(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3822903号

(P3822903)

(45)発行日　平成18年9月20日(2006.9.20)　(24)登録日　平成18年6月30日(2006.6.30)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/565	(2006.01)	C07K	14/565	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	F
A61K 38/21	(2006.01)	A61K	37/66	F

請求項の数 20　(全 23 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-524145
(86)(22)出願日　平成7年3月13日(1995.3.13)
(65)公表番号　特表平10-500563
(43)公表日　平成10年1月20日(1998.1.20)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/003206
(87)国際公開番号　WO1995/025170
(87)国際公開日　平成7年9月21日(1995.9.21)
審査請求日　平成14年3月5日(2002.3.5)
(31)優先権主張番号　08/213,448
(32)優先日　平成6年3月15日(1994.3.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

微生物の受託番号　ATCC　69584

(73)特許権者
バイオジェン，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２，　ケンブリッジ，ケンブリッジ　センター　１４
(74)代理人
弁理士　山本　秀策
(72)発明者　ゴエルズ，　スーザン　イー.
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０１８９０，　ウインチェスター，ポンド　ストリート　１９５
(72)発明者　ケイト，　リチャード　エル.
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１９３，　ウエストン，アロウヘッド　ロード　６４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＩＦＮ－βの新規変異タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

IFN－β変異タンパク質であって、

野生型IFN－βに従って番号付けした野生型IFN－βの101位のval(V)がphe(F)で置換されており、

該変異タンパク質が抗ウイルス活性を示し、これは野生型IFN－βに対する抗体で少なくとも部分的に中和される、IFN－β変異タンパク質。

【請求項２】

野生型IFN－βに従って番号付けした野生型IFN－βの101位のval(V)がphe(F)で置換されていることを除くと野生型IFN－βと同一のアミノ酸配列を有する、IFN－β変異タンパク質。

【請求項３】

以下の式:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-
Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-
Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-
Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-
Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-
Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-
Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-
Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-
Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-
Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-
His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-
Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-
Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn（配列番号 1)

を有する、請求項２に記載のIFN－β変異タンパク質。

【請求項４】

IFN－β変異タンパク質をコードするDNAであって、
野生型IFN－βに従って番号付けした野生型IFN－βの101位のval(V)がphe(F)で置換されており、
該変異タンパク質が抗ウイルス活性を示し、これは野生型IFN－βに対する抗体で少なくとも部分的に中和される、DNA。

【請求項５】

野生型IFN－βに従って番号付けした野生型IFN－βの101位のval(V)がphe(F)で置換されていることを除くと野生型IFN－βと同一のアミノ酸配列を有するIFN－β変異タンパク質をコードする、DNA。

【請求項６】

以下の式:

**Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-
Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-
Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-
Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-
Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-
Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-
Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-
Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-
Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-
Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-
His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-
Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-
Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn（配列番号 1)**

のIFN－β変異タンパク質をコードする、請求項５に記載のDNA。

【請求項７】

101位のアミノ酸をコードするコドンがTTCである、請求項６に記載のDNA。

【請求項８】

配列番号２の式を有するDNA。

【請求項９】

請求項４～８のいずれかのDNAにより特徴付けられる組換えDNA分子であって、該DNAの配列が該組換えDNA分子中で発現調節配列に作動可能に連結されている、組換えDNA分子。

【請求項１０】

請求項９の組換えDNA分子で形質転換された、宿主。

【請求項１１】

IFN－β変異タンパク質を生成する方法であって、

ここで、野生型IFN－βに従って番号付けした野生型IFN－βの101位のval(V>がPhe(F)で置換されており、

該変異タンパク質が抗ウイルス活性を示し、これは野生型IFN－βに対する抗体で少なくとも部分的に中和され、

該方法が、請求項１０に記載の宿主を培養する工程およびIFN－β変異タンパク質を回収する工程を包含する、方法。

【請求項１２】

前記IFN－β変異タンパク質が配列番号２の式により含まれるDNAによりコードされ、そして前記宿主が培養中の動物細胞である、請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】

抗ウイルス有効量の請求項１～３のいずれかのIFN－β変異タンパク質および薬学的に受容可能なキャリアを含有する、ウイルス感染を処置するための薬学的組成物。

【請求項１４】

患者におけるウイルス感染を処置するための遺伝子治療用組成物であって、

該組成物は、IFN－β変異タンパク質をコードするDNAを含み、

野生型IFN－βに従って番号付けした野生型IFN－βの101位のval(V)がphe(F)で置換されており、

該変異タンパク質が抗ウイルス活性を示し、これは野生型IFN－βに対する抗体で少なくとも部分的に中和される、組成物。

【請求項１５】

患者におけるウイルス感染を処置するための遺伝子治療用組成物であって、

該組成物は、IFN－β変異タンパク質をコードするDNAを含み、

該IFN－β変異タンパク質が、野生型IFN－βに従って番号付けした野生型IFN－βの101位のval(V)がphe(F)で置換されていることを除いて野生型IFN－βと同一であるアミノ酸配列を有する、組成物。

【請求項１６】

前記DNAが以下の式:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (配列番号 1)

のIFN－β変異タンパク質をコードする、請求項１５に記載の組成物。

【請求項１７】

101位のアミノ酸をコードするコドンがTTCである、請求項１６に記載の組成物。

【請求項１８】
患者におけるウイルス感染を処置するための遺伝子治療用組成物であって、該組成物は、配列番号２のヌクレオチド1～561の配列または配列番号２のヌクレオチド64～561の配列を有するDNAを含む、組成物。
【請求項１９】
前記ウイルス感染が肝炎である、請求項１４～１８のいずれかに記載の組成物。
【請求項２０】
前記肝炎がHBVである、請求項１９に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
発明の技術分野
本発明は、野生型IFN－βに従って番号付けした場合に、101位のval(V)がphe(F)、trp(W)、tyr(Y)、またはhis(H)で置換されているインターフェロンβ（IFN－β）の変異タンパク質に関する。
発明の背景
インターフェロンは、ウイルス、マイトジェン、およびポリヌクレオチドを含む種々の誘導因子に反応してほとんどの動物細胞により分泌される１本鎖ポリペプチドである。インターフェロンは、細胞の機能の調節に関与し、そして抗ウイルス特性、抗増殖特性、および免疫調節特性を有する。天然のヒトインターフェロンは３つの主なタイプ：α-IFN（白血球）、IFN-β（線維芽細胞）およびγ-IFN（免疫性）に分類される。天然のIFN-βは、主として２倍体線維芽細胞により生成され、そしてリンパ芽球細胞により生成される量はより少ない。
IFN-βは、糖タンパク質である。この核酸配列およびアミノ酸配列は決定されている（Houghtonら、「逆転写酵素の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマーを使用して推定されるヒト線維芽細胞インターフェロンの完全なアミノ酸配列」，Nucleic Acids Research，8，2885-94頁（1980）；T.Taniguchiら、「ヒト線維芽細胞DNAの核酸配列」，Gene，10，11-15頁（1980））。組換えIFN-βは、生成されそして特徴付けられている。
IFN-βは、種々の生物学的活性および免疫学的活性を示す。IFN-βの生物学的活性の１つは、抗ウイルス活性である。この抗ウイルス活性は、IFN-βに対する抗体により中和され得る。欧州特許第EP-B1-41313号を参照のこと。IFN-βに対する抗体の調製および精製は、欧州特許第EP-B1-41313号および本明細書中の引用文献に記載されている。IFN-βはまた、インターフェロンレセプターを発現する細胞（例えば、Daudi細胞またはA549細胞）に結合し得る。
これらの活性の結果、IFN-βは、免疫療法、抗腫瘍および抗ガン療法、ならびに抗ウイルス療法への潜在的な応用性を有する。
多数の研究および臨床試験が野生型および組換えIFN-βの両方の抗腫瘍および抗ガンの特性に対して行われ、現在も続けられている。これらは、いくつかの悪性疾患（例えば、骨肉腫、基底細胞ガン、子宮頚部形成異常、神経膠腫、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、およびHodgkin疾患）の処置を包含する。さらに、IFN-βは、黒色腫および乳ガンを罹う患者において皮下腫瘍節に注入した場合、局所的な腫瘍後退を生じることが示されている。
IFN-β（野生型および組換え体）は、パピローマウイルスを含む種々のウイルス感染（例えば、性器疣および子宮頚部のコンジローム；急性／慢性のＢ型肝炎および非Ａ非Ｂ型肝炎（Ｃ型肝炎）を含むウイルス肝炎；陰部疱疹；帯状疱疹；疱疹状角膜炎；単純疱疹；ウイルス脳炎；サイトメガロウイルス肺炎（pheumonia））；およびライノウイルスの予防において臨床的に試験されてきた。多発性硬化症の処置における組換えIFN-βを使用する臨床試験もまた、行われており、そしてIFN-βは、米国では多発性硬化症の処置のために販売が認可されている。
発明の要旨
本発明は、野生型IFN-βに従って番号付けした101位のval(V)がphe(F)、tyr(Y)、trp(W)、またはhis(H)で置換されているIFN-βの変異タンパク質を提供する。本発明はまた、こ

