

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7007914号
(P7007914)

(45)発行日 令和4年2月10日(2022.2.10)

(24)登録日 令和4年1月12日(2022.1.12)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/6813(2018.01)

C 1 2 Q 1/6813 Z

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 Z

C 0 7 K 14/555(2006.01)

C 0 7 K 14/555

A 6 1 K 38/21 (2006.01)

A 6 1 K 38/21

請求項の数 15 (全62頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-559434(P2017-559434)

(86)(22)出願日 平成28年5月11日(2016.5.11)

(65)公表番号 特表2018-517406(P2018-517406
A)

(43)公表日 平成30年7月5日(2018.7.5)

(86)国際出願番号 PCT/CN2016/081678

(87)国際公開番号 WO2016/180335

(87)国際公開日 平成28年11月17日(2016.11.17)

審査請求日 令和1年5月10日(2019.5.10)

(31)優先権主張番号 62/160,006

(32)優先日 平成27年5月12日(2015.5.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 514290247

スーパーラブ ファー イースト リミテ
ッド英国領バージン諸島 トルトラ島 ロード
・タウン ピー. オー. ボックス 3 1 5
2 オーエムシー・チェインバース

(74)代理人 100100158

弁理士 鮫島 睦

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ウェイ・グアンウェン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腫瘍に対して直接阻害作用を有するインターフェロンの同定方法、及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

テストインターフェロンの組換え高効率複合インターフェロン (r S I F N - c o) に対する相対効力を確定又は比較する、またはテストインターフェロンと r S I F N - c o との間の同等性を構築する方法において、

(1) 前記テストインターフェロンと r S I F N - c o を提供することと、及び

(2) 同じ特定な条件で、インビトロで、前記テストインターフェロンと r S I F N - c o により、それぞれ以下の活性

(i) H T - 2 9 細胞における L R P 6 及び F Z D 6 の発現に対するダウンレギュレーション；および

(i i) I F N α - 2 b よりも高い I F N A R 1 への結合親和性、及び I F N α - 2 b よりも低い I F N A R 2 への結合親和性；

を測定することを含む、

統計学的に有意であるように (i) の所定の活性およびテストインターフェロンによる (i i) の所定の活性を有するのは、前記テストインターフェロンおよび r S I F N - c o が同じ効力を有することか、又は前記テストインターフェロンおよび r S I F N - c o が同等であることを示す、

方法。

【請求項2】

ステップ (2) において、以下のいずれか 1 種または多種の活性

(i i i) いずれか 1 種又は多種の担癌マウスモデル体内の癌細胞生長に対する阻害；
(i v) 癌細胞生存率の減少；
(v) 癌細胞転移に対する阻害；
(v i) 癌細胞における β -カテニン／TCF の転写活性に対する阻害；
(v i i) 癌細胞における Axin 2、CD24、サバイビン及び ID2 のうちいずれか 1 種又は多種の発現に対する阻害；
(v i i i) 癌細胞における偽足形成に対する阻害；
(i x) 癌細胞における β -カテニン発現に対する阻害；
(x) 癌細胞における DKK-3、KLF-4 及び BATF2 のうちいずれか 1 種又は多種の発現に対するアップレギュレーション；および
(x i) 癌細胞 p-STAT 発現に対するアップレギュレーションにおける、IFN α -2b よりも低い B18R 阻害に対する感受性；

を測定することをさらに含み、

活性 (i v) ~ (x i) がインビトロ条件で測定され、統計学的に有意であるように (i) の所定の活性およびテストインターフェロンによる (i i) の所定の活性を、統計学的に有意であるように (i i i)、(i v)、(v)、(v i) 及び (v i i) のうち所定のいずれか 1 種、又は 2 種、又は 3 種、又は 4 種、又は 5 種の活性と組み合わせて有するのは、及び／又は前記テストインターフェロンが、(v i i i)、(i x)、(x) 及び (x i) のうち所定のいずれか 1 種又は多種の活性を有するのは、前記テストインターフェロンおよび rSIFN-co が同じ効力を有することか、又は前記テストインターフェロンおよび rSIFN-co が同等であることをさらに示す、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

1 種又は多種の前記活性を測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞、結腸癌細胞、子宮頸癌細胞、肝臓癌細胞、乳癌細胞及び前立腺癌細胞のうちいずれか 1 種又は多種を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

1 種又は多種の前記活性を測定するために用いられる癌細胞は、A549 細胞、HeLa 細胞、CL-1 細胞、Huh-7 細胞、SW480 細胞、MDA-MB-231 細胞、Calu-1 細胞、SMMC-7721 細胞、PANC-1 細胞、SW620 細胞、SPC-A4 細胞、H1299 細胞、H460 細胞及び HT-29 細胞のうちいずれか 1 種又は多種を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

活性 (i i) の測定において、IFN α -2b に比べて、テストインターフェロンが少なくとも 2 倍、好ましくは、少なくとも 3 倍、より好ましくは、少なくとも 4 倍、さらに好ましくは、少なくとも 4.5 倍とより高い IFNAR1 への結合親和性を有する場合、前記テストインターフェロン及び rSIFN-co は同じ効力を有する又は同等であるとみなされる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

活性 (i i) の測定において、IFN α -2b に比べて、テストインターフェロンが少なくとも 5 倍、好ましくは、少なくとも 7 倍、より好ましくは、少なくとも 9 倍、さらに好ましくは、少なくとも 11 倍とより低い IFNAR2 への結合親和性を有する場合、前記テストインターフェロン及び rSIFN-co は同じ効力を有する又は同等であるとみなされる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

活性 (i i) の測定において、解離定数 (K_D) を測定することで、IFN α -2b、テストインターフェロン及び／又は rSIFN-co の IFNAR1 及び／又は IFNAR2 への結合親和性を確定する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

活性 (x i) を測定するために用いられる癌細胞は、A549 細胞及び HeLa 細胞のう

10

20

30

40

50

ちいずれか1種又は多種を含む、請求項2～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

活性(x i)の測定において、癌細胞に接触する前に、IFN α -2b、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-coを5ng/ml～20ng/ml、好ましくは10ng/mlのB18Rとともにインキュベートする、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

活性(x i)の測定において、IFN α -2bに比べて、癌細胞p-STAT発現に対するアップレギュレーションにおけるテストインターフェロンが、より低いB18R阻害に対する感受性を有する場合、前記テストインターフェロン及びrSIFN-coは同じ効力を有する又は同等であるとみなされる、請求項8又は9に記載の方法。

10

【請求項11】

活性(x i)の測定において、ウエスタンブロットを利用してp-STAT発現に対するアップレギュレーションを測定する、請求項2～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

統計学的に有意であるとは、コントロールに比べて、p値 ≤ 0.05 、又は ≤ 0.01 、又は ≤ 0.005 、又は ≤ 0.001 、又は ≤ 0.0005 、又は ≤ 0.0001 である、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記コントロールは、テストインターフェロン又はrSIFN-coで処理されず、又は生理食塩水若しくはPBSで処理され、又はIFN α -2bで処理され、又は未処理のコントロール(Mock)である、請求項12に記載の方法。

20

【請求項14】

前記テストインターフェロンとrSIFN-coは同じアミノ酸配列(配列番号1)を有し、且つ同じヌクレオチド配列(配列番号2)にコードされている、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

前記テストインターフェロンとrSIFN-coは同じ比活性を有する、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、テストインターフェロンのrSIFN-coに対する相対効力を確定又は比較する新規な方法、テストインターフェロンとrSIFN-coとの間の実質的同等性(substantial equivalence)を構築する方法、癌細胞転移、偽足(pseudopod)形成、 β -カテニン/TCF-媒介の転写活性及び β -カテニンの蛋白レベルを阻害する方法、Wnt関連受容体若しくは共受容体(coreceptor)の発現をダウンレギュレーションする方法、Wntシグナル伝達経路の標的遺伝子の発現を阻害する方法、腫瘍阻害遺伝子をアップレギュレーションする方法、ならびにいずれ及びあらゆる前記方法を行うための測定キットに関する。本発明はさらに前記活性を有するインターフェロン若しくはインターフェロン代用物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

スーパーインターフェロン(以下、「rSIFN-co」又は「sIFN-I」と呼ばれ、固形腫瘍に対して治療作用を有するインターフェロンである)は既に特許文献1(組換え高効率複合インターフェロン)と特許文献2(組換えインターフェロンをコードする核酸)に記載されている。rSIFN-coは、INFERGEN(登録商標)(interferon alfacon-1)(特許文献3に開示された複合インターフェロン α)と同じアミノ酸配列をコードする工程化された遺伝子構築物より発現される。しかし、rSIFN-coは、INFERGEN(登録商標)をコードする核酸配列と異なる新しい核酸配列にコードされている。INFERGEN(登録商標)に比べて、rSIFN-

50

c o 蛋白は新しい三次構造と改善された生物学特性を有する。

【0003】

特許文献4、特許文献5と特許文献6に記載されているように、I N F E R G E N（登録商標）に比べて、r S I F N - c o は、固形腫瘍に対する直接阻害作用及び抗ウイルス活性を含むより広域スペクトルの生物活性も有する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】米国特許第7, 364, 724号

米国特許第7, 585, 647号

米国特許第4, 695, 623号

米国特許第8, 114, 395号

米国特許第8, 287, 852号

米国特許第8, 425, 896号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

r S I F N - c o が他の従来の市販インターフェロンよりも独特な生物学活性、及び人類への応用可能性を有することに鑑みて、r S I F N - c o と他のテストインターフェロンの生物学活性及び／又は効力を評価する方法を提供することが望まれ、例えば、製造過程
中或いは他の面における品質制御を目的として、最終製品が所望の活性を保有又は有し、
且つ従来の市販のインターフェロンと異なっていることを保証する。さらに、r S I F N
- c o の他の用途、及び所望の活性を有するインターフェロン若しくはインターフェロン
代用物を提供することが望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

一つの形態では、本発明は、テストインターフェロンのr S I F N - c o 若しくはr S I
F N - c o 代用物に対する相対効力を確定又は比較する方法において、（1）前記テスト
インターフェロンとr S I F N - c o 若しくはr S I F N - c o 代用物を提供することと
、（2）同じ特定な条件で、前記テストインターフェロンとr S I F N - c o 若しくはr
S I F N - c o 代用物に対して、それぞれ以下の（a）～（k）から選ばれるいずれか1
種又は多種の活性を測定することを含み、前記テストインターフェロンが、統計学的に
有意であるように、（a）、（b）、（c）、（d）、（e）及び（f）のうち所定のい
ずれか1種、又は2種、又は3種、又は4種、又は5種、又は6種の活性を有し、及び／
又は前記テストインターフェロンが、（g）、（h）、（i）、（j）及び（k）のうち
所定のいずれか1種、又は例えば2種、又は3種、又は4種、又は5種のような多種の活
性を有するのは、前記テストインターフェロンがr S I F N - c o 若しくはr S I F N -
c o 代用物と実質的に同じ効力を有し、即ち、実質的に同じ有効性を有し又は実質的に同
じ結果を生じることを示す、方法を提供する。（a）いずれか1種又は多種の担癌動物モ
デル体内の癌細胞生長に対する阻害；（b）癌細胞生存率の減少；（c）癌細胞転移に対
する阻害；（d）癌細胞におけるβ-カテニン／T C F の転写活性に対する阻害；（e）
癌細胞におけるL R P 6 及び／又はF Z D 6 の発現に対するダウンレギュレーション；（
f）癌細胞におけるA x i n 2、C D 2 4、サバイビン及びI D 2 のうちいずれか1種又は
多種の発現に対する阻害；（g）癌細胞における偽足形成に対する阻害；（h）癌細胞
におけるβ-カテニン発現に対する阻害；（i）癌細胞、例えばA 5 4 9 細胞又はS W 6
2 0 細胞におけるD K K - 3、K L F - 4 及びB A T F 2 のうちいずれか1種又は多種の
発現に対するアップレギュレーション；（j）I F N α - 2 b よりも高いI F N A R 1 へ
の結合親和性、及び／又はI F N α - 2 b よりも低いI F N A R 2 への結合親和性；（k）
癌細胞p - S T A T 発現に対するアップレギュレーションにおける、I F N α - 2 b より
も低いB 1 8 R 阻害に対する感受性。ここで、「実質的に同じ」とは、少なくとも約7

10

20

30

40

50

0%が同じであり、好ましくは、少なくとも約80%が同じであり、より好ましくは、少なくとも約90%が同じであり、さらに好ましくは、少なくとも約95%が同じである。

【0007】

他の形態では、本発明は、テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物との間の実質的同等性を構築する方法において、(1)前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物を提供することと、(2)同じ特定の条件で、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物に対して、それぞれ以下の(a)~(k)から選ばれるいずれか1種又は多種の活性を測定することを含み、前記テストインターフェロンが、統計学的に有意であるように、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(f)のうち所定のいずれか1種又は2種、又は3種、又は4種、又は5種、又は6種の活性を有し、及び/又は前記テストインターフェロンが、(g)、(h)、(i)、(j)及び(k)のうち所定のいずれか1種又は多種の活性、例えば2種、又は3種、又は4種、又は5種の活性を有するのは、前記テストインターフェロンがrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物と実質的同等であることを示す、方法を提供する。(a)いずれか1種又は多種の担癌動物モデル体内の癌細胞生長に対する阻害；(b)癌細胞生存率の減少；(c)癌細胞転移に対する阻害；(d)癌細胞におけるβ-カテニン/TCFの転写活性に対する阻害；(e)癌細胞におけるLRP6及び/又はFZD6の発現に対するダウンレギュレーション；(f)癌細胞におけるAxin2、CD24、サバイビン及びID2のうちいずれか1種又は多種の発現に対する阻害；(g)癌細胞における偽足形成に対する阻害；(h)癌細胞におけるβ-カテニン発現に対する阻害；(i)癌細胞、例えばA549細胞又はSW620細胞におけるDKK-3、KLF-4及びBATF2のうちいずれか1種又は多種の発現に対するアップレギュレーション；(j)IFNα-2bよりも高いIFNAR1への結合親和性、及び/又はIFNα-2bよりも低いIFNAR2への結合親和性；(k)癌細胞p-STAT発現に対するアップレギュレーションにおける、IFNα-2bよりも低いB18R阻害に対する感受性。

【0008】

幾つかの実施形態では、前記1種又は多種の活性を測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞、結腸癌細胞、子宮頸癌細胞、肝臓癌細胞、乳癌細胞及び前立腺癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、前記1種又は多種の活性を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、SW480細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞、SMMC-7721細胞、PANC-1細胞、SW620細胞、SPC-A4細胞、H1299細胞、H460細胞及びHT-29細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。

【0009】

幾つかの実施形態では、活性(a)である体内癌細胞生長に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は、肝臓癌細胞、子宮頸癌細胞、結腸癌細胞及び肺癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性(a)を測定するために用いられる癌細胞は、SMMC-7721細胞、Hela細胞、HT-29細胞、SPC-A4細胞及びA549細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、HT-29細胞、SPC-A4細胞及びA549細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、さらに好ましくは、A549細胞を含む。幾つかの実施形態では、活性(a)の阻害作用の測定において、生理食塩水若しくはPBSはコントロールとして用いられる。幾つかの実施形態では、活性(a)の測定において担癌動物モデルに投与されるテストインターフェロン及び/又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は、約0.02mg~約0.30mg、好ましくは、約0.05mg~約0.15mgの量で投与される。幾つかの実施形態では、活性(a)の測定において担癌動物モデルに投与されるテストインターフェロン及び/又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は一日おきに投与される。幾つかの実施形態では、活性(a)の測定において担癌動物モデルに投与されるテストインターフェロン及び/又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は、約2週間~

10

20

30

40

50

約6週間、好ましくは、約3週間～約4週間継続して投与される。

【0010】

幾つかの実施形態では、活性（b）である癌細胞生存率の減少の測定において、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は、約6.25mcg/ml～約25mcg/ml、好ましくは、約10mcg/ml～約18mcg/ml、さらに好ましくは、約10mcg/ml～約15mcg/mlの濃度範囲で、それぞれ癌細胞生存率を約50%減少させる。幾つかの実施形態では、活性（b）の測定において、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は、少なくとも約25mcg/ml、好ましくは、少なくとも約50mcg/ml、より好ましくは、少なくとも約75mcg/ml、さらに好ましくは、少なくとも約100mcg/mlの濃度で、それぞれ癌細胞生存率を実質的に検出できない程度まで減少させる。幾つかの実施形態では、活性（b）の測定において、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物の濃度は約0.2mcg/ml～約100mcg/mlの濃度範囲に入る。幾つかの実施形態では、活性（b）の測定において、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、癌細胞を少なくとも約1日間、好ましくは、少なくとも約2日間処理する。幾つかの実施形態では、活性（b）を測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞、結腸癌細胞、子宮頸癌細胞、肝臓癌細胞、乳癌細胞及び前立腺癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、肺癌細胞、結腸癌細胞、肝臓癌細胞、乳癌細胞及び前立腺癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性（b）を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、SW480細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞、SMMC-7721細胞及びPANC-1細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、A549細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、SW480細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞、SMMC-7721細胞及びPANC-1細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。

【0011】

幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性（b）を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、活性（b）を測定するために用いられる癌細胞は、約1日間～約10日間、好ましくは、約1日間～約6日間処理される。幾つかの実施形態では、活性（b）を測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞及び結腸癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性（b）を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞及びSW620細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。

【0012】

幾つかの実施形態では、活性（c）である癌細胞転移に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞及び結腸癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性（c）を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞及びSW620細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、トランスウェル法を利用して活性（c）である癌細胞転移に対する阻害を測定する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性（c）を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性（c）を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約20時間、好ましくは、少なくとも約24時間処理する。

【0013】

幾つかの実施形態では、活性（d）である癌細胞におけるβ-カテニン／TCFの転写活性に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞及び結腸癌細胞のうちい

10

20

30

40

50

いずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性(d)を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞、H1299細胞、H460細胞、HT-29細胞及びSW620細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、A549細胞、H1299細胞、H460細胞及びSW620細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(d)を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約20時間、好ましくは、少なくとも約24時間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(d)を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、β-カテニン／TCFの転写活性はレポーターシステムを用いて測定される。幾つかの実施形態では、前記レポーターシステムはTOPFlash又はpSV40-RLプラスミドを含む。

10

【0014】

幾つかの実施形態では、活性(e)である癌細胞におけるLRP6及び／又はFZD6の発現に対するダウンレギュレーションを測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞及び結腸癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性(e)を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞、H460細胞、SW620細胞及びHT-29細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、A549細胞、SW620細胞及びHT-29細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、さらに好ましくは、HT-29細胞を含む。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(e)を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約20時間、好ましくは、少なくとも約24時間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(e)を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、活性(e)の測定において、LRP6及び／又はFZD6のmRNAレベルを測定することによりLRP6及び／又はFZD6の発現を確定する。

20

【0015】

幾つかの実施形態では、活性(f)であるAxin2、CD24、サバイビン及びID2のうちいずれか1種又は多種の発現に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は肺癌細胞を含み、好ましくは、A549細胞を含む。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(f)を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約20時間、好ましくは、少なくとも約24時間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(f)を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、活性(f)の測定において、Axin2、CD24、サバイビン及び／又はID2のmRNAレベルを測定することによりそれに対応する発現を確定する。幾つかの実施形態では、活性(f)の測定において、コントロールに比べて、テストインターフェロンが癌細胞におけるAxin2、CD24、サバイビン及びID2のうちいずれか1種又は多種のうち少なくとも約30%、好ましくは、少なくとも約40%、より好ましくは、少なくとも約50%、さらに好ましくは、少なくとも約60%の発現を減少する場合、前記テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する又は実質的同等であるとみなされる。

30

40

【0016】

幾つかの実施形態では、活性(g)である癌細胞における偽足形成に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は肺癌細胞を含み、好ましくは、A549細胞を含む。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(g)を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約4日間、好ましくは、少なくとも約8日間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml

50

～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(g)を測定するために用いられる癌細胞を処理する。

【0017】

幾つかの実施形態では、活性(h)である癌細胞におけるβ-カテニン発現に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞及び結腸癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性(h)を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞及びSW480細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性(h)の測定において、ウエスタンブロットを利用してβ-カテニン発現に対する阻害を測定する。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(h)を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約48時間、好ましくは、少なくとも約72時間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(h)を測定するために用いられる癌細胞を処理する。

【0018】

幾つかの実施形態では、活性(i)である癌細胞におけるDKK-3、KLF-4及びBATF2のいずれか1種又は多種の発現に対するアップレギュレーションを測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞及び結腸癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性(i)を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞、H460細胞、SW620細胞及びHT-29細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、A549細胞及びSW620細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(i)を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約20時間処理し、好ましくは、少なくとも約24時間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(i)を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、活性(i)の測定において、DKK-3、KLF-4及び／又はBATF2のmRNAレベルを測定することによりそれに対応する発現を確定する。

【0019】

幾つかの実施形態では、活性(j)の測定において、IFNα-2bに比べて、テストインターフェロンが少なくとも約2倍、好ましくは、少なくとも約3倍、より好ましくは、少なくとも約4倍、さらに好ましくは、少なくとも約4.5倍、例えば4.72倍とより高いIFNAR1への結合親和性を有する場合、前記テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する又は実質的同等であるとみなされる。幾つかの実施形態では、活性(j)の測定において、IFNα-2bに比べて、テストインターフェロンが少なくとも約5倍、好ましくは、少なくとも約7倍、より好ましくは、少なくとも約9倍、さらに好ましくは、少なくとも約11倍、例えば11.9倍とより低いIFNAR2への結合親和性を有する場合、前記テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する又は実質的同等であるとみなされる。幾つかの実施形態では、活性(j)の測定において、解離定数(K_D)を測定することで、IFNα-2b、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物のIFNAR1及び／又はIFNAR2への結合親和性を確定する。

【0020】

幾つかの実施形態では、活性(k)を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞及びHela細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性(k)の測定において、癌細胞に接触する前に、IFNα-2b、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物を約5ng/ml～約20ng/mlの範囲で処理する。

g/ml、好ましくは約10 ng/mlのB18Rとともにインキュベートする。幾つかの実施形態では、活性(k)の測定において、IFN α -2bに比べて、癌細胞p-S T A T発現に対するアップレギュレーションにおけるテストインターフェロンが、より低いB18R阻害に対する感受性を有する場合、前記テストインターフェロン及び/又はr S I F N-c o若しくはr S I F N-c o代用物は実質的に同じ効力を有する又は実質的同等であるとみなされる。幾つかの実施形態では、活性(k)の測定において、ウエスタンブロットを利用してp-S T A T発現に対するアップレギュレーションを測定する。

【0021】

幾つかの実施形態では、統計学的に有意であるとは、コントロールに比べて、p値 ≤ 0.05 、又は ≤ 0.01 、又は ≤ 0.005 、又は ≤ 0.001 、又は ≤ 0.0005 、又は ≤ 0.0001 である。

【0022】

幾つかの実施形態では、前記コントロールは、テストインターフェロン又はr S I F N-c o若しくはr S I F N-c o代用物で処理されず、生理食塩水若しくはPBSで処理され、又はIFN α -2bで処理され、又は未処理のコントロール(Mock)である。

【0023】

他の形態では、本発明は、(a)複数濃度のテストインターフェロンを提供すること、(b)該複数濃度のテストインターフェロンを用いて、特定の条件で、第一群の癌細胞の生存率に対するテストインターフェロンの第一投与量反応を確定すること、(c)複数濃度のr S I F N-c o若しくはr S I F N-c o代用物を提供すること、(d)該複数濃度のr S I F N-c o若しくはr S I F N-c o代用物を用いて、同じ特定の条件で、第二群の癌細胞の生存率に対するr S I F N-c o若しくはr S I F N-c o代用物の第二投与量反応を確定すること、及び、(e)第一投与量反応と第二投与量反応とを比較することを含む、化合物(例えば、テストインターフェロン)の効力を確定又は比較する方法を提供する。このように、化合物、例えばテストインターフェロンのr S I F N-c o若しくはr S I F N-c o代用物に対する相対効力を確定する。

【0024】

幾つかの実施形態では、r S I F N-c oは特定の比活性を有し、且つ比活性が約 4×10^8 IU/mg $\sim$ 約 1×10^9 IU/mgの範囲内にある。幾つかの実施形態では、比活性が約 4.4×10^8 IU/mg $\sim$ 約 9×10^8 IU/mgの範囲内にある。幾つかの実施形態では、比活性が約 5×10^8 IU/mg $\sim$ 約 8×10^8 IU/mgの範囲内にある。幾つかの実施形態では、比活性が約 6×10^8 IU/mg $\sim$ 約 7.5×10^8 IU/mgの範囲内にある。好ましくは、比活性が約 4×10^8 IU/mg $\sim$ 約 5×10^8 IU/mgの範囲内にある。

【0025】

幾つかの実施形態では、化合物の効力を確定又は比較する方法において、テストインターフェロン又はr S I F N-c oの濃度が約0.2 mcg/ml $\sim$ 約100 mcg/mlの範囲内にある。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン又はr S I F N-c oの濃度は、0.2 mcg/ml、0.39 mcg/ml、0.78 mcg/ml、1.56 mcg/ml、3.13 mcg/ml、6.25 mcg/ml、12.5 mcg/ml、25 mcg/ml、50 mcg/ml及び100 mcg/mlのうち少なくとも2種以上の濃度である。

【0026】

幾つかの実施形態では、テストインターフェロン又はr S I F N-c oで癌細胞を少なくとも約20時間、好ましくは少なくとも約24時間、より好ましくは少なくとも約48時間、さらに好ましくは少なくとも約72時間処理する。

【0027】

幾つかの実施形態では、本発明は本文に記載したような方法を提供し、r S I F N-c oは約6.25 mcg/ml $\sim$ 約25 mcg/mlの濃度範囲(癌細胞のタイプに依存する。)で癌細胞生存率を50%減少できる効力を有する。幾つかの実施形態では、r S I F

10

20

30

40

50

N-c oは、約6.25mcg/ml~12.5mcg/mlの濃度範囲内で、癌細胞生存率を50%減少させることができる。他の実施形態では、rSIFN-c oは、約12.5mcg/ml~25mcg/mlの濃度範囲内で、癌細胞生存率を50%減少させることができる。幾つかの実施形態では、rSIFN-c oのIC₅₀は約10mcg/ml~約18mcg/mlの範囲内にあり、好ましくは、約10mcg/ml~約15mcg/mlの範囲内にある。

【0028】

他の形態では、本発明は、(a)複数の癌細胞を提供すること、(b)特定の条件で、ある量のテストインターフェロンで第一群の癌細胞をテストし、第一群の生存率データを生成すること、(c)同じ特定の条件で、有効量のrSIFN-c o若しくはrSIFN-c o代用物で第二群の癌細胞を処理し、第二群の生存率データを生成すること、及び、(d)第一群の生存率データと第二群の生存率データとを比較し、テストインターフェロンの効力を確定することを含む、化合物(例えば、テストインターフェロン)のrSIFN-c o若しくはrSIFN-c o代用物に対する癌細胞生存率への相対効力を確定又は比較する方法を提供する。

