、項目27または28のいずれか1項に記載の改変H1 HAポリペプチド。

(項目30) 前記親H1 HAポリペプチドが2009A/H1N1単離体中に見出される、項目10~12のいずれか1項に記載のH1 HAポリペプチドバリエーション。

(項目31) 前記親H1 HAポリペプチドが表1中に見出される、項目10~12のいずれか1項に記載のH1 HAポリペプチドバリエーション。

30

(項目32) 項目10~16のいずれか1項に記載のH1 HAポリペプチドバリエーションを含むワクチン組成物。

(項目33) 前記ワクチン組成物が弱毒化生ウイルスを含む、項目32に記載のワクチン組成物。

(項目34) 前記ワクチン組成物がウイルス様粒子を含む、項目32に記載のワクチン組成物。

(項目35) 前記ワクチン組成物がサブユニットワクチンである、項目32に記載のワクチン組成物。

(項目36) 前記H1 HAポリペプチドバリエーションが、アミノ酸98位、136位、137位、138位、145位、153位、155位、156位、159位、183位、186位、187位、189位、190位、192位、193位、194位、195位、196位、215位、219位、222位、225位、226位、227位、および228位のうちの1つ以上に変異をさらに含む、項目35に記載のワクチン組成物。

40

(項目37) アジュバントをさらに含む、32~36のいずれか1項に記載のワクチン組成物。

(項目38) インフルエンザウイルス感染症に罹患しているか罹患しやすい個体に32~37のいずれか1項に記載のワクチン組成物を投与する工程を含む方法。

本発明は、さらに以下を提供する。

(項目A1)

50

改変 H 1 H A インフルエンザ血球凝集素 (「H A」) ポリペプチドであって、そのアミノ酸配列が、

H 1 H A 中の残基が I l e ではない野生型 H 3 H A の残基 2 1 9 に対応する位置の残基、

H 1 H A 中の残基が S e r ではない、野生型 H 3 H A の残基 1 8 6 に対応する位置の残基、

H 1 H A 中の残基が P r o でも A l a でもない、野生型 H 3 H A の残基 1 8 9 に対応する位置の残基、

H 1 H A 中の残基が T h r でも G l u でもない、野生型 H 3 H A の残基 2 2 7 に対応する位置の残基、および

その組み合わせ

からなる群から選択される配列エレメントを含む、改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 2)

項目 A 1 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドであって、そのアミノ酸配列が野生型 H 3 H A の残基 2 1 9 に対応する位置の残基を含み、H 1 H A 中の残基が I l e ではない、改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 3)

残基 2 1 9 に対応する位置の前記残基が L y s である、項目 A 2 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 4)

項目 A 1 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドであって、そのアミノ酸配列が野生型 H 3 H A の残基 1 8 6 に対応する位置の残基をさらに含み、H 1 H A 中の残基が S e r ではない、改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 5)

残基 1 8 6 に対応する位置の前記残基が P r o である、項目 A 4 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 6)

項目 A 1 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドであって、そのアミノ酸配列が野生型 H 3 H A の残基 1 8 9 に対応する位置の残基をさらに含み、H 1 H A 中の残基が A l a ではない、改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 7)

残基 1 8 9 に対応する位置の前記残基が T h r である、項目 A 6 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 8)

項目 A 1 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドであって、そのアミノ酸配列が野生型 H 3 H A の残基 2 2 7 に対応する位置の残基をさらに含み、H 1 H A 中の残基が G l u ではない、改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 9)

残基 2 2 7 に対応する位置の前記残基が A l a である、項目 A 8 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 1 0)

残基 1 8 6 に対応する位置の前記残基が P r o であり、

残基 1 8 9 に対応する位置の前記残基が T h r であり、

残基 2 2 7 に対応する位置の前記残基が A l a である、

項目 A 2 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 1 1)

項目 A 1 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドであって、そのアミノ酸配列が、

H 1 H A 中の残基が S e r ではない、野生型 H 3 H A の残基 1 8 6 に対応する位置の残基、

H 1 H A 中の残基が P r o または A l a ではない、野生型 H 3 H A の残基 1 8 9 に

10

20

30

40

50

対応する位置の残基、および

H 1 H A中の残基がThrまたはGluではない、野生型H 3 H Aの残基2 2 7に
対応する位置の残基

を含む、改変H 1 H Aポリペプチド。

(項目A 1 2)

残基1 8 6に対応する位置の前記残基がProである、項目A 1 1に記載の改変H 1 H
Aポリペプチド。

(項目A 1 3)

残基1 8 9に対応する位置の前記残基がThrである、項目A 1 1に記載の改変H 1 H
Aポリペプチド。

(項目A 1 4)

残基2 2 7に対応する位置の前記残基がAlaである、項目A 1 1に記載の改変H 1 H
Aポリペプチド。

(項目A 1 5)

項目A 1に記載の改変H 1 H Aポリペプチドであって、そのアミノ酸配列が野生型H 3
H Aの残基2 2 5に対応する位置の残基をさらに含み、H 1 H A中の残基がAspで
はない、改変H 1 H Aポリペプチド。

(項目A 1 6)

残基2 2 5に対応する位置の前記残基が、Asn、Gly、およびGluからなる群から
選択される、項目A 4 8に記載の改変H 1 H Aポリペプチド。

(項目A 1 7)

項目A 1に記載の改変H 1 H Aポリペプチドであって、そのアミノ酸配列が野生型H 3
H Aの残基1 4 5に対応する位置の残基をさらに含み、H 1 H A中の残基がLysで
はない、改変H 1 H Aポリペプチド。

(項目A 1 8)

残基1 4 5に対応する位置の前記残基が、SerおよびAsnからなる群から選択される
、項目A 5 0に記載の改変H 1 H Aポリペプチド。

(項目A 1 9)

前記改変H 1 H Aポリペプチドが、野生型H 1 H Aポリペプチドと比較してアンブレ
ラトポロジグリカンへの結合の増強を示す、項目A 1に記載の改変H 1 H Aポリペ
チド。