れらのIFN-β変異タンパク質をコードするDNA配列、発現調節配列に作動可能に連結されたそれらの配列を含み、そして適切な宿主においてIFN-β変異タンパク質の発現を誘導し得る組換えDNA分子、これらの組換えDNA分子で形質転換された宿主、およびIFN-βを含む薬学的組成物を提供する。これらの組成物は、免疫療法ならびに抗ガン、抗腫瘍、および抗ウイルス療法において有用である。

【図面の簡単な説明】

図１は、本発明の好ましい変異タンパク質IFN-β（phe_{101}）のアミノ酸配列（配列番号１）を示す。

図２は、IFN-β（phe_{101}）をコードする好ましい縮重DNA配列および天然IFN-β（配列番号２）のシグナル配列を示す。

図３は、インターフェロンレセプター保有細胞に対するIFN-β（phe_{101}）結合の分析を示す。パネルＡおよびＢは、それぞれDaudi細胞に対する^{125}I-IFN-β（phe_{101}）および野生型^{125}I-IFN-βのレセプター結合データを示す。パネルＣおよびＤは、それぞれA549細胞に対する^{125}I-IFN-β（phe_{101}）および野生型^{125}I-IFN-βのレセプター結合データを示す。

図４は、エンドプロテイナーゼLyse-Cによるペプチドマッピングでの IFN-β（phe_{101}）および野生型IFN-βの分析を示す。

図５は、野生型IFN-βに対する抗体がIFN-β（phe_{101}）および野生型IFN-βの活性を中和することを示す。

発明の詳細な説明

本明細書中で用いたように、「野生型IFN-β」は、例えば、欧州特許第EP-B1-41313号、図４で示される天然のヒトIFN-βの通常存在するアミノ酸配列を有する天然または組換えのIFN-βを意味する。

本明細書中で用いたように、「IFN-β変異タンパク質」は、野生型IFN-βに従って番号付けした101位のval(V)がphe(F)、tyr(Y)、trp(W)、またはhis(H)、好ましくはphe(F)で置換されているポリペプチドを意味する。本発明者らの最も好ましいIFN-β変異タンパク質は、他の残基において野生型IFN-βと同一のアミノ酸配列を有する。しかし、本発明のIFN-β変異タンパク質はまた、天然のIFN-βポリペプチド鎖の他の残基の１またはそれ以上の部位におけるアミノ酸の挿入、欠失、置換、および改変により特徴付けられ得る。本発明に従って、任意のこのような挿入、欠失、置換、および改変は、野生型IFN-βに対する抗体により少なくとも部分的に中和され得る抗ウイルス活性を保持するIFN-β変異タンパク質を生じる。

本発明者らは、保存的改変および置換（すなわち、変異タンパク質の２次構造および３次構造に最小限度の影響を有するもの）を好む。このような保存的置換は、DayhoffによるAtlas of Protein Sequence and Structure 5（1978），およびArgosによるEMBO J., 8, 779-785（1989）に記載されている置換を包含する。例えば、以下の群のいずれかに属するアミノ酸は保存的変化を示す：

- ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr;
- cys, ser, tyr, thr;
- val, ile, leu, met, ala, phe;
- lys, arg, his; and
- phe, tyr, trp, his.

本発明者らはまた、分子間架橋または不適切なジスルフィド結合形成の部位を除去する改変または置換を好む。例えば、IFN-βは、野生型の17位、31位および141位に３つのcys残基を有することが公知である。米国特許第4,588,585号は、17位のcys(C)がser(S)で置換されたIFN-β変異タンパク質について言及している。この置換はまた、本発明において利用され得る。例えば、本発明は、野生型IFN-βに従って番号付けられた17位のcys(C)に対しser(S)で置換されており、そしてphe(F)、trp(W)、tyr(Y)、またはhis(H)、好ましくはphe(F)で101位のval(V)が置換されているIFN-β変異タンパク質を包含する。

「野生型IFN-βに従って番号付けした」により、本発明者らは、そのアミノ酸が野生型IFN-βにおいて天然に存在する位置に関して、選択アミノ酸を同定することを意味する。挿入または置換がIFN-β変異タンパク質になされる場合、当業者は野生型IFN-βに従って番号付けした場合、101位に通常存在するval(V)が変異タンパク質において位置がシフトし得ることを認める。しかし、シフトしたval(V)の位置は、隣接アミノ酸の検査および野生型IFN-βにおけるval_{101}と隣接するアミノ酸との相関により容易に決定され得る。

本発明のIFN-β変異タンパク質は、当該分野で公知の適切な方法により生成される。このような方法は、本発明のIFN-β変異タンパク質をコードするDNA配列を構築する工程、および適切な形質転換宿主においてそれらの配列を発現させる工程を包含する。この方法は、本発明の組換え変異タンパク質を生成し得る。しかし、本発明の変異タンパク質はまた、あまり好ましくないにもかかわらず、化学合成、または化学合成と組換えDNA技術とを組み合わせることによっても生成され得る。

本発明の変異タンパク質を生成するための組換え方法の１実施態様において、DNA配列は野生型IFN-βをコードするDNA配列を単離または合成することにより構築され、次いで、部位特異的変異誘発によりval_{101}のコドンをphe(F)、trp(W)、tyr(Y)、またはhis(H)、好ましくはphe(F)のコドンに変える。この技術は周知である。例えば、Markら、「ヒト線維芽細胞インターフェロン遺伝子の部位特異的変異誘発」、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81, 5662-66頁（1984）;米国特許第4,588,585号（本明細書で参考として引用されている）を参照のこと。

本発明のIFN-β変異タンパク質をコードするDNA配列を構築する別の方法は、化学合成である。例えば、所望のIFN-β変異タンパク質をコードする遺伝子がオリゴヌクレオチド合成機を使用する化学手段により合成され得る。このようなオリゴヌクレオチドは、所望のIFN-β変異タンパク質のアミノ酸配列に基づいて設計され、そして好ましくは組換え変異タンパク質が生成される宿主細胞において好まれるコドンが選択される。これに関しては、遺伝コードが縮重（アミノ酸が１以上のコドンによりコードされ得ること）することが十分に認識されている。例えば、phe(F)は、２つのコドンTTCまたはTTTによりコードされ、tyr(Y)はTACまたはTATによりコードされ、そしてhis(H)はCACまたはCATによりコードされる。trp(W)は単一のコドンTGGによりコードされる。従って、特定のIFN-β変異タンパク質をコードする所定のDNA配列については、そのIFN-β変異タンパク質をコードする多くのDNA縮重配列が存在し得ることが認められる。例えば、図２に示す好ましいDNA配列に加えて、図１に示すIFN-β変異タンパク質をコードする多くの縮重DNA配列が存在する。これらの縮重DNA配列は本発明の範囲内であると考えられる。

部位特異的変異誘発、合成、または他の方法により調製される本発明のIFN-β変異タンパク質をコードするDNA配列はまた、シグナル配列をコードするDNA配列を含み得るか、または含み得ない。このようなシグナル配列は、存在する場合、IFN-β変異タンパク質の発現のために選択された細胞により認識されるシグナル配列であるべきである。これは、原核性シグナル配列、真核性シグナル配列、またはこの２つの組み合わせであり得る。これはまた、天然のIFN-βのシグナル配列であり得る。シグナル配列の含有は、IFN-β変異タンパク質が作られる組換え細胞からのIFN-β変異タンパク質の分泌が望まれるか否かに依存する。選択細胞が原核細胞である場合、DNA配列がシグナル配列をコードしないことが一般に好ましい。選択細胞が真核細胞である場合、シグナル配列がコードされることが一般に好ましく、そして最も好ましくは野生型IFN-βシグナル配列が使用される。