【0029】

幾つかの実施形態では、約1日間~約6日間の範囲内で癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、約6.25mcg/ml~約50mcg/ml、好ましくは約7mcg/ml~約25mcg/ml、より好ましくは約8mcg/ml~約12.5mcg/ml、さらに好ましくは約10mcg/mlの範囲内の濃度でrSIFN-c oを使用する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml~約20mcg/mlの範囲内の濃度でrSIFN-c oを使用する。幾つかの実施形態では、rSIFN-c oは特定の比活性を含む。

【0030】

幾つかの実施形態では、本文に用いられる癌細胞はヒト腫瘍細胞と動物腫瘍細胞から選ばれる。幾つかの実施形態では、腫瘍細胞は肺腫瘍細胞、又は子宮頸腫瘍細胞、又は肝臓腫瘍細胞、又は結腸直腸腫瘍細胞、又は乳腺腫瘍細胞、又はすい臓腫瘍細胞、又は前立腺腫瘍細胞、又はウイルス誘発した腫瘍細胞又はウイルス転化した細胞である。幾つかの実施形態では、癌細胞はA549細胞、Calu-1細胞、CL-1細胞、H460細胞、H1299細胞、Hela細胞、HT29細胞、Huh-7細胞、MDA-MB-231細胞、PANC-1細胞、RAW264.7細胞、SMMC-7721細胞、SW480細胞及びSW620細胞のうちから選ばれる少なくとも1種である。

【0031】

幾つかの実施形態では、テストインターフェロンもインターフェロンであり、rSIFN-c oと異なる製造ロットから得られるインターフェロンを含む。幾つかの実施形態では、前記テストインターフェロンのアミノ酸配列とrSIFN-c oのアミノ酸配列(配列番号1)は少なくとも90%の同一性を有し、好ましくは、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、100%の同一性を有する。幾つかの実施形態では、前記テストインターフェロンをコードするヌクレオチド配列とrSIFN-c oをコードするヌクレオチド配列(配列番号2)は少なくとも90%の同一性を有し、好ましくは、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、100%の同一性を有する。幾つかの実施形態では、前記テストインターフェロンとrSIFN-c oは同じアミノ酸配列(配列番号1)を有し、且つ同じヌクレオチド配列(配列番号2)にコードされている。幾つかの実施形態では、前記テストインターフェロンとrSIFN-c oは実質的に同じ比活性を有する。幾つかの実施形態では、前記比活性は約 4×10^8 IU/mg~約 1×10^9 IU/mgの範囲内にある。幾つかの実施形態では、前記テストインターフェロンは、配列番号2に示されるポリヌクレオチド配列を大腸菌(E. coli)に導入することを含む方法により得られる。幾つかの実施形態では、前記テストインターフェロンは大腸菌宿主の中でポリヌクレオチド(配列番号2)を発現することにより作られ、好ましくは、大腸菌宿主の中でPBADプロモーターの制御で発現される。

【0032】

他の形態では、本発明は、（例えば、腫瘍転移中に発生する）細胞転移を阻害する方法を提供し、細胞を有効量の $rSIFN-co$ に所定時間さらし、細胞転移を阻害することを含む。

【0033】

幾つかの実施形態では、 $rSIFN-co$ の有効量は、約 $5mcg/ml$ ~ 約 $100mcg/ml$ 、好ましくは約 $8mcg/ml$ ~ 約 $50mcg/ml$ 、より好ましくは約 $10mcg/ml$ ~ 約 $25mcg/ml$ 、さらに好ましくは約 $12mcg/ml$ ~ 約 $18mcg/ml$ を含む。幾つかの実施形態では、 $rSIFN-co$ の有効量は、約 $5mcg/ml$ ~ 約 $20mcg/ml$ 、好ましくは、約 $10mcg/ml$ を含む。

【0034】

他の形態では、本発明は、癌細胞を有効量の $rSIFN-co$ に所定時間さらすことにより、偽足形成を阻害することを含む、癌細胞における偽足形成を阻害する方法を提供する。幾つかの実施形態では、 $rSIFN-co$ の有効量は、約 $5mcg/ml$ ~ 約 $20mcg/ml$ 、好ましくは、約 $10mcg/ml$ を含む。

【0035】

他の形態では、本発明は、細胞を有効量の $rSIFN-co$ に所定時間さらすことを含む、細胞における β -カテニン/ TCF -媒介の転写活性を阻害する方法を提供する。幾つかの実施形態では、レポーターシステムにより、好ましくは、ルシフェラーゼレポーターシステムにより、 β -カテニン/ TCF -媒介の転写活性を確定する。幾つかの実施形態では、レポーターシステムは $TOPFlash$ レポーターシステムである。幾つかの実施形態では、プラスミド $pSV40-RL$ を使用する。

【0036】

他の形態では、本発明はさらに、細胞を有効量の $rSIFN-co$ に所定時間さらすことを含む、細胞における β -カテニンの蛋白レベルを減少する方法を提供する。幾つかの実施形態では、 β -カテニンの特異性抗体を使用し、ウエスタンブロットを介して β -カテニンの蛋白レベルを検出する。幾つかの実施形態では、 $GAPDH$ をコントロールとして用いる。

【0037】

他の形態では、本発明は、細胞を有効量の $rSIFN-co$ に所定時間さらすことにより、 Wnt 関連受容体若しくは共受容体をダウンレギュレーションすることを含む、細胞における Wnt 関連受容体若しくは共受容体の発現をダウンレギュレーションする方法を提供する。幾つかの実施形態では、 Wnt 関連受容体若しくは共受容体は LRP 蛋白、例えば $LRP6$ を含む。幾つかの実施形態では、 Wnt シグナル伝達の受容体若しくは共受容体は FZD 蛋白、例えば $FZD6$ を含む。幾つかの実施形態では、 Wnt 関連受容体若しくは共受容体の発現の確定は、これら受容体若しくは共受容体の $mRNA$ レベルの確定を含む。幾つかの実施形態では、これら $mRNA$ に対応する $cDNA$ を調製することにより、これら $mRNA$ レベルを確定する。

【0038】

他の形態では、本発明は、細胞におけるある遺伝子 (Wnt シグナル伝達経路のうち少なくとも1個の標的遺伝子を含む) の発現を阻害する方法、例えば標的遺伝子過度活発 ($overactive$) の疾病又は症状を治療する方法を提供する。これらダウンレギュレーション遺伝子は $Axin2$ 、 $CD24$ 、サバイビン ($Survivin$)、及び/又は $ID2$ を含む。該方法は、細胞を有効量の $rSIFN-co$ に所定時間さらすことにより、標的遺伝子の発現を阻害することを含む。

【0039】

本発明の幾つかの実施形態では、細胞が $rSIFN-co$ にさらされる所定時間は少なくとも約12時間、好ましくは、少なくとも約20時間、より好ましくは、少なくとも約24時間、さらに好ましくは、少なくとも約36時間、さらに好ましくは、少なくとも約48時間、さらに好ましくは、少なくとも約72時間である。幾つかの実施形態では、 $rSIFN-co$ 処理した細胞が癌細胞である。

10

20

30

40

50

【0040】

他の形態では、本発明は、細胞を有効量の $rSIFN-c\alpha$ に所定時間さらすことにより、少なくとも1種の腫瘍阻害遺伝子の発現に対するアップレギュレーションを実現することを含む、細胞におけるある遺伝子（少なくとも1種の腫瘍阻害遺伝子を含む）の発現をアップレギュレーションする方法を提供する。幾つかの実施形態では、アップレギュレーションされる遺伝子は、DKK3、KLF4及びBATF2のうち少なくとも1種を含む。幾つかの実施形態では、これらmRNAレベルを測定することでアップレギュレーションされた遺伝子の発現を確定する。幾つかの実施形態では、cDNAはこれらmRNAにより合成され、測定目的に合わせて任意に増幅される。

【0041】

他の形態では、本発明は、少なくとも1種、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10又は11種の下記の(a)～(k)の活性において、テスト化合物と $rSIFN-c\alpha$ 若しくは $rSIFN-c\alpha$ 代用物との間の実質的同等性を構築する方法において、下記(a)～(k)の活性を比較して実質的に同じ反応を示すことを含む方法を提供する。(a) いずれか1種又は多種の担癌動物モデル体内の癌細胞生長に対する阻害；(b) 癌細胞生存率の減少；(c) 癌細胞転移に対する阻害；(d) 癌細胞における β -カテニン／TCFの転写活性に対する阻害；(e) 癌細胞におけるLRP6及び／又はFZD6の発現に対するダウンレギュレーション；(f) 癌細胞におけるAxin2、CD24、サバイビン及びID2のうちいずれか1種又は多種の発現に対する阻害；(g) 癌細胞における偽足形成に対する阻害；(h) 癌細胞における β -カテニン発現に対する阻害；(i) 癌細胞におけるDKK-3、KLF-4及びBATF2のうちいずれか1種又は多種の発現に対するアップレギュレーション；(j) $IFN\alpha-2b$ よりも高い $IFNAR1$ への結合親和性、及び／又は $IFN\alpha-2b$ よりも低い $IFNAR2$ への結合親和性；(k) 癌細胞 $p-STAT$ 発現に対するアップレギュレーションにおける、 $IFN\alpha-2b$ よりも低いB18R阻害に対する感受性。幾つかの実施形態では、本発明は、少なくとも2種の上記の活性において実質的同等性を構築することを提供し、好ましくは、本発明は、少なくとも3種の上記の活性において実質的同等性を構築することを提供し、より好ましくは、少なくとも4種の上記の活性において実質的同等性を構築することを提供し、さらに好ましくは、少なくとも5種の上記の活性において実質的同等性を構築することを提供し、さらに好ましくは、少なくとも6種の上記の活性において実質的同等性を構築することを提供し、さらに好ましくは、少なくとも7種、又は8種、又は9種、又は10種、又は11種の上記の活性において実質的同等性を構築することを提供する。

【0042】

他の形態では、本発明は、テストインターフェロン効力を確定する、少なくとも1種のWnt-関連標的遺伝子の発現を阻害する、腫瘍阻害遺伝子をアップレギュレーションする、及び／又は、LRP6及び／又はFZD6発現をダウンレギュレーションするための、(a) $rSIFN-c\alpha$ 若しくは $rSIFN-c\alpha$ 代用物と、(b) 本文に述べた一つ以上の方法を行うための取り扱い説明書及びこれら方法を行うための試薬のうち少なくとも1種と、を含む測定キットを提供する。これら試薬はリン酸塩緩衝塩水(PBS)又は緩衝剤を含んでもよい。幾つかの実施形態では、測定キットにおける $rSIFN-c\alpha$ 若しくは $rSIFN-c\alpha$ 代用物は特定な比活性を有する。

【0043】

他の形態では、本発明は、いずれか1種又は多種の担癌動物モデル体内の癌細胞生長に対する阻害；癌細胞生存率の減少；癌細胞転移に対する阻害；癌細胞における β -カテニン／TCFの転写活性に対する阻害；癌細胞におけるLRP6及び／又はFZD6の発現に対するダウンレギュレーション；癌細胞におけるAxin2、CD24、サバイビン及びID2のうちいずれか1種又は多種の発現に対する阻害；癌細胞における偽足形成に対する阻害；癌細胞における β -カテニン発現に対する阻害；癌細胞におけるDKK-3、KLF-4及びBATF2のうちいずれか1種又は多種の発現に対するアップレギュレーション； $IFN\alpha-2b$ よりも高い $IFNAR1$ への結合親和性、及び／又は $IFN\alpha-2$

10

20

30

40

50

bよりも低いIFN α 2への結合親和性；及び、癌細胞p-S-T-A-T発現に対するアップレギュレーションにおける、IFN α -2bよりも低いB18R阻害に対する感受性から選ばれる少なくとも1種、好ましくは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10又は11種の活性を含むインターフェロン若しくはインターフェロン代用物を提供し、前記インターフェロン若しくはインターフェロン代用物はrSIFN-coではない。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】図1は、実施例1に記載の処理を開始してから21日間の間、ヒト肝臓癌腫瘍SMMC-7721のヌードマウスにおける生長曲線を示し、平均相対腫瘍体積(RTV)で表し、各群に対して、MMC(5mg/kg)、若しくは0.15mg/マウスのrSIFN-co、若しくは0.10mg/マウスのrSIFN-co、若しくは0.05mg/マウスのrSIFN-coで処理し、又はビヒクルの生理食塩水(NS)(0.15ml/マウス)で注射した。

10

【図2】図2は、実施例2に記載の28日間処理期間でのヒト子宮頸腫瘍のヌードマウスにおける生長曲線を示し、RTVで表し、各群に対して、MMC(5mg/kg)、若しくは0.15mg/マウスのrSIFN-co、若しくは0.10mg/マウスのrSIFN-co、若しくは0.05mg/マウスのrSIFN-coで処理し、又はビヒクルの生理食塩水(0.15ml/マウス)で注射した。

【図3】図3は、実施例3に記載の28日間処理期間でのヒト結腸腫瘍HT-29のヌードマウスにおける生長曲線を示し、RTVで表し、各群に対して、MMC(5mg/kg)、若しくは0.15mg/マウスのrSIFN-co、若しくは0.10mg/マウスのrSIFN-co、若しくは0.05mg/マウスのrSIFN-co、若しくは0.15mg/マウスのIFN α -2bで処理し、又はビヒクルの生理食塩水(0.15ml/マウス)で注射した。

20

【図4】図4は、実施例4に記載の21日間処理期間でのヒト肺腫瘍SPC-A4のヌードマウスにおける生長曲線を示し、RTVで表し、各群に対して、MMC(5mg/kg)、若しくは0.15mg/マウスのrSIFN-co、若しくは0.10mg/マウスのrSIFN-co、若しくは0.05mg/マウスのrSIFN-co、若しくは0.15mg/マウスのIFN α -2bで処理し、又はビヒクルの生理食塩水(0.15ml/マウス)で注射した。

30

【図5】図5は、濃度が0、0.2、0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25、50及び100mcg/ml(μ g/ml)のrSIFN-co又はIFN α -2bで48時間処理した後、異なる腫瘍細胞の生存率に関する投与量反応曲線を示す。テストする細胞は、A549肺腫瘍細胞(図5A)、Hela子宮頸腫瘍細胞(図5B)、CL-1肝臓腫瘍細胞(図5C)、Huh-7肝臓腫瘍細胞(図5D)、SW480結腸腫瘍細胞(図5E)、MDA-MB-231乳腺腫瘍細胞(図5F)、Calu-1肺腫瘍細胞(図5G)、SMMC-7721肝臓腫瘍細胞(図5H)、及びPANC-1前立腺腫瘍細胞(図5I)である。結果は、コントロール細胞に対する細胞生存の百分率として表され、少なくとも2つの独立した実験の平均値として表される。

【図6】図6は、1、2、3、4、5及び6日間の所定日数で処理した後、10mcg/mlでのIFN α -2b処理とrSIFN-co処理の、A549細胞(図6A)とSW620細胞(図6B)の生存率に対する作用をそれぞれ示す生存率曲線である。細胞生存率はMTT法により評価される。結果はコントロール細胞に対する細胞生存の百分率として表され、少なくとも2つの独立した実験の平均値として表される。(**p<0.01)

40

【図7】図7は、Mockコントロール(図7, A列)に比べて、rSIFN-co処理(図7, C列)とIFN α -2b処理(図7, B列)の、肺癌細胞A549の3D培養における4日後のコロニー形成(1行目)(100倍拡大)、及び8日後の偽足形成(2行目と3行目)(400倍拡大)に対する作用をそれぞれ示すミクロ写真である。A列とB列における黒い矢印は癌細胞から突出する偽足を示す。C列における星印付きの矢印が偽足のない細胞を示す。

50

【図8】図8A～図8Eは、mockコントロールに比べて、rSIFN-co処理とIFN α -2b処理の、異なる肺癌細胞A549（図8A）、H1299（図8B）及びH460（図8C）、並びに異なる結腸癌細胞HT-29（図8D）及びSW620（図8E）の β -カテニン／TCF-媒介の転写活性に対する作用をそれぞれ示す棒グラフである。数値は3回の試験の平均値である。（* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ）

【図9】図9Aと図9Bは、mockコントロールに比べて、rSIFN-co処理とIFN α -2b処理の、異なる癌細胞A549、H460、SW620及びHT-29におけるWnt関連受容体若しくは共受容体LRP6（図9A）とFZD6（図9B）の発現に対する作用をそれぞれ示す棒グラフ（GAPDH発現に対するmRNAレベルにより測定される）である。3群で並行して実験を行い、結果をmockコントロール群で正規化する。

10

【図10】図10Aと図10Bはウエスタンブロットであり、それぞれ24、48及び72時間処理した後、mockコントロールに比べて、rSIFN-co処理とIFN α -2b処理の、癌細胞A549（図10A）とSW480（図10B）における β -カテニンの蛋白レベルに対する作用をそれぞれ示す。GAPDH発現はコントロールとして用いられる。3群で並行して実験を行う。

【図11】図11A～図11Dは、rSIFN-co又はIFN α -2bでA549肺癌細胞を24時間処理した後、mockコントロールに比べて、Wntシグナル伝達経路の下流であるAxin2（図11A）、CD24（図11B）、サバイビン（図11C）及びID2（図11D）という4種の遺伝子の相対mRNA発現レベルを示す棒グラフである。3群で並行して実験を行い、mockコントロール群で正規化する。

20

【図12】図12A～図12Cは、rSIFN-co又はIFN α -2bで処理した後、mockコントロールに比べて、異なる腫瘍細胞A549、H460、SW620及びHT-29における3種の腫瘍阻害遺伝子DKK-3（図12A）、BATF2（図12B）及びKLF4（図12C）の相対mRNA発現レベルを示す棒グラフである。3群で並行して実験を行い、mockコントロール群で正規化する。

【図13】図13Aと図13Bは、mockコントロールに比べて、IFN α -2b又はrSIFN-coで処理した後、A549細胞（図13A）とSW620細胞（図13B）の腫瘍細胞転移を示す棒グラフである。結果はこの処理後の単位領域中の転移細胞平均数 $\pm$ SDとして表される。（** $p < 0.01$ ）

30

【図14】図14は、Mockコントロール及び5FU処理した細胞に比べて、A549細胞（図14A）とSW620細胞（図14B）をIFN α -2b又はrSIFN-coで24時間又は48時間処理した後、それぞれ針でプロカスペーゼ-3（procaspase-3）、切断したカスパーゼ-3（cleaved caspase-3）、プロカスペーゼ-8（procaspase-8）、切断したカスパーゼ-8（cleaved caspase-8）、PARP及び β -チューブリン（ β -tubulin）の特異性抗体を染色して得られるウエスタンブロットである。

【図15】図15は、A549細胞を10mcg/mlのIFN α -2b（図15A）、又は10mcg/mlのrSIFN-co（図15B）で処理した後、又はHela細胞を10mcg/mlのIFN α -2b（図15C）、又は10mcg/mlのrSIFN-co（図15D）で処理した後、P-STAT1、STAT1、P-STAT2、STAT2、P-STAT3、STAT3及びGAPDHの特異性抗体により染色して得られるウエスタンブロットである。

40

【図16】図16は、PBS処理したコントロールに比べて、処理を開始してからの27日間で、IFN α -2b又はrSIFN-co処理した後、腫瘍生長に対する阻害を示す腫瘍生長曲線である。データは平均腫瘍体積（mm³） $\pm$ SD（ $n=8$ ）として表される。

【図17】図17Aは、定常解析（steady-analysis）モデルにより解析して得られるIFNAR1インターフェロン受容体の親和定数の K_D （IFNAR1-EC/IFN α -2b）： $2.835 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ （黒いダイヤモンド形）と K_D （IFNAR1-EC/rSIFN-co）： $6.003 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ （黒い円

50

形)を示す。図17Bは、動的解析モデルにより解析して得られるIFNAR2インターフェロン受容体の親和定数の K_D (IFNAR2-EC/IFN α -2b) $1.843 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ と K_D (IFNAR2-EC/rSIFN-co) : $2.192 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ を示す。図17Cは、IFN α -2bとrSIFN-coのそれぞれの、IFNAR1-EC又はIFNAR2-ECへの受容体結合親和性の比較結果を示す棒グラフであり、rSIFN-co/IFNAR1がIFN α -2b/IFNAR1よりも約4.72倍と強い結合親和性を示すこと、及び、rSIFN-co/IFNAR2がIFN α -2b/IFNAR2よりも約11.9倍と弱い結合親和性を示すことを表明する。

【図18】図18は、癌細胞を 1 ng/ml (最終の測定濃度)のrSIFN-co又はIFN α -2bで処理した後、P-STAT1、STAT1、P-STAT2、STAT2、P-STAT3、STAT3、アクチン及びGAPDHの特異性抗体により染色して得られるウェスタンブロットであり、処理前に、この癌細胞をそれぞれ1、10又は100 ng/ml のB18R組換え蛋白とともにインキュベートし、前記癌細胞はA549細胞 (図18A) 又はHeLa細胞 (図18B) である。

【発明を実施するための形態】

【0045】

詳細な説明

定義

特に断りのない限り、本文に用いられる科学・技術用語は、当業者がそれらに与える意味又は当業者が通常に理解する意味を有する。

【0046】

また、特に断りのない限り、単数形は複数を含み、複数形は単数を含む。

【0047】

また、特に断りのない限り、本文に用いられる用語「又は (or)」は「及び／又は (and/or)」を意味する。

【0048】

本文に用いられる用語「化合物」とは、あらゆる蛋白 (あらゆる抗体、あらゆる活性抗体断片、とあらゆる二量体蛋白又は多量体蛋白を含む)、ポリペプチド、小分子、及び1種又は多種の生物学活性を有する他の分子を指す。

【0049】

本文に用いられる用語「含む (comprise又はcomprising)」は広義的に解釈されて制限されず、「である (is又はare)」という意味を含む。

【0050】

本文に用いられる用語「症状」と「疾病」は互換して使用しても併用しても良く、被験者の疾病、感染、炎症、癌症、治療による副作用、又は悪い健康状況の他の成因を示す。

【0051】

本文に用いられる用語「有効量」は、所望の効果を奏する、例えば細胞生存率を減少させる、蛋白の発現若しくは活性をダウンレギュレーション若しくはアップレギュレーションする、又は疾病若しくは病症を治療する量を意味する。

【0052】

本文に用いられる用語「実質的同等性を構築する」とは、ある又は幾つかのテストを行うことで実質的に同じレベルの反応、活性、有効性又は結果を示し、実験誤差の制限内 (例えば、±標準差 (SD)) にある。

【0053】

本文に用いられる用語「実質的に同じ」とは、少なくとも約70%が同じ、好ましくは、少なくとも約80%が同じ、より好ましくは、少なくとも約90%が同じ、さらに好ましくは、少なくとも約95%が同じであることを意味する。

【0054】

本文に用いられる用語「約・・・の範囲」又は「約・・・の間の範囲」は、該範囲内の数、及びこの特定な範囲内のすべての一位と小数点を意味する。例えば、「約 4×10^8 I

10

20

30

40

50

U/mgと約 5×10^8 IU/mgとの間の範囲」は 4×10^8 IU/mg、 4.1×10^8 IU/mg、 4.2×10^8 IU/mg、 4.3×10^8 IU/mg、 4.4×10^8 IU/mg等を含み、且つ「8mcg/ml～20mcg/ml」は9mcg/ml、10mcg/ml等を含む。

【0055】

本文に用いられる用語「含む(include又はincluding)」は非限定的に理解すべきであり、且つ指定の元素及び非指定の元素も含む。

【0056】

本文に用いられる用語「インターフェロン」又は「IFN」はあらゆる自然的にある又は人為的に発生させるインターフェロンを意味し、題名が「複合ヒト白血球インターフェロン」のアメリカ特許4,695,623に記載の複合インターフェロン α 、及びrSIFN-coを含む。

10

【0057】

本文に用いられる用語「インターフェロン活性」は、自然的にあるインターフェロンとrSIFN-coの特徴としての1種又は多種の生物学活性、例えば抗腫瘍活性及び／又は抗ウイルス活性を意味する。

【0058】

本文に用いられる用語「rSIFN-co」はコンテキストに応じて、アメリカ特許第7,364,724号とアメリカ特許第7,585,647号に記載したようなポリヌクレオチド配列とアミノ酸配列、又はその活性断片を有する蛋白又は核酸分子を意味する。前記アメリカ特許第7,364,724号とアメリカ特許第7,585,647号に記載のポリヌクレオチド配列とアミノ酸配列は以下の通りである。

20

【0059】

30

40

50

【化 1】

M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A
1 ATGTGCGACC TGCCGCAGAC CCACTCCCTG GGTAAACGTC GTGCTCTGAT CCTGCTGGCT
TACACGCTGG ACGGCGTCTG GGTGAGGGAC CCAITGGCAG CACGAGACTA GGACGACCGA

Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P
61 CAGATGCGTC GTAICTCCCC GTTCTCCTGC CTGAAAGACC GTCACGACTT CGGTTTCCCG
GTCTACGCAG CATAGAGGGG CAAGAGGACG GACTTTCTGG CAGTGCTGAA GCCAAAGGGC

Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E
121 CAGGAAGAAT TCGACGGTAA CCAGTTCCAG AAAGCTCAGG CTATCTCCGT TCTGCACGAA
GTCCITCTTA AGCTGCCATT GGTCAAGGTC TTTCGAGTCC GATAGAGGCA AGACGTGCTT

M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E
181 ATGATCCAGC AGACCTTCAA CCTGTCTCC ACCAAAGACT CCTCCGCTGC TTGGGACGAA
TACTAGGTCG TCTGGAAGTT GGACAAGAGG TGGTTTCTGA GGAGGCGACG AACCTGCTT

S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C
241 TCCCTGCTGG AAAAATCTCA CACCGAAGT TACCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCTTGC
AGGGACGACC TTTTAAAGAT GTGGCTTGAC ATGGTCGTCG ACTTGCTGGA CCTTCGAACG

V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A
301 GTIATCCAGG AAGTTGGTGT TGAAGAAACC CCGCTGATGA ACGTTGACTC CATCCTGGCT
CAATAGGTCC TTCAACCACA ACTTCTTTGG GGCGACTACT TGCAACTGAG GTAGGACCGA

V K K Y F Q R I T L Y L T E K K Y S P C
361 GTIAAAAAAT ACTTCCAGCG TATCACCTG TACCTGACCG AAAAAAATA CTCCCCGTGC
CAATTTTTIA TGAAGGTCGC ATAGTGGGAC ATGGACTGGC TTTTITTTAT GAGGGGCACG

A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q
421 GCTTGGGAAG TTGTTCGTGC TGAAATCAIG CGTTCCTTCT CCTGTCCAC CAACCTGCAG
CGAACCCITC AACAAGCAG ACTTTAGTAC GCAAGGAAGA GGGACAGGTG GTTGGACGTC