(項目A 2 0)

前記改変ポリペプチドが、野生型H 1 H Aポリペプチドと比較して少なくとも2倍、少
なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍
、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、または少なくとも10
00倍のアンブレラ - トポロジグリカンへの結合の増強を示す、項目A 1に記載の改変
H 1 H Aポリペプチド。

(項目A 2 1)

前記改変H 1 H Aポリペプチドが、コートポロジグリカンよりもむしろアンブレラ
トポロジグリカンに優先的に結合する、項目A 1に記載の改変H 1 H Aポリペプチド

。

(項目A 2 2)

前記改変H 1 H Aポリペプチドが、野生型H 1 H Aポリペプチドと比較してインフル
エンザウイルスのヒトへの感染性の増強を示す、項目A 1に記載の改変H 1 H Aポリペ
プチド。

(項目A 2 3)

前記H 1 H Aポリペプチドの配列が表1中に示される、前記項目Aのいずれか1項に記
載の改変H 1 H Aポリペプチド。

(項目A 2 4)

薬学的組成物として処方された前記項目Aのいずれか1項に記載の改変H 1 H Aポリペ

10

20

30

40

50

プチド。

(項目 A 2 5)

前記薬学的組成物がワクチン組成物である、項目 A 2 3 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 2 6)

前記ワクチン組成物が弱毒化生ウイルスを含む、項目 A 2 4 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 2 7)

前記ワクチン組成物がウイルス様粒子を含む、項目 A 2 4 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチド。

10

(項目 A 2 8)

前記ワクチン組成物がサブユニットワクチンである、項目 A 2 4 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 2 9)

前記 H 1 H A ポリペプチドが、アミノ酸 9 8 位、1 3 6 位、1 3 7 位、1 3 8 位、1 4 5 位、1 5 3 位、1 5 5 位、1 5 6 位、1 5 9 位、1 8 3 位、1 8 6 位、1 8 7 位、1 8 9 位、1 9 0 位、1 9 2 位、1 9 3 位、1 9 4 位、1 9 5 位、1 9 6 位、2 1 5 位、2 1 9 位、2 2 2 位、2 2 5 位、2 2 6 位、2 2 7 位、および 2 2 8 位のうちの 1 つ以上に変異をさらに含む、項目 A 2 4 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチド。

(項目 A 3 0)

前記ワクチン組成物がアジュバントをさらに含む、項目 A 2 4 に記載の改変 H 1 H A ポリペプチド。

20

(項目 A 3 1)

前記項目 A のいずれか 1 項に記載の改変 H 1 H A ポリペプチドに特異的に結合する結合剤。

(項目 A 3 2)

前記結合剤が、H 1 H A ポリペプチドとアンブレラトポロジグリカンとの間の結合相互作用と競合する干渉剤である、項目 A 3 1 に記載の結合剤。

(項目 A 3 3)

前記結合剤が、野生型 H 1 H A ポリペプチドと比較してアンブレラ - トポロジグリカンへの結合の増強を示す H 1 H A ポリペプチドバリエーションである、項目 A 3 2 に記載の結合剤。

30

(項目 A 3 4)

前記結合剤が、野生型 H 1 H A ポリペプチドと比較してインフルエンザウイルスのヒトへの感染性の増強が示される H 1 H A ポリペプチドバリエーションである、項目 A 3 2 に記載の結合剤。

(項目 A 3 5)

薬学的組成物として処方された項目 A 3 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の結合剤。

(項目 A 3 6)

前記薬学的組成物がワクチン組成物である、項目 A 3 5 に記載の結合剤。

40

(項目 A 3 7)

前記ワクチン組成物が弱毒化生ウイルスを含む、項目 A 3 6 に記載の結合剤。

(項目 A 3 8)

前記ワクチン組成物がウイルス様粒子を含む、項目 A 3 6 に記載の結合剤。

(項目 A 3 9)

前記ワクチン組成物がサブユニットワクチンである、項目 A 3 6 に記載の結合剤。

(項目 A 4 0)

前記 H 1 H A ポリペプチドが、アミノ酸 9 8 位、1 3 6 位、1 3 7 位、1 3 8 位、1 4 5 位、1 5 3 位、1 5 5 位、1 5 6 位、1 5 9 位、1 8 3 位、1 8 6 位、1 8 7 位、1 8 9 位、1 9 0 位、1 9 2 位、1 9 3 位、1 9 4 位、1 9 5 位、1 9 6 位、2 1 5 位、2 1

50

9 位、2 2 2 位、2 2 5 位、2 2 6 位、2 2 7 位、および 2 2 8 位のうちの 1 つ以上に変異をさらに含む、項目 A 3 6 に記載の結合剤。

(項目 A 4 1)

前記ワクチン組成物がアジュバントをさらに含む、項目 A 3 6 に記載の結合剤。

(項目 A 4 2)

インフルエンザ感染症に罹患しているか罹患しやすい患者の処置、予防、診断、または層別化のための項目 A 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の H 1 H A ポリペプチドまたは項目 A 3 1 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の結合剤。

(項目 A 4 3)

前記ポリペプチドまたは結合剤をインフルエンザ感染症の処置のために使用する、項目 A 4 2 に記載の H 1 H A ポリペプチドまたは結合剤。

(項目 A 4 4)

前記ポリペプチドまたは結合剤をインフルエンザ感染症の予防のために使用する、項目 A 4 2 に記載の H 1 H A ポリペプチドまたは結合剤。

(項目 A 4 5)

前記ポリペプチドまたは結合剤をインフルエンザ感染症の診断のために使用する、項目 A 4 2 に記載の H 1 H A ポリペプチドまたは結合剤。

(項目 A 4 6)