標準的な方法が、本発明に従って、IFN-β変異タンパク質をコードする遺伝子を合成するために適用され得る。例えば、逆翻訳遺伝子を構築するために全アミノ酸配列が使用され得る。IFN-β変異タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むDNAオリゴマーが合成され得る。例えば、所望のポリペプチドの一部をコードするいくつかの小さなオリゴヌクレオチドが合成され得、次いで連結され得る。個々のオリゴヌクレオチドは、代表的には、相補的なアセンブリーのための５’または３’突出部（overhangs）を含有する。

一旦アセンブリーされると（合成、部位特異的変異誘発、または別の方法により）、本発明のIFN-β変異タンパク質をコードするDNA配列は、発現ベクターに挿入され、そして所

望の形質転換宿主においてIFN-β変異タンパク質の発現に適切な発現調節配列に作動可能に連結される。適当なアセンブリーが、ヌクレオチド配列決定、制限酸素マッピング、および適切な宿主における生物学的に活性なポリペプチドの発現により確認され得る。当該分野で周知であるように、宿主においてトランスフェクトされた遺伝子の高レベルの発現を得るためには、この遺伝子は選択した発現宿主において機能する転写および翻訳発現調節配列に作動可能に連結されなければならない。

発現調節配列および発現ベクターの選択は、宿主の選択に依存する。広範囲の発現宿主／ベクター組み合わせが用いられ得る。真核宿主に有用な発現ベクターは、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、およびサイトメガロウイルス由来の発現調節配列を含むベクターを含有する。細菌宿主に有用な発現ベクターは、公知の細菌プラスミド（例えば、E.coliに由来するプラスミド、col E1、pCR1、pBR322、pMB9、およびそれらの誘導体を包含する）、より広い宿主範囲のプラスミド（例えば、RP4）、ファージDNA（例えば、λファージの数多くの誘導体（例えば、NM989））、および他のDNAファージ（例えば、M13および糸状単鎖DNAファージ）を包含する。酵母細胞に有用な発現ベクターは、２μプラスミドおよびその誘導体を包含する。昆虫細胞に有用なベクターは、pVL941を包含する。本発明者らはpBG311を好む。Gateら「ミューラー管阻害物質に関するウシおよびヒト遺伝子の単離および動物細胞におけるヒト遺伝子の発現」，Cell，45，685-98頁（1986）。

さらに、任意の多種多様な発現調節配列がこれらのベクターにおいて使用され得る。これらの有用な発現調節配列は、上記の発現ベクターの構造遺伝子と関連した発現調節配列を包含する。有用な発現調節配列の例は、例えば、以下を包含する：SV40またはアデノウイルスの初期および後期プロモーター、lacシステム、trpシステム、TACシステムまたはTRCシステム、λファージの主要なオペレーターおよびプロモーター領域（例えば、PL）、fdコートタンパク質の調節領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の解糖酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター（例えば、Pho5）、酵母α接合系のプロモーター、および原核または真核細胞またはそれらのウイルスの遺伝子の発現を調節することが公知の他の配列、ならびにそれらの種々の組み合わせ。

任意の適切な宿主が、本発明のIFN-β変異タンパク質の産生に使用され得る。これは、細菌、真菌（酵母を包含する）、植物、昆虫、哺乳動物、または他の適切な動物細胞または細胞株、ならびにトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物を包含する。さらに詳細には、これらの宿主は、周知の真核宿主および原核宿主（例えば、E.coli、Pseudomonas、Bacillus、Streptomycesの系統）、真菌、酵母、昆虫細胞（例えば、Spodoptera Frugiperda（SF9））、動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞およびNS/0のようなマウス細胞、COS１、COS7、BSC1、BSC40、およびBMT10のようなアフリカミドリザル細胞、およびヒト細胞、ならびに組織培養における植物細胞を包含する。動物細胞の発現について、本発明者らは培養中のCHO細胞およびCOS7細胞を好み、そして特にCHO-DDUKY-β1細胞系統（前出、18～19頁）を好む。

無論のこと、全てのベクターおよび発現調節配列が本明細書に記載のDNA配列を発現させるために同等に良好に機能するわけではないことが理解されるべきである。全ての宿主が同じ発現系で同等に良好に機能するわけでもない。しかし、当業者は、これらのベクター、発現調節配列、および宿主の間で過度の実験なしに選択を行い得る。例えば、ベクターの選択において、宿主細胞は考慮されなければならない。なぜなら、ベクターはその宿主内で複製しなければならないからである。ベクターのコピー数、このコピー数を調節する能力、およびベクターによりコードされる任意の他のタンパク質（例えば、抗生物質マーカー）の発現もまた、考慮されるべきである。例えば、本発明で使用される好ましいベクターは、IFN-β変異タンパク質をコードするDNAをコピー数増幅させ得るベクターを包含する。このような増幅可能ベクターは、当該分野で周知である。これらは、例えば、DHFR増幅により増幅され得るベクター（例えば、Kaufman、米国特許第4,470,461号、KaufmanおよびSharp、「モジュラージヒドロ葉酸レダクターゼcDNA遺伝子の構築：効率的な発現に利用されるシグナルの解析」，Mol.Cell.Biol.，２，1304-19頁，（1982）を参照のこと

）またはグルタミンシンテターゼ（「GS」）増幅により増幅され得るベクター（例えば、米国特許第5,122,464号および欧州特許公開出願では第338,841号を参照のこと）を包含する。
発現調節配列の選択において、種々の因子がまた考慮されるべきである。これらは、例えば、配列の相対的強度（relative strength）、その制御性、および本発明のIFN-β変異タンパク質をコードする実際のDNA配列とのその適合性、特に潜在的な２次構造に関しての適合性を包含する。宿主は、それらの選択したベクターとの適合性、本発明のDNA配列によりコードされる産物の毒性、それらの分泌特性、ポリペプチドを正確に折り畳む能力、それらの発酵または培養の必要条件、およびDNA配列によりコードされた産物の精製の容易さを考慮して選択されるべきである。
これらのパラメーター内で、当業者は、発酵または大量動物細胞培養（例えば、CHO細胞またはCOS7細胞を使用する）において所望のDNA配列を発現する種々のベクター／発現調節配列／宿主の組み合わせを選択し得る。
本発明に従って得られたIFN-β変異タンパク質は、変異タンパク質を産生するために使用される宿主生物に依存して、グリコシル化され得るかまたはグリコシル化され得ない。細菌が宿主細胞として選ばれる場合、産生されるIFN-β変異タンパク質はグリコシル化されない。一方、真核細胞は、IFN-β変異タンパク質をグリコシル化するが、おそらくこれは天然のIFN-βがグリコシル化されるのと同じ方法にはよらない。
形質転換宿主により産生されたIFN-β変異タンパク質は、任意の適切な方法に従って精製され得る。INF-βの精製について種々の方法が公知である。例えば、米国特許第4,289,689号、同第4,359,389号、同第4,172,071号、同第4,551,271号、同第5,244,655号、同第4,485,017号、同第4,257,938号、および同第4,541,952号を参照のこと。本発明者らは、免疫アフィニティー精製を好む。例えば、Okamuraら、「ヒト線維芽細胞様（fibroblastoid）インターフェロン：免疫吸着カラムクロマトグラフィーおよびＮ末端アミノ酸配列」，Biochem.，19，3831-35頁（1980）を参照のこと。
本発明のIFN-β変異タンパク質の生物学的活性は、当該分野で公知の任意の適切な方法によりアッセイされ得る。このようなアッセイは、欧州特許第EP-B1-41313号に記載のような抗ウイルス活性の抗体中和、プロテインキナーゼ活性の誘導、オリゴアデニル酸2,5-Aシンテターゼ活性の誘導、またはホスホジエステラーゼ活性の誘導を包含する。このようなアッセイはまた免疫調節アッセイ（例えば、米国特許第4,753,795号を参照のこと）、増殖阻害アッセイ、およびインターフェロンレセプターを発現する細胞への結合の測定を包含する。
本発明のIFN-β変異タンパク質は、野生型の天然IFN-βまたは組換えIFN-βが治療に用いられるのとほぼ匹敵する用量で投与される。IFN-β変異タンパク質の有効量が、好ましくは投与される。「有効量」は、処置される状態または適応症の重篤度または展開を防止または軽減し得る量を意味する。IFN-β変異タンパク質の有効量は、とりわけ、疾患、用量、IFN-β変異タンパク質の投与計画、IFN-βが単独で投与されるかまたは他の治療剤と併用されるか、組成物の血清中半減期、および患者の全般的な健康状態に依存することが、当業者には明らかである。
IFN-β変異タンパク質は、好ましくは薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物中で投与される。「薬学的に受容可能なキャリア」は、それが投与される患者に適当でない効果を全く生じないキャリアを意味する。このような薬学的に受容可能なキャリアは、当該分野で周知である。本発明者らは、ヒト血清アルブミンを好む。
本発明のIFN-β変異タンパク質は周知の方法で薬学的組成物中に処方され得る。例えば、E.W.MartinによるRemington's Pharmaceutical Sciences（これは、本明細書中に参考として援用されている）は、適切な処方を記載しているので、参照のこと。IFN-β変異タンパク質の薬学的組成物は、液体、ゲル、凍結乾燥、または任意の他の適切な形態を包含する種々の形態で処方され得る。好ましい形態は、特定の処方される適応症に依存し、そして当業者には明らかである。
IFN-β変異タンパク質の薬学的組成物は、経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮内、または