E R L R R K E (配列番号:1)

481 GAACGTCTGC GTCGTAAAGA ATAA (配列番号:2)

CTTGCAGACG CAGCATTCT TATT (配列番号:3)

【0060】

本文に用いられる用語「rSIFN-co代用物」とは、rSIFN-coに対して効力を測定した又は測定しようとする、テスト化合物の効力又は活性の確定において比較の目的でrSIFN-coの代わりに使用できる任意の化合物を意味する。rSIFN-co代用物はインターフェロン又はインターフェロン特性を有する化合物であっても良い。

【0061】

本文に用いられる比活性は生物学活性と蛋白質含有量との比である。該生物学活性は、任意の本分野で慣用する関連生物学活性、例えば、中華人民共和国薬典2010版三部付録XCに公布している細胞病変阻害法により測定した生物学活性であっても良い。蛋白質含

10

20

30

40

50

有量は本分野で慣用する任意の方法、例えば、中華人民共和国薬典2010版三部付録V I Bに公布しているLowry法により測定できる。

【0062】

本文に用いられる用語「治療(treatment)」は、疾病を完全又は一部治癒する、疾病の不進展を引き起こす又は誘発する、疾病又は病症の嚴重さを改善又は減少させる、疾病再発を防止する、疾病再発の頻度を減少させる、疾病の副作用を減少する、疾病を緩和させる、健康状況を改善する全体感覚等を含む。

【0063】

用語「Wnt関連受容体若しくは共受容体」は、単独又は共同的にWntファミリー蛋白に結合し、細胞中の標準Wntシグナル伝達経路又は非標準Wntシグナル伝達経路におけるシグナル伝達を誘発する1種又は多種の分子を含む。該用語は、例えば、Wnt共受容体であって、DKK1と相互作用する低密度リポ蛋白受容体相関蛋白6であるLRP6、及びWnt-4リガンドの受容体とされる、Wntシグナル伝達の受容体であるFZD6を含む。

【0064】

本文に用いられる用語「Wntシグナル伝達活性」とは、Frizzled(FZD)ファミリー受容体及びLRP5/LRP6共受容体に結合することにより伝達するWntシグナル伝達カスケードであり、 β -カテニンの放出及びその細胞核への転移を引き起こし、細胞活性化する。

【0065】

本文に用いられる用語「IFNAR1」とは、Uzeら, Cell, 60:225-234(1990)によりクローンされた557個のアミノ酸の受容体蛋白質であり、Uzeらの229頁図5に示すように、409個の残基の細胞外ドメイン、21個の残基の膜貫通ドメイン、及び100個の残基の細胞内ドメインを含む。幾つかの実施形態では、前記用語は、IFNAR1の断片を含み、IFNAR1の細胞外ドメイン(EC又はECD)(或いはEC又はECDの断片)を含む。

【0066】

本文に用いられる用語「IFNAR2」とは、Domanskiら, J. Biol. Chem., 37:21606-21611(1995)によりクローンされた515個のアミノ酸の受容体蛋白質であり、Domanskiらの21608頁図1に示すように、217個の残基の細胞外ドメイン、21個の残基の膜貫通ドメイン、及び250個の残基の細胞内ドメインを含む。幾つかの実施形態では、前記用語は、IFNAR2の断片を含み、IFNAR2の細胞外ドメイン(EC又はECD)(或いはEC又はECDの断片)を含む。

【0067】

本発明の発明者は、rSIFN-coの投与又は治療による生物学作用を見出し、特に、製造過程で効力の一致性を必要とする場合、或いは薬物開発過程で効力を改善しようとする場合、これら生物学作用はrSIFN-co及び他の類似する特性を有するような化合物の効力の評価に用いられることを見出した。本発明の発明者はさらに、今まで未知の、rSIFN-coを用いて治療する生物学作用を見出し、且つこれら生物学作用は、特定の遺伝子をアップレギュレーション又はダウンレギュレーションする必要がある他の症状又は疾病の治療を含むrSIFN-coの他の用途に用いられる。

【0068】

一つの形態では、本発明は、テストインターフェロンのrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物に対する相対効力を確定又は比較する方法において、(1)前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物を提供することと、(2)同じ特定の条件で、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物に対して、それぞれ以下の(a)~(k)から選ばれるいずれか1種又は多種の活性を測定することとを含み、前記テストインターフェロンが、統計学的に有意であるように、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(f)のうち所定のい

10

20

30

40

50

いずれか1種、又は2種、又は3種、又は4種、又は5種、又は6種の活性を有し、及び／又は前記テストインターフェロンが、(g)、(h)、(i)、(j)及び(k)のうち所定のいずれか1種又は多種の活性、例えば2種、又は3種、又は4種、又は5種の活性を有するのは、前記テストインターフェロンがrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物と実質的に同じ効力を有することを示す、方法を提供する。(a)いずれか1種又は多種の担癌動物モデル体内の癌細胞生長に対する阻害；(b)癌細胞生存率の減少；(c)癌細胞転移に対する阻害；(d)癌細胞におけるβ-カテニン／TCFの転写活性に対する阻害；(e)癌細胞におけるLRP6及び／又はFZD6の発現に対するダウンレギュレーション；(f)癌細胞におけるAxin2、CD24、サバイビン及びID2のうちいずれか1種又は多種の発現に対する阻害；(g)癌細胞における偽足形成に対する阻害；(h)癌細胞におけるβ-カテニン発現に対する阻害；(i)癌細胞、例えばA549細胞又はSW620細胞におけるDKK-3、KLF-4及びBATF2のうちいずれか1種又は多種の発現に対するアップレギュレーション；(j)IFNα-2bよりも高いIFNAR1への結合親和性、及び／又はIFNα-2bよりも低いIFNAR2への結合親和性；(k)癌細胞p-STAT発現に対するアップレギュレーションにおける、IFNα-2bよりも低いB18R阻害に対する感受性。

【0069】

他の形態では、本発明は、テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物との間の実質的同等性を構築する方法において、(1)前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物を提供することと、(2)同じ特定の条件で、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物に対して、それぞれ以下の(a)～(k)から選ばれるいずれか1種又は多種の活性を測定することを含み、前記テストインターフェロンが、統計学的に有意であるように、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(f)のうち所定のいずれか1種、又は2種、又は3種、又は4種、又は5種、又は6種の活性を有し、及び／又は前記テストインターフェロンが、(g)、(h)、(i)、(j)及び(k)のうち所定のいずれか1種又は多種の活性、例えば2種、又は3種、又は4種、又は5種の活性を有するのは、前記テストインターフェロンがrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物と実質的同等であることを示す、方法を提供する。(a)いずれか1種又は多種の担癌動物モデル体内の癌細胞生長に対する阻害；(b)癌細胞生存率の減少；(c)癌細胞転移に対する阻害；(d)癌細胞におけるβ-カテニン／TCFの転写活性に対する阻害；(e)癌細胞におけるLRP6及び／又はFZD6の発現に対するダウンレギュレーション；(f)癌細胞におけるAxin2、CD24、サバイビン及びID2のうちいずれか1種又は多種の発現に対する阻害；(g)癌細胞における偽足形成に対する阻害；(h)癌細胞におけるβ-カテニン発現に対する阻害；(i)癌細胞、例えばA549細胞又はSW620細胞におけるDKK-3、KLF-4及びBATF2のうちいずれか1種又は多種の発現に対するアップレギュレーション；(j)IFNα-2bよりも高いIFNAR1への結合親和性、及び／又はIFNα-2bよりも低いIFNAR2への結合親和性；(k)癌細胞p-STAT発現に対するアップレギュレーションにおける、IFNα-2bよりも低いB18R阻害に対する感受性。好ましくは、テストインターフェロンで処理又は投与する場合、例えばA549細胞及び／又はSW620細胞におけるインビトロ癌細胞生存率の減少の存在、及び例えばA549細胞、H1299細胞、H460細胞及びHT-29細胞のうちいずれか1種又は多種におけるβ-カテニン／TCFの転写活性に対する阻害の存在は、統計学的に有意である。そして好ましくは、JAK／STATシグナル伝達の付加的存在は、テストインターフェロンとrSIFN-coとの間が実質的同等であることを示す。また好ましくは、例えば、約10mcg/mlのテストインターフェロンで適当な細胞を約1日間～約6日間処理する場合、細胞生存率の測定を行っても良い。好ましくは、A549細胞、H1299細胞、H460細胞及びHT-29細胞のうちいずれか1種又は多種の癌細胞において、β-カテニン／TCFの転写活性に対する阻害を測定し、例えば、約10mcg/mlのテストインターフェロンでこれら細胞を約

10

20

30

40

50

24時間処理する。好ましくは、STAT蛋白、例えばSTAT1、STAT2及び／又はSTAT3のリン酸化の存在を測定することで、JAK／STATシグナル伝達を測定し、例えば約10mcg／mlのテストインターフェロンでA549細胞又はHela細胞を異なる時間、例えば約5、15、30、60、120及び／又は240分間処理する。

【0070】

幾つかの実施形態では、上記の方法のステップ(2)において、同じ特定の条件で、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物に対して、少なくとも2種の上記の活性、例えば、(a)と(b)；(a)と(c)；(a)と(d)；(a)と(e)；(a)と(f)；(a)と(g)；(a)と(h)；(a)と(i)；(a)と(j)；(a)と(k)；(b)と(c)；(b)と(d)；(b)と(e)；(b)と(f)；(b)と(g)；(b)と(h)；(b)と(i)；(b)と(j)；(b)と(k)；(c)と(d)；(c)と(e)；(c)と(f)；(c)と(g)；(c)と(h)；(c)と(i)；(c)と(j)；(c)と(k)；(d)と(e)；(d)と(f)；(d)と(g)；(d)と(h)；(d)と(i)；(d)と(j)；(d)と(k)；(e)と(f)；(e)と(g)；(e)と(h)；(e)と(i)；(e)と(j)；(e)と(k)；(f)と(g)；(f)と(h)；(f)と(i)；(f)と(j)；(f)と(k)；(g)と(h)；(g)と(i)；(g)と(j)；(g)と(k)；(h)と(i)；(h)と(j)；(h)と(k)；(i)と(j)；(i)と(k)；(j)と(k)、を測定する。

【0071】

幾つかの実施形態では、上記の方法のステップ(2)において、同じ特定の条件で、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物に対して、少なくとも3種の上記の活性、例えば、(a)、(b)及び(c)；(a)、(b)及び(d)；(a)、(b)及び(e)；(a)、(b)及び(f)；(a)、(b)及び(g)；(a)、(b)及び(h)；(a)、(b)及び(i)；(a)、(b)及び(j)；(a)、(b)及び(k)；(a)、(c)及び(d)；(a)、(c)及び(e)；(a)、(c)及び(f)；(a)、(c)及び(g)；(a)、(c)及び(h)；(a)、(c)及び(i)；(a)、(c)及び(j)；(a)、(c)及び(k)；(a)、(d)及び(e)；(a)、(d)及び(f)；(a)、(d)及び(g)；(a)、(d)及び(h)；(a)、(d)及び(i)；(a)、(d)及び(j)；(a)、(d)及び(k)；(a)、(e)及び(f)；(a)、(e)及び(g)；(a)、(e)及び(h)；(a)、(e)及び(i)；(a)、(e)及び(j)；(a)、(e)及び(k)；(a)、(f)及び(g)；(a)、(f)及び(h)；(a)、(f)及び(i)；(a)、(f)及び(j)；(a)、(f)及び(k)；(a)、(g)及び(h)；(a)、(g)及び(i)；(a)、(g)及び(j)；(a)、(g)及び(k)；(a)、(h)及び(i)；(a)、(h)及び(j)；(a)、(h)及び(k)；(a)、(i)及び(j)；(a)、(i)及び(k)；(a)、(j)及び(k)；(b)、(c)及び(d)；(b)、(c)及び(e)；(b)、(c)及び(f)；(b)、(c)及び(g)；(b)、(c)及び(h)；(b)、(c)及び(i)；(b)、(c)及び(j)；(b)、(c)及び(k)；(b)、(d)及び(e)；(b)、(d)及び(f)；(b)、(d)及び(g)；(b)、(d)及び(h)；(b)、(d)及び(i)；(b)、(d)及び(j)；(b)、(d)及び(k)；(b)、(e)及び(f)；(b)、(e)及び(g)；(b)、(e)及び(h)；(b)、(e)及び(i)；(b)、(e)及び(j)；(b)、(e)及び(k)；(b)、(f)及び(g)；(b)、(f)及び(h)；(b)、(f)及び(i)；(b)、(f)及び(j)；(b)、(f)及び(k)；(b)、(g)及び(h)；(b)、(g)及び(i)；(b)、(g)及び(j)；(b)、(g)及び(k)；(b)、(h)及び(i)；(b)、(h)及び(j)；(b)、(h)及び(k)；(b)、(i)及び(j)；(b)、(i)及び(k)；(b)、(j)及び(k)；(c)、(d)及び(e)；(c)、(d)及び(f)；(c)、(d)及び(g)；(c)、(d)及び(h)；(c)、(d)及び(i)；(c)、(d)及び(j)；(c)、(d)及び(k)；(c)、(e)及び(f)；(c)、(e)及び(g)；(c)、(e)及び(h)；(c)、(e)及び(i)；(c)、(e)及び(j)；(c)、(e)及び(k)；(c)、(f)及び(g)；(c)、(f)及び(h)；(c)、(f)及び(i)；(c)、(f)及び(j)；(c)、(f)及び(k)；(c)、(g)及び(h)；(c)、(g)及び(i)；(c)、(g)及び(j)；(c)、(g)及び(k)；(c)、(h)及び(i)；(c)、(h)及び(j)；(c)、(h)及び(k)；(c)、(i)及び(j)；(c)、(i)及び(k)；(c)、(j)及び(k)；(d)、(e)及び(f)；(d)、(e)及び(g)；(d)、(e)及び(h)；(d)、(e)及び(i)；(d)、(e)及び(j)；(d)、(e)及び(k)；(d)、(f)及び(g)；(d)、(f)及び(h)；(d)、(f)及び(i)；(d)、(f)及び(j)；(d)、(f)及び(k)；(d)、(g)及び(h)；(d)、(g)及び(i)；(d)、(g)及び(j)；(d)、(g)及び(k)；(d)、(h)及び(i)；(d)、(h)及び(j)；(d)、(h)及び(k)；(d)、(i)及び(j)；(d)、(i)及び(k)；(d)、(j)及び(k)；(e)、(f)及び(g)；(e)、(f)及び(h)；(e)、(f)及び(i)；(e)、(f)及び(j)；(e)、(f)及び(k)；(e)、(g)及び(h)；(e)、(g)及び(i)；(e)、(g)及び(j)；(e)、(g)及び(k)；(e)、(h)及び(i)；(e)、(h)及び(j)；(e)、(h)及び(k)；(e)、(i)及び(j)；(e)、(i)及び(k)；(e)、(j)及び(k)；(f)、(g)及び(h)；(f)、(g)及び(i)；(f)、(g)及び(j)；(f)、(g)及び(k)；(f)、(h)及び(i)；(f)、(h)及び(j)；(f)、(h)及び(k)；(f)、(i)及び(j)；(f)、(i)及び(k)；(f)、(j)及び(k)；(g)、(h)及び(i)；(g)、(h)及び(j)；(g)、(h)及び(k)；(g)、(i)及び(j)；(g)、(i)及び(k)；(g)、(j)及び(k)；(h)、(i)及び(j)；(h)、(i)及び(k)；(h)、(j)及び(k)；(i)、(j)及び(k)；(j)及び(k)。

h) ; (c)、(d) 及び (i) ; (c)、(d) 及び (j) ; (c)、(d) 及び (k) ; (c)、(e) 及び (f) ; (c)、(e) 及び (g) ; (c)、(e) 及び (h) ; (c)、(e) 及び (i) ; (c)、(e) 及び (j) ; (c)、(e) 及び (k) ; (c)、(f) 及び (g) ; (c)、(f) 及び (h) ; (c)、(f) 及び (i) ; (c)、(f) 及び (j) ; (c)、(f) 及び (k) ; (c)、(g) 及び (h) ; (c)、(g) 及び (i) ; (c)、(g) 及び (j) ; (c)、(g) 及び (k) ; (c)、(h) 及び (i) ; (c)、(h) 及び (j) ; (c)、(h) 及び (k) ; (c)、(i) 及び (j) ; (c)、(i) 及び (k) ; (c)、(j) 及び (k) ; (d)、(e) 及び (f) ; (d)、(e) 及び (g) ; (d)、(e) 及び (h) ; (d)、(e) 及び (i) ; (d)、(e) 及び (j) ; (d)、(e) 及び (k) ; (d)、(f) 及び (g) ; (d)、(f) 及び (h) ; (d)、(f) 及び (i) ; (d)、(f) 及び (j) ; (d)、(f) 及び (k) ; (d)、(g) 及び (h) ; (d)、(g) 及び (i) ; (d)、(g) 及び (j) ; (d)、(g) 及び (k) ; (d)、(h) 及び (i) ; (d)、(h) 及び (j) ; (d)、(h) 及び (k) ; (d)、(i) 及び (j) ; (d)、(i) 及び (k) ; (d)、(j) 及び (k) ; (e)、(f) 及び (g) ; (e)、(f) 及び (h) ; (e)、(f) 及び (i) ; (e)、(f) 及び (j) ; (e)、(f) 及び (k) ; (e)、(g) 及び (h) ; (e)、(g) 及び (i) ; (e)、(g) 及び (j) ; (e)、(g) 及び (k) ; (e)、(h) 及び (i) ; (e)、(h) 及び (j) ; (e)、(h) 及び (k) ; (e)、(i) 及び (j) ; (e)、(i) 及び (k) ; (e)、(j) 及び (k) ; (f)、(g) 及び (h) ; (f)、(g) 及び (i) ; (f)、(g) 及び (j) ; (f)、(g) 及び (k) ; (f)、(h) 及び (i) ; (f)、(h) 及び (j) ; (f)、(h) 及び (k) ; (f)、(i) 及び (j) ; (f)、(i) 及び (k) ; (f)、(j) 及び (k) ; (g)、(h) 及び (i) ; (g)、(h) 及び (j) ; (g)、(h) 及び (k) ; (g)、(i) 及び (j) ; (g)、(i) 及び (k) ; (g)、(j) 及び (k) ; (h)、(i) 及び (j) ; (h)、(i) 及び (k) ; (h)、(j) 及び (k) ; (i)、(j) 及び (k)、を測定する。

【0072】

幾つかの実施形態では、上記の方法のステップ(2)において、同じ特定の条件で、前記テストインターフェロンと rSIFN-co 若しくは rSIFN-co 代用物に対して、少なくとも4種の上記の活性、例えば、(a)、(b)、(c) 及び (d) ; (a)、(b)、(c) 及び (e) ; (a)、(b)、(c) 及び (f) ; (a)、(b)、(c) 及び (g) ; (a)、(b)、(c) 及び (h) ; (a)、(b)、(c) 及び (i) ; (a)、(b)、(c) 及び (j) ; (a)、(b)、(c) 及び (k) ; (a)、(c)、(d) 及び (e) ; (a)、(c)、(d) 及び (f) ; (a)、(c)、(d) 及び (g) ; (a)、(c)、(d) 及び (h) ; (a)、(c)、(d) 及び (i) ; (a)、(c)、(d) 及び (j) ; (a)、(c)、(d) 及び (k) ; (a)、(d)、(e) 及び (f) ; (a)、(d)、(e) 及び (g) ; (a)、(d)、(e) 及び (h) ; (a)、(d)、(e) 及び (i) ; (a)、(d)、(e) 及び (j) ; (a)、(d)、(e) 及び (k) ; (a)、(e)、(f) 及び (g) ; (a)、(e)、(f) 及び (h) ; (a)、(e)、(f) 及び (i) ; (a)、(e)、(f) 及び (j) ; (a)、(e)、(f) 及び (k) ; (a)、(f)、(g) 及び (h) ; (a)、(f)、(g) 及び (i) ; (a)、(f)、(g) 及び (j) ; (a)、(f)、(g) 及び (k) ; (a)、(g)、(h) 及び (i) ; (a)、(g)、(h) 及び (j) ; (a)、(g)、(h) 及び (k) ; (a)、(h)、(i) 及び (j) ; (a)、(h)、(i) 及び (k) ; (a)、(i)、(j) 及び (k) ; (b)、(c)、(d) 及び (e) ; (b)、(c)、(d) 及び (f) ; (b)、(c)、(d) 及び (g) ; (b)、(c)、(d) 及び (h) ; (b)、(c)、(d) 及び (i) ; (b)、(c)、(d) 及び (j) ; (b)、(c)、(d) 及び (k) ; (b)、(d)、(e) 及び (f) ; (b)、(d)、(e) 及び (g) ; (b)、(d)、(e) 及び (h) ;

(b)、(d)、(e) 及び (i) ; (b)、(d)、(e) 及び (j) ; (b)、(d)、(e) 及び (k) ; (b)、(e)、(f) 及び (g) ; (b)、(e)、(f) 及び (h) ; (b)、(e)、(f) 及び (i) ; (b)、(e)、(f) 及び (j) ; (b)、(e)、(f) 及び (k) ; (b)、(f)、(g) 及び (h) ; (b)、(f)、(g) 及び (i) ; (b)、(f)、(g) 及び (j) ; (b)、(f)、(g) 及び (k) ; (b)、(g)、(h) 及び (i) ; (b)、(g)、(h) 及び (j) ; (b)、(g)、(h) 及び (k) ; (b)、(h)、(i) 及び (j) ; (b)、(h)、(i) 及び (k) ; (b)、(i)、(j) 及び (k) ; (c)、(d)、(e) 及び (f) ; (c)、(d)、(e) 及び (g) ; (c)、(d)、(e) 及び (h) ; (c)、(d)、(e) 及び (i) ; (c)、(d)、(e) 及び (j) ; (c)、(d)、(e) 及び (k) ; (c)、(d)、(f) 及び (g) ; (c)、(d)、(f) 及び (h) ; (c)、(d)、(f) 及び (i) ; (c)、(d)、(f) 及び (j) ; (c)、(d)、(f) 及び (k) ; (c)、(d)、(g) 及び (h) ; (c)、(d)、(g) 及び (i) ; (c)、(d)、(g) 及び (j) ; (c)、(d)、(g) 及び (k) ; (c)、(d)、(h) 及び (i) ; (c)、(d)、(h) 及び (j) ; (c)、(d)、(h) 及び (k) ; (c)、(e)、(f) 及び (g) ; (c)、(e)、(f) 及び (h) ; (c)、(e)、(f) 及び (i) ; (c)、(e)、(f) 及び (j) ; (c)、(e)、(f) 及び (k) ; (c)、(f)、(g) 及び (h) ; (c)、(f)、(g) 及び (i) ; (c)、(f)、(g) 及び (j) ; (c)、(f)、(g) 及び (k) ; (c)、(g)、(h) 及び (i) ; (c)、(g)、(h) 及び (j) ; (c)、(g)、(h) 及び (k) ; (c)、(h)、(i) 及び (j) ; (c)、(h)、(i) 及び (k) ; (c)、(i)、(j) 及び (k) ; (d)、(e)、(f) 及び (g) ; (d)、(e)、(f) 及び (h) ; (d)、(e)、(f) 及び (i) ; (d)、(e)、(f) 及び (j) ; (d)、(e)、(f) 及び (k) ; (d)、(f)、(g) 及び (h) ; (d)、(f)、(g) 及び (i) ; (d)、(f)、(g) 及び (j) ; (d)、(f)、(g) 及び (k) ; (d)、(g)、(h) 及び (i) ; (d)、(g)、(h) 及び (j) ; (d)、(g)、(h) 及び (k) ; (d)、(h)、(i) 及び (j) ; (d)、(h)、(i) 及び (k) ; (d)、(i)、(j) 及び (k) ; (e)、(f)、(g) 及び (h) ; (e)、(f)、(g) 及び (i) ; (e)、(f)、(g) 及び (j) ; (e)、(f)、(g) 及び (k) ; (e)、(g)、(h) 及び (i) ; (e)、(g)、(h) 及び (j) ; (e)、(g)、(h) 及び (k) ; (e)、(h)、(i) 及び (j) ; (e)、(h)、(i) 及び (k) ; (e)、(i)、(j) 及び (k) ; (f)、(g)、(h) 及び (i) ; (f)、(g)、(h) 及び (j) ; (f)、(g)、(h) 及び (k) ; (f)、(h)、(i) 及び (j) ; (f)、(h)、(i) 及び (k) ; (f)、(i)、(j) 及び (k) ; (g)、(h)、(i) 及び (j) ; (g)、(h)、(i) 及び (k) ; (g)、(i)、(j) 及び (k) ; (h)、(i)、(j) 及び (k)、を測定する。

【0073】

幾つかの実施形態では、上記の方法のステップ (2) において、同じ特定の条件で、前記テストインターフェロンと rSIFN-co 若しくは rSIFN-co 代用物に対して、少なくとも 5 種の上記の活性、例えば、(a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) ; (a)、(b)、(c)、(d) 及び (f) ; (a)、(b)、(c)、(d) 及び (g) ; (a)、(b)、(c)、(d) 及び (h) ; (a)、(b)、(c)、(d) 及び (i) ; (a)、(b)、(c)、(d) 及び (j) ; (a)、(b)、(c)、(d) 及び (k) ; (a)、(c)、(d)、(e) 及び (f) ; (a)、(c)、(d)、(e) 及び (g) ; (a)、(c)、(d)、(e) 及び (h) ; (a)、(c)、(d)、(e) 及び (i) ; (a)、(c)、(d)、(e) 及び (j) ; (a)、(c)、(d)、(e) 及び (k) ; (a)、(d)、(e)、(f) 及び (g) ; (a)、(d)、(e)、(f) 及び (h) ; (a)、(d)、(e)、(f) 及び (i) ; (a)、(d)、(e)、(f) 及び (j) ; (a)、(d)、(e)、(f) 及び (k) ; (a)、

(e)、(f)、(g)及び(h)；(a)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(a)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(a)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(a)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(a)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(a)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(f)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(g)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(h)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(i)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(j)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(k)；(b)、(d)、(e)、(f)及び(g)；(b)、(d)、(e)、(f)及び(h)；(b)、(d)、(e)、(f)及び(i)；(b)、(d)、(e)、(f)及び(j)；(b)、(d)、(e)、(f)及び(k)；(b)、(e)、(f)、(g)及び(h)；(b)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(b)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(b)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(b)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(b)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(b)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(c)、(d)、(e)、(f)及び(g)；(c)、(d)、(e)、(f)及び(h)；(c)、(d)、(e)、(f)及び(i)；(c)、(d)、(e)、(f)及び(j)；(c)、(d)、(e)、(f)及び(k)；(c)、(e)、(f)、(g)及び(h)；(c)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(c)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(c)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(c)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(c)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(c)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(d)、(e)、(f)、(g)及び(h)；(d)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(d)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(d)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(d)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(d)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(d)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(f)、(g)、(h)、(i)及び(j)；(f)、(g)、(h)、(i)及び(k)；(g)、(h)、(i)、(j)及び(k)、を測定する。