前記ポリペプチドまたは結合剤を、

患者集団を準備する工程、

前記集団中の各患者由来の血液を結合剤と接触させる工程、

前記結合剤が各患者の血液中の H 1 H A ポリペプチドに結合するかどうかを決定する工程、および

前記結合剤が患者の血液中の H 1 H A ポリペプチドに結合する場合、以下：

前記患者が、A / サウスカロライナ / 1 / 1 9 1 8 または A / ブタ / アイオワ / 1 5 / 1 9 3 0 に対するワクチン接種の実施の際にインフルエンザのヒト結合または感染性の増強を示すインフルエンザ株から保護されるか、

前記患者が、ヒト結合または感染性の増強を示すインフルエンザ株による感染に対する感受性が低いか、

前記患者が事前に曝露されなかった患者よりもワクチン接種または処置の必要性が低いことを示す、

と決定される工程

を行うことによって、インフルエンザ感染症に罹患しているか罹患しやすい患者の層別化のために使用する、項目 A 4 2 に記載の H 1 H A ポリペプチドまたは結合剤。

(項目 A 4 7)

前記 H 1 H A ポリペプチドまたは結合剤を、インフルエンザ感染症に罹患しているか罹患しやすいと決定された患者におけるインフルエンザ感染症の処置または予防のために使用する、項目 A 4 3 または 4 4 に記載の H 1 H A ポリペプチドまたは結合剤。

(項目 A 4 8)

項目 A 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の H 1 H A ポリペプチドまたは項目 A 3 1 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の結合剤を、インフルエンザの処置または予防とする患者に投与することによる、インフルエンザの処置または予防。

10

20

30

40

【 2 B 】

H1	サブタイプ	183	190	222	226
ADA76	PKLSKSYNNKGGKVELVIMG	333	333	333	333
AS130	PKLSKSYNNKGGKVELVIMG	333	333	333	333
APR34	PKLKNSSYNNKGGKVELVIMG	333	333	333	333
ASC18	PKLSKSYNNKGGKVELVIMG	333	333	333	333
AT91	PWLSKSYNNKGGKVELVIMG	333	333	333	333
ANY18	PKLSKSYNNKGGKVELVIMG	333	333	333	333
H3	サブタイプ	153	153	153	153
ADU63	PVLNVMTMNDPDKLYI	153	153	153	153
AA168	PVLNVMTMNDPDKLYI	153	153	153	153
AM99	PALNVMTMNDPDKLYI	153	153	153	153
H5	サブタイプ	133	133	133	133
ADS97	PTIKRSYNNVQDILLI	133	133	133	133
Viet04	PTIKRSYNNVQDILLI	133	133	133	133

FIG. 2B

【 3 A 】

H1	サブタイプ	133	133	133	133
H1_01	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H1_02	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H2	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H3	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H4	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H5	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H6	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H7	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H8	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H9	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H10	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H11	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H12	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H13	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H14	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H15	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133
H16	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	133	133	133	133

FIG. 4A

CA_04_09	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
CA_04_09 Mut1	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
CA_04_09 Mut2	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
SC_1_18	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
Sols_3_06	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
Bris_59_07	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
CA_04_09	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
CA_04_09 Mut1	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
CA_04_09 Mut2	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
SC_1_18	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
Sols_3_06	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
Bris_59_07	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
CA_04_09	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227
CA_04_09 Mut1	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227
CA_04_09 Mut2	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227
SC_1_18	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227
Sols_3_06	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227
Bris_59_07	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227

【 3 B 】

H1	サブタイプ	334	334	334	334
H1_01	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H1_02	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H2	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H3	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H4	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H5	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H6	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H7	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H8	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H9	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H10	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H11	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H12	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H13	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H14	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H15	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334
H16	ENGYCTEIDIEDEHEDSSISSE	334	334	334	334

FIG. 3B

【 4 A - 1 】

CA_04_09	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
CA_04_09 Mut1	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
CA_04_09 Mut2	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
SC_1_18	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
Sols_3_06	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
Bris_59_07	MKAIIIVLLYTFANAADTTCIG	136	145	153	156
CA_04_09	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
CA_04_09 Mut1	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
CA_04_09 Mut2	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
SC_1_18	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
Sols_3_06	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
Bris_59_07	VETPSSDNGTCYPGDIDYEL	186	186	190	196
CA_04_09	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227
CA_04_09 Mut1	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227
CA_04_09 Mut2	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227
SC_1_18	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227
Sols_3_06	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227
Bris_59_07	LNGIHPSTGADQOSLYQAD	219	222	227	227