皮下、または任意の他の受容可能な様式で投与され得る。投与の好ましい様式は、特定の処置される適応症に依存し、そして当業者には明らかである。
IFN-β変異タンパク質の薬学的組成物は、他の治療剤と併用して投与され得る。これらの薬剤は、同じ薬学的組成物の一部として混合され得るか、またはIFN-β変異タンパク質とは別々に、同時にまたは任意の他の受容可能な処置計画に従うかのいずれかで投与され得る。さらに、IFN-β変異タンパク質の薬学的組成物は、他の治療の補助として使用され得る。
従って、本発明は、ウイルス感染、ガンまたは腫瘍、異常な細胞増殖の処置のため、または任意の適切な動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトにおける免疫調節のための組成物および方法を提供する。
遺伝子治療適用における本発明のIFN-β変異タンパク質をコードするDNA配列の使用もまた意図されている。
意図される遺伝子治療適用は、IFN-βがその抗ウイルス活性により効果的な治療を提供することが期待される疾患（例えば、肝炎および特にHBVを包含するウイルス性疾患、またはIFN-βまたはIFN-βに感受性の感染性因子に応答する他の感染症）の処置を包含する。同様に、本発明は、免疫調節のための遺伝子治療適用、ならびにその抗増殖活性によりIFN-βが効果的な治療を提供することが期待される疾患（例えば、腫瘍およびガン、または所望でない細胞増殖により特徴付けられる他の状態（例えば、再狭窄））の処置における適用を包含する。
遺伝子治療を使用するIFN-βの局所的な送達は、非特異的投与に伴う潜在毒性の問題を回避し、標的領域へ治療剤を提供し得る。
インビトロおよびインビボの遺伝子治療法の両方が意図される。
限定された細胞集団に潜在的な治療遺伝子を導入するためのいくつかの方法が公知である。例えば、Mulligan、「遺伝子治療の基本的科学」，Science，260，926-31頁（1993）を参照のこと。これらの方法は、以下を包含する：
1）直接的遺伝子導入。例えば、Wolffら、「インビボにおけるマウス筋肉への直接的遺伝子導入」，Science，247，1465-68頁（1990）を参照のこと；
2）リポソーム媒介DNA導入。例えば、Caplenら、「嚢胞性繊維症を患う患者の鼻上皮へのリポソーム媒介CFTR遺伝子導入」，Nature Med.，3，39-46頁（1995）；Crystal、「薬物としての遺伝子」，Nature Med.，1，15-17頁（1995）；GaoおよびHuang、「哺乳動物細胞の効率的なトランスフェクションのための新規のカチオン性リポソーム試薬」，Biochem. Biophys. Res. Comm.，179，280-85頁（1991）を参照のこと；
3）レトロウイルス媒介DNA導入。例えば、Kayら、「Ｂ型血友病のインビボ遺伝子治療：第IX因子欠損のイヌにおける持続的な部分的矯正」，Science，262，117-19頁（1993）；Anderson、「ヒトの遺伝子治療」，Science，256，808-13頁（1992）を参照のこと。
4）DNAウイルス媒介DNA導入。このようなDNAウイルスは、アデノウイルス（好ましくはAd-2またはAd-5に基づくベクター）、ヘルペスウイルス（好ましくは単純疱疹ウイルスに基づくベクター）、およびパルボウイルス（好ましくは「欠損」または非自律性パルボウイルスに基づくベクター、より好ましくはアデノ随伴ウイルスに基づくベクター、最も好ましくはAAV-2に基づくベクター）を包含する。例えば、Aliら、「遺伝子治療のためのベクターとしてのDNAウイルスの使用」，Gene Therapy，1，367-84頁（1994）；米国特許第4,797,368号（これは、本明細書中に参考として援用されている）、および米国特許第5,139,941号（これは、本明細書中に参考として援用されている）を参照のこと。
目的の遺伝子を導入するための特定のベクター系の選択は、種々の因子に依存する。重要な因子の１つは、標的の細胞集団の性質である。レトロウイルスベクターが幅広く研究され、そして数多くの遺伝子治療の適用に使用されているが、これらのベクターは、一般に非分裂細胞の感染に適していない。さらに、レトロウイルスは、発ガン性の可能性を有する。
アデノウイルスは広範な宿主域を有するという利点があるが、静止期の細胞または最終分化細胞（例えば、ニューロンまたは肝細胞）に感染し得、そして本質的に非発ガン性であ

るようである。例えば、Aliら、前出、367頁を参照のこと。アデノウイルスは宿主ゲノムに組み込まれないようである。なぜなら、それらは染色体外に存在するため、挿入変異誘発の危険性は著しく減少している。Aliら、前出、373頁。
アデノ随伴ウイルスは、アデノウイルスに基づくベクターと類似の利点を示す。しかし、AAVは、ヒト第19染色体への部位特異的組込みを示す。Aliら、前出、377頁。
好ましい実施態様においては、本発明のIFN-β変異タンパク質コードDNAは、動脈損傷後の血管平滑筋細胞増殖の遺伝子治療に使用される。動脈壁の損傷により、平滑筋細胞の動脈壁内層への移動が生じ、ここで、平滑筋細胞は増殖し、そして細胞外基質成分を合成する。例えば、Changら、「構成的に活性な形態の網膜芽腫遺伝子産物を用いる血管増殖性疾患のための細胞増殖抑制性の遺伝子治療」, Science, 267, 518頁（1995）を参照のこと。この増殖反応は、アテローム性動脈硬化の病因に関与している。
動脈損傷の臨床上重要な硬化（setting）の１つは、冠状動脈の経皮バルーン血管形成のために起こる。動脈の機械的拡張後、多くの場合、細胞性増殖反応が生じ、細胞の再増殖を局所的に導き、これは内腔を侵し、そして血流を危険にさらす。この反応は、再狭窄として知られ、抗血小板剤、アンジオテンシン転換酵素アンタゴニスト、またはヒトにおける細胞毒性薬を包含する従来の処置には反応しなかった。例えば、Ohnoら、「動脈損傷後の血管平滑筋細胞の増殖のための遺伝子治療」, Science, 265, 781頁（1994）を参照のこと。
本実施態様によれば、本発明のIFN-β変異タンパク質をコードするDNAでの遺伝子治療は、冠状動脈バルーン血管形成と同時または直後において、それ自身を必要とする患者に提供される。この取り組みは、本発明のIFN-β変異タンパク質の抗増殖活性により所望でないSMC増殖を防止するという利点を有する。当業者は、INF-β変異タンパク質DNAを含有する任意の適切な遺伝子治療ベクターが本実施態様に従って使用され得ることを認める。このようなベクターを構築する技術は公知である。例えば、Ohnoら、前出、784頁；Changら、前出、522頁を参照のこと。冠状動脈バルーン血管形成の手順は周知である。IFN-β変異タンパク質DNA含有ベクターの標的動脈部位への導入は、例えば、Ohnoら、前出、784頁に記載のような公知の技術により達成され得る。
本発明がより理解されるように、以下の実施例を示す。これらの実施例は例示を目的とするだけであり、本発明の範囲が何らかの方法によって限定されるとは解釈されない。