【0074】

幾つかの実施形態では、上記の方法のステップ(2)において、同じ特定の条件で、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物に対して、少なくとも6種の上記の活性、例えば、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(f)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(g)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(h)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(k)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(g)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(h)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(i)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(j)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(k)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(a)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(a)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(a)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(g)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(h)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(i)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(j)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(k)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(b)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(b)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(b)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(c)、(d)、(e)、

(f)、(g)及び(j)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(c)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(c)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(c)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(k)、を測定する。

【0075】

幾つかの実施形態では、上記の方法のステップ(2)において、同じ特定の条件で、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物に対して、少なくとも7種の上記の活性、例えば、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(g)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(h)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)及び(k)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(k)を測定する。

【0076】

幾つかの実施形態では、上記の方法のステップ(2)において、同じ特定の条件で、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物に対して、少なくとも8種の上記の活性、例えば、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(h)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)及び(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)及び(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)及び(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)及び(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)及び(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)及び(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(a)、

10

20

30

40

50

(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)及び(k)、を測定する。

【0077】

幾つかの実施形態では、上記の方法のステップ(2)において、同じ特定の条件で、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物に対して、少なくとも9種、10種、又はあらゆる11種の上記の活性、例えば、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)及び(k)、を測定する。

【0078】

幾つかの実施形態では、活性(a)の測定において、コントロールに比べて、テストインターフェロンは、統計学的に有意であるように(例えば $p < 0.05$ 、好ましくは、 $p < 0.01$ 、より好ましくは、 $p < 0.005$ 、さらに好ましくは、 $p < 0.001$ 、また好ましくは、 $p < 0.0005$ 、またさらに好ましくは、 $p < 0.0001$)、(a)における所定の活性を有すると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。

【0079】

幾つかの実施形態では、活性(a)の測定で使用される担癌動物モデルは、マウス、好ましくは、ヌードマウス、より好ましくは、BALB/cAnu/nuマウスを含む。幾つかの実施形態では、前記マウス、例えば、BALB/cAnu/nuマウスは、約3～約7週齢、好ましくは、約4～約6週齢のマウスを含む。幾つかの実施形態では、前記マウス、例えば、BALB/cAnu/nuマウスは、体重が約 15 ± 2 g～約 30 ± 2 gであり、好ましくは、約 19 ± 2 g～約 23 ± 2 gの範囲内にある。

【0080】

幾つかの実施形態では、活性(a)である体内癌細胞生長に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は、肝臓癌細胞、子宮頸癌細胞、結腸癌細胞及び肺癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性(a)を測定するために用いられる癌細胞は、SMMC-7721細胞、Hela細胞、HT-29細胞、SPC-A4細胞及びA549細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、HT-29細胞、SPC-A4細胞及びA549細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、より好ましくは、A549細胞を含む。

【0081】

幾つかの実施形態では、活性(a)の阻害作用の測定において、生理食塩水又はPBS、好ましくは、生理食塩水はコントロールとして用いられる。幾つかの実施形態では、活性(a)の測定において担癌動物モデルに投与されるテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は、約0.02mg～約0.30mg、好ましくは、約0.05mg～約0.15mg、より好ましくは、約0.075mg～約0.10mgの量で投与される。幾つかの実施形態では、活性(a)の測定において担癌動物モデルに投与されるテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は一日おきに投与される。幾つかの実施形態では、活性(a)の測定において担癌動物モデルに投与されるテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は、約2週間～約6週間、好ましくは、約3週間～約4週間継続して投与される。幾つかの実施形態では、活性(a)の測定において担癌動物モデルに投与されるコントロールが、約0.05ml～約0.30ml、好ましくは、約0.10ml～約0.20mlの量で投与される。幾つかの実施形態では、活性(a)の測定において担癌動物モデルに投与されるコントロールは一日おきに投与される。幾つかの実施形態では、活性(a)の測定において担癌動物モデルに投与されるコントロールは約2週間～約6週間、好ましくは、約3週間～約4週間継続して投与される。幾つかの実施形態では、腫瘍内にテストインターフェロン及び／又はコントロールを投与する。

【0082】

幾つかの実施形態では、活性（a）の測定でSMMC-7721細胞を使用する場合、コントロール（例えば、生理食塩水）に比べて、テストインターフェロンは、統計学的に有意であるように（例えば約0.05mgと約0.10mgに対して、 $p < 0.05$ 、好ましくは、約0.15mgに対して、 $p < 0.01$ ）、（a）における所定の活性を有すると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は約0.02mg～約0.30mg、好ましくは、約0.05mg～約0.15mg、より好ましくは、約0.075mg～約0.10mgの量で一日おきに投与され、約3週間継続して投与される。

10

【0083】

幾つかの実施形態では、活性（a）の測定でHela細胞を使用する場合、コントロール（例えば、生理食塩水）に比べて、テストインターフェロンは、統計学的に有意であるように（例えば、約0.15mgに対して、 $p < 0.05$ 、好ましくは、約0.05mgと約0.10mgに対して、 $p < 0.01$ ）、（a）における所定の活性を有すると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は約0.02mg～約0.30mg、好ましくは、約0.05mg～約0.15mg、より好ましくは、約0.075mg～約0.10mgの量で一日おきに投与され、約4週間継続して投与される。

20

【0084】

幾つかの実施形態では、活性（a）の測定でHT-29細胞を使用する場合、コントロール（例えば、生理食塩水）に比べて、テストインターフェロンは、統計学的に有意であるように、（例えば約0.10mgと約0.15mgに対して、 $p < 0.01$ 、好ましくは、約0.05mgに対して、 $p < 0.001$ ）、（a）における所定の活性を有すると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は約0.02mg～約0.30mg、好ましくは、約0.05mg～約0.15mg、より好ましくは、約0.075mg～約0.10mgの量で一日おきに投与され、約4週間継続して投与される。

30

【0085】

幾つかの実施形態では、活性（a）の測定でSPC-A4細胞を使用する場合、コントロール（例えば、生理食塩水）に比べて、テストインターフェロンは、統計学的に有意であるように（例えば約0.05mg、約0.10mgと約0.15mgに対して、 $p < 0.01$ ）、（a）における所定の活性を有すると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は約0.02mg～約0.30mg、好ましくは、約0.05mg～約0.15mg、より好ましくは、約0.075mg～約0.10mgの量で一日おきに投与され、約3週間継続して投与される。

40

【0086】

幾つかの実施形態では、活性（a）の測定でA549細胞を使用する場合、コントロール（例えば、PBS）に比べて、テストインターフェロンは、統計学的に有意であるように（例えば $p < 0.0001$ ）、（a）における所定の活性を有すると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は約0.02mg～約0.30mg、好ましくは、約0.05mg～約0.15mg、より好ましくは、約0

50

．075mg～約0.10mgの量で一日おきに投与され、約3週間継続して投与される。
【0087】

幾つかの実施形態では、活性（b）である癌細胞生存率の減少の測定において、テストインターフェロンが約6.25mcg/ml～約25mcg/ml、好ましくは、約10mcg/ml～約18mcg/ml、より好ましくは、約10mcg/ml～約15mcg/mlの濃度範囲にある場合、癌細胞生存率を約50%減少させると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。幾つかの実施形態では、活性（b）の測定において、テストインターフェロンが少なくとも約25mcg/ml、好ましくは、少なくとも約50mcg/ml、より好ましくは、少なくとも約75mcg/ml、さらに好ましくは、少なくとも約100mcg/mlの濃度で、癌細胞生存率を実質的に検出できない程度まで減少させると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。

10

【0088】

幾つかの実施形態では、活性（b）の測定において、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物の濃度は約0.2mcg/ml～約100mcg/mlの濃度範囲に入る。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物の濃度は、0.2mcg/ml、0.39mcg/ml、0.78mcg/ml、1.56mcg/ml、3.13mcg/ml、6.25mcg/ml、12.5mcg/ml、25mcg/ml、50mcg/ml及び100mcg/mlのうち少なくとも2種以上の濃度を含む。幾つかの実施形態では、活性（b）の測定において、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、癌細胞を少なくとも約1日間、好ましくは、少なくとも約2日間処理する。

20

【0089】

幾つかの実施形態では、活性（b）を測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞、結腸癌細胞、子宮頸癌細胞、肝臓癌細胞、乳癌細胞及び前立腺癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、肺癌細胞、結腸癌細胞、肝臓癌細胞、乳癌細胞及び前立腺癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性（b）を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、SW480細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞、SMMC-7721細胞及びPANC-1細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、A549細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、SW480細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞、SMMC-7721細胞及びPANC-1細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。

30

【0090】

幾つかの実施形態では、活性（b）の測定において、前記テストインターフェロンが約6.25mcg/ml～約12.5mcg/mlの濃度範囲で処理した後、SW480細胞、MDA-MB-231細胞及びPANC-1細胞のうちいずれか1種又は多種の生存率を約50%減少させると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。

40

【0091】

幾つかの実施形態では、活性（b）の測定において、前記テストインターフェロンが約12.5mcg/ml～約25mcg/mlの濃度範囲で処理した後、A549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、Calu-1細胞及びSMMC-7721細胞のうちいずれか1種又は多種の生存率を約50%減少させると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。

【0092】

50

幾つかの実施形態では、活性（b）の測定において、A549細胞及び／又はSW620細胞を使用する場合、コントロール（例えば、IFN α -2b）に比べて、テストインターフェロンは、統計学的に有意であるように（例えば $p < 0.01$ ）、（b）における所定の活性を有すると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性（b）を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、活性（b）を測定するために用いられる癌細胞は約1日間～約10日間、好ましくは、約1日間～約6日間処理される。

10

【0093】

幾つかの実施形態では、活性（b）の測定において、Am-Blue法又はMTT法により癌細胞生存率を測定する。

【0094】

幾つかの実施形態では、活性（c）の測定において、コントロールに比べて、テストインターフェロンは、統計学的に有意であるように（例えば $p < 0.01$ ）、（c）における所定の活性を有すると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。幾つかの実施形態では、前記コントロールは未処理のコントロール（Mock）である。

20

【0095】

幾つかの実施形態では、活性（c）である癌細胞転移に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞及び結腸癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性（c）を測定するために用いられる癌細胞はA549細胞及びSW620細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、トランスウェル法を利用して活性（c）である癌細胞転移に対する阻害を測定する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性（c）を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性（c）を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約20時間、好ましくは、少なくとも約24時間処理する。

30

【0096】

幾つかの実施形態では、活性（d）の測定において、コントロールに比べて、テストインターフェロンは、統計学的に有意であるように（例えば $p < 0.05$ ，好ましくは、 $p < 0.01$ ）、（d）における所定の活性を有すると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。幾つかの実施形態では、前記コントロールは未処理のコントロール（Mock）である。

【0097】

幾つかの実施形態では、活性（d）である癌細胞における β -カテニン／TCFの転写活性に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞及び結腸癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性（d）を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞、H1299細胞、H460細胞、HT-29細胞及びSW620細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、A549細胞、H1299細胞、H460細胞及びSW620細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性（d）を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約20時間、好ましくは、少なくとも約24時間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性（d）を測定するため

40

50

に用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、 β -カテニン／TCFの転写活性はレポーターシステムを用いて測定される。幾つかの実施形態では、前記レポーターシステムはTOPFLASH又はpSV40-RLプラスミドを含む。

【0098】

幾つかの実施形態では、活性(e)の測定において、コントロールに比べて、テストインターフェロンは、統計学的に有意であるように(例えば $p < 0.005$ 、好ましくは、 $p < 0.001$ 、より好ましくは、 $p < 0.0005$)、(e)における所定の活性を有すると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。幾つかの実施形態では、前記コントロールは未処理のコントロール(Mock)である。

10

【0099】

幾つかの実施形態では、活性(e)である癌細胞におけるLRP6及び／又はFZD6の発現に対するダウンレギュレーションを測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞及び結腸癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性(e)を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞、H460細胞、SW620細胞及びHT-29細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、A549細胞、SW620細胞及びHT-29細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、より好ましくは、HT-29細胞を含む。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(e)を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約20時間、好ましくは、少なくとも約24時間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml〜約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(e)を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、活性(e)の測定において、LRP6及び／又はFZD6のmRNAレベルを測定することによりLRP6及び／又はFZD6の発現を確定する。幾つかの実施形態では、mRNAレベルを測定する時、GAPDHをコントロールとして用いる。

20

【0100】

幾つかの実施形態では、活性(f)の測定において、コントロールに比べて、テストインターフェロンは、統計学的に有意であるように(例えば、 $p < 0.0005$ 、好ましくは、 $p < 0.0001$)、(f)における所定の活性を有すると、前記テストインターフェロンとrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。幾つかの実施形態では、前記コントロールは未処理のコントロール(Mock)である。

30

【0101】

幾つかの実施形態では、活性(f)であるAxin2、CD24、サバイビン及びID2のうちいずれか1種又は多種の発現に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は肺癌細胞を含み、好ましくは、A549細胞を含む。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(f)を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約20時間、好ましくは、少なくとも約24時間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml〜約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性(f)を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、活性(f)の測定において、Axin2、CD24、サバイビン及び／又はID2のmRNAレベルを測定することによりそれに対応する発現を確定する。幾つかの実施形態では、mRNAレベルを測定する時、GAPDHをコントロールとして用いる。

40

【0102】

幾つかの実施形態では、活性(f)の測定において、コントロールに比べて、テストインターフェロンが癌細胞におけるAxin2、CD24、サバイビン及びID2のうちいずれか1種又は多種のうち少なくとも約30%、好ましくは、少なくとも約40%、より好

50

ましくは、少なくとも約50%、さらに好ましくは、少なくとも約60%の発現を減少する場合、前記テストインターフェロン及び／又はrSIFN-c α 若しくはrSIFN-c α 代用物は実質的に同じ効力有する又は実質的同等であるとみなされる。

【0103】

幾つかの実施形態では、活性(g)の測定において、前記テストインターフェロンが実質的に癌細胞における偽足形成を阻害した場合、前記テストインターフェロンとrSIFN-c α 若しくはrSIFN-c α 代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。ここで、「実質的に阻害」とは、少なくとも約60%阻害し、好ましくは、少なくとも約70%阻害し、より好ましくは、少なくとも約80%阻害し、さらに好ましくは、少なくとも約90%阻害し、またさらに好ましくは、少なくとも約95%阻害する。

10

【0104】

幾つかの実施形態では、活性(g)である癌細胞における偽足形成に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は肺癌細胞を含み、好ましくは、A549細胞を含む。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-c α 若しくはrSIFN-c α 代用物で、活性(g)を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約4日間、好ましくは、少なくとも約8日間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-c α 若しくはrSIFN-c α 代用物で、活性(g)を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、Matrigelで活性(g)を測定するために用いられる癌細胞を培養する。

20

【0105】

幾つかの実施形態では、活性(h)の測定において、前記テストインターフェロンが癌細胞における β -カテニンレベルを顕著に減少させた場合、前記テストインターフェロンとrSIFN-c α 若しくはrSIFN-c α 代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。ここで、例えばウエスタンブロットにおいて処理前に比べて蛋白質を示すバンドが薄くなる又はなくなれば、処理後に癌細胞における β -カテニンレベルが顕著に減少する。

【0106】

幾つかの実施形態では、活性(h)である癌細胞における β -カテニン発現に対する阻害を測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞及び結腸癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性(h)を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞及びSW480細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、活性(h)の測定において、ウエスタンブロット法を利用して β -カテニン発現に対する阻害を測定する。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-c α 若しくはrSIFN-c α 代用物で、活性(h)を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約48時間、好ましくは、少なくとも約72時間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-c α 若しくはrSIFN-c α 代用物で、活性(h)を測定するために用いられる癌細胞を処理する。

30

40

【0107】

幾つかの実施形態では、活性(i)の測定において、IFN α -2bに比べて、前記テストインターフェロンが癌細胞におけるDKK-3、KLF-4及びBATF2のうちいずれか1種又は多種の発現をより効果的にアップレギュレーションできると、前記テストインターフェロンとrSIFN-c α 若しくはrSIFN-c α 代用物は実質的に同じ効力を有する及び／又は実質的同等であることを示す。

【0108】

幾つかの実施形態では、活性(i)である癌細胞におけるDKK-3、KLF-4及びBATF2のうちいずれか1種又は多種の発現に対するアップレギュレーションを測定するために用いられる癌細胞は、肺癌細胞及び結腸癌細胞のうちいずれか1種又は多種を含む

50

。幾つかの実施形態では、活性（i）を測定するために用いられる癌細胞は、A549細胞、H460細胞、SW620細胞及びHT-29細胞のうちいずれか1種又は多種を含み、好ましくは、A549細胞及びSW620細胞のうちいずれか1種又は多種を含む。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性（i）を測定するために用いられる癌細胞を少なくとも約20時間処理し、好ましくは、少なくとも約24時間処理する。幾つかの実施形態では、約5mcg/ml～約20mcg/ml、好ましくは、約10mcg/mlのテストインターフェロン及び／又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で、活性（i）を測定するために用いられる癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、活性（i）の測定において、DKK-3、KLF-4及び／又はBATF2のmRNAレベルを測定することによりそれに対応する発現を確定する。幾つかの実施形態では、mRNAレベルを測定する時、GAPDHをコントロールとして用いる。

10

【0109】

幾つかの実施形態では、統計学的に有意であるとは、コントロールに比べて、 p 値 ≤ 0.05 、又は ≤ 0.01 、又は ≤ 0.005 、又は ≤ 0.001 、又は ≤ 0.0005 、又は ≤ 0.0001 である。

【0110】

幾つかの実施形態では、前記コントロールは、テストインターフェロン又はrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物で処理されず、又は生理食塩水若しくはPBSで処理され、又はIFN α -2bで処理され、又は前記コントロールが未処理コントロール（Mock）である。

20

【0111】

一つの形態では、本発明は、（a）複数濃度のテストインターフェロンを提供すること、（b）該複数濃度のテストインターフェロンを用いて、特定の条件で、第一群の癌細胞生存率に対するテストインターフェロンの第一投与量反応を確定すること、（c）複数濃度のrSIFN-co若しくはrSIFN-coの代用物（以下、「rSIFN-co代用物」と呼ばれる）を提供すること、（d）該複数濃度のrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物を用いて、同じ特定の条件で、第二群の癌細胞生存率に対するrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物の第二投与量反応を確定すること、及び、（e）第一投与量反応と第二投与量反応とを比較することを含む、化合物（例えば、テストインターフェロン）の効力を確定又は比較する方法を提供する。このように、化合物、例えばテストインターフェロンのrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物に対する相対効力を確定する。

30

【0112】

本発明の幾つかの実施形態では、大腸菌宿主において、好ましくは大腸菌宿主においてプロモーターPBADの制御で新しいポリヌクレオチド（配列番号2）を発現して、アメリカ特許7,364,724（組換え高効率複合インターフェロン）に記載したようなrSIFN-co（配列番号1）を調製する。本発明の幾つかの実施形態では、rSIFN-coは、配列番号2に示されるポリヌクレオチド配列を大腸菌に導入することを含む方法により得られる。本発明の幾つかの実施形態では、rSIFN-coが配列番号1のアミノ酸配列を有し、配列番号2のヌクレオチド配列でコードされ、配列番号2のヌクレオチド配列にコードされないインターフェロン、例えばインターフェロン α 1facon-1（INFERGEN（登録商標））に比べて、前記インターフェロンはB型肝炎ウイルス表面抗原（HbsAg）とB型肝炎ウイルスe抗原（HbeAg）の発現に対して増加した阻害活性を有する。

40

【0113】

幾つかの実施形態では、本文方法に用いられるrSIFN-coは特定の比活性を有する。該比活性は、例えば、約 4×10^8 IU/mg～約 1×10^9 IU/mgの範囲内であってもよい。幾つかの実施形態では、比活性が約 4.4×10^8 IU/mg～約 9×10^8 IU/mgの範囲内にある。幾つかの実施形態では、比活性が約 5×10^8 IU/mg

50

～約 8×10^8 IU/mg の範囲内にある。幾つかの実施形態では、比活性が約 6×10^8 IU/mg～約 7.5×10^8 IU/mg の範囲内にある。好ましくは、比活性が約 4×10^8 IU/mg～約 5×10^8 IU/mg の範囲内にある。

【0114】

幾つかの実施形態では、化合物の効力を確定又は比較する方法において、テストインターフェロン又は rSIFN-co の濃度が約 0.2 mcg/ml～約 100 mcg/ml の範囲内にある。幾つかの実施形態では、テストインターフェロン又は rSIFN-co の濃度は、 0.2 mcg/ml、 0.39 mcg/ml、 0.78 mcg/ml、 1.56 mcg/ml、 3.13 mcg/ml、 6.25 mcg/ml、 12.5 mcg/ml、 25 mcg/ml、 50 mcg/ml 及び 100 mcg/ml のうち少なくとも2種以上の濃度を含む。

10

【0115】

幾つかの実施形態では、本文に用いられる rSIFN-co 効果を確定する方法における細胞は癌細胞であり、ヒト細胞又は動物細胞である。テストインターフェロン又は rSIFN-co で細胞を少なくとも約24時間、好ましくは、少なくとも約48時間、より好ましくは、少なくとも約72時間処理し、特に断りのない限り、標準培養条件で、完全培地において、 37°C で、 5% CO_2 雰囲気中で処理する。培地は、腫瘍細胞の培養に適するあらゆる標準完全培地であってもよく、例えば、 10% 胎児牛血清 (Biocrom, Germany)、 4 mM グルタミン、 50 U/ml ペニシリン及び 50 mg/ml ストレプトマイシンが補充されている Shanghai Cell Collection (中国上海) の培地から入手できる。IFN α -2b は上海華新生物高技術有限公司 (中国上海) から入手でき、rSIFN-co は四川輝陽生命工程股份有限公司 (中国成都) から入手できる。

20

【0116】

幾つかの実施形態では、本発明は、約 6.25 mcg/ml～約 25 mcg/ml の濃度範囲内で (癌細胞のタイプに依存)、癌細胞生存率を 50% 減少させる能力を有する rSIFN-co を提供する。幾つかの実施形態では、rSIFN-co は約 6.25 mcg/ml～ 12.5 mcg/ml の濃度範囲内で細胞の生存率を 50% 減少できる。他の実施形態では、rSIFN-co は約 12.5 mcg/ml～ 25 mcg/ml の濃度範囲内で細胞生存率を 50% 減少できる。幾つかの実施形態では、rSIFN-co の IC 50 が約 10 mcg/ml～約 18 mcg/ml の範囲内にある。

30

【0117】

幾つかの実施形態では、テストインターフェロンもインターフェロンであるが、比較で使用する rSIFN-co と異なる製造ロットより得られる。

【0118】

したがって、例えば、テストインターフェロンなどの化合物の効力を確定する時、テストインターフェロンが多種の濃度に希釈され、使用される容器に適する一定数の調製細胞 (例えば、 $100 \mu\text{l}$ 完全培地における 5×10^3 細胞) をこれら多種の濃度のテストインターフェロンと共に一定時間、例えば48時間インキュベートする。インキュベートした後、細胞の生存率を確定し、同様にテストインターフェロンではなく、rSIFN-co で処理した細胞生存率と比較する。結果より、それぞれのテストインターフェロンで処理した細胞及び rSIFN-co で処理した細胞の投与量反応曲線が作られ比較できる。このように、 50% 有効投与量又は IC 50 の面で、テストインターフェロンの rSIFN-co に対する相対効力を確定できる。

40

【0119】

他の形態では、本発明は、(a) 複数の癌細胞を提供すること、(b) 特定の条件で、一定量のテストインターフェロンで第一群の癌細胞を測定し、第一群の生存率データを生成すること、(c) 同じ特定の条件で、有効量の rSIFN-co 若しくは rSIFN-co 代用物で第二群の癌細胞を処理し、第二群の生存率データを生成すること、及び、(d) 第一群の生存率データと第二群の生存率データとを比較することにより、テストインタ

50

ーフェロンの効力を確定することを含む、化合物（例えば、テストインターフェロン）の $rSIFN-co$ 若しくは $rSIFN-co$ 代用物に対する癌細胞生存率への相対効力を確定又は比較する方法を提供する。

【0120】

幾つかの実施形態では、約1日間～約6日間の範囲内で癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、約 6.25 mcg/ml ～約 50 mcg/ml 、好ましくは約 7 mcg/ml ～約 25 mcg/ml 、より好ましくは約 8 mcg/ml ～約 12.5 mcg/ml 、さらに好ましくは約 10 mcg/ml の範囲内の濃度で $rSIFN-co$ を使用する。幾つかの実施形態では、 $rSIFN-co$ は特定な比活性を含む。

【0121】

幾つかの実施形態では、本文に用いられる癌細胞はヒト腫瘍細胞と動物腫瘍細胞から選ばれる。幾つかの実施形態では、腫瘍細胞は肺腫瘍細胞、又は子宮頸腫瘍細胞、又は肝臓腫瘍細胞、又は結腸腫瘍細胞、又は乳腺腫瘍細胞、又はすい臓腫瘍細胞、又は前立腺腫瘍細胞、又はウイルス誘発した腫瘍細胞又はウイルス転化した細胞である。幾つかの実施形態では、癌細胞は A549 細胞、Calu-1 細胞、CL-1 細胞、H460 細胞、H1299 細胞、Hela 細胞、HT29 細胞、Huh-7 細胞、MDA-MB-231 細胞、PANC-1 細胞、RAW264.7 細胞、SMMC-7721 細胞、SW480 細胞及び SW620 細胞のうちから選ばれる少なくとも1種である。

【0122】

したがって、例えば、テスト容器に適する適当な体積における一定数の癌細胞、例えば、 $100\text{ }\mu\text{l}$ 完全培地における 2×10^3 細胞を、96 ウェルプレートに置き、約 10 mcg/ml のテストインターフェロン又は $rSIFN-co$ で1、2、3、4、5又は6日間継続して処理し、又は処理せずにコントロールとしてもよく、未処理コントロール群の生存率に対する処理した細胞の生存率を毎日確定する。実験終了時、未処理コントロール群の生存率に対する処理細胞の生存率は、インターフェロン処理の日数に対してプロットできる。このように、テスト化合物が癌細胞生存率を減少させる能力を比較でき、 $rSIFN-co$ に対する相対効力を確定できる。

【0123】

幾つかの実施形態では、本発明は、細胞を有効量の $rSIFN-co$ に所定時間さらすことにより、細胞転移を阻害することを含む、（例えば腫瘍転移中で発生した）細胞転移を阻害する方法を提供する。