【 図 5 B - 1 】

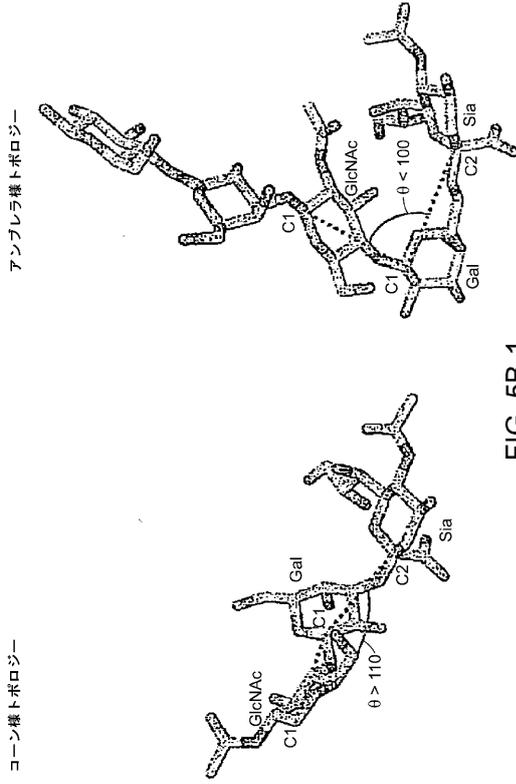


FIG. 5B-1

【 図 5 B - 2 】

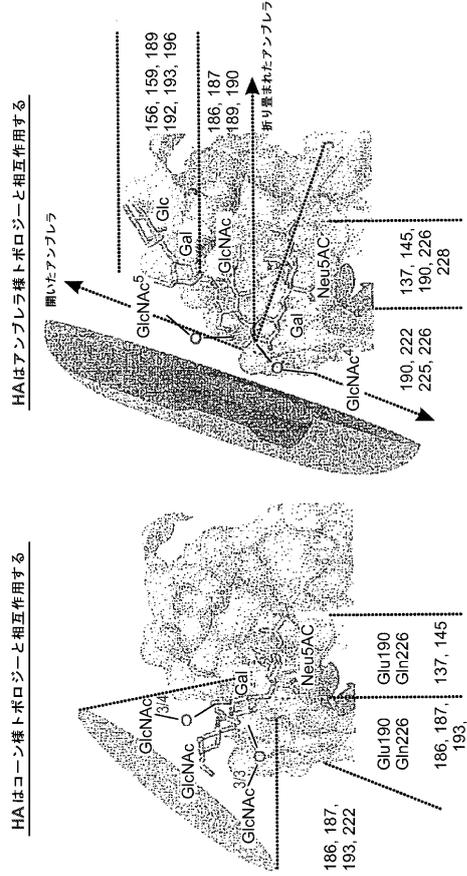
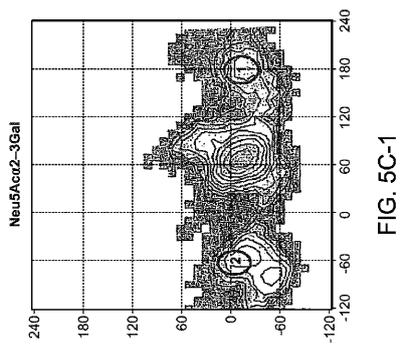
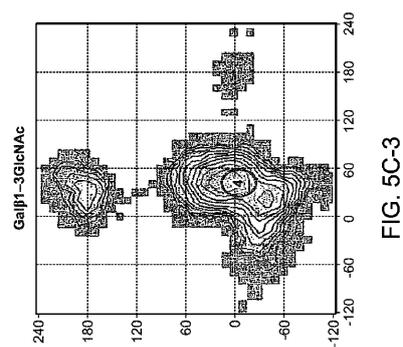


FIG. 5B-2

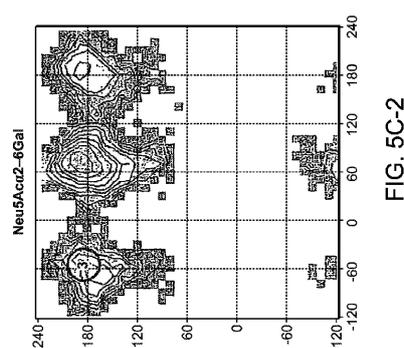
【 図 5 C - 1 】



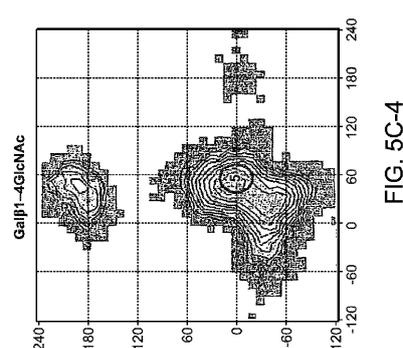
【 図 5 C - 3 】



【 図 5 C - 2 】



【 図 5 C - 4 】



【 図 5 C - 5 】

α2-3 結合の高次構造サブリング

コーン様	100%
アンブレラ様	0%

【 図 5 C - 6 】

α2-6 結合の高次構造サブリング

アンブレラ様 (%) : コーン様 (%)	
ω = - 60°	60 : 20
ω = + 60°	10 : 40
ω = 180°	30 : 30

FIG. 5C-5

FIG. 5C-6

【 図 6 】

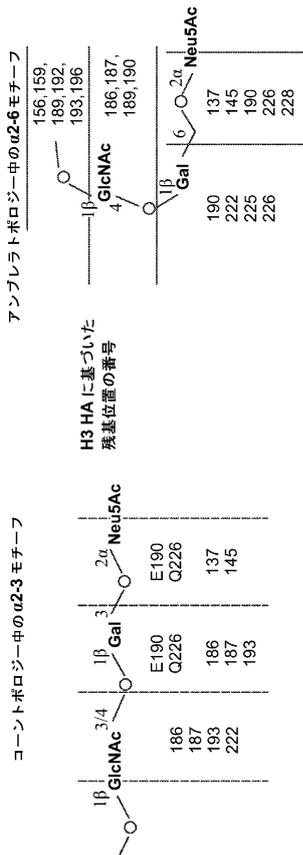
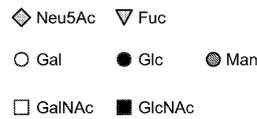


FIG. 6

【 図 7 】

コートポロジー中のα2-3およびα2-6モチーフ

- コア構造に結合した短鎖オリゴサッカリドまたはオリゴサッカリド分枝の典型
- N結合コアの短鎖分枝
- O結合コアの短鎖分枝
- コートポロジーはまた、コア構造に結合したより長いα2-3およびα2-6オリゴサッカリド分枝によって採用され得る。