実施例

ヒトIFN-β（phe_{101}）を含有する発現ベクター
本発明者らは、発現ベクターとしてプラスミドpBG311を用いた。pBG311の完全な記載は、Cateら、「ミューラー管阻害物質に関するウシおよびヒト遺伝子の単離ならびに動物細胞におけるヒト遺伝子の発現」, Cell, 45, 685-98頁（1986）に示される。このベクターは、SV40初期プロモーター、スプライスシグナル、およびポリアデニル化シグナルを使用し、そして骨格としてpAT153を用いて構築された。
標準的なプロトコルに従い、図２に示されるDNA配列（配列番号２）を含有するDNAフラグメントをpBG311にクローン化し、そして天然のIFN-βのシグナル配列をコードするDNA配列を通してSV40初期プロモーターに作動可能に連結した。得られた発現ベクターをpBeta-pheと命名した。IFN-β変異タンパク質DNA配列（配列番号２）は、野生型IFN-βに従って番号付けした101位のval(V)が、phe(F)で置換されていることを除くと、野生型IFN-βと同一のアミノ酸配列を有するIFN-β変異タンパク質をコードする。この配列によりコードされる変異タンパク質は、IFN-β（phe_{101}）と命名されている。
コンピテントなEscherichia coli（SURE™, Stratagene）を、標準的な手順に従いpBeta-pheプラスミドで形質転換した。pBeta-pheプラスミドを含有する（すなわちIFN-β（phe_{101}）をコードするDNA配列を含有する）コロニーを、標準的なプロトコル（GrunsteinおよびHogness, 1975）を用いてIFN-β（phe_{101}）に特異的なオリゴヌクレオチドプローブへのハイブリダイゼーションにより同定した。
増殖ベクター
本発明者らは、プラスミドpAdD26SV(A)-3を用いて、本発明者らの最終的な形質転換体に

おいてIFN-β（phe_{101}）遺伝子を増幅した。このプラスミドは、KaufmanおよびSharp、「モジュラージヒドロ葉酸レダクターゼcDNA遺伝子の構築：効率的な発現に利用されるシグナルの解析」、Mol. Cell. Biol., 2, 1304-19頁（1982）および米国特許第4,740,461号に記載されている。このプラスミドは、アデノウイルス２（Ad2）主要後期プロモーター（MLP）の転写調節下で、マウスのジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）を発現する。５’スプライス部位（免疫グロブリン可変領域遺伝子由来）は、Ad2 MLPとDHFRコード配列との間に位置する。SV40ポリアデニル化部位は、DHFR遺伝子の下流に存在する。プラスミドは、原核生物の複製の起点（ori）およびpBR322由来のテトラサイクリン耐性遺伝子を含有する。

細胞株の形質転換

CHO-DUKX-B1 $DHFR^-$細胞株を、pBeta-pheプラスミドおよびプラスミドpAdD26SV(a)-3で共形質転換した。この細胞株は、エチルメタンスルホネートおよびUV照射誘導変異誘発による野生型CHO-K1細胞株由来であった。ChasinおよびUrlaub「ジヒドロ葉酸レダクターゼ活性欠損チャイニーズハムスター細胞変異株の単離」、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、77, 4216-20頁（1980）を参照のこと。ジヒドロ葉酸レダクターゼは、葉酸のテトラヒドロ葉酸への転換を触媒する。機能的なDHFRを有しない細胞は、増殖のために外因性のリボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシドを必要とする。増殖の阻害は、DHFRに結合し、そしてDHFRを阻害する、メトトレキセート、葉酸アナログにより誘導され得る。メトトレキセートの滴定は、DHFR遺伝子の増幅によるメトトレキセート耐性を導き得る。（KaufmanおよびSharp, 1982, 前出）。DHFRが増幅される場合、DHFRの近隣の遺伝子の増幅および発現の増加がしばしば生じる。それ故、高レベルのメトトレキセートに耐性の細胞は、しばしば近隣遺伝子の増加した特異的な生産性を示す。

pBeta-pheプラスミド（Xmn1で制限した）およびプラスミドpAdD26SV(a)-3（Stulで制限した）を、それぞれ10:1の比で混合した。DNAを、エレクトロポレーションによりCHO-DUKX-B1 $DHFR^-$細胞に形質転換した。細胞を、非選択性α＋培地（αMEM塩基＋リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド、10%ウシ胎児血清（FBS）、４mMグルタミン）にプレートし、そして２日間増殖させた。次いで培地をα^-培地（リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシドを含有しないαMEM塩基、10%FBS、４mMグルタミン）＋50nMメトトレキセート（MTX）に交換した。細胞をトリプシン処理により取り出し、そして約8×10^5細胞/10cm組織培養プレートに播いた。14日後、クローンを選び取り、そして96ウェル組織培養プレートで増殖させた。１つのクローンを、12ウェル組織培養プレートに拡大し、次いで７日後に250nM MTXの存在下で６ウェル組織培養プレートに置いた。このクローンをT75フラスコに拡大し（α^-培地＋250nM MTXで成育させた）、次いで750nM MTXで増幅した。サブクローンを、96ウェル組織培養プレートに選び取り、48ウェル組織培養プレートに拡大し、次いで６ウェル組織培養プレートに拡大し、次いでT75組織培養フラスコに拡大した。

IFN-β（phe_{101}）の精製

上記のサブクローン（またはそれに類似した他のもの）を培養することにより産生され、次いで培養培地に分泌されたIFN-β（phe_{101}）を、実質的にOkamuraら、「ヒト線維芽細胞様インターフェロン：免疫吸着カラムクロマトグラフィーおよびN末端のアミノ酸配列」、Biochem., 19, 3831-35頁（1980）に記載されるような免疫アフィニティークロマトグラフィーにより精製し得る。

CNBr-Sepharose 4B樹脂（２g、７ml）を、１mM HClに懸濁することにより調製する。ゲルを、15分間焼結（scintered）ガラスフィルター上で１mM HClで洗浄する。抗IFN-β mabs（例えば、B02、Yamasa、Japan）を、２時間室温にて撹拌装置上で結合緩衝液（100mM $NaHCO_3$、pH8.3、500mM NaCl）中にインキュベートすることにより、CNBr-Sepharose 4B樹脂に結合させる。代表的には、樹脂の１mlあたり1～2mg IFN-β mabが結合されるが、この量は、変動し得る。未反応のCNBrを４℃、一晩、100mM Tris-HCl、pH８、500mM NaClでブロックする。あるいは、未反応のCNBrを、実質的に同一の条件下で100mMエタノールアミンでブロックする。