【0124】

幾つかの実施形態では、本文に言及した腫瘍細胞のような細胞を $rSIFN-co$ にさらすことは、インビトロ又はインビボで、有効量の $rSIFN-co$ が存在したままで細胞を 37°C で一定時間（例えば24時間）インキュベートすることにより、又は動物或いは被験者に有効量の $rSIFN-co$ を投与することで一定濃度の $rSIFN-co$ を所望の効果を得るために十分な時間保持することにより、実施できる。上述した所望の効果は、例えば転移中の腫瘍細胞転移に対する阻害、又は偽足生成に対する阻害、 β -カテニン/TCFの転写活性に対する阻害、 β -カテニンの発現に対する阻害、Wnt 関連受容体及び/又は共受容体に対するダウンレギュレーション、Wnt シグナル伝達下流標的遺伝子に対するダウンレギュレーション、腫瘍阻害遺伝子に対するアップレギュレーション、及び本文に記載している他の状況である。

【0125】

任意の適当な市販のキットを用いて細胞転移検出を行ってもよい。例えば、ここで、Becton-Dickinson Biosciences (N. J., USA) の24ウェルプレートにセットされている微孔膜を含む $8\text{ }\mu\text{m}$ インサート式セル (insert) を使用できる。この検出について、 37°C の FBS を含有しない温熱炭酸水素塩類培地をインサート式セルの内部及びウェルの底部に添加し、加湿された組織培養インキュベーターにおいて 37°C 、5% CO_2 雰囲気中で約2時間復水した。復水した後、注意深く培地を除去し、約 0.5×10^4 細胞/インサート式セルの密度で、約 $500\text{ }\mu\text{l}$ の FBS を

10

20

30

40

50

含有しない培地に混合懸濁し調製される細胞（例えば37℃でrSIFN-coで24時間予め処理した細胞）をインサート式セルフィルターの上側に接種する。その後、24ウェルプレートの下室に500μlの10%FBSを含有する完全培地を添加しても良い。そして、37℃で細胞／インサート式セル／プレートを約24時間インキュベートし、例えば綿棒で室膜の上側にある非転移細胞を除去できる。転移細胞を含有するインサート式培養セルの下表面は例えば4%のパラホルムアルデヒドで固定し、2%クリスタルバイオレットで染色することができる。室膜と反対側にある転移細胞の数をカウントし、単位領域の平均転移細胞数を確定できる。このように、テストインターフェロンの腫瘍細胞転移を阻害する能力を示すことができる。

【0126】

幾つかの実施形態では、rSIFN-coの有効量は、約5mcg/ml～約100mcg/ml、好ましくは約8mcg/ml～約50mcg/ml、より好ましくは約10mcg/ml～約25mcg/ml、さらに好ましくは約12mcg/ml～約18mcg/mlを含む。

【0127】

他の形態では、本発明は、癌細胞を有効量のrSIFN-coに所定時間さらすことにより、偽足形成を阻害することを含む、癌細胞における偽足形成を阻害する方法を提供する。

【0128】

他の形態では、本発明は、細胞を有効量のrSIFN-coに所定時間さらすことを含む、細胞におけるβ-カテニン／TCF-媒介の転写活性を阻害する方法を提供する。

【0129】

幾つかの実施形態では、ルシフェラーゼレポーターシステムを用いてβ-カテニン／TCF-媒介の転写活性を確定できる。幾つかの実施形態では、レポーターシステムはTOPFlashレポーターシステムである。幾つかの実施形態では、プラスミドpSV40-RLを使用する。したがって、例えば、テストしようとする細胞を96ウェルプレート上に敷き、例えばウェル毎に約1×10⁴細胞、37℃で約12時間インキュベートし、そして、約100ngのTOPFlash (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) で瞬時トランスフェクションする。トランスフェクションの効率を標準化するために、さらに1ngのSV40プロモーターにより駆動される内部コントロールレポーターウミシイタケ (Renilla reniformis) ルシフェラーゼ (pRL-SV40, Promega, Madison, WI) で細胞をコトランスフェクションする。6時間トランスフェクションした後、インビトロ分析に用いる細胞をrSIFN-coで約24時間処理しても良い。インビトロ分析のためのrSIFN-co処理の後又はインビボ分析のためのトランスフェクションの後、デュアルルシフェラーゼエッセイシステムキットを用いてメーカーのマニュアル (Cat #: E1960, Promega) に従ってルシフェラーゼ検出を行うことができる。相対ルシフェラーゼ活性はホタルルシフェラーゼ／ウミシイタケルシフェラーゼ (firefly / renilla luciferase) 活性の比率として確定できる。

【0130】

他の形態では、本発明はさらに、細胞を有効量のrSIFN-coに所定時間さらすことを含む、細胞におけるβ-カテニンの蛋白レベルを減少させる方法を提供する。幾つかの実施形態では、その特異性抗体を用いてウエスタンブロットによりβ-カテニンの蛋白レベルを測定する。幾つかの実施形態では、GAPDHをコントロールとして用いる。

【0131】

細胞（細胞はインビトロ培養又はインビボ腫瘍サンプルに由来する）におけるβ-カテニンレベルを確定するウエスタンブロット分析について、標準ステップが用いられる。例えば、全細胞蛋白は抽出試薬 (Cat #: P0013) を利用してメーカーのマニュアル (Beyotime, China) に従って抽出できる。Bio-Rad Lowry蛋白検出システムにより蛋白濃度を確定できる。SDS-PAGEにより10%～12%ゲルで全蛋白を分離し、そして0.45μmの硝酸セルロース膜 (Millipore Co

10

20

30

40

50

orporation, Billerica, MA, USA) 上に転移することができる。該膜はブロッキング緩衝液 (5%牛血清白蛋白、10mmol/L Tris-HCl pH 8.0、150mmol/L NaCl、及び0.05% Tween 20) を用いて4℃で徹夜ブロックでき、そして一次抗体 (1:1000に希釈) とともにインキュベートし、そしてHRP結合の二次抗体とインキュベートする。抗体はどの販売会社から購入してもよく、例えばマウスモノクローナルβ-カテニン抗体 (1:1000, Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA)、マウスモノクローナルGAPDH抗体 (1:2000, Kangwei Biotechnology, China) 及び抗マウスHRP結合の二次抗体 (1:2000, Santa Cruz Technology) 等の抗体を用いることができる。冷光/蛍光イメージングLAS4000システム (GE Healthcare Life Sciences, USA) 及びsuper signal west pico化学発光基質キット (Thermo Scientific, USA) を用いてプロットを可視化することができる。

【0132】

他の形態では、本発明は、細胞を有効量のrSIFN-coに所定時間さらすことにより、Wnt関連受容体若しくは共受容体をダウンレギュレーションすることを含む、細胞におけるWnt関連受容体若しくは共受容体の発現をダウンレギュレーションする方法を提供する。幾つかの実施形態では、Wnt関連受容体若しくは共受容体はLRP蛋白、例えばLRP6を含む。幾つかの実施形態では、Wntシグナル伝達受容体又は共受容体はFZD蛋白、例えばFZD6を含む。上述した通り、細胞をrSIFN-coにさらす方法はインビトロ方法又はインビボ方法であっても良い。

【0133】

幾つかの実施形態では、Wnt関連受容体若しくは共受容体の発現を確定することはこれら受容体又は共受容体のmRNAレベルを確定することを含む。任意の標準方法によりこれらmRNAレベルを確定できる。幾つかの実施形態では、これらmRNAに対応するcDNAを調製してこれらmRNAレベルを確定する。例えば、TRIzol試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、メーカーの取り扱い説明書に従って全mRNAを分離することができる。相補DNA (cDNA) は、RT-PCRキット (Cat#:FSQ-101, TOYOBO, Japan) を用いてメーカーの取り扱い説明書に従って合成され、そしてSYBR Green PCRキット (Cat#:QPK-201, TOYOBO, Japan) を用いて定量PCR (qPCR) を行ってもよい。適当なプライマーを使用でき、例えば、LRP6に用いられるプライマーは、センスプライマー: 5'-TGAGAACCAGCACACAGG-3' (配列番号4)、アンチセンスプライマー: 5'-CATAAACCAAGAGGCACAGAAGC-3' (配列番号5) であってもよく、且つFZD6に用いられるプライマーは、センスプライマー: 5'-GCGGAGTGAAGGAAGGATTAGTC-3' (配列番号6)、アンチセンスプライマー: 5'-TGACAAGCAGAGATGTGGAACC-3' (配列番号7) であっても良い。増幅プロトコールは、95℃で1分間インキュベートし、40サイクル (95℃で、15秒; 60℃で、15秒; 及び72℃で、30秒) であっても良い。SYBR Green染料をPCR産物に結合することはBio-Rad検出システムでリアルタイムでモニターされ、そしてBio-Rad CFX manager 2.1ソフトウェアで分析してもよい。各条件についてサンプルを揃え、並行して行ってもよい。2- $\Delta\Delta C_t$ 法により、インターフェロン処理したサンプルとMock未処理のサンプルとを比較し、倍率変化に対してプロットすることができる。GAPDHを標準化コントロールとして用いられる。該2- $\Delta\Delta C_t$ 法は、通常、リアルタイム定量PCR実験からの遺伝子発現の相対変化を分析することに利用される。

【0134】

他の形態では、本発明は、細胞におけるある遺伝子 (Wntシグナル伝達経路のうち少なくとも1つの標的遺伝子を含む) の発現をダウンレギュレーションする方法、例えば標的遺伝子突然変異又は過度活発の疾病又は症状を治療する方法を提供する。これらダウンレ

ギユレーション遺伝子は例えばAxin2、CD24、サバイビン及び／又はID2を含む。該方法は、細胞を有効量のrSIFN-coに所定時間さらすことにより、標的遺伝子の発現を阻害することを含む。ダウンレギュレーションの度合は標準技術、例えば前述したqPCRにより確定できる。例えば、これらqPCRについて、Axin2に対して、センスプライマー：5'-CGTGGATACCTTAGACTT-3'（配列番号8）とアンチセンスプライマー：5'-GCTGTTGTCTCTCAATGTA-3'（配列番号9）を用いることができ、CD24に対して、センスプライマー5'-TGAAGAACATGTGAGAGGTTTGAC-3'（配列番号10）とアンチセンスプライマー5'-GAAAACTGAATCTCCATTCCACAA-3'（配列番号11）を用いることができ、サバイビンに対して、センスプライマー：5'-ACCGCATCTCTACAATTCAAG-3'（配列番号12）とアンチセンスプライマー5'-CAAGTCTGGCTCGTTCTC-3'（配列番号13）を用いることができ、ID2に対して、センスプライマー5'-CACAAACAACAACAACAAC-3'（配列番号14）とアンチセンスプライマー5'-CACAGTCCAAGTAAGAGA-3'（配列番号15）を用いることができる。

【0135】

本発明の幾つかの実施形態では、細胞がrSIFN-coにさらされる所定時間は少なくとも約12時間、好ましくは、少なくとも約20時間、より好ましくは、少なくとも約24時間、さらに好ましくは、少なくとも約36時間、さらに好ましくは、少なくとも約48時間、さらに好ましくは、少なくとも約72時間である。幾つかの実施形態では、rSIFN-co処理した細胞は癌細胞である。

【0136】

他の形態では、本発明は、細胞を有効量のrSIFN-coに所定時間さらすことにより、少なくとも1種の腫瘍阻害遺伝子の発現に対するアップレギュレーションを実現することを含む、細胞におけるある遺伝子（少なくとも1種の腫瘍阻害遺伝子を含む）の発現をアップレギュレーションする方法を提供する。幾つかの実施形態では、アップレギュレーションする遺伝子はDKK3、KLF4及びBATF2のうち少なくとも1種を含む。標準技術により、これら遺伝子のアップレギュレーション程度を確定できる。幾つかの実施形態では、mRNAレベルを測定することにより、アップレギュレーション遺伝子の発現を確定できる。幾つかの実施形態では、これらmRNAからcDNAを合成して任意に増幅させてこの測定目的に用いる。一つの実例として、増幅目的で、BATF2に対して、センスプライマー5'-CAGAGCAGGGAGCACAAACC-3'（配列番号16）とアンチセンスプライマー5'-TGAGCAGAGGAGAGCAGAGG-3'（配列番号17）、DKK3に対して、センスプライマー5'-GGAGCCTGACTGAAAGAGATGG-3'（配列番号18）とアンチセンスプライマー5'-ACGCCCTAAAGCACACACCTG-3'（配列番号19）、KLF4に対して、センスプライマー5'-CCTTCAACCTGGCGGACATCAAC-3'（配列番号20）とアンチセンスプライマー5'-GGCTGCTGCGGCGGAATG-3'（配列番号21）というプライマーを使用できる。

【0137】

他の形態では、本発明は、少なくとも1種、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10又は11種の下記の（a）～（k）の活性において、テスト化合物とrSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物との間の実質的同等性を構築する方法において、下記（a）～（k）の活性を比較して実質的に同じ反応を示すことを含む方法を提供する。（a）いずれか1種又は多種の担癌動物モデル体内の癌細胞生長に対する阻害；（b）癌細胞生存率の減少；（c）癌細胞転移に対する阻害；（d）癌細胞におけるβ-カテニン／TCFの転写活性に対する阻害；（e）癌細胞におけるLRP6及び／又はFZD6の発現に対するダウンレギュレーション；（f）癌細胞におけるAxin2、CD24、サバイビン及びID2のうちいずれか1種又は多種の発現に対する阻害；（g）癌細胞における偽足形成に対する阻害；（h）癌細胞におけるβ-カテニン発現に対す

る阻害；（i）癌細胞、例えばA549細胞又はSW620細胞におけるDKK-3、KLF-4及びBATF2のうちいずれか1種又は多種の発現に対するアップレギュレーション；（j）IFN α -2bよりも高いIFNAR1への結合親和性、及び／又はIFN α -2bよりも低いIFNAR2への結合親和性；（k）癌細胞p-STAT発現に対するアップレギュレーションにおける、IFN α -2bよりも低いB18R阻害に対する感受性。幾つかの実施形態では、本発明は、少なくとも2種の上記の活性、例えば、（a）と（b）；（a）と（c）；（a）と（d）；（a）と（e）；（a）と（f）；（a）と（g）；（a）と（h）；（a）と（i）；（a）と（j）；（a）と（k）；（b）と（c）；（b）と（d）；（b）と（e）；（b）と（f）；（b）と（g）；（b）と（h）；（b）と（i）；（b）と（j）；（b）と（k）；（c）と（d）；（c）と（e）；（c）と（f）；（c）と（g）；（c）と（h）；（c）と（i）；（c）と（j）；（c）と（k）；（d）と（e）；（d）と（f）；（d）と（g）；（d）と（h）；（d）と（i）；（d）と（j）；（d）と（k）；（e）と（f）；（e）と（g）；（e）と（h）；（e）と（i）；（e）と（j）；（e）と（k）；（f）と（g）；（f）と（h）；（f）と（i）；（f）と（j）；（f）と（k）；（g）と（h）；（g）と（i）；（g）と（j）；（g）と（k）；（h）と（i）；（h）と（j）；（h）と（k）；（i）と（j）；（i）と（k）；（j）と（k）、において実質的同等性を構築することを提供し、好ましくは、本発明は、少なくとも3種の上記の活性、例えば、（a）、（b）及び（c）；（a）、（b）及び（d）；（a）、（b）及び（e）；（a）、（b）及び（f）；（a）、（b）及び（g）；（a）、（b）及び（h）；（a）、（b）及び（i）；（a）、（b）及び（j）；（a）、（b）及び（k）；（a）、（c）及び（d）；（a）、（c）及び（e）；（a）、（c）及び（f）；（a）、（c）及び（g）；（a）、（c）及び（h）；（a）、（c）及び（i）；（a）、（c）及び（j）；（a）、（c）及び（k）；（a）、（d）及び（e）；（a）、（d）及び（f）；（a）、（d）及び（g）；（a）、（d）及び（h）；（a）、（d）及び（i）；（a）、（d）及び（j）；（a）、（d）及び（k）；（a）、（e）及び（f）；（a）、（e）及び（g）；（a）、（e）及び（h）；（a）、（e）及び（i）；（a）、（e）及び（j）；（a）、（e）及び（k）；（a）、（f）及び（g）；（a）、（f）及び（h）；（a）、（f）及び（i）；（a）、（f）及び（j）；（a）、（f）及び（k）；（a）、（g）及び（h）；（a）、（g）及び（i）；（a）、（g）及び（j）；（a）、（g）及び（k）；（a）、（h）及び（i）；（a）、（h）及び（j）；（a）、（h）及び（k）；（a）、（i）及び（j）；（a）、（i）及び（k）；（a）、（j）及び（k）；（b）、（c）及び（d）；（b）、（c）及び（e）；（b）、（c）及び（f）；（b）、（c）及び（g）；（b）、（c）及び（h）；（b）、（c）及び（i）；（b）、（c）及び（j）；（b）、（c）及び（k）；（b）、（d）及び（e）；（b）、（d）及び（f）；（b）、（d）及び（g）；（b）、（d）及び（h）；（b）、（d）及び（i）；（b）、（d）及び（j）；（b）、（d）及び（k）；（b）、（e）及び（f）；（b）、（e）及び（g）；（b）、（e）及び（h）；（b）、（e）及び（i）；（b）、（e）及び（j）；（b）、（e）及び（k）；（b）、（f）及び（g）；（b）、（f）及び（h）；（b）、（f）及び（i）；（b）、（f）及び（j）；（b）、（f）及び（k）；（b）、（g）及び（h）；（b）、（g）及び（i）；（b）、（g）及び（j）；（b）、（g）及び（k）；（b）、（h）及び（i）；（b）、（h）及び（j）；（b）、（h）及び（k）；（b）、（i）及び（j）；（b）、（i）及び（k）；（b）、（j）及び（k）；（c）、（d）及び（e）；（c）、（d）及び（f）；（c）、（d）及び（g）；（c）、（d）及び（h）；（c）、（d）及び（i）；（c）、（d）及び（j）；（c）、（d）及び（k）；（c）、（e）及び（f）；（c）、（e）及び（g）；（c）、（e）及び（h）；（c）、（e）及び（i）；（c）、（e）及び（j）；（c）、（e）及び（k）；（c）、（f）及び（g）；（c）、（f）及び（h）；（c）、（f）及び（i）；（c）、（f）及び（j）

10

20

30

40

50

) ; (c)、(f) 及び (k) ; (c)、(g) 及び (h) ; (c)、(g) 及び (i) ;
 ; (c)、(g) 及び (j) ; (c)、(g) 及び (k) ; (c)、(h) 及び (i) ;
 (c)、(h) 及び (j) ; (c)、(h) 及び (k) ; (c)、(i) 及び (j) ; (c)、
 (i) 及び (k) ; (c)、(j) 及び (k) ; (d)、(e) 及び (f) ; (d)、
 (e) 及び (g) ; (d)、(e) 及び (h) ; (d)、(e) 及び (i) ; (d)、
 (e) 及び (j) ; (d)、(e) 及び (k) ; (d)、(f) 及び (g) ; (d)、
 (f) 及び (h) ; (d)、(f) 及び (i) ; (d)、(f) 及び (j) ; (d)、
 (f) 及び (k) ; (d)、(g) 及び (h) ; (d)、(g) 及び (i) ; (d)、(g)
 及び (j) ; (d)、(g) 及び (k) ; (d)、(h) 及び (i) ; (d)、(h)
 及び (j) ; (d)、(h) 及び (k) ; (d)、(i) 及び (j) ; (d)、(i) 及
 び (k) ; (d)、(j) 及び (k) ; (e)、(f) 及び (g) ; (e)、(f) 及び
 (h) ; (e)、(f) 及び (i) ; (e)、(f) 及び (j) ; (e)、(f) 及び (k) ;
 (e)、(g) 及び (h) ; (e)、(g) 及び (i) ; (e)、(g) 及び (j) ;
 (e)、(g) 及び (k) ; (e)、(h) 及び (i) ; (e)、(h) 及び (j) ;
 (e)、(h) 及び (k) ; (e)、(i) 及び (j) ; (e)、(i) 及び (k) ;
 (e)、(j) 及び (k) ; (f)、(g) 及び (h) ; (f)、(g) 及び (i) ; (f)、
 (g) 及び (j) ; (f)、(g) 及び (k) ; (f)、(h) 及び (i) ; (f)、
 (h) 及び (j) ; (f)、(h) 及び (k) ; (f)、(i) 及び (j) ; (f)、
 (i) 及び (k) ; (f)、(j) 及び (k) ; (g)、(h) 及び (i) ; (g)、
 (h) 及び (j) ; (g)、(h) 及び (k) ; (g)、(i) 及び (j) ; (g)、
 (i) 及び (k) ; (g)、(j) 及び (k) ; (h)、(i) 及び (j) ; (h)、(i)
 及び (k) ; (h)、(j) 及び (k) ; (i)、(j) 及び (k)、において実質的
 同等性を構築することを提供し、より好ましくは、本発明は、少なくとも4種の上記の活
 性、例えば、(a)、(b)、(c) 及び (d) ; (a)、(b)、(c) 及び (e) ;
 (a)、(b)、(c) 及び (f) ; (a)、(b)、(c) 及び (g) ; (a)、(b)
)、(c) 及び (h) ; (a)、(b)、(c) 及び (i) ; (a)、(b)、(c) 及
 び (j) ; (a)、(b)、(c) 及び (k) ; (a)、(c)、(d) 及び (e) ; (a)
)、(c)、(d) 及び (f) ; (a)、(c)、(d) 及び (g) ; (a)、(c)
)、(d) 及び (h) ; (a)、(c)、(d) 及び (i) ; (a)、(c)、(d) 及
 び (j) ; (a)、(c)、(d) 及び (k) ; (a)、(d)、(e) 及び (f) ; (a)
)、(d)、(e) 及び (g) ; (a)、(d)、(e) 及び (h) ; (a)、(d)、
 (e) 及び (i) ; (a)、(d)、(e) 及び (j) ; (a)、(d)、(e) 及び (k) ;
 (a)、(e)、(f) 及び (g) ; (a)、(e)、(f) 及び (h) ; (a)
)、(e)、(f) 及び (i) ; (a)、(e)、(f) 及び (j) ; (a)、(e)、
 (f) 及び (k) ; (a)、(f)、(g) 及び (h) ; (a)、(f)、(g) 及び (i) ;
 (a)、(f)、(g) 及び (j) ; (a)、(f)、(g) 及び (k) ; (a)、
 (g)、(h) 及び (i) ; (a)、(g)、(h) 及び (j) ; (a)、(g)、(h)
) 及び (k) ; (a)、(h)、(i) 及び (j) ; (a)、(h)、(i) 及び (k) ;
 (a)、(i)、(j) 及び (k) ; (b)、(c)、(d) 及び (e) ; (b)、(c)
)、(d) 及び (f) ; (b)、(c)、(d) 及び (g) ; (b)、(c)、(d)
 及び (h) ; (b)、(c)、(d) 及び (i) ; (b)、(c)、(d) 及び (j) ;
 (b)、(c)、(d) 及び (k) ; (b)、(d)、(e) 及び (f) ; (b)、(d)
)、(e) 及び (g) ; (b)、(d)、(e) 及び (h) ; (b)、(d)、(e) 及
 び (i) ; (b)、(d)、(e) 及び (j) ; (b)、(d)、(e) 及び (k) ; (b)
)、(e)、(f) 及び (g) ; (b)、(e)、(f) 及び (h) ; (b)、(e)
)、(f) 及び (i) ; (b)、(e)、(f) 及び (j) ; (b)、(e)、(f) 及び
 (k) ; (b)、(f)、(g) 及び (h) ; (b)、(f)、(g) 及び (i) ; (b)
)、(f)、(g) 及び (j) ; (b)、(f)、(g) 及び (k) ; (b)、(g)、
 (h) 及び (i) ; (b)、(g)、(h) 及び (j) ; (b)、(g)、(h) 及び (k) ;
 (b)、(h)、(i) 及び (j) ; (b)、(h)、(i) 及び (k) ; (b)

10

20

30

40

50

、(i)、(j)及び(k)；(c)、(d)、(e)及び(f)；(c)、(d)、(e)及び(g)；(c)、(d)、(e)及び(h)；(c)、(d)、(e)及び(i)；(c)、(d)、(e)及び(j)；(c)、(d)、(e)及び(k)；(c)、(d)、(f)及び(g)；(c)、(d)、(f)及び(h)；(c)、(d)、(f)及び(i)；(c)、(d)、(f)及び(j)；(c)、(d)、(f)及び(k)；(c)、(d)、(g)及び(h)；(c)、(d)、(g)及び(i)；(c)、(d)、(g)及び(j)；(c)、(d)、(g)及び(k)；(c)、(d)、(h)及び(i)；(c)、(d)、(h)及び(j)；(c)、(d)、(h)及び(k)；(c)、(e)、(f)及び(g)；(c)、(e)、(f)及び(h)；(c)、(e)、(f)及び(i)；(c)、(e)、(f)及び(j)；(c)、(f)、(g)及び(h)；(c)、(f)、(g)及び(i)；(c)、(f)、(g)及び(j)；(c)、(f)、(g)及び(k)；(c)、(g)、(h)及び(i)；(c)、(g)、(h)及び(j)；(c)、(g)、(h)及び(k)；(c)、(h)、(i)及び(j)；(c)、(h)、(i)及び(k)；(c)、(i)、(j)及び(k)；(d)、(e)、(f)及び(g)；(d)、(e)、(f)及び(h)；(d)、(e)、(f)及び(i)；(d)、(e)、(f)及び(j)；(d)、(e)、(f)及び(k)；(d)、(f)、(g)及び(h)；(d)、(f)、(g)及び(i)；(d)、(f)、(g)及び(j)；(d)、(f)、(g)及び(k)；(d)、(g)、(h)及び(i)；(d)、(g)、(h)及び(j)；(d)、(g)、(h)及び(k)；(d)、(h)、(i)及び(j)；(d)、(h)、(i)及び(k)；(d)、(i)、(j)及び(k)；(e)、(f)、(g)及び(h)；(e)、(f)、(g)及び(i)；(e)、(f)、(g)及び(j)；(e)、(f)、(g)及び(k)；(e)、(g)、(h)及び(i)；(e)、(g)、(h)及び(j)；(e)、(g)、(h)及び(k)；(e)、(h)、(i)及び(j)；(e)、(h)、(i)及び(k)；(e)、(i)、(j)及び(k)；(f)、(g)、(h)及び(i)；(f)、(g)、(h)及び(j)；(f)、(g)、(h)及び(k)；(f)、(h)、(i)及び(j)；(f)、(h)、(i)及び(k)；(f)、(i)、(j)及び(k)；(g)、(h)、(i)及び(j)；(g)、(h)、(i)及び(k)；(g)、(i)、(j)及び(k)；(h)、(i)、(j)及び(k)、において実質的同等性を構築することを提供し、さらに好ましくは、本発明は、少なくとも5種の上記の活性、例えば、(a)、(b)、(c)、(d)及び(e)；(a)、(b)、(c)、(d)及び(f)；(a)、(b)、(c)、(d)及び(g)；(a)、(b)、(c)、(d)及び(h)；(a)、(b)、(c)、(d)及び(i)；(a)、(b)、(c)、(d)及び(j)；(a)、(b)、(c)、(d)及び(k)；(a)、(c)、(d)、(e)及び(f)；(a)、(c)、(d)、(e)及び(g)；(a)、(c)、(d)、(e)及び(h)；(a)、(c)、(d)、(e)及び(i)；(a)、(c)、(d)、(e)及び(j)；(a)、(c)、(d)、(e)及び(k)；(a)、(d)、(e)、(f)及び(g)；(a)、(d)、(e)、(f)及び(h)；(a)、(d)、(e)、(f)及び(i)；(a)、(d)、(e)、(f)及び(j)；(a)、(d)、(e)、(f)及び(k)；(a)、(e)、(f)、(g)及び(h)；(a)、(e)、(f)、(g)及び(i)；(a)、(e)、(f)、(g)及び(j)；(a)、(e)、(f)、(g)及び(k)；(a)、(f)、(g)、(h)及び(i)；(a)、(f)、(g)、(h)及び(j)；(a)、(f)、(g)、(h)及び(k)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(f)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(g)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(h)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(i)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(j)；(b)、(c)、(d)、(e)及び(k)；(b)、(d)、(e)、(f)及び(g)；(b)、(d)、(e)、(f)及び(h)；(b)、(d)、(e)、(f)及び(i)；(b)、(d)、(e)、(f)及び(j)；(b)、(d)、(e)、(f)及び(k)；(b)、(e)、(f)、(g)及び(h)