灰色の点線（4S および 6S）は、フコシル化および硫酸化修飾のための潜在的部位を示す。

FIG. 7

【 図 8 A - 1 】

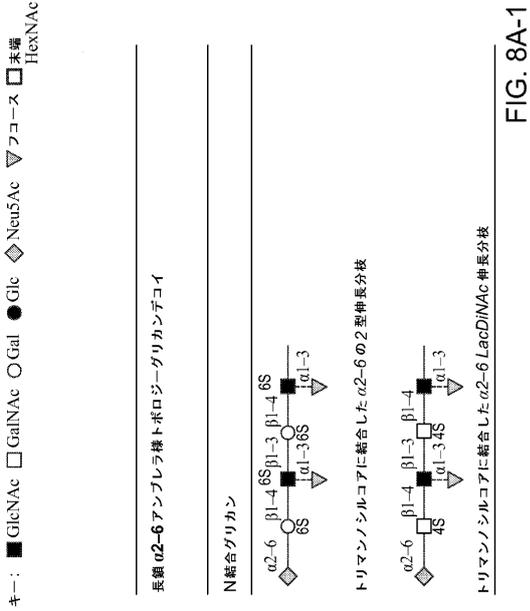


FIG. 8A-1

【 図 8 A - 2 】

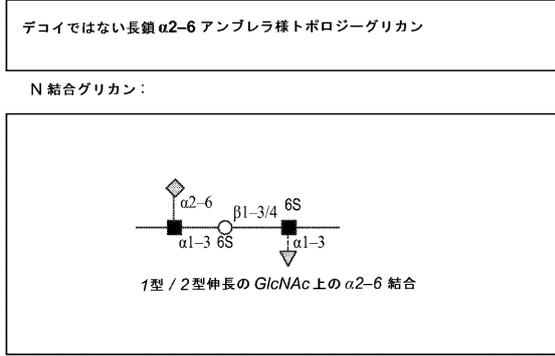


FIG. 8A-2

【 図 8 A - 3 】

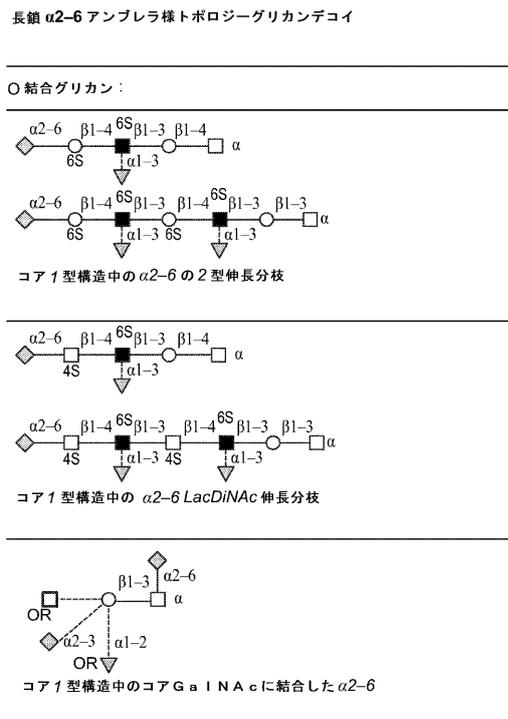


FIG. 8A-3

【 図 8 A - 4 】

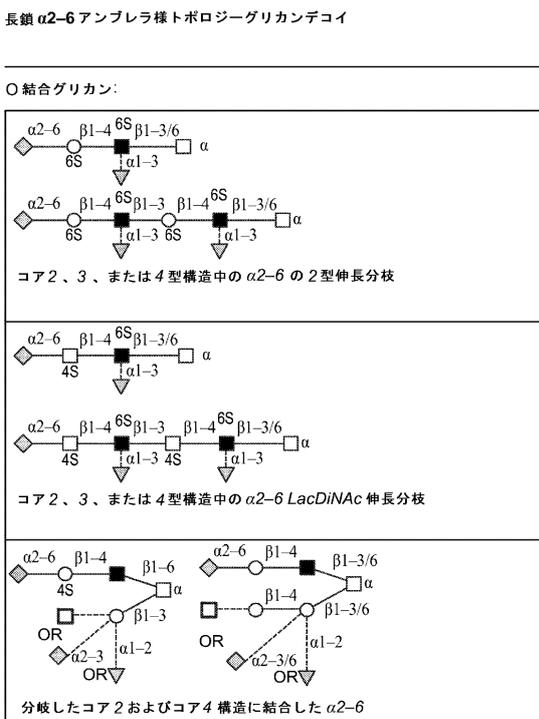


FIG. 8A-4

【 図 8 A - 5 】

デコイではない長鎖 $\alpha 2-6$ アンブレラ様トポロジーグリカン

○ 結合グリカン:

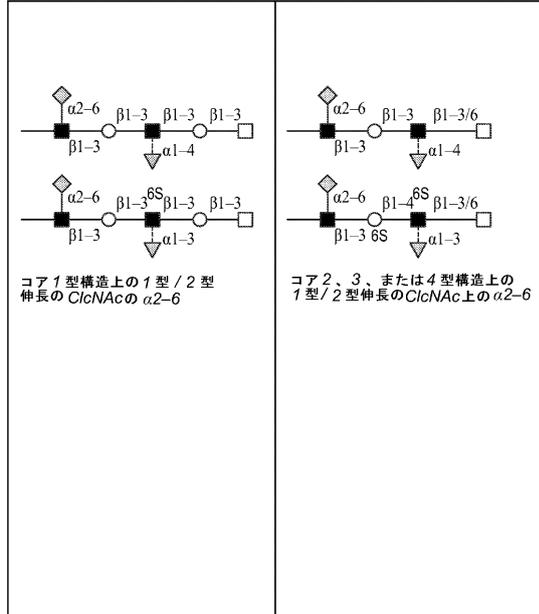


FIG. 8A-5

【 図 8 A - 7 】

デコイではない長鎖 $\alpha 2-6$ アンブレラ様トポロジーグリカン

糖脂質:

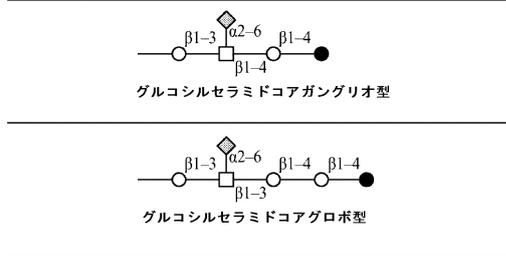


FIG. 8A-7

【 図 8 A - 6 】

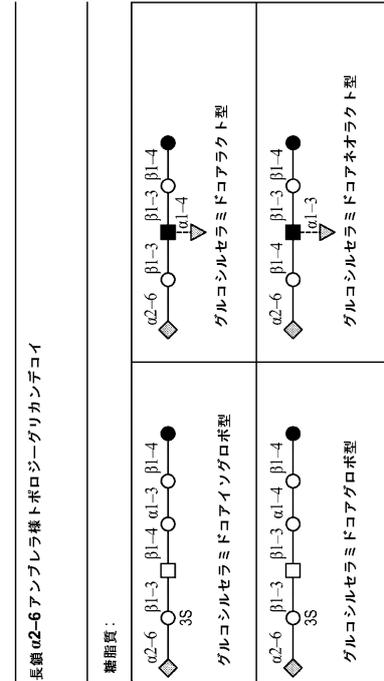


FIG. 8A-6

【 図 8 B 】

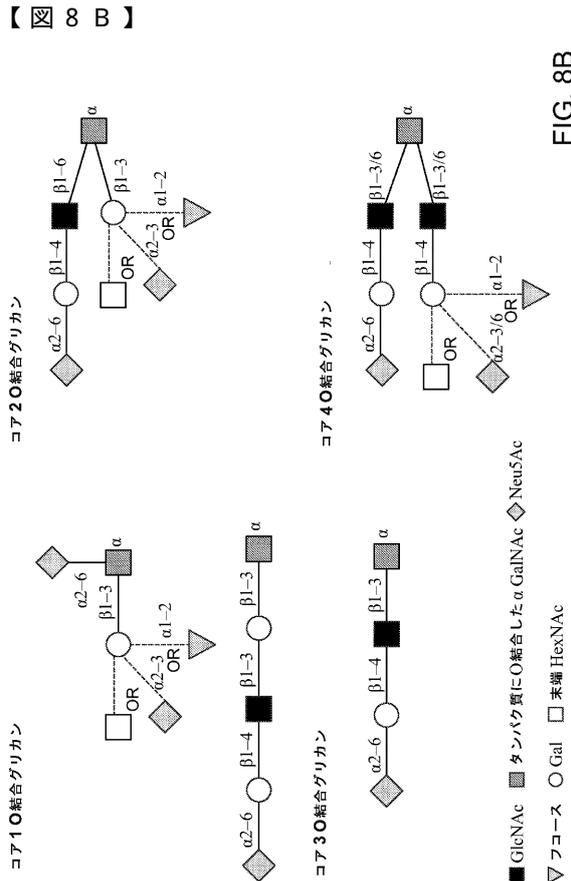


FIG. 8B

【 図 1 2 】

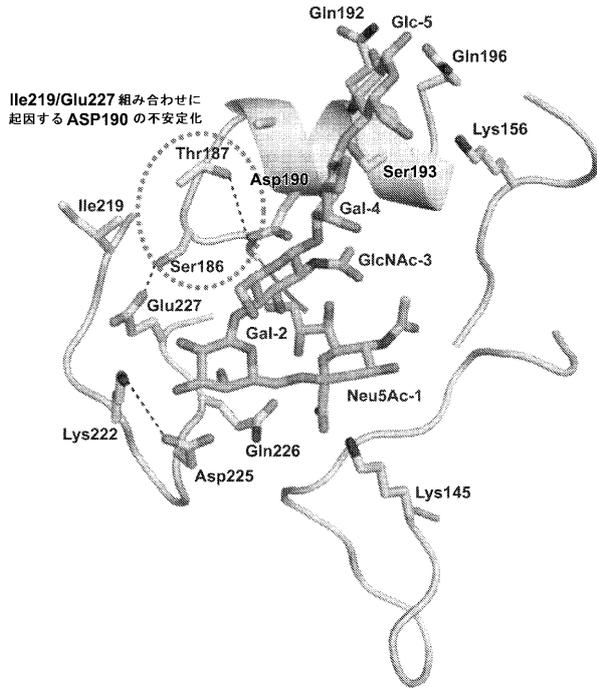


FIG. 12

【 図 1 3 A 】

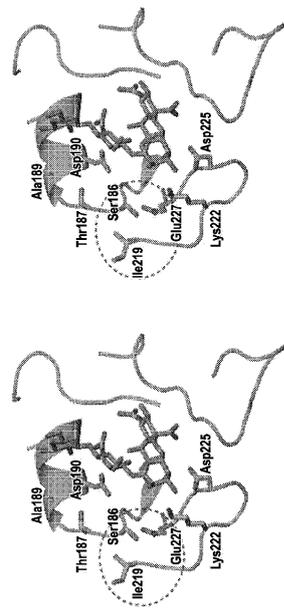


FIG. 13A

【 図 1 3 B 】

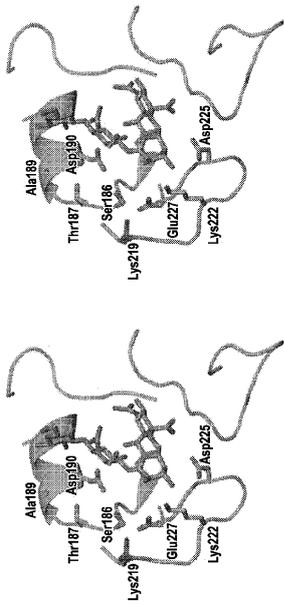


FIG. 13B

【 図 1 3 C 】

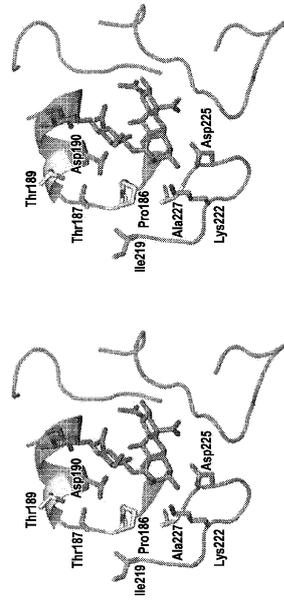


FIG. 13C

【 13 D 】

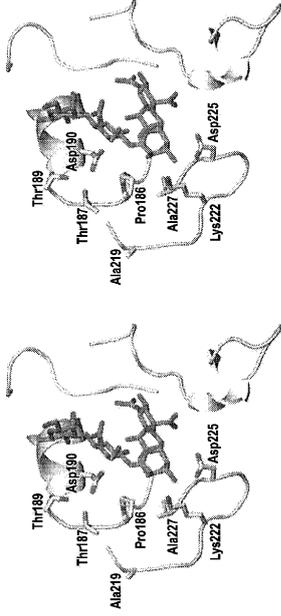


FIG. 13D

【 14 4 】

グリカン	詳細な名称
3'SLN	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-
6'SLN	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-
3'SLN-LN	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-
6'SLN-LN	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-
3'SLN-LN-LN	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-