結合樹脂を、異なるpHの３つのサイクルで洗浄する。それぞれのサイクルは、500mM NaClを含有するアセテート緩衝液（100mM、pH４）での洗浄、それに続く500mM NaClを含有するTris緩衝液（100mM、pH８）での洗浄からなる。
１cm×３cmカラム（2.3ml総容積）を、結合樹脂で調製する。カラムをPBS（５カラム容量よりも大きい）で平衡化する。IFN-β（phe_{101}）含有サンプルを、平衡化緩衝液、pH6.8中に1:3で希釈し、そしてロードする。このロードをPBSで追跡し、そして20mM K_2HPO_4、１M NaCl、pH6.8で洗浄し、そして200mMクエン酸ナトリウム、pH２で溶出する。500mM Mes、pH６でこのサンプルを希釈することにより、溶出液のpHを６に調整した。
ペプチドマッピングによる特徴付け
上記と異なり、かつより好ましくない様式で生産および精製されたIFN-β（phe_{101}）、変異タンパク質をペプチドマッピングにより特徴付けた。IFN-β（phe_{101}）または野生型IFN-βサンプルの30μgアリコートを凍結乾燥し、200μlのエンドプロテイナーゼLys-C消化緩衝液（100mM TRIS、pH９、0.5mM EDTA）に懸濁し、1.5μgのエンドプロテイナーゼLys-Cとともに12時間22℃にてインキュベートし、そしてC_8逆相HPLCカラム（0.45×25cm）上でマッピング分析を行った。カラムを、30分間、1.4mls/分の0.1%TFA中のアセトニトリルの０～70%グラジエントで展開した。カラム流出液を214nmでモニターした。図４、パネルAは、IFN-β（phe_{101}）に関するペプチドマップの一部を示す。矢尻は、ペプチドTFLEEK（配列番号３）を示す。このピークは、野生型IFN-βに関するペプチドマップ中には、存在しない。図４、パネルBは、野生型IFN-βに関するペプチドマップの相当する領域を示す。矢尻は、ペプチドTVLEEK（配列番号４）を示す。TFLEEKおよびTVLEEKの一致性を、タンパク質配列分析により確認した。本発明者らは、β-Phe_{101}および野生型β-IFNが、98%の純度よりも高いことを見積もる。タンパク質濃度を、１mg溶液に対して1.5の吸光係数を用いて、280nmでの吸光度から見積もった。生物学的研究のためにタンパク質を安定化するために、それらを５%FBSおよび５mM HEPES、を含有するPBS pH7.5中に４μg/mlにまで希釈した。
CPEアッセイにおけるIFN-β（phe_{101}）の抗ウイルス活性
ペプチドマッピングにより特徴付けたIFN-β（phe_{101}）の調製物を、抗ウイルス活性について細胞変性効果（Cytopathic Effect）（CPE）アッセイにおいて分析した。野生型組換えIFN-βスタンダードを、10,000ユニット/mLの濃度でDulbeccoの改変Eagle培地（DMEM）、10% FBS、４mMグルタミン中に調製し、-70℃にて一定分量で保存した。１日目、スタンダード、コントロール、およびIFN-$β_{Phe}$サンプルを、３つの希釈系列でDMEM、10% FBS、４mMグルタミンに希釈した：
i）64単位/mLで開始し、続いて２倍に希釈する、ii）12単位/mLで開始し、続いて1.5倍に希釈する、およびiii）６単位/mLで開始し、続いて1.2倍に希釈する。次いで希釈物の50μlを、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルに対するカラム中に添加した。A549細胞を、10^5細胞/mlで、ウェルあたり50μLの、DMEM、10%FBS、４mMグルタミンのそれぞれのウェルに添加した。そして細胞を、５%CO_2下で15～20時間37℃にてインキュベートする。
プレート内容物を漂白バケット（bleach bucket）内で振盪し、そして培地中の適切な希釈度の100μL脳心筋炎ウイルス（EMCウイルス）をそれぞれのウェルに添加した。ウイルスおよび細胞を５%CO_2下で30時間37℃にてインキュベートした。次いでプレート内容物を漂白バケット内で振盪し、そして0.75%クリスタルバイオレット色素をプレートに添加した。5～10分後、プレートを蒸留水で洗浄し、そして乾燥させ、視覚的に示した。
サンプルおよびスタンダードを、それぞれのアッセイプレート上で２点平行で試験した。これによりアッセイの日あたり希釈系列あたり２つのデータ点が得られる。
IFN-β（phe_{101}）を、２点平行で14アッセイで試験した。野生型組換えIFN-βをスタンダードとして用いた。これらの実験に基づき、IFN-β（phe_{101}）は、$3.5～6.7×10^8$の95%信頼区間で$4.8×10^8$単位/mgの比活性を有した。野生型IFN-βは、$1.6～2.5×10^8$の信頼区間で約$2.0×10^8$単位/mgの比活性を有した。図５のデータは、同様の結果を示す。
本発明者らの抗ウイルスアッセイにおいて計測されたように、組換えIFN-β（phe_{101}）の

比活性は、組換え野生型IFN-βの比活性よりも平均して約2.5倍高い。

レセプター結合に関するIFN-β（phe_{101}）の分析

上記のCPEアッセイで用いたIFN-β（phe_{101}）をまた、インターフェロンレセプターを発現する細胞に結合する能力についても分析した。これらの研究のために、本発明者らは、Daudi細胞またはA549細胞への野生型^{125}I-IFN-βまたは^{125}I-IFN-β（phe_{101}）のいずれかの結合を調査した（図３）。キャリア非含有IFN-βを、実質的にクロラミンＴ方法に従ってヨウ素化した。未反応のヨウ素を、１mg/mlウシ血清アルブミンを含有するPBSで平衡化したSuperdex 75カラムでサイズ排除クロマトグラフィーにより除去した。ヨウ素化IFN-βの濃度を、CPEアッセイにより測定し、これは2×10^8単位/mgの比活性と見なした。通常５ng（１μL、300,000cpm）のヨウ素化IFN-β（単独または50倍過剰量の非ヨウ素化インターフェロンの存在下のいずれか）を10μLよりも少ない総容積で1.7mLエッペンドルフチューブに添加した。標識したリガンドを、単独（－）で結合させるか、または非標識IFN-β（phe_{101}）、α2-IFN（α2）、γ-IFN（γ）または野生型組換えIFN-β（WT）と競合させた。

Daudi細胞およびA549細胞（American Type Culture Collection）の両方を用いた。細胞を2×10^6細胞/mLでDMEM/5%FBS中に懸濁した。IFN-βのサンプルに、0.5mLの細胞懸濁物を添加した。チューブを反転により混合し、45分間外界温度でインキュベートした。次いで細胞を、２分間1000×gでペレット化し、0.5mL DMEM/10%FBSで２回洗浄した。それぞれの洗浄に続いて２分間1000×gの遠心分離の工程を行った。細胞を0.1mLに再懸濁し、計測のためにチューブに移し、そして結合をBeckmanγ407カウンターで定量した。

このデータは、IFN-β（phe_{101}）の結合が、両方の細胞型における野生型IFN-βの結合と非常に類似していることを示唆する。野生型^{125}I-IFN-βおよび^{125}I-IFN-β（phe_{101}）の匹敵する量が結合され、そして非ヨウ素化α-IFN、野生型IFN-β、およびI-IFN-β（phe_{101}）により同様に競合された。この結合は、組換えヒトγ-IFNの添加により影響されなかった。

IFN-β（phe_{101}）の抗ウイルス活性は、野生型IFN-βに対する抗体により実質的に中和される。

上記のようにCHO細胞中に産生された多数の組換え変異タンパク質IFN-β（phe_{101}）の調製物を、カラムクロマトグラフィーを用いて約90%の純度に精製した。これらのサンプルを25pg/mlに希釈した。野生型組換えIFN-β（本明細書では、IFN-β（val_{101}）と称される）を、実質的に同一の方法で生産および精製した。

スタンダード抗ウイルスアッセイおよび抗体中和アッセイを用いて、野生型IFN-β（val_{101}）に対する抗体は、IFN-β（phe_{101}）を少なくとも部分的に中和することを実証した。本発明者らが用いた特定の抗ウイルスアッセイおよび中和アッセイ（以下に詳細に示す）は、欧州特許第EP B1 41313号に記載されている抗ウイルスアッセイおよび抗体中和アッセイと実質的に同一である。26頁、1-21行；29頁、48行～32頁、３行を参照のこと。

Ａ．細胞含有プレートの調製

A549細胞（ATCC CCL185）を、3×10^4細胞/100μl培地/ウェルで96ウェルプレートに播種した。用いた培地は、Dulbeccoの改変Eagle培地（DMEM）、10%FBS、４mMグルタミンであった。次いで細胞含有プレートを５%CO_2下で約24時間37℃でインキュベートした。

Ｂ．マスタープレートの調製

次いで系列希釈したウェル（２点平行）を用いてサンプルまたはスタンダードを含有するマスタープレートを作製した。サンプルウェルは、ウサギ抗IFN-βポリクローナル血清の存在下または非存在下で、精製組換え変異タンパク質IFN-β（phe_{101}）または野生型組換えIFN-β（val_{101}）のいずれかを含有した。コントロールウェルは、抗LFA3抗体の存在下または非存在下で緩衝液単独または組換え野生型IFN-β（スタンダードとして）のいずれかを含有した（データは示さず）。

系列希釈を以下のようにして実施した。200μlのコントロール、あるいは野生型または変異タンパク質IFN-βサンプル（約25pg/mlの濃度）を、それぞれのプレートのＡ列のそれぞれのウェルに添加した。Ａ列のサンプルの最終濃度は、8.5pg/mlであった。次いで１:1