10

20

30

40

50

; (b)、(e)、(f)、(g) 及び (i); (b)、(e)、(f)、(g) 及び (j); (b)、(e)、(f)、(g) 及び (k); (b)、(f)、(g)、(h) 及び (i); (b)、(f)、(g)、(h) 及び (j); (b)、(f)、(g)、(h) 及び (k); (c)、(d)、(e)、(f) 及び (g); (c)、(d)、(e)、(f) 及び (h); (c)、(d)、(e)、(f) 及び (i); (c)、(d)、(e)、(f) 及び (j); (c)、(d)、(e)、(f) 及び (k); (c)、(e)、(f)、(g) 及び (h); (c)、(e)、(f)、(g) 及び (i); (c)、(e)、(f)、(g) 及び (j); (c)、(e)、(f)、(g) 及び (k); (c)、(f)、(g)、(h) 及び (i); (c)、(f)、(g)、(h) 及び (j); (c)、(f)、(g)、(h) 及び (k); (d)、(e)、(f)、(g) 及び (h); (d)、(e)、(f)、(g) 及び (i); (d)、(e)、(f)、(g) 及び (j); (d)、(e)、(f)、(g) 及び (k); (d)、(f)、(g)、(h) 及び (i); (d)、(f)、(g)、(h) 及び (j); (d)、(f)、(g)、(h) 及び (k); (f)、(g)、(h)、(i) 及び (j); (f)、(g)、(h)、(i) 及び (k); (g)、(h)、(i)、(j) 及び (k)、において実質的同等性を構築することを提供し、さらに好ましくは、本発明は、少なくとも 6 種の上記の活性、例えば、(a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (f); (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (g); (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (h); (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (i); (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (j); (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (k); (a)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (g); (a)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (h); (a)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (i); (a)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (j); (a)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (k); (a)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (h); (a)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (i); (a)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (j); (a)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (k); (a)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (i); (a)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (j); (a)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (k); (b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (g); (b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (h); (b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (i); (b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (j); (b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (k); (b)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (h); (b)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (i); (b)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (j); (b)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (k); (b)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (i); (b)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (j); (b)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (k); (c)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (h); (c)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (j); (c)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (k); (c)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (i); (c)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (j); (c)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (k); (c)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (i); (c)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (j); (c)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (k); (d)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (i); (d)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (j); (d)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (k)、において実質的同等性を構築することを提供し、さらに好ましくは、本発明は、少なくとも 7 種の上記の活性、例えば (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (g); (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (h); (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (i); (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (j); (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (k); (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (h); (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (i); (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (j); (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g) 及び (k)

10

20

30

40

50

）及び（k）；（a）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（i）；（a）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（j）；（a）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（k）；（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）及び（h）；（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）及び（i）；（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）及び（j）；（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）及び（k）；（b）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（i）；（b）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（j）；（b）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（k）；（c）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（i）；（c）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（j）；（c）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（k）、において実質的同等性を構築することを提供し、さらに好ましくは、本発明は、少なくとも8種の上記の活性、例えば（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）及び（h）；（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）及び（i）；（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）及び（j）；（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）及び（k）；（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（i）；（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（j）；（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（k）；（a）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（i）；（a）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（j）；（a）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（k）；（a）、（b）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（i）；（a）、（b）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（j）；（a）、（b）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（k）；（a）、（b）、（c）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（i）；（a）、（b）、（c）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（j）；（a）、（b）、（c）、（e）、（f）、（g）、（h）及び（k）；（a）、（b）、（c）、（d）、（f）、（g）、（h）及び（i）；（a）、（b）、（c）、（d）、（f）、（g）、（h）及び（j）；（a）、（b）、（c）、（d）、（f）、（g）、（h）及び（k）；（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（g）、（h）及び（j）；（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（g）、（h）及び（k）；（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（h）及び（i）；（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（h）及び（j）；（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）及び（j）；（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）及び（k）、において実質的同等性を構築することを提供し、さらに好ましくは、本発明は、少なくとも9種、10種、又はあらゆる11種の上記の活性、例えば（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）、（i）、（j）及び（k）、において実質的同等性を構築することを提供する。

【0138】

他の形態では、本発明は、（a）*rSIFN-co*若しくは*rSIFN-co*代用物と、（b）本文に述べた一つ以上の方法を行うための取り扱い説明書及びこれら方法を行うための試薬のうち少なくとも1種と、を含む測定キットを提供する。これら試薬はリン酸塩緩衝塩水（PBS）又は緩衝剤を含んでもよい。幾つかの実施形態では、測定キットにおける*rSIFN-co*若しくは*rSIFN-co*代用物は特定な比活性を有する。

【0139】

幾つかの実施形態では、前記テストインターフェロンはさらに癌細胞におけるJAK/STATシグナル伝達経路によりシグナルを伝達する及び／又は*rSIFN-co*と共通IFNAR1/2受容体をシェアすることにより、*rSIFN-co*と実質的に等価である又は*rSIFN-co*と実質的に同じ効力を有する。幾つかの実施形態では、STATファミリー、例えばSTAT1、STAT2及び／又はSTAT3に由来するリン酸化蛋白

10

20

30

40

50

の存在を検出することで、JAK/STAT経路を介するシグナル伝達を検出する。幾つかの実施形態では、ウエスタンブロットによりこのような検出を行う。幾つかの実施形態では、癌細胞A549及び/又はHeLa細胞はこのような検出を行うために用いられる。幾つかの実施形態では、約10mcg/mlのテストインターフェロン又はrSIFN-coで前記癌細胞を処理する。幾つかの実施形態では、前記テストインターフェロン又はrSIFN-coで癌細胞を約5、15、30、60、120及び/又は240分間処理する。幾つかの実施形態では、インターフェロンで処理した後、細胞蛋白を収集してウエスタンブロット分析に用いる。幾つかの実施形態では、GAPDHをコントロールとして用いる。

【0140】

幾つかの実施形態では、rSIFN-co若しくはrSIFN-co代用物との同等性、又は相対効力を構築するために行われるテスト又は活動は、任意の慣例的な方法を用いてもよく、ここで挙げた方法に制限されることはない。

【実施例】

【0141】

ここで、以下の実施例により本発明をさらに説明するが、これら実施例は本発明の範囲を制限するものではない。本発明は、具体的に言及されていないが当業者にとって有用な任意の元素や制限が存在する又は存在しないままで行うことができる。さらに、ここで、本発明の説明は制限の意図がなく、特に断りのない限り、当業者に理解できる範囲で、記載された特徴、元素、又は制限の同等や変更、又はその一部の等同物若しくは変更を含むことは言うまでもない。本文に記載した概要を鑑みて、種々の他の実施形態を実施することができることは当然である。図面を組み合わせ、上述した内容より、具体的な説明と実施例及び添付の請求項に基づいて、本発明の他の目的、特徴、及び利点は、当業者にとって明白となる。

【0142】

すべてのデータは平均値±標準差(SD)として表される。tテスト(及びノンパラメトリックテスト)を用いて、異なる変化量の間の関係を分析する。p<0.05である時、統計学的に有意である。

【0143】

実施例1. rSIFN-coのヒト肝臓癌に対する活性

ヒト肝臓癌SMMC-7721をモデルとして本研究を行い、インビボシステムでヒト肝臓癌に対するrSIFN-coの活性と効力を実証した。テスト物であるrSIFN-coの活性を、マイトマイシンC(「MMC」)の活性と比較した。rSIFN-coは無色の液体であり、濃度が1mg/mlであり、四川輝陽生命工程股份有限公司(中国成都)より提供された。テスト物を希釈せずに用いた。解凍して注射に用いるまで4℃で貯蔵した。マイトマイシンC(「MMC」)、ロット505 AGB、濃度2mg/バイアルはKyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. (日本)より提供された。MMCを注射時に生理食塩水で希釈した。

【0144】

アメリカ国立衛生研究院(NIH)実験動物の管理と使用ガイドにより、動物実験を行った。

【0145】

用いられた動物は4~6週齢の雄性BALB/cAnu/nuマウスであり、重さが約23±2gであり、上海薬物研究所(中国上海)より得られた。研究方案は上海薬物研究所の動物使用と管理委員会に審査され、基準制度を満たしており、研究を開始する前に委員会に批准された。研究に用いられるプロセスは、動物の不快感、苦痛や痛みを極力避ける又は最小化するように設計した。規定に基づき、嚴重な又は慢性的で緩和できない痛み又は苦痛を経験する動物を無痛で安楽死させる。6匹の動物を一つの籠に入れた。これら動物の耳に穴を開ける識別法で耳標を付けた。室温を25℃±1℃に維持した。光照射は、12時間オンで12時間オフとした。食物は不断給餌された。水ボトルで動物に、5µ

10

20

30

40

50

mのフィルターでろ過した都市水道水を自由に飲めるように供給した。研究者と輝陽生命工程股分有限公司はいずれも、何らの本発明の意向や目的を干渉又は影響する食品汚染又は水汚染がないと考える。

【0146】

テスト物（rSIFN-co）とビヒクルコントロールをそれぞれ腫瘍内（i.t.）に投与した。動物の群によって、処理毎にマウス1匹毎に0.05ml～0.15mlの体積でテスト物を投与した。MMCを10マイクロリットル（μl）／gで静脈（i.v.）投与した。マウス1匹毎に0.15mlの体積で生理食塩水を注射し、ビヒクルコントロールとした。

【0147】

動物をランダムに処理群に分けた。最初に、すべての動物は一つの大きな動物籠に入れた。群を分けて研究するために、それらは後に分けられ、各処理群を各籠に6匹の動物を入れた。各群の投与量や投与方案を表1に記載する。群1と群2はコントロール群であり、一回目処理後に一日おきに各動物にビヒクルを投与した。群3の動物は処理開始後の1日目と6日目に5mg/kgの投与量でMMCを投与した。群4、群5及び群6の動物は一回目処理後にそれぞれ0.15mg/マウス（群4）、又は0.10mg/マウス（群5）又は0.05mg/マウス（群6）に一日おきにrSIFN-coを投与した。研究の過程において、週に2回各腫瘍の長さと幅を測定することで、腫瘍生長をモニターした。研究の過程において、各動物を週に2回秤量した。

【0148】

各マウスに 5×10^6 個の細胞を皮膚下（s.c.）接種することにより、各動物に腫瘍であるヒト肝臓癌SMMC-7721異種移植物を移入した。研究を開始する前に、異種移植物をヌードマウス中で2回継代した。無菌条件で、生長良好な腫瘍を 1.5 mm^3 の断片に切断し、トロカール針で一つのこのような断片を各匹の研究動物の右側腹部に注射した。腫瘍が $100 \text{ mm}^3 \sim 200 \text{ mm}^3$ の体積に達する時、マウスをランダムにコントロール群又は処理群に分け、各群を表1に記載した投与量と日程に従って、ビヒクル（群1と群2）、rSIFN-co（群4、群5及び群6）又はMMC（群3）を受けさせ、3週間続けた。マイクロキャリパーで各腫瘍のサイズ（長さ×幅）を週に2回測定した。式 $V = (\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2$ により腫瘍体積（V）を算出する。各相対腫瘍体積（RTV）は公式 $RTV = V_t / V_0$ により算出され、 V_t は測定当日の腫瘍体積であり、 V_0 は一回目処理当日の腫瘍体積であった。テスト物又はコントロール対象の治療効果をT/C（%）と阻害%で示し、T/C（%）は、公式： $T/C (\%) = (\text{処理群の平均RTV} / \text{コントロール群の平均RTV}) \times 100\%$ を用い、阻害%は、公式： $\text{阻害}\% = 100\% - T/C\%$ を用いた。

【0149】

【表1】

表1. 実施例1の投与量レベルと群分け

群	n	処理	投与量	投与日程
1	6	ビヒクル	NA	1日おき
2	6	ビヒクル	NA	1日おき
3	6	MMC	5 mg/kg	1日目と16日目
4	6	rSIFN-co	0.15 mg/マウス	1日おき
5	6	rSIFN-co	0.15 mg/マウス	1日おき
6	6	rSIFN-co	0.15 mg/マウス	1日おき

【0150】

結果を表2と図1に示す。表2は、各処理群の0日目の初期腫瘍サイズ、21日目の最終腫瘍サイズ並びに算出された平均RTV、T/C%及び阻害%を示す。

【0151】

【表 2】

表 2. rSIFN-co のヒト肝臓癌 SMMC-7721 に対する活性

処理	TV (mm ³ , 平均値±SD) (D0)	TV (mm ³ , 平均値±SD) (D21)	RTV (平均値 ±SD)	T/C (%)	阻害%	P値
生理食塩水 (12 匹のマウス)	129±26	1172±302	9.36±3.9			
MMC	125±35	621±247	5.05±2.1*	52.82	47.18	p<0.05
0.15 mg rSIFN -co	123±20	505±226	4.13±1.9**	43.20	56.80	p<0.01
0.10 mg rSIFN -co	124±15	573±287	4.57±2.3*	47.80	52.20	p<0.05
0.05 mg rSIFN -co	124±26	592±139	4.97±1.7*	51.99	48.01	p<0.05

10

【0152】

表 2 は、r S I F N - c o がすべての 3 つのテスト投与量で活性を有し、且つヒト肝臓癌細胞の生長を効果的に阻害したことを示す。21 日目 (D 2 1) の平均 R T V は、ビヒクルコントロール群が 9. 3 6 ± 3. 9 であり、MMC 処理群が 5. 0 5 ± 2. 1 であり、0. 1 5 m g r S I F N - c o 処理群が 4. 1 3 ± 1. 9 であり、0. 1 0 m g r S I F N - c o 処理群が 4. 5 7 ± 2. 3 であり、且つ 0. 0 5 m g r S I F N - c o 処理群が 4. 9 7 ± 1. 7 であった。21 日目 (D 2 1) の阻害%は、MMC 処理群が 4 7. 1 8 % であり、0. 1 5 m g r S I F N - c o 処理群が 5 6. 8 0 % であり、0. 1 0 m g r S I F N - c o 処理群が 5 2. 2 0 % であり、且つ 0. 0 5 m g r S I F N - c o 処理群が 4 8. 0 1 であった。各処理群とビヒクルコントロール群との間の R T V 差異は統計学的に有意であると確定された。

20

【0153】

図 1 は、各処理群に対する 21 日間の研究期間で、ヌードマウスにおけるヒト肝臓癌 S M M C - 7 7 2 1 の生長進展 (R T V より表される) を示し、処理を開始してから 3、7、10、14、17 及び 21 日目の腫瘍測定結果を示す。結果は、7 日目の前に各 MMC 処理群と r S I F N - c o 処理群における腫瘍生長の遅延を示し、21 日目まで維持された。結果はさらに、より高い r S I F N - c o 投与量でより大きな阻害傾向を有することを示す。

30

【0154】

テスト物で処理した動物はいずれもテスト投与量に良く耐えられ、毒性又は体重軽減することはなかった。ビヒクル群、MMC 処理群、0. 1 5 m g r S I F N - c o 処理群、0. 1 0 m g r S I F N - c o 処理群及び 0. 0 5 m g r S I F N - c o 処理群の動物の平均体重 (グラムで) は 0 日目 (と 21 日目) でそれぞれ、2 2. 7 (2 4. 8)、2 3. 9 (2 5. 4)、2 3. 7 (2 5. 3)、2 4. 3 (2 6. 2)、及び 2 2. 6 (2 4. 4) であった。

40

【0155】

実施例 2. r S I F N - c o のヒト子宮頸癌に対する活性

H e l a 細胞をモデルとして本研究を行い、r S I F N - c o のヒト子宮頸腫瘍治療に対する活性と効力を実証した。結果より、r S I F N - c o が活性を有し、ヒト子宮頸癌細胞の生長を効果的に阻害したことを示す。特に説明したこと以外、実施例 1 のように該研究を行った。まず、実施例 1 と類似する方法で、ヌードマウスに 5×10^6 個の H e l a 細胞を皮膚下接種して、生長良好な異種移植物をヌードマウス中で 2 回継代し、ヒト子宮頸癌異種移植物を構築して調製した。その後、1. 5 m m³ の断片を作って、s. c. 方

50

式でテスト動物に移植した。動物の体重は投与初期の時、平均が 19 ± 2 g であった。実施例 1 に比べて、用いられる動物がいずれも雌性であった。各処理群の投与量や投与方案は実施例 1 と類似し、相違点は 0 日目で処理を開始してからの 1 と 13 日目に MMC を注射し、且つ研究を処理開始後に 28 日間続けた。

【0156】

結果は表 3 と図 2 に示される。表 3 は、算出された 0 日目と 28 日目の平均 TV、並びに算出された平均 RTV、T/C (%) 及び阻害%を示す。28 日目 (D28) の RTV は、ビヒクルコントロール群が 12.45 ± 4.46 であり、MMC 処理群が 4.97 ± 1.85 であり、0.15 mg rSIFN-co 処理群が 7.42 ± 1.91 であり、0.10 mg rSIFN-co 処理群が 6.64 ± 2.04 であり、0.05 mg rSIFN-co 処理群が 6.64 ± 1.60 であった。28 日目の阻害%は、MMC 処理群が 60.08% であり、0.15 mg rSIFN-co 処理群が 40.40% であり、0.10 mg rSIFN-co 処理群が 46.67% であり、0.05 mg rSIFN-co 処理群が 46.67% であった。MMC 処理群、0.15 mg rSIFN-co 処理群、0.10 mg rSIFN-co 処理群及び 0.05 mg rSIFN-co 処理群に対応する T/C (%) はそれぞれ 39.92%、59.60%、53.33% 及び 53.33% である。各処理群とビヒクルコントロール群との間の RTV 差異は統計学的に有意であると確定された。結果より、rSIFN-co はテスト動物におけるヒト子宮頸癌の生長を効果的に阻害したことを示す。

【0157】

【表 3】

表 3. rSIFN-co のヒト子宮頸癌 He1a 異種移植物に対する活性

処理	TV (mm ³ , 平均値±SD) (D0)	TV (mm ³ , 平均値±SD) (D28)	RTV (平均値± SD)	T/C (%)	阻害%	P値
生理食塩水 (12 匹のマウス)	138± 25	1720± 756	12.45±4.46			
MMC	130± 28	676± 358	4.97± 1.85**	39.92	60.08	p<0.01
0.15 mg rSIFN -co	136± 25	1025± 400	7.42± 1.91*	59.60	40.40	p<0.05
0.10 mg rSIFN -co	135± 28	865± 186	6.64±2.04**	53.33	46.67	p<0.01
0.05 mg rSIFN -co	135± 26	886± 232	6.64±1.60**	53.33	46.67	p<0.01

【0158】

図 2 は、28 日間の研究期間での各処理群の RTV 進展を示し、処理を開始してから 4、7、11、14、18、21、25 及び 28 日目に行われた腫瘍測定を反映する。結果より、7 日目の前に各 MMC 処理群と rSIFN-co 処理群におけるヒト子宮頸腫瘍生長の遅延を示し、28 日目まで維持された。

【0159】

研究中のすべての動物はいずれも rSIFN-co 処理に耐えられ、毒性現象がない。28 日間の処理期間で極小の平均体重変化が観察された。

【0160】

実施例 3. rSIFN-co のヒト結腸癌に対する活性

HT-29 をモデルとして本研究を行い、rSIFN-co のヒト結腸癌治療に対する活性と効力を実証した。結果より、rSIFN-co が活性を有し、ヒト結腸癌細胞の生長を効果的に阻害したことを示す。特に説明したこと以外、実施例 1 のように該研究を行っ

た。まず、実施例 1 と類似する方法で、ヌードマウスに 5×10^6 個の HT-29 細胞を皮膚下接種して、生長良好な異種移植物をヌードマウス中で 2 回継代し、ヒト結腸癌異種移植物を構築して調製した。その後、 1.5 mm^3 の断片を作って、s.c. 方式でテスト動物に移植した。動物の体重は投与初期の時、平均が $20 \pm 2 \text{ g}$ であった。実施例 1 に比べて、この研究に用いられる動物がいずれも雌性であった。各処理群の投与量や投与方案は実施例 1 に記載した通りであり、相違点は 1 日目と 10 日目に群 3 に対して MMC を投与し、且つ別途に群 7 を増加したことにより、群 7 において、各マウスを体積が 0.15 ml で投与量が 0.15 mg / マウスの IFN α -2b で処理し、rSIFN-co 処理群と同様に 1 日おきに行い、処理を計 4 週間実施した。濃度が 1.41 mg/ml の IFN α -2b は輝陽生命工程股份有限公司により提供された。結果を表 4 と図 3 中に示す。

【表 4】

表 4. rSIFN-co のヒト結腸癌 HT-29 異種移植物に対する活性

処理	TV (mm^3 , 平均値 $\pm$ SD) (D0)	TV (mm^3 , 平均値 $\pm$ SD) (D28)	RTV (平均値 $\pm$ SD)	T/C (%)	阻害%	P値
生理食塩水 (1 2匹のマウス)	131 ± 23	1107 ± 424	8.41 ± 2.82			
MMC (5 mg/ kg)	132 ± 22	395 ± 95	$3.12 \pm 1.19^{***}$	37.10	62.9	$p < 0.001$
rSIFN-co 0.15 mg	131 ± 36	570 ± 144	$4.51 \pm 1.25^{**}$	53.63	46.37	$p < 0.01$
rSIFN-co 0.10 mg	128 ± 39	541 ± 196	$4.22 \pm 0.87^{**}$	50.18	49.82	$p < 0.01$
rSIFN-co 0.05 mg	130 ± 26	416 ± 166	$3.28 \pm 1.25^{***}$	39	61	$p < 0.001$
IFN α -2b 0.15 mg	128 ± 44	831 ± 420	6.26 ± 1.43	74.44	25.56	$p > 0.05$

【0162】

表 4 は、算出された 0 日目の初期平均 TV と 28 日目の最終平均 TV、並びに算出された平均 RTV、T/C (%) 及び阻害%を示す。28 日目 (D28) の RTV は、ビヒクルコントロール群が 8.41 ± 2.82 であり、MMC 処理群が 3.12 ± 1.19 であり、 0.15 mg rSIFN-co 処理群が 4.51 ± 1.25 であり、 0.10 mg rSIFN-co 処理群が 4.22 ± 0.87 であり、 0.05 mg rSIFN-co 処理群が 3.28 ± 1.25 であり、IFN α -2b 処理群が 6.26 ± 1.43 である。28 日目の阻害%は、MMC 処理群が 62.9%であり、 0.15 mg rSIFN-co 処理群が 46.37%であり、 0.10 mg rSIFN-co 処理群が 49.82%であり、 0.05 mg rSIFN-co 処理群が 61%であり、IFN α -2b 処理群が 25.56%であった。MMC 処理群、 0.15 mg rSIFN-co 処理群、 0.10 mg rSIFN-co 処理群、 0.05 mg rSIFN-co 処理群及び IFN α -2b 処理群に対応する T/C (%) はそれぞれ 37.10%、53.63%、50.18%、39.00% 及び 74.44% であった。結果より、rSIFN-co が IFN α -2b よりもヒト結腸癌細胞の生長を効果的に阻害したことを示す。各処理群とビヒクルコントロール群との間の RTV 差異は統計学的に有意であると確定された。

【0163】

図 3 は 28 日間の研究期間で各処理群の RTV で表されるヒト結腸腫瘍生長に対する阻害を示し、処理を開始してから 3、7、10、14、17、21、24 及び 28 日目に行った腫瘍測定を反映する。結果より、7 日目の前に各 MMC 処理群と rSIFN-co 処

理群におけるヒト結腸腫瘍生長の遅延を示し、28日目まで維持された。3種の投与量のrSIFN-coはいずれもIFN α -2bよりも強い腫瘍生長阻害を引き起こした。

【0164】

実施例1及び2と同様に、すべてのrSIFN-coで処理した動物はいずれもテストの投与量に耐えられ、薬物毒性現象がなく、最小化の体重変化を示した。

【0165】

実施例4．rSIFN-coのヒト肺癌に対する活性

SPC-A4をモデルとして本研究を行い、rSIFN-coのヒト肺癌治療に対する活性と効力を実証した。結果より、rSIFN-coがヒト肺腫瘍生長に対して顕著な阻害を示し、且つrSIFN-coがIFN α -2bよりも遥かに効果的であった。特に説明したこと以外、実施例3のように該研究を行った。まず、実施例1と類似する方法で、テスト動物に注射するヒト異種移植物を構築して調製し、相違点はヌードマウスに 2.5×10^6 個のSPC-A4細胞を皮膚下(s.c.)接種して、生長良好な腫瘍をヌードマウス中で2回継代することであった。その後、 1.5 mm^3 の断片を作って、s.c.方式でテスト動物に移植した。動物の体重は投与初期の時、平均が $22 \pm 2 \text{ g}$ であった。実施例3に比べて、該研究に用いられる動物がいずれも雌性であり、且つ該研究は21日間の処理を行った。各処理群の投与量や投与方案は実施例3に記載した通りであり、相違点は1と6日目に群3に対してMMCを投与することにある。結果を表5と図4に示す。