キー: Neu5Ac: N-アセチル D-ノイラミン酸; Gal: D-ガラクトース (galactose);
 GlcNAc: N-アセチル D-グルコサミン. α/β: ピラノース糖のアノマー配置.
 全ての糖はスベーターを介してヒオタンに結合している
 (<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resources/recorded5.shtml>
 に記載の -Sp-LC-LC-ヒオタン)

FIG. 14

【 15 A 】

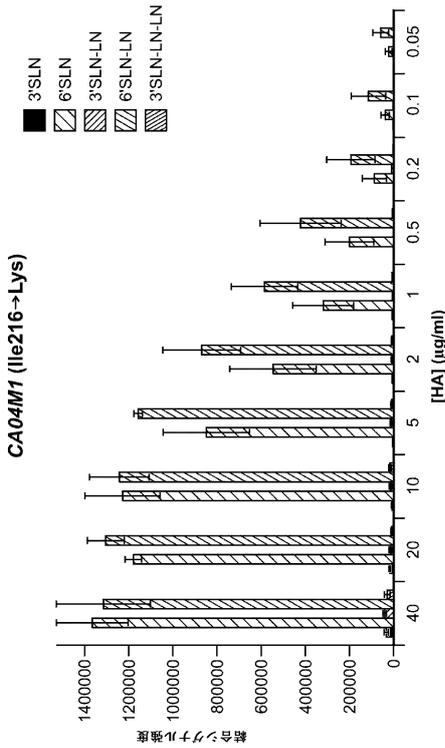


FIG. 15A

【 15 B 】

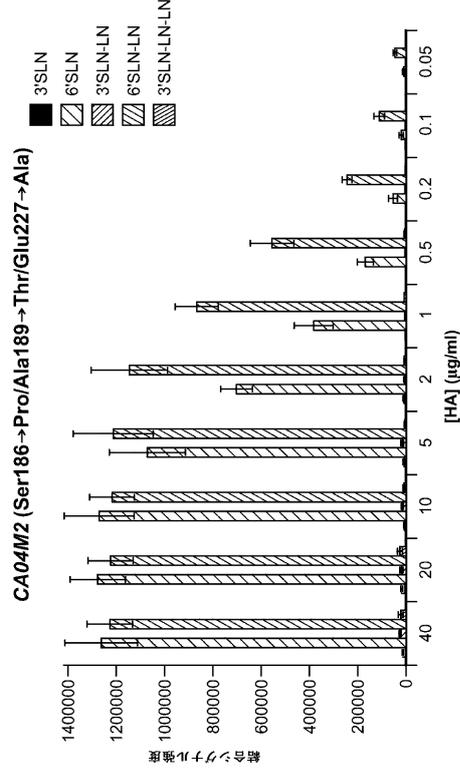


FIG. 15B

【 図 15 C 】

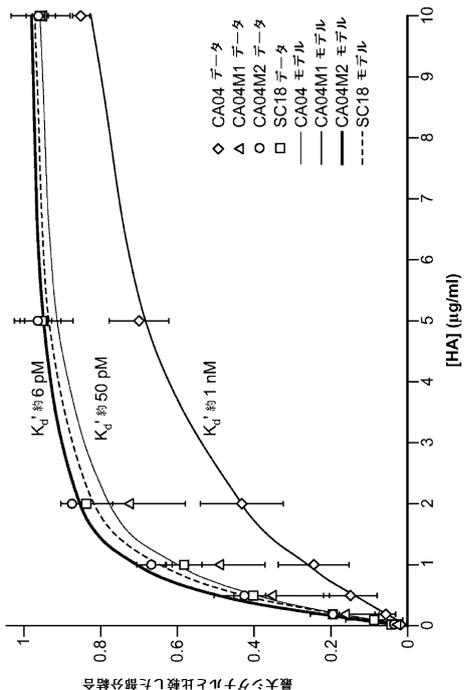


FIG. 15C

【 図 15 D 】

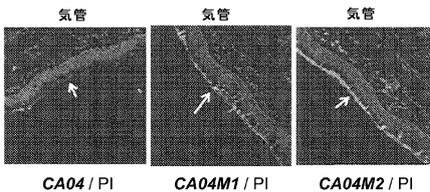


FIG. 15D

【 図 16 - 1 】

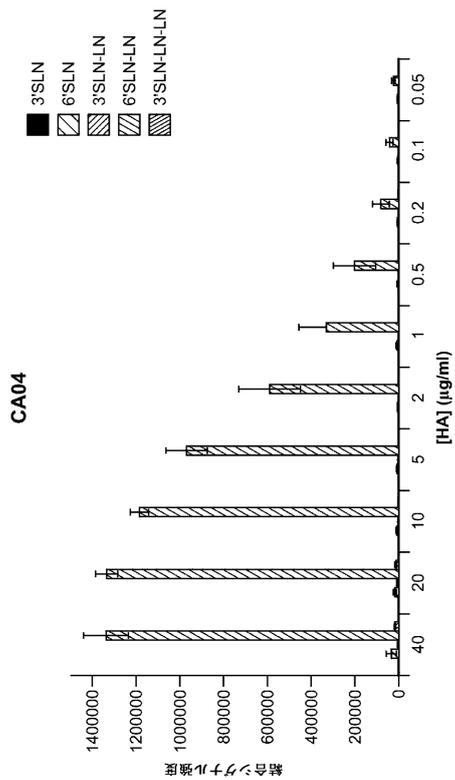


FIG. 16

【 図 16 - 2 】

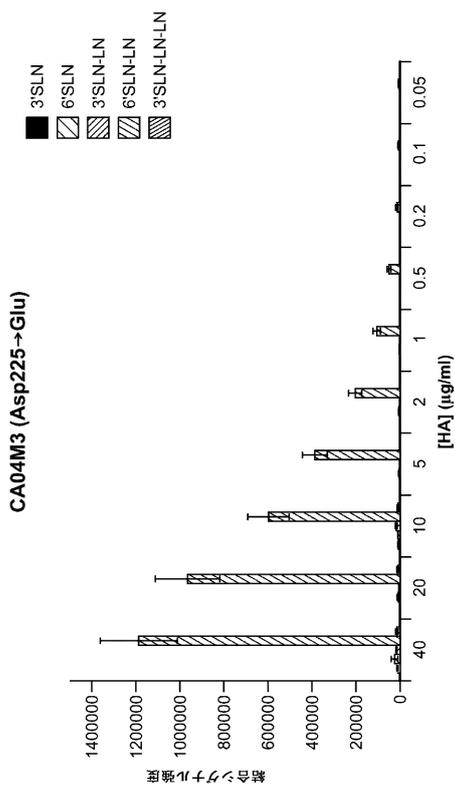


FIG. 16 (続き)

【 図 16 - 3 】

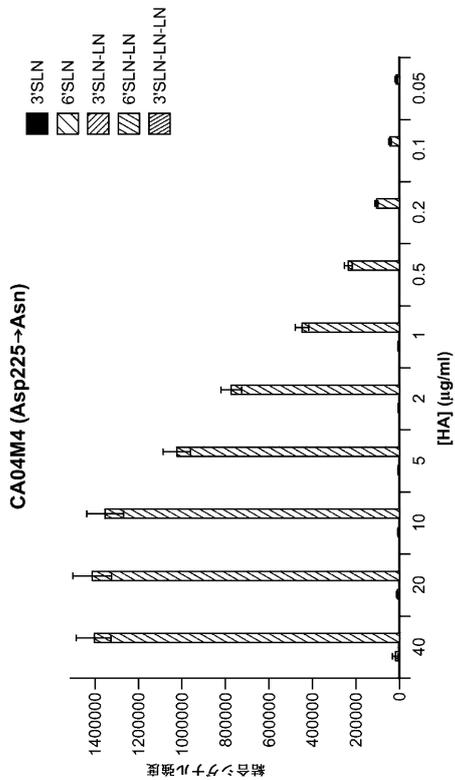


FIG. 16 (続き)

【 図 16 - 4 】

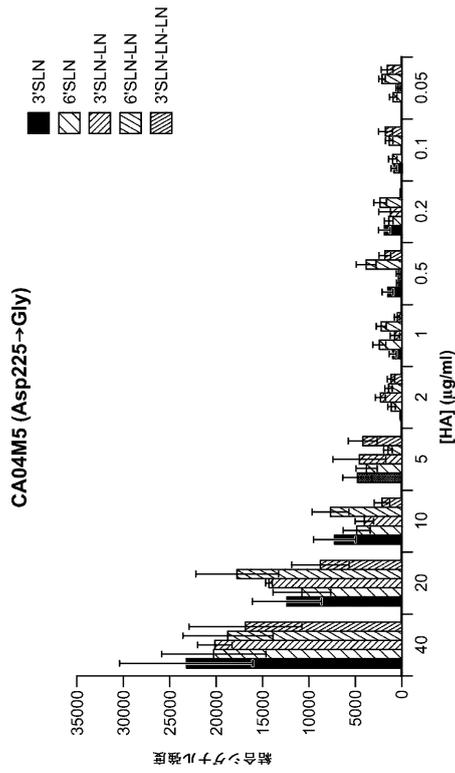


FIG. 16 (続き)

【 図 16 - 5 】

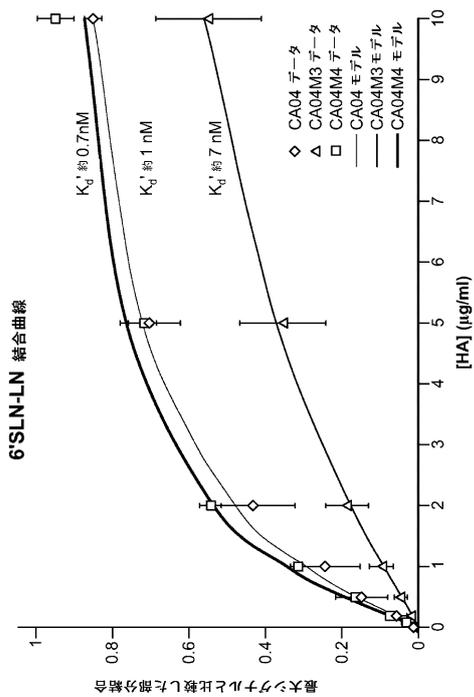


FIG. 16 (続き)

【配列表】

0005886194000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 31/16	(2006.01)	A 6 1 K 39/42
A 6 1 K 31/711	(2006.01)	A 6 1 P 31/16
		A 6 1 K 31/711

- (72)発明者 ビスワナサン, カーティック
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 1, ウォルサム, スターズ ヒル ロード
 3 1 1 4
- (72)発明者 ラマン, ラウル
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 2, ウォルサム, クロックタワー ドライブ
 1 3 2, ユニット 3 1 1
- (72)発明者 シュリバー, ザッカリー エイチ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, フェアモント アベニュー
 1 6
- (72)発明者 サシセカラン, ラム
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 3 0, ベッドフォード, デュバル ウェイ 4

審査官 荒木 英則

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 8 / 0 7 3 1 6 1 (WO, A 1)
 Science, 2 0 0 9年 5月2 2日, Vol.325, No.5937, p.197-201

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 1 4 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
 A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 GenBank/EMBL/DDBJ/UniProt/GeneSeq
 REGISTRY/CAplus/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/WPIDS
 (STN)