.5の希釈を、それぞれのプレートに実施した。
Ｃ．野生型IFN-βに対する対抗
野生型IFN-β（val_{101}）に対する抗体を、組換え野生型IFN-β（val_{101}）で免疫したウサギ中に産生させた。ウサギ抗IFN-βポリクローナル血清を、適切な間隔で免疫ウサギから回収し、プールし、そして使用するまで保存した（ウサギIFN-β血清プール6/25/93；５ｍｌ/バイアル、0.02%アジド；ref. 0.01742.062）。
Ｄ．サンプル/Abインキュベーション
ウサギ抗IFN-βポリクローナル血清を、マスタープレートの適切なウェルに添加した。抗体の最終希釈度は、１：1000であった。抗体/IFN-β混合物を45分間室温でインキュベートした。
Ｅ．コントロール、サンプル、またはサンプル/Abとの細胞のインキュベーション
次いで培地を調製された細胞含有プレートから吸引し、そして調製されたマスタープレート由来の、適切な、コントロール、IFN-βサンプル、またはIFN-β/Abサンプルのアリコート（100μｌ/ウェル）に取り替えた。細胞含有プレートを、５％CO_2下で16～24時間37℃にてインキュベートした。
Ｆ．ウイルスのチャレンジ
次の工程は、ウイルスのチャレンジであった。次いで細胞含有プレート内容物を吸引し、そして適切な希釈度の脳心筋炎ウイルス（EMCV）の溶液の100μｌをそれぞれの細胞に添加した。ウイルスおよび細胞を５％CO_2下で41～45時間37℃にてインキュベートした。
細胞含有プレートをXTT/PMS比色定量法を用いて展開した。1mg/ml XTT（3,3-［1-（フェニルアミノ）カルボニル］-3,4-テトラアゾリウム］-ビス-（4-メトキシ-6-ニトロ）-ベンゼンスルホン酸；Sigma）溶液を、リン酸緩衝生理食塩水中に調製した。1mg/ml PMS（フェナジンメトサルフェート）溶液を水中に調製した。PMS/XTT溶液を1:50で調製した。展開溶液を、リン酸緩衝生理食塩水中にPMS/XTTを1:3で希釈することにより調製した。テトラゾリウム化合物XTTは、生細胞により還元され、オレンジ色のホルマゾンを形成する。発色は、生細胞数に直接相関する。
細胞含有プレートを吸引し、そして150μｌ/のウェルのリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。次いでそれぞれのウェルに150μｌの展開溶液を与える。プレートを５％CO_2下で30～60分間37℃にてインキュベートした。
450nmの吸光度をSoftmaxソフトウェアを有するMolecular Devices $Thermo_{max}$マイクロプレートリーダーで測定した。結果を、図５にグラフで示す。吸光度をIFN-β濃度に対してプロットする。
図５は、ウサギ抗IFN-βポリクローナル血清の非存在下における、変異タンパク質IFN-β（phe_{101}）サンプル（黒四角；■）および野生型IFN-β（val_{101}）のサンプル（黒菱形；◆）が、EMCVからA549細胞を保護したことを示す。これは、変異タンパク質IFN-βまたは野生型IFN-β濃度を増加につれて吸光度が増加すること（より多い生細胞を示す）により示される。
図５はまた、ウサギ抗IFN-βポリクローナル血清の存在下における、変異タンパク質IFN-β（phe_{101}）のサンプル（白四角；□）および野生型IFN-β（val_{101}）のサンプル（白菱形；◇）が、EMCVからA549細胞を保護しなかったことを示す。これは、変異タンパク質IFN-βまたは野生型IFN-β濃度のいずれかに関する基線の吸光度の値により示され、ほとんど全てのA549細胞が死滅したことを示す。
まとめると、図５は、変異タンパク質IFN-β（phe_{101}）の抗ウイルス活性が、野生型IFN-βに対する抗体（すなわち、ウサギ抗IFN-β抗体）により中和されたことを示す。
IFN-β変異タンパク質遺伝子治療での再狭窄の処置
再狭窄のための遺伝子治療の初期の試験は、以下のプロトコルに従って、組換え野生型ブタIFN-βを用いるブタモデルにおいて行われる。
細胞増殖は、免疫組織化学により測定する。全ての動物に、屠殺の１時間前に、25mg/kg総用量のBrdC（Sigma, St. Louis, MO）の静脈注入を与える。BrdCに対するモノクローナル抗体（１:1000希釈、Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL）を用いる免疫

組織化学を、Goncharoffら、J.Immunol.Methods、93、97頁（1988）に記載のように実施し、増殖細胞中の核を標識する。血管平滑筋細胞の同定を、Islkら、Am.J.Pathol.，141，1139頁（1992）に記載のように、平滑筋α-アクチンに対する抗体（１:500希釈、Boehringer Mannheim，Germany）を用いる免疫組織化学により実施する。

家畜のヨークシャーブタ（12～15kg）を、１％亜酸化窒素を用いて（2.2mg/kg筋肉内）ロンプンと組み合わせてゾラゼパミン-チレタミン（6.0mg/kg）で麻酔する。腸骨大腿骨動脈を、無菌的外科手順により曝露し、そして２重のバルーンカテーテルを、Nabelら、Science，249，1285頁（1990）に記載のように腸骨大腿骨動脈内に挿入する。基部のバルーンを、５分間、オンライン変圧器（pressure transducer）により測定されるように、300 mm Hgにまで膨張させる。バルーンを収縮させ、そして基部のバルーンと遠部のバルーンとの間の中央空間が、以前のバルーン損傷の領域を占めるように、カテーテルを進行させる。両方のバルーンを膨張させ、そしてセグメントをヘパリン処理生理食塩水で洗浄する。アデノウイルスの種菌を、カテーテルの中央空間内に20分間滴注する。カテーテルを除去し、そして回復するように血流を順行させる。

全てのブタの損傷した動脈に、ブタIFN-βをコードする挿入物を含有するADV-ΔE1ベクター、または挿入物を欠失するADV-ΔE1ベクターの１mlあたり10^{10}プラーク形成単位（PFU）を感染させる。それぞれの動物において、両方の腸骨大腿骨動脈を、1×10^{10}PFU/mlの力価の同一のベクターでトランスフェクトし、0.7mlをそれぞれの動物に用いた（7×10^{9}PFUの最終容量）。

これらのブタの血管セグメントを、21または42日後に摘出する。それぞれの動脈を同一の様式で処理する。２つの２重バルーン間の滴注の領域を、同一サイズの５つの横断面にカットする。セクション１および４を、メチルカルノアで固定し、そしてセクション３および５をホルマリンで固定し、そして全てのセクションをパラフィン包埋し、そしてヘマトキシリンエオシンで染色する。さらなる抗体研究を、メチルカルノア固定した動脈またはホルマリン固定した動脈において実施する。セクション２由来の組織を液体窒素内で瞬間凍結し、そしてDNA単離のために-80℃にて保存する。内膜および内側の領域の大きさを、２名の異なる読みとり者により盲検的にそれぞれの動脈由来の４つのセクションにおいて測定し、それぞれの血管についての大きさを平均化する。動脈の検体のスライドを、Nabelら、Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A，90，10759頁（1993）に記載のように顕微鏡に基づくビデオ画像診断分析システム（Image-1システム、Universal Imaging，Weschester，PA）で研究する。

上記のアデノウイルスに基づくAd-ΔE1ベクターに代わるものとして、直接的な遺伝子導入もまた用いられ得る。１つの適切な構築物は、IFN-βDNA配列に対して３’側にSV-40ポリA’シグナルを有する、RSV骨格（IFN-βの発現を導くRSV-Lプロモーターを有する）由来のプラスミドである。例えば、Gormanら、Science，221，551-53頁（1983）を参照のこと。

次いでベクターが、ヒトにおける遺伝子治療のために本発明のヒトIFN-β変異タンパク質をコードするDNA挿入物を含有するように、上記のプロトコルを改変する。

配列

以下は、配列リストに示される配列の要旨である：

配列番号１－－IFN-β（phe_{101}）のアミノ酸配列

配列番号２－－天然のIFN-βのシグナル配列をコードする配列を含有する、IFN-β（phe_{101}）をコードするDNA配列

配列番号３－－ペプチドTFLEEKのアミノ酸配列

配列番号４－－ペプチドTVLEEKのアミノ酸配列

寄託

プラスミドpBeta-phe（これは、IFN-β（phe_{101}）および天然のIFN-βのシグナル配列をコードするDNA配列を含有する）を含有するE.coli K-12は、寄託されている。寄託は、ブダペスト条約に従ってなされ、そして1994年３月11日にAmerican Type Culture Collection，Rockville，Maryland，U.S.Aに寄託された。寄託物は、受託番号69584を受けた。