【0166】

【表5】

表4．rSIFN-coのヌードマウスにおけるヒト肺癌SPC-A4異種移植物の成長に対する作用

処理	TV (mm ³ , 平均値 $\pm$ SD) (D0)	TV (mm ³ , 平均値 $\pm$ SD) (D21)	RTV (平均値 $\pm$ SD)	T/C (%)	阻害%	P値
生理食塩水 (12匹のマウス)	168 $\pm$ 42	7133 $\pm$ 2708	42.54 $\pm$ 2.82			
MMC (5 mg/kg)	166 $\pm$ 42	1831 $\pm$ 540	11.54 $\pm$ 4.37***	27.13	72.87	p<0.001
rSIFN-co 0.15 mg	169 $\pm$ 40	2284 $\pm$ 653	13.72 $\pm$ 3.96**	32.25	67.75	p<0.01
rSIFN-co 0.10 mg	168 $\pm$ 49	2388 $\pm$ 1544	14.91 $\pm$ 11.19**	35.05	64.95	p<0.01
rSIFN-co 0.05 mg	170 $\pm$ 41	2244 $\pm$ 1043	15.45 $\pm$ 9.07**	36.32	63.68	p<0.01
IFN α -2b 0.15 mg	191 $\pm$ 44	4908 $\pm$ 2433	27.84 $\pm$ 15.51	65.47	34.53	p>0.05

【0167】

図4は、21日間の研究期間における各処理群のRTVで表されるヌードマウスにおけるヒト肺腫瘍の生長阻害を示し、処理を開始してから4、7、11、14、18、と21日目に行った腫瘍測定を反映する。結果は、7日目の前に各MMC処理群とrSIFN-co処理群における腫瘍生長の遅延を示し、研究終了の21日目まで維持された。11日目になってはじめてIFN α -2b処理群中で腫瘍阻害が観察された。IFN α -2bによる腫瘍生長阻害はいずれのrSIFN-co処理群における腫瘍生長阻害よりも低く且つ統計学的に有意ではない(p>0.05)。したがって、rSIFN-coはIFN α -2bよりもヒト肺癌細胞の生長を効果的に阻害した。

【0168】

0.05mg rSIFN-co処理群における1匹のマウスが17日目に原因不明で死

亡した以外、実施例1～3と同様に、すべての動物はいずれもテスト物のテスト投与量に耐えられ、毒性又は体重軽減の現象が観察されなかった。

【0169】

実施例5. rSIFN-coは多種のヒト実体癌細胞生存率を減少した細胞培養と試薬。ヒト肺癌細胞系(A549、H1299、H460、Calu-1)、ヒト肝臓癌細胞系(SMMC-7721、Huh-7、CL-1)、ヒト子宮頸癌細胞系(Hela)、ヒト乳癌細胞系(MDA-MB-231)、ヒト前立腺癌細胞系(PANC-1)及びヒト結腸癌細胞系(SW620、HT29、SW480)はShanghai Cell Collection(中国上海)から購入された。以上の細胞系はいずれもShanghai Cell Collectionによる対応する完全生長培地で5% CO₂と37℃において培養され、該完全生長培地は10%熱失活胎児牛血清(Biochrom, Germany)を含有し、4mMグルタミン、50U/mlペニシリン及び50mg/mlストレプトマイシンが補充された。完全生長培地は、A549に対してF-12K(ロットGNM21127; 杭州吉諾生物医薬技術有限公司)、SW620とMDA-MB-231に対してL-15(ロット41300-039, GIBCO)、SMMC-7721、Hela、Huh-7、CL-1及びPANC-1に対してDMEM(ロットC11995, GIBCO)、H460、H1299及びSW480に対してRMP1-1640(ロットC11875, GIBCO)、HT-29に対してMacro5a(ロットM4892, Sigma)、Calu-1に対してDMEM+10%FBSであった。

【0170】

96ウェルプレートに対して100µlの完全培地中の約 5×10^3 個の細胞をウェル毎に入れ、徹夜インキュベートし、そしてそれぞれIFNα-2b又はrSIFN-coを用いて100µg/ml、50µg/ml、25µg/ml、12.5µg/ml、6.25µg/ml、3.13µg/ml、1.56µg/ml、0.78µg/ml、0.39µg/ml及び0.20µg/mlの濃度で約48時間処理し、そして細胞を収集して分析した。SunBio Am-Blue測定キット(Cat#: SBAB8025, Shanghai SBO Medical Biotechnology Co., Ltd, 中国上海)により細胞生存率を評価する。そのマニュアルに従って各ウェルに10µlのAm-Blueを添加した。その後、細胞を5% CO₂と37℃で4時間インキュベートする。96ウェルプレートを30秒振盪した後、Thermo Scientificプレートリーダー(Thermo Fisher Scientific, Inc., Lowell, MA)により570nmと595nm各ウェルの吸光率を読み取る。以下のように相対細胞生存率を算出する: 細胞生存率 = (処理群(OD₅₇₀ - OD₅₉₅) - 空白(OD₅₇₀ - OD₅₉₅)) / (コントロール群(OD₅₇₀ - OD₅₉₅) - 空白(OD₅₇₀ - OD₅₉₅)) × 100%、但し、コントロール群が対応の未処理細胞である。結果を図5に示し、腫瘍細胞の生存率は未処理のコントロール細胞に対する百分率として表される。各データ点は少なくとも2個の独立実験の平均値を表す。

【0171】

図5は、rSIFN-co又はIFNα-2b処理して癌細胞生存率を減少させる各癌細胞系(A)-(I)の投与量反応曲線を示す。(A) A549細胞; (B) Hela細胞; (C) CL-1細胞; (D) Huh-7細胞; (E) SW480細胞; (F) MDA-MB-231細胞; (G) Calu-1細胞; (H) SMMC-7721細胞; (I) PANC-1細胞。

【0172】

結果より、最高のテスト濃度(100µg/ml)でも、IFNα-2bがA549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、SW480細胞及びSMMC-7721細胞の生存率減少に対して効果が無いかほとんど効果がないことを示した。100mcg/ml(µg/ml)のIFNα-2bでHuh-7細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞及びPANC-1細胞を処理する時、50%未満の生存率減少が観察された。それに比

べて、 $rSIFN-c$ は遥かに低い投与量で、投与量に依存する形で腫瘍細胞生存率を減少でき、SW480細胞、MDA-MB-231細胞及びPANC-1細胞に対して、 $6.25\mu g/ml \sim 12.5\mu g/ml$ の濃度で50%に近い細胞生存率減少に達成でき、A549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、Calu-1細胞及びSMMC-7721細胞に対して、 $12.5\mu g/ml \sim 25\mu g/ml$ の濃度で50%に近い細胞生存率減少に達成できた。通常、 $rSIFN-c$ が細胞生存率を減少する IC_{50} は、異なる癌細胞に対して約 $10mcg/ml \sim 18mcg/ml$ の範囲内にある。 $100mcg/ml$ の $rSIFN-c$ で、いずれの癌細胞系に対しても細胞生存率が検出されなかった。したがって、各テスト濃度で、 $rSIFN-c$ はいずれも $IFN\alpha-2b$ よりも腫瘍細胞生存率を効果的に減少した。

10

【0173】

実施例6A. $rSIFN-c$ が $IFN\alpha-2b$ よりも細胞生存率を効果的に減少させる
 $rSIFN-c$ が細胞生存率を減少させる能力を実証するために、A549とSW620腫瘍細胞（ $100\mu l$ の完全培地中の 2×10^3 個の細胞をウェル毎に入れる）を96ウェルプレートに入れ、それぞれ $10\mu g/ml$ の $rSIFN-c$ 又は $IFN\alpha-2b$ で1～6日間処理した。標準MTT法（3-（4，5-ジメチル-2-チアゾリル）-2，5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド検出，Sigma，St. Louis，MO）により、細胞生存率を評価した。該検出について、各ウェルに約 $20\mu l$ のMTT（ $4mg/ml$ ）を加える。細胞を $37^\circ C$ で4時間インキュベートする。その後、丁寧に各ウェルの上澄み液を除去してから、各ウェルに同体積（ $150\mu l$ ）のジメチルスルホキシド（DMSO）を加えてクレードル上で徹底的に15分間混合した。Thermo Scientificプレートリーダー（Thermo Fisher Scientific Inc.，Lowell，MA）を用いて $595nm$ において96ウェルプレートの吸光度を読み取る。相対細胞生存率は以下のように算出される：細胞生存率 = （処理群（OD₅₉₅） - 空白（OD₅₉₅）） / （コントロール群（OD₅₉₅） - 空白（OD₅₉₅）） × 100%。

20

【0174】

結果は未処理のコントロール細胞に対する百分率として表される。各データ点は少なくとも2個の独立実験の平均値を表す。図6に示されるように、 $IFN\alpha-2b$ に比べて、 $rSIFN-c$ は時間に依存する形でSW620細胞の細胞生存率を激しく減少させるが、 $IFN\alpha-2b$ は有するとしても極弱い時間依存効果を有した。 $rSIFN-c$ の時間依存性効果はA549細胞に対して、処理の約最初の3日間で顕著であった。各細胞系に対して、各時間点で、 $rSIFN-c$ と $IFN\alpha-2b$ との間の効果差異が統計学的に有意であった（ $p < 0.01$ ）。これらデータは $rSIFN-c$ の時間依存性の強い抗腫瘍効果を示した。

30

【0175】

実施例6B. $rSIFN-c$ がインビボで腫瘍生長を阻害する

NIH実験動物の管理と使用ガイドにより該実験を行った。4～5週齢の雌性BALB/cヌードマウスは上海実験動物センター（中国上海）より得られた。約 5×10^6 個のA549細胞を各マウスに皮膚下注射して異種移植腫瘍を移入した。動物をランダムに3群（各群8匹のマウス）に分け、PBS（1XPBS， $pH 7.2-7.4$ ）、各マウス $100\mu g/100\mu l$ の $rSIFN-c$ 又は各マウス $100\mu g/100\mu l$ の $IFN\alpha-2b$ で一日おきに腫瘍内処理を計12回行った。3日間毎に一回腫瘍を測定し、腫瘍体積は以下のように算出される：腫瘍体積（ mm^3 ） = （長さ × 幅²） / 2。結果を図16に示す。データは平均値 ± SD（ $n = 8$ ）として表される。結果より、PBS処理群に比べて、 $rSIFN-c$ は移入した腫瘍の生長をほとんど完全に阻害できることを実証した（ $p < 0.0001$ ）。しかし、 $IFN\alpha-2b$ は腫瘍生長に対する顕著な阻害を示さなかった。結果より、インビボで腫瘍生長を阻害する面では、 $rSIFN-c$ は $IFN\alpha-2b$ よりも有効であることを実証した。

40

【0176】

50

実施例6C. *rSIFN-co*は三次元培養体系における腫瘍細胞のコロニー形成と偽足形成を阻害する

Matrigel (BD Corporation, Cat#: 356234) を4℃冷蔵庫で氷の上で徹夜解凍し、24ウェルプレートを一20℃で徹夜冷凍した。その後、150μlの1.0mg/mlの*Matrigel*で冷凍した24ウェルプレートの各ウェルを塗布した。その後、*Matrigel*が塗布された24ウェルプレートを37℃で20-30分間インキュベートした。肺癌細胞A549をトリプシン化してカウントする。*Matrigel*が塗布されたウェルに、2%*Matrigel*及び10mcg/mlのIFNα-2b又は*rSIFN-co*を含有する又はコントロールとしてのインターフェロンを含有しない馴化培地 (Conditioned medium) における約5×10³個の細胞を接種した。これら細胞を37℃で少なくとも約8日間インキュベートする。3日間毎に一回約200μlの上記の馴化培地を添加し、培地が乾かすのを防止する。4日目又は8日目に、写真を撮ってコロニーのサイズと偽足形成を観察した。実験は3群並行して行った。

【0177】

結果を図7に示す。4日間後、*rSIFN-co*処理群 (図7C) は未処理群 (図7A) よりも小さいコロニーを有することを発見した。8日後、*rSIFN-co*処理群は3群のうち最小のコロニーを有するだけではなく、細胞の周囲にはほとんど突出する偽足がないことも発見し (図7C、第2と3行)、未処理群 (図7A、第2と3行) とIFNα-2b処理群 (図7B、第2と3行) の細胞において、偽足形成が顕著である。該実験は、*rSIFN-co*が癌細胞コロニーの生長を阻害できるだけではなく、癌細胞における偽足形成 (転移に必須な特徴) も阻害できることを証明した。

【0178】

実施例7. *rSIFN-co*のβ-カテニン/TCFの転写活性に対する阻害

β-カテニン/TCF転写レポーターシステムテスト。*rSIFN-co*のWnt/β-カテニンシグナル伝達に対するインビトロ作用を測定した。癌細胞を96ウェルプレートに入れ (ウェル毎に1×10⁴個の細胞)、12時間インキュベートし、そして100ng TOPFlash (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) で瞬時トランスフェクションを行った。トランスフェクション効率を標準化するために、細胞を1ngのSV40プロモーターに駆動される内部コントロールレポーターウミシイタケルシフェラーゼpRL-SV40 (Promega, Madison, WI, USA) でコトランスフェクションし、そして10mcg/mlインターフェロン*rSIFN-co*又はIFNα-2bで6時間処理する又はトランスフェクションした後に処理せずにコントロール (Mock) とする。インターフェロンで24時間処理した後、メーカーのマニュアル (Cat#: E1960, Promega) に従って、デュアルルシフェラーゼエッセイシステムキットでルシフェラーゼ検測を行った。相対ルシフェラーゼ活性はホタルルシフェラーゼ活性/ウミシイタケルシフェラーゼ活性の比率として表される。実験は3群並行して行った。

【0179】

図8に示されるように、結果より、*rSIFN-co*はヒト実体癌細胞におけるβ-カテニン/TCF媒介の転写活性を減少することを示した。24時間処理した後、3種の肺癌細胞 (A549、H1299、H460) と2種類の結腸癌細胞 (HT-29、SW620) において、β-カテニン/TCF媒介の転写活性は著しく*rSIFN-co*に阻害されていた (* , p<0.05 ; ** , p<0.01) 。しかし、A549細胞、H1299細胞、H460細胞及びHT-29細胞に対して、IFNα-2bは阻害作用を有せず、反って増強作用をもたらした。

【0180】

簡単に言えば、コントロール群、IFNα-2b処理群及び*rSIFN-co*処理群におけるホタルルシフェラーゼ活性/ウミシイタケルシフェラーゼ活性の比率はそれぞれ: (A) A549細胞に対して約310、約350及び約100であった; (B) H1299

細胞に対して約800、約1000及び約500であった；(C) H460細胞に対して約450、約500及び約280であった；(D) HT-29細胞に対して約300、約600及び約200であった；(E) SW620細胞に対して約1500、約1200及び約100未満であった。該研究より、Wnt/TCFシグナル伝達を阻害する面では、rSIFN-coはIFN α -2bより優れているため、その抗腫瘍効果もより優れている。

【0181】

実施例8. rSIFN-coが癌細胞における β -カテニンの蛋白レベルを減少させる
癌細胞A549とSw480を約85%の集密度まで培養して6ウェルプレートに入れた。細胞をそれぞれ10mcg/ml IFN α -2b又はrSIFN-coで24時間、
48時間又は72時間処理し、又は処理せずにコントロール(Mock)とした。処理後、細胞を収集してウエスタンブロットし、その特異性抗体で β -カテニンの蛋白レベルを検測し、GAPDHを内因性ローディングコントロールとする。実験は3群並行して繰り返した。

【0182】

ウエスタンブロット分析。多種の蛋白の発現を確定するために、6ウェルプレートから細胞を収集し、メーカーのマニュアル(Beyotime, China)に従って抽出試薬(Cat#: P0013)で細胞全蛋白を抽出した。Lowry蛋白測定キット(Bio-Rad, USA)により全蛋白濃度を測定する。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により、10%~12%のゲル上で全蛋白を分離し、それを0.22又は0.45 μ mのPVDF膜上(Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)に転移した。5%脱脂乳、牛血清白蛋白、10mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、150mmol/L NaCl及び0.05% Tween20で、4℃で膜を徹夜ブロッキングした。その後、ブロッキングされた膜と一次抗体(1:1000に希釈)とをインキュベートし、そしてHRP結合の二次抗体とともにインキュベートした。冷光/蛍光イメージングLAS4000システム(GE Healthcare Life Sciences, USA)とsuper signal west pico化学発光基質キット(Thermo Scientific, USA)を用いてブロットを可視化した。

【0183】

本研究では、使用される一次抗体はマウスモノクローナル β -カテニン抗体(1:1000; Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA)とマウスモノクローナルGAPDH抗体(1:2000)(Kangwei Biotechnology, China)である。抗マウスHRP結合の二次抗体(Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA)を1:2000の濃度で使用した。図10に示される結果より、A549細胞について、2日間(48時間)処理した後、rSIFN-coは β -カテニンの蛋白レベルを大幅に減少させたことを示した。これら細胞について、3日間(72時間)処理した後、さらなる減少が観察された。SW480細胞における β -カテニンの蛋白レベル減少は、rSIFN-coで72時間処理した後に顕著となった。肺癌A549細胞と結腸癌SW480細胞中において、 β -カテニンのダウンレギュレーションは明らかに時間依存性であった。それに比べて、IFN α -2bは何らの顕著な β -カテニンレベルの減少も引き起こさず、それが β -カテニンのダウンレギュレーションには作用がないことを示した。

【0184】

実施例9. rSIFN-coはWnt経路媒介の標的遺伝子の転写ダウンレギュレーションを引き起こす

肺癌A549細胞を6ウェルプレートに接種し、それぞれ10 μ g/mlのIFN α -2b又はrSIFN-coで処理し、又は処理せずにコントロール(Mock)とした。24時間処理した後、TRIzol試薬で細胞全mRNAを分離し、cDNAを合成し、4種のWntシグナル伝達下流遺伝子Axin2、CD24、サバイビン及びID2の特異

10

20

30

40

50

性プライマーでさらにqPCRを行った。実験は3群並行して行い、Mock群で標準化した。

【0185】

定量PCR (qPCR) 分析。メーカーの取り扱い説明書に従ってTRIzol試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて全mRNAを分離した。メーカーの取り扱い説明書に従ってRT-PCRキット (Cat#: FSQ-101, TOYOBO, Japan) を用いて相補DNA (cDNA) を合成した後、SYBR Green PCRキット (Cat#: QPK-201, TOYOBO, Japan) を用いてqPCRを行った。4種のWnt経路標的遺伝子のプライマーは、Axin2センスプライマー: 5'-CGTGGATACCTTAGACTT-3' (配列番号8) とアンチセンスプライマー: 5'-GCTGTTGTTCTCAATGTA-3' (配列番号9); CD24センスプライマー: 5'-TGAAGAACAATGTGAGAGGTTTGAC-3' (配列番号10) とアンチセンスプライマー: 5'-GAAAACTGAATCTCCATTCCACAA-3' (配列番号11); サバイビンセンスプライマー: 5'-ACCGCATCTCTACATTCAAG-3' (配列番号12) とアンチセンスプライマー: 5'-CAGTCTGGCTCGTTCCTC-3' (配列番号13) 及びID2センスプライマー: 5'-CACAAACAACAACAACAAC-3' (配列番号14) とアンチセンスプライマー: 5'-CACAGTCCAAGTAAGAGA-3' (配列番号15) であった。

【0186】

増幅プロトコールは、95℃で1分間インキュベートし、40サイクル (95℃15秒, 60℃15秒, 72℃30秒) を含んだ。Bio-Rad検測システムを用いて、リアルタイムでSYBR Green染料がPCR産物に結合する状況をモニターし、そしてBio-Rad CFX manager 2.1ソフトウェアで分析した。各条件についてサンプルを集め、2群並行して行う。2- $\Delta\Delta C_t$ 法により処理したサンプルとMockを比較し、倍率変化でプロットした。GAPDHを標準化コントロールとして用いた。

【0187】

図11に示す結果より、rSIFN-coはWnt経路媒介の標的遺伝子Axin2、CD24、サバイビン及びID2のダウンレギュレーションを引き起こす。rSIFN-co処理後に、これら遺伝子のmRNAレベルが顕著に減少するが、IFN α -2b処理後に顕著に減少していない。

【0188】

簡単に言えば、Mockコントロールの相対発現レベルを1とすると、Axin2遺伝子 (図11A) は、IFN α -2b処理によって1よりやや高いレベルが得られたが、rSIFN-co処理によって約0.4のレベル ($p < 0.0001$, rSIFN-co処理と未処理とを比較する) が得られた。Mock未処理細胞、IFN α -2b処理細胞及びrSIFN-co処理細胞について、CD24遺伝子の相応レベル (図11B) はそれぞれ1、約0.9及び約0.4 ($p < 0.0001$) であり、サバイビン遺伝子の相応レベル (図11C) はそれぞれ1、約0.9及び約0.4 ($p < 0.0005$) であり、ID2遺伝子の相応レベル (図11D) はそれぞれ1、約1及び約0.4 ($p < 0.0001$) であった。

【0189】

実施例10. rSIFN-coは異なる細胞におけるWnt関連受容体若しくは共受容体LRP6/FZD6のmRNAレベルをダウンレギュレーションできる

rSIFN-coのLRP6/FZD6に対する調節を研究した。実施例9に行われた通り、qPCRにより本実施例を実施した。癌細胞A549、H460、SW620及びHT-29を6ウェルプレートに接種し、10 μ g/mlのIFN α -2b又はrSIFN-coで処理する又は処理せずにコントロール (Mock) とした。24時間処理した後、TRIzol試薬で細胞全mRNAを分離し、LRP6とFZD6の特異性プライマーを用いてcDNAに対してqPCRを行う。使用されるプライマーは、LRP6センスプライマー: 5'-TGAAGAACCAGCACCAAGG-3' (配列番号4) とアン

チセンスプライマー：5' - C A T A A C C A A G A G G C A C A G A A G C - 3' (配列番号5)、及びFZD6センスプライマー：5' - G C G G A G T G A A G G A A G G A T T A G T C - 3' (配列番号6)とアンチセンスプライマー：5' - T G A A C A A G C A G A G A T G T G G A A C C - 3' (配列番号7)である。実験は3群並行して行い、mockコントロール群で正規化した。結果は、LRP6又はFZD6のGAPDHに対する相対mRNAレベルとして記録された。

【0190】

図9に示される結果より、4種の癌細胞系において、rSIFN-coはLRP6とFZD6を異なる程度でダウンレギュレーションさせたことを示した。図9Aは、rSIFN-co処理後にA549細胞 ($p < 0.005$)、SW620細胞 ($p < 0.005$) 及びHT-29細胞 ($p < 0.005$) におけるLRP6 mRNAの相対発現は顕著に著減少したが、IFN α -2b処理では顕著な減少が観察されなかったことを示した。図9Bは、rSIFN-co処理後にすべての4個の細胞系A549 ($p < 0.001$)、H460 ($p < 0.0005$)、SW620 ($p < 0.001$) 及びHT-29 ($p < 0.0005$) においてFZD6 mRNAの相対発現が顕著に減少したことを示した。他のインターフェロンIFN α -2bは、HT-29細胞におけるFZD6 mRNAの発現を増強させる一方、A549細胞、H460細胞及びSW620細胞において、rSIFN-coと同じ程度に達していないが、FZD6 mRNAの発現をある程度減少させた。結果より、rSIFN-coによるWntシグナル伝達経路の阻害は、Wnt関連の細胞表面受容体LRP6とFZD6の発現が阻害されることにより引き起こされた可能性があることを示す。rSIFN-coは、テストされるヒト癌細胞(例えばヒト肺癌細胞とヒト結腸癌細胞)において、 β -カテニン/TCF媒介の転写活性と β -カテニン蛋白レベル及びWntシグナル伝達経路関連受容体、共受容体並びに標的遺伝子に対するダウンレギュレーションを含むWnt経路を阻害する面では、インターフェロンIFN α -2bより優れていた。

【0191】

実施例11. rSIFN-coが腫瘍阻害遺伝子の発現をアップレギュレーションする
本研究ではrSIFN-coの腫瘍阻害遺伝子に対するアップレギュレーション作用を実証した。癌細胞A549、H460、SW620及びHT-29を6ウェルプレートに接種し、10mcg/mlのIFN α -2b又はrSIFN-coで処理する又は処理せずにMockコントロールとする。24時間処理した後、TRIZOL試薬で細胞全mRNAを分離し、cDNAを合成し、DKK3、KLF4とBATF2の特異性プライマーを用いてさらにqPCRを行った。BATF2に対して、センスプライマー5' - C A G A G C A G G G A G C A C A A A C C - 3' (配列番号16)とアンチセンスプライマー5' - T G A G C A G A G G A G A G C A G A G G - 3' (配列番号17)を使用し、DKK3に対して、センスプライマー5' - G G A G C C T G A C T G A A G A G A T G G - 3' (配列番号18)とアンチセンスプライマー5' - A C G C C T A A A G C A C A C A C C T G - 3' (配列番号19)を使用し、KLF4に対して、センスプライマー5' - C C T T C A A C C T G G C G G A C A T C A A C - 3' (配列番号20)とアンチセンスプライマー5' - G G C T G C T G C G G C G G A A T G - 3' (配列番号21)を使用した。

【0192】

実験は3群並行して行い、mockコントロール群で正規化した。図12に示される結果はGAPDHと比較する相対mRNA発現レベルとして表された。A549細胞に対して、rSIFN-co処理はすべての3種の腫瘍阻害遺伝子DKK-3 (図12A)、BATF2 (図12B) 及びKLF4 (図12C) の発現を大幅に増大させ、IFN α -2bよりも遥かに有効であった。SW620細胞において、コントロールとIFN α -2b処理に比べて、rSIFN-co処理後にKLF4発現のアップレギュレーションも大幅に増加した。IFN α -2b処理はH460細胞におけるDKK-3の発現を顕著に増加した。

【0193】

10

20

30

40

50

実施例 12. rSIFN-co が癌細胞転移を阻害する

IFN α -2b 又は rSIFN-co で 24 時間処理（未処理のコントロール（Mock）に比べる）した後、肺癌 A549 細胞と結腸癌 SW620 細胞が微孔膜を通して転移する能力を確定することで、rSIFN-co の腫瘍細胞転移を阻害する能力を実証した。24 ウェルプレートにおいて 8 μ m 細胞培養インサート式セル（Becton-Dickinson Biosciences, NJ, USA）で細胞転移テストを行う。FBS を含有しない温熱（37℃）炭酸水素塩類培地をインサート式セルの内部及びウェルの底部に加え、加湿された組織培養インキュベーターにおいて 37℃、5% CO₂ 雰囲気です約 2 時間復水した。復水した後、注意深く培地を除去した。その後、500 μ l の FBS を含有しない培地に混合懸濁する調製細胞（10 μ g/ml IFN α -2b 又は 10 μ g/ml rSIFN-co で処理した後、又は完全に処理していない）を 0.5×10^4 細胞/インサート式セルの密度でインサート式セルのフィルターの上部に接種した。24 ウェルプレートの下室に 500 μ l の 10% FBS 含有完全培地を入れた。通常の培養条件で 37℃において 24 時間過ぎた後、室膜上部の非転移細胞を綿棒で除去した。培養セルの下部を 4% パラホルムアルデヒドで固定して 2% クリスタルバイオレットで染色する。3 群の並行ウェルのそれぞれにおいて、細胞が入れている室膜の反対側における転移細胞数をカウントする。各実験を少なくとも 2 回繰り返し、毎回 3 群の並行ウェルを使用した。

【0194】

図 13 に示される結果は、Mock、IFN α -2b 処理細胞及び rSIFN-co 処理細胞のそれぞれの単位領域における転移細胞の平均数を示す。膜を通して転移した A549 細胞について、未処理の Mock 群では約 30 個の細胞/領域が観察され、IFN α -2b 群では約 110 個の細胞が観察され、rSIFN-co 処理群では約 10 個の細胞が観察された。IFN α -2b 処理による転移増強と rSIFN-co 処理による転移阻害が統計学的に有意であった（ $p < 0.01$ ）。SW620 細胞を用いる時にも rSIFN-co による顕著な阻害が観察された。これに対して、IFN α -2b 処理は SW620 細胞における腫瘍細胞転移を増加させた。したがって、rSIFN-co は腫瘍細胞転移を効果的に阻害し、IFN α -2b よりも遥かに有効である。

【0195】

実施例 13. rSIFN-co は細胞アポトーシス経路により作用を果たしたのではない
本研究は、rSIFN-co は細胞アポトーシス経路以外の経路により腫瘍細胞生存率を減少させる作用を果たすことを示すために行われた。腫瘍細胞 A549 と SW620 を 6 ウェルプレートに入れ、徹夜インキュベートしてから 10 mcg/ml の IFN α -2b 又は 10 mcg/ml の rSIFN-co 又は 5 FU で 24 時間又は 48 時間処理する、又は処理しない（Mock コントロールとする）。その後、ウエスタンブロットにより細胞アポトーシス関連の分子標記物をモニターする。使用される一次抗体は、マウスモノクローナル β -チューブリン抗体（1:2000, Cat#: CW0098A）とマウスモノクローナル GAPDH 抗体（1:2000, Cat#: CW0100A）（Kangwei Biotechnology, China）；マウスモノクローナル PARP 抗体（1:1000, Cat#: sc-2007, Santa Cruz Biotechnology, Inc.）；ウサギモノクローナルプロカスペーゼ-3 抗体（1:1000, Cat#: 9665）とウサギポリクローナル切断したカスパーゼ-3 抗体（1:1000, Cat#: 9661）（Cell Signaling Technology, USA）；ヤギポリクローナルプロカスペーゼ-8 抗体（1:1000, Cat#: sc-6136, Santa Cruz Biotechnology, Inc.）；ウサギモノクローナル切断したカスパーゼ-8 抗体（1:1000, Cat#: 9496）（Cell Signaling Technology, USA）であった。

【0196】

A549 細胞の結果を図 14 A に示し、SW620 細胞の結果を図 14 B に示す。ウエスタンブロットは、5 FU（既知の細胞アポトーシスを招く薬物）で処理した後、細胞のプ

10

20

30

40

50

ロカスパーゼ-3、プロカスパーゼ-8及びPARPレベルは顕著な減少を示すが、切断したカスパーゼ-3と切断したカスパーゼ-8はレベル増加を示した。それに対して、インターフェロンIFN α -2b又はrSIFN-coはいずれも、プロカスパーゼ-3、プロカスパーゼ-8又はPARPレベルを減少させず、切断したカスパーゼ-3又は切断したカスパーゼ-8レベルを増加させなかった。したがって、結果より、この2種類のインターフェロン、特にrSIFN-coは、細胞アポトーシス以外の異なるメカニズムにより腫瘍細胞生存率を減少させる可能性がある。

【0197】

実施例14. rSIFN-coがSTATリン酸化を引き起こす

該実験は、rSIFN-coはIFN α -2bと同様にJAK/STATシグナル伝達経路を利用することを示すために行われた。本研究において、A549細胞とHela細胞とをそれぞれ3.3cmの皿に入れ、37℃で徹夜インキュベートし、そしてそれぞれ10 μ g/mlのIFN α -2b又はrSIFN-coで0、5、15、30、60、120及び240分間処理した。処理後、細胞を収集し、細胞蛋白を抽出してSDS-PAGEアガロースにロッドし、ウエスタンブロット分析を行うことにより、STAT1 (Tyr701)、STAT2 (Tyr690) 及びSTAT3 (Tyr705) のリン酸化を観察する。GAPDHをロッキングコントロールとした。

【0198】

使用される一次抗体は、STAT1 (1:1000, Cat#:9175S)、Tyr701リン酸化-STAT1 (1:1000, Cat#:9167S)、STAT2 (1:500, Cat#4594)、Tyr690リン酸化-STAT2 (1:1000, Cat#:441S)、STAT3 (1:1000, Cat#:9132)、Tyr705リン酸化-STAT3 (1:1000, Cat#:9145S) である。抗マウス (Cat#:sc-2005) 又は抗ウサギ (Cat#:sc-2004) 又は抗ヤギ (Cat#:sc-2020) HRP-結合の二次抗体 (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA) を1:2000の濃度で使用した。冷光/蛍光イメージングLAS4000システム (GE Healthcare Life Sciences, USA) とsuper signal west pico化学発光基質キット (Thermo Scientific, USA) を用いてプロットを可視化した。

【0199】

図15に示される結果より、この2種類のインターフェロン、即ち、IFN α -2bとrSIFN-coは、A549細胞とHela細胞中でSTAT1、STAT2とSTAT3リン酸化パターンにおいて似たような挙動を示す。したがって、rSIFN-co媒介のJAK/STATシグナル伝達レベルとIFN α -2b媒介のJAK/STATシグナル伝達レベルとは差異がなく、rSIFN-coとIFN α -2bは共通なIFNAR1/2受容体をシェアする可能性があることを示唆した。

【0200】

実施例15. rSIFN-coのIFNAR1及びIFNAR2への結合親和性

表面プラズモン共鳴技術に基づき、Biacore T100蛋白質相互作用アレイシステム (General Electric HealthCare Co.) を使用してIFN α -2bとrSIFN-coのIFNAR1-EC (Cata:13222-H08H, Sino Biological Inc) 又はIFNAR2-EC (Cata:10359-H08H, Sino Biological Inc) への結合親和性を測定した。受容体サブユニットを固定するために、20 μ g/mlのIFNAR1-ECサブユニット及び50 μ g/mlのIFNAR2-ECサブユニットをそれぞれCM5センサーチップとともにインキュベートし、蛋白質中のアミノ基を介してチップのカルボキシル化デキストラン表面に結合させた。そして、2種のテストするインターフェロンを異なる濃度でリガンドに垂直注射し、IFN α -2b/IFNAR1結合は100~3,000nMの範囲にあり、rSIFN-co/IFNAR1結合は50~1,000nMの範囲にあり、IFN α -2b/IFNAR2結合及びrSIFN-co/IFNAR2結合

10

20

30

40

50

は3.125～80 nMという別の範囲にあり、IFNs／IFNAR2結合期間中、再生された2M NaCl緩衝液を加えて5秒間の再活性化手順を継続させた。メーカーのマニュアルに従ってデータを分析した。式 $K_D = k_d / k_a$ （d：解離；a：結合）に基づいてレート定数から解離定数 K_D を確定した。

【0201】

図17はrSIFN-coとIFN α -2bの異なる受容体結合親和性を示した。この実験条件では、定常分析モデルにより分析してIFNAR1インターフェロン受容体の親和定数： K_D （IFNAR1-EC／rSIFN-co）： $6.003 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ； K_D （IFNAR1-EC／IFN α -2b）： $2.835 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ （図17A）を得ることができ、動的分析モデルにより分析してIFNAR2インターフェロン受容体の親和定数： K_D （IFNAR2-EC／rSIFN-co）： $2.192 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ ； K_D （IFNAR2-EC／IFN α -2b）： $1.843 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ （図17B）を得ることができ、それらの親和定数の比較結果について、IFN α -2bに比べて、rSIFN-co／IFNAR1はより強い結合親和性を示す（4.72倍）（図17C）が、IFN α -2bに比べて、rSIFN-co／IFNAR2は11.9倍のより弱い結合親和性を示す（図17C）。

【0202】

実施例16．癌細胞において、B18R予備処理後、rSIFN-coはIFN α -2bよりも高いp-STATsを引き起こす

本研究では、A549とHeLa細胞を徹夜インキュベートした。培地において10倍連続希釈した（1、10及び100 ng/ml，最終の測定濃度）B18R組換え蛋白（ワクシニアウイルスでコードされた中和I型インターフェロン受容体，I型インターフェロン阻害剤とも呼ばれる，Cat#：14-8185，eBioscience，Inc）を調製したとともに、室温で一定量（1 ng/ml，最終の測定濃度）の各種IFN蛋白（IFN α -2bとrSIFN-co）を1時間混合した。B18R／IFN複合物で上記2種の細胞を処理して30分間インキュベートした。そして、細胞溶解物を集め、ウェスタンブロットによってSTAT1（Tyr701）、STAT2（Tyr690）及びSTAT3（Tyr705）のリン酸化を検出した。GAPDH及びアクチンをロッキングコントロールとした。

【0203】

使用される一次抗体はSTAT1（1：1000，Cat#：9175S）（Cell Signaling Technology，USA）、Tyr701リン酸化-STAT1（1：1000，Cat#：9167S）（Cell Signaling Technology，USA）、STAT2（1：500-1：1000，Cat#4594）（Cell Signaling Technology，USA）、Tyr690リン酸化-STAT2（1：500-1：1000，Cat#：441S）（Cell Signaling Technology，USA）、STAT3（1：1000，Cat#：9132）（Cell Signaling Technology，USA）、Tyr705リン酸化-STAT3（1：1000，Cat#：9145S）（Cell Signaling Technology，USA）、GAPDH（Cat#：CW0100A，Kangwei biotech，Inc）、 β -アクチン（Cat#：CW0096，Kangwei biotech，Inc）であった。

【0204】

図18に示すように、A549細胞（図18A）及びHeLa細胞（図18B）において、10 ng/mlの阻害剤B18Rの存在下で、IFN α -2b群に比べて、rSIFN-coはSTAT1／2／3リン酸化に対するより高い誘導を示す。

【産業上の利用可能性】

【0205】

本文に述べた方法と測定キットは、テスト化合物、例えばインターフェロンの効力の確定に用いられ、且つ β -カテニン又はLRP6、FZD6、Axin2、CD24、サバイ

10

20

30

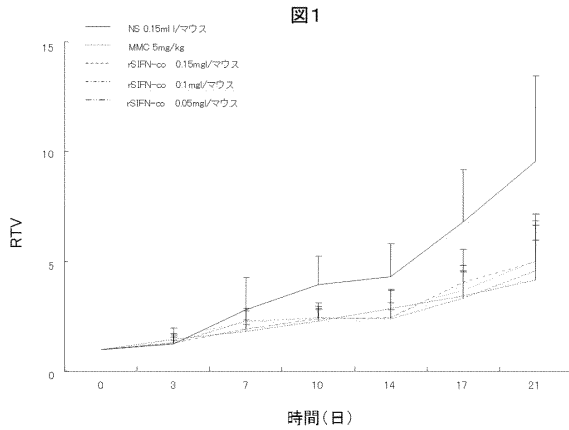
40

50

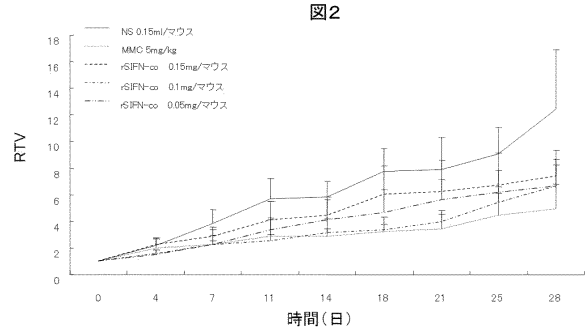
ピン及びID 2のうちいずれか1種又は多種の過度活発又は過度発現、又はDKK 3、BATF 2、あるいはKLF 4のダウンレギュレーションにより、不利な影響を受ける疾病又は病症の治療に用いられる。

【図面】

【図 1】

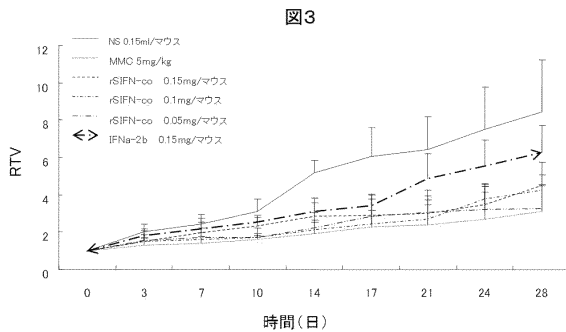


【図 2】

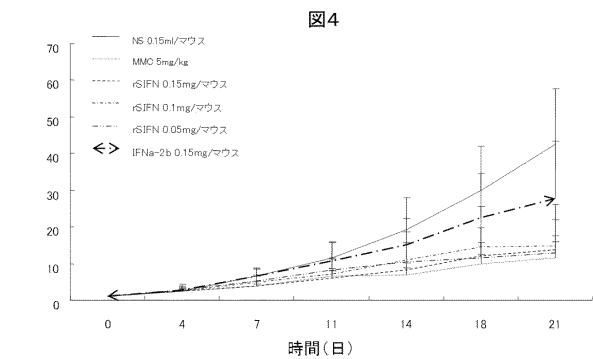


10

【図 3】



【図 4】



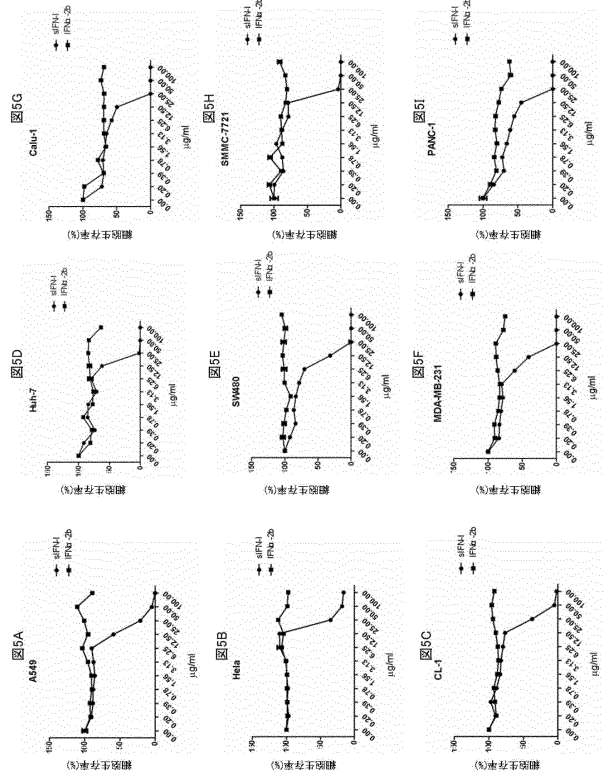
20

30

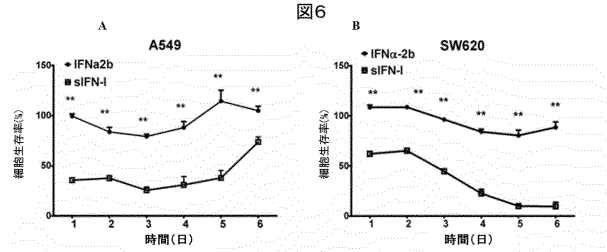
40

50

【図 5】



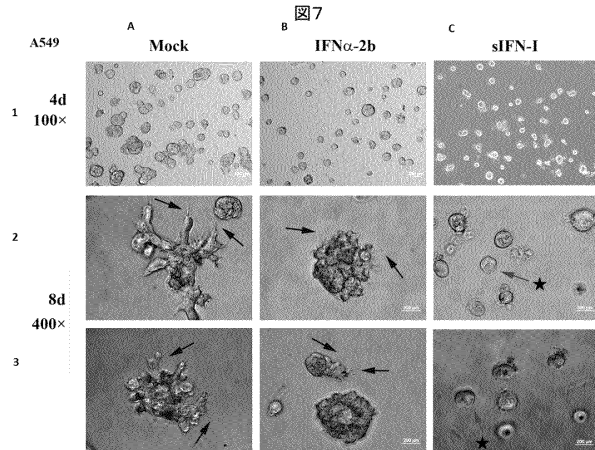
【図 6】



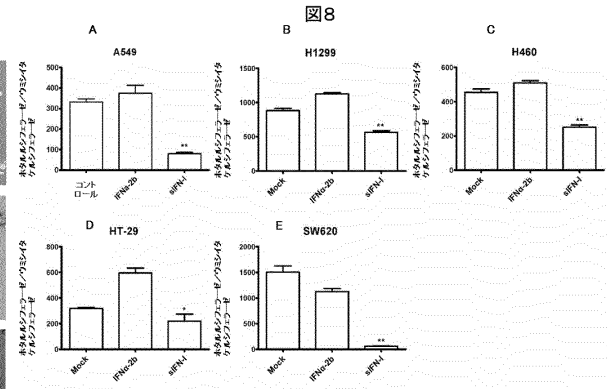
10

20

【図 7】



【図 8】

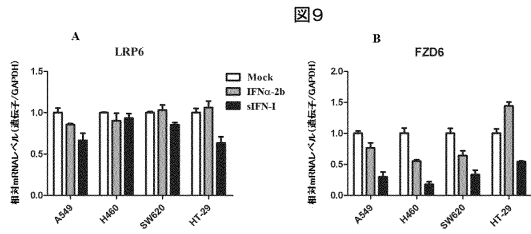


30

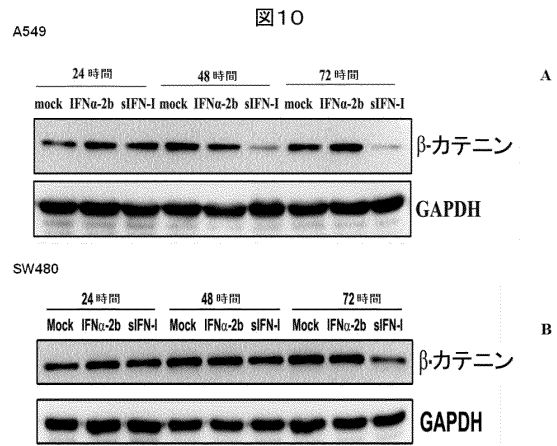
40

50

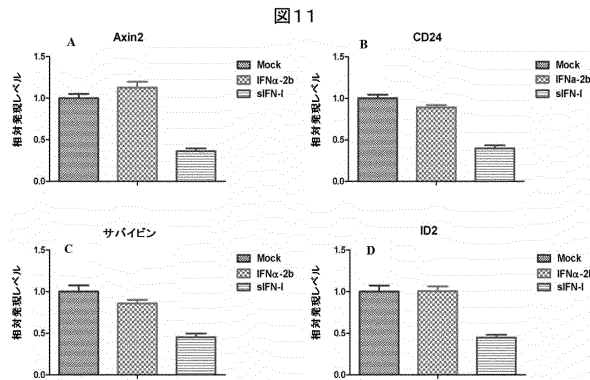
【図 9】



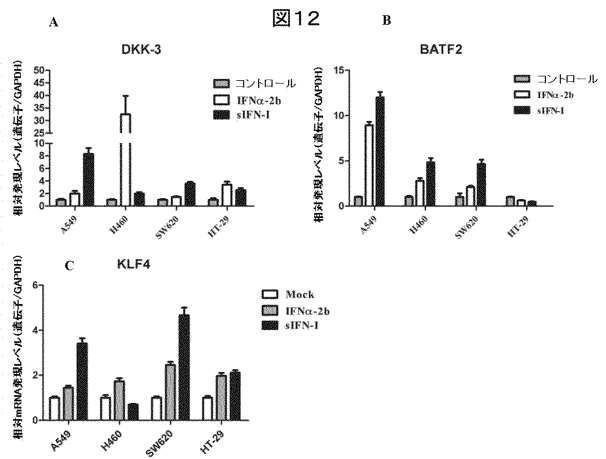
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

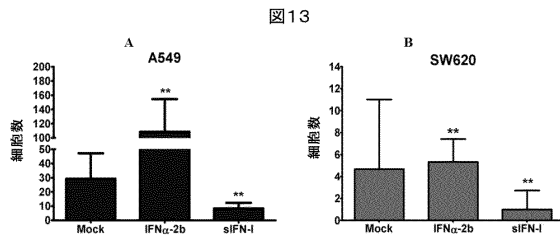
20

30

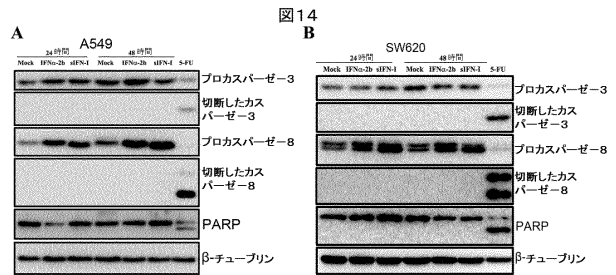
40

50

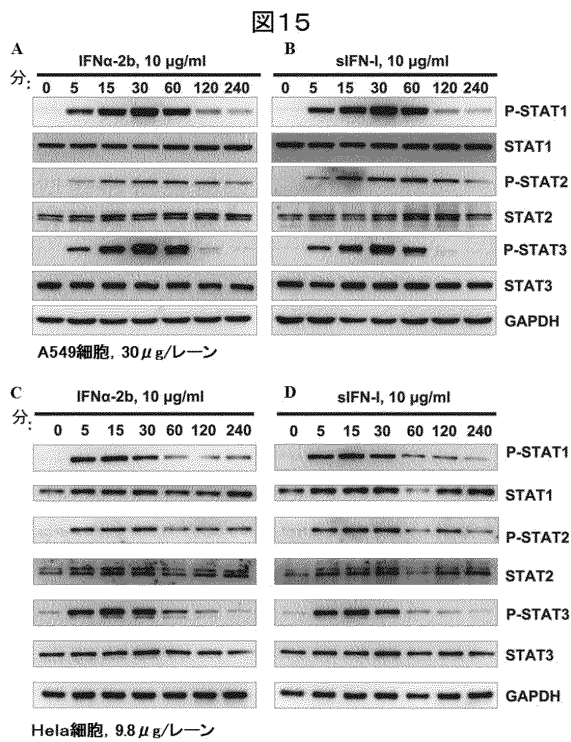
【図 13】



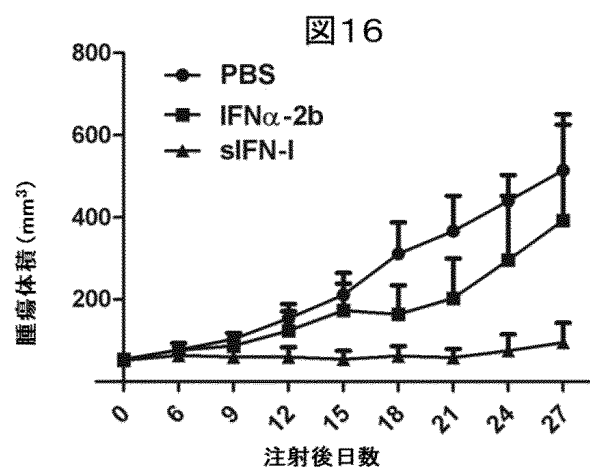
【図 14】



【図 15】



【図 16】



10

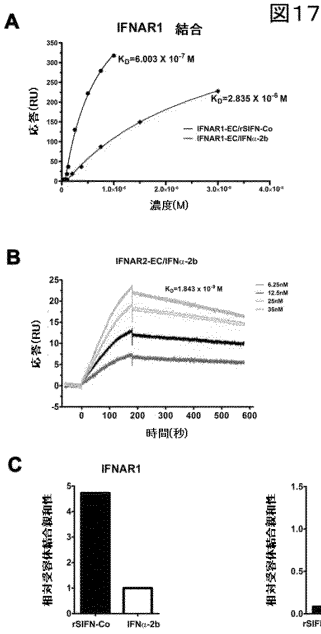
20

30

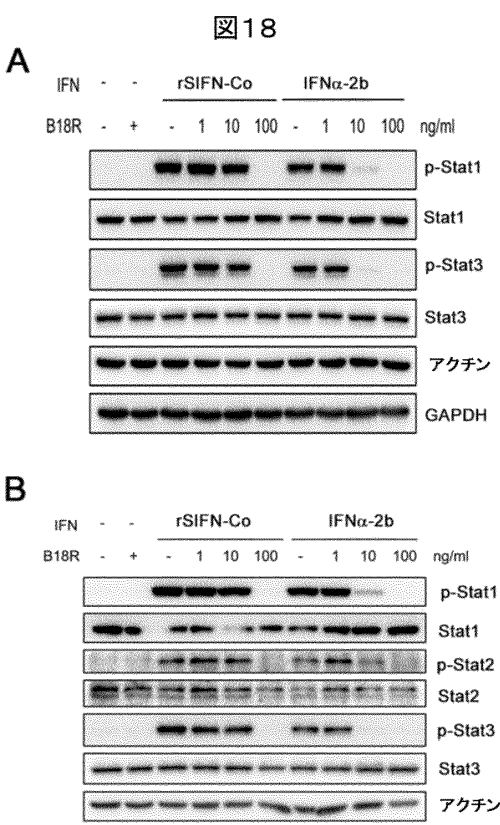
40

50

【図 17】



【図 18】



10

20

【配列表】

0007007914000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 7
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 N	9/99	(2006.01)	C 1 2 N	9/99	Z N A

中華人民共和国 6 1 0 0 6 3 シーチュアン、チェンドウ、ジンジャン・ディストリクト、サンセ・
ロード、ナンバー 1 6 3、ルーム 4 0 2

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 4 / 1 0 6 4 9 2 (WO, A 2)
 特表 2 0 1 7 - 5 0 2 2 6 3 (JP, A)
 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 2 7 3 5 2 7 (US, A 1)
 特表 2 0 1 3 - 5 4 1 9 4 4 (JP, A)
 特開 2 0 0 9 - 0 5 7 3 6 4 (JP, A)
 特表 2 0 1 5 - 5 0 5 8 1 8 (JP, A)
 特表 2 0 1 3 - 5 3 3 9 7 7 (JP, A)
 特開 2 0 1 0 - 2 3 9 9 6 8 (JP, A)
 Journal of Sichuan University, Medical Science Edition, 2010年, Vol.41, No.1, p.29-34
 Journal of Sichuan University, Medical Science Edition, 2008年, Vol.39, No.5, p.715-718
 Journal of Hepatology, 2011年, Vol.54, No.3, p.506-512
 Trends in Immunology, 2015年03月, Vol.36, No.3, p.139-149
 The Journal of Biological Chemistry, Vol.282, No.15, 2007年, p.11602-11611
 Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2014年, Vol.18. No.3, p.492-502
 PLOS ONE, 2012年, Vol.7, No.10, e47040
 Biochemical Pharmacology, 2011年, Vol.82, p.1682-1691

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q **1 / 0 2**
C 1 2 N **1 5 / 0 9**
C 0 7 K **1 4 / 5 5 5**
G 0 1 N **3 3 / 5 0**
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)