上記の記載は、説明および記述の目的のためのみに示されている。この記載は、開示された厳密な形態に本発明を限定することを意図しない。本発明の範囲は、本明細書に添付された請求の範囲によって定義されることを意図する。

配列表

(1) 一般的情報：

(i) 出願人：バイオジェン，インコーポレイテッドゴールズ，スーザン イーケイト，リチャード エルペピンスキー，ブレイク アールチャウ，ピンチャン イー

(ii) 発明の名称：IFN-βの新規変異タンパク質

(iii) 配列数：５

(iv) 連絡住所：

(A) 名称：ジェイムス エフ．ハーレー，ジュニア

(B) 番地：フィッシュ アンド ニーブ，アベニュー オブ ザ アメリカズ1251

(C) 市：ニューヨーク

(D) 州：ニューヨーク

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：10020-1104

(ｖ) コンピューター読み出し形態：

(A) 媒体型：フロッピーディスク

(B) コンピューター：IBM PC互換用

(C) OS：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントイン リリース #1.0，バージョン #1.25

(vi) 現在の出願データ：

(A) 出願番号：

(B) 出願日：

(C) 分類：

(viii) 代理人／事務所情報：

(A) 氏名：ハーレー，ジュニア，ジェイムス エフ

(B) 登録番号：27,794

(C) 照会／記録番号：B179

(ix) 電話回線情報：

(A) 電話：（212）596-9000

(B) テレファックス：（212）596-9090

(2) 配列番号１の情報：

(i) 配列の特色：

(A) 長さ：166アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(xi) 配列：配列番号１：

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95

His Leu Lys Thr Phe Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

(2) 配列番号２の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：561塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：cDNA
(iii) ハイポセティカル：NO
(iv) アンチセンス：NO
(ix) 配列の特徴：
(A) 特徴を表す記号：sig_peptide
(B) 存在位置：1..63
(ix) 配列の特徴：
(A) 特徴を表す記号：mat_peptide
(B) 存在位置：64..561
(ix) 配列の特徴：
(A) 特徴を表す記号：CDS
(B) 存在位置：1..561
(xi) 配列：配列番号２：

```
ATG ACC AAC AAG TGT CTC CTC CAA ATT GCT CTC CTG TTG TGC TTC TCC      48
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
-21 -20                 -15                 -10

ACT ACA GCT CTT TCC ATG AGC TAC AAC TTG CTT GGA TTC CTA CAA AGA      96
Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 -5                  1                   5                  10

AGC AGC AAT TTT CAG TGT CAG AAG CTC CTG TGG CAA TTG AAT GGG AGG     144
Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
                15                  20                  25

CTT GAA TAC TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC CCT GAG GAG     192
Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
            30                  35                  40

ATT AAG CAG CTG CAG CAG TTC CAG AAG GAG GAC GCC GCA TTG ACC ATC     240
Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
        45                  50                  55

TAT GAG ATG CTC CAG AAC ATC TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT     288
Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
    60                  65                  70                  75

AGC ACT GGC TGG AAT GAG ACT ATT GTT GAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC     336
Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
                80                  85                  90

TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA TTC CTG GAA GAA AAA CTG GAG     384
Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Phe Leu Glu Glu Lys Leu Glu
            95                  100                 105

AAA GAA GAT TTC ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA     432
Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
        110                 115                 120

AGA TAT TAT GGG AGG ATT CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AGT     480
Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
    125                 130                 135

CAC TGT GCC TGG ACC ATA GTC AGA GTG GAA ATC CTA AGG AAC TTT TAC     528
His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
140                 145                 150                 155

TTC ATT AAC AGA CTT ACA GGT TAC CTC CGA AAC                         561
Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
            160                 165
```

(2) 配列番号３の情報：

(i) 配列の特色：

(A) 長さ：187アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号３：

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
-21 -20 -15 -10

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
-5 1 5 10

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
15 20 25

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
30 35 40

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
45 50 55

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
60 65 70 75

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
80 85 90

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Phe Leu Glu Glu Lys Leu Glu
95 100 105

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
110 115 120

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
125 130 135

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
140 145 150 155

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
160 165

(2) 配列番号４の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：６アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：ペプチド
(iii) ハイポセティカル：NO
(iv) アンチセンス：NO
(xi) 配列：配列番号４：

Thr Phe Leu Glu Glu Lys
1 5

(2) 配列番号５の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：６アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：ペプチド
(iii) ハイポセティカル：NO
(iv) アンチセンス：NO
(xi) 配列：配列番号５：

Thr Val Leu Glu Glu Lys
1 5

【図１】

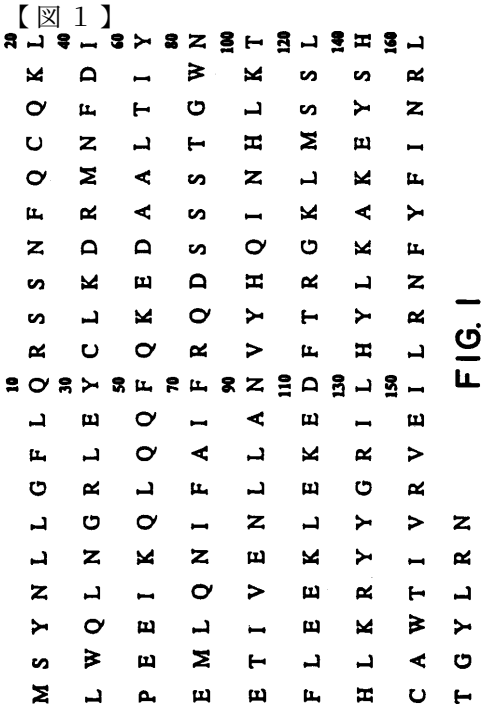

FIG. 1

【図２】

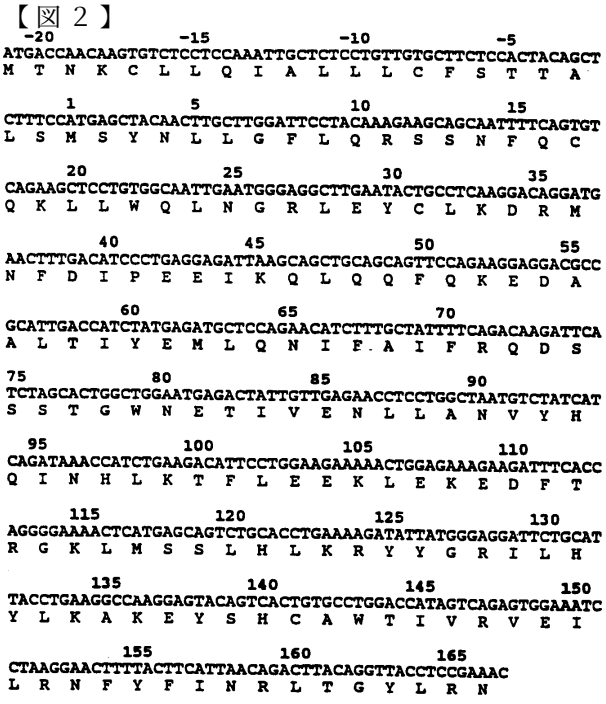

FIG. 2

【図３Ａ】

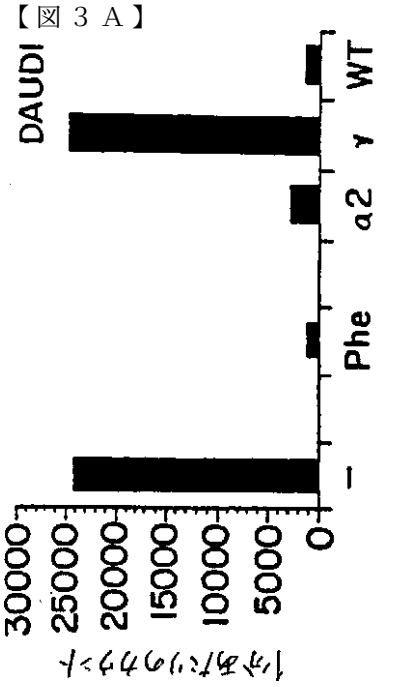

FIG. 3A

【図３Ｂ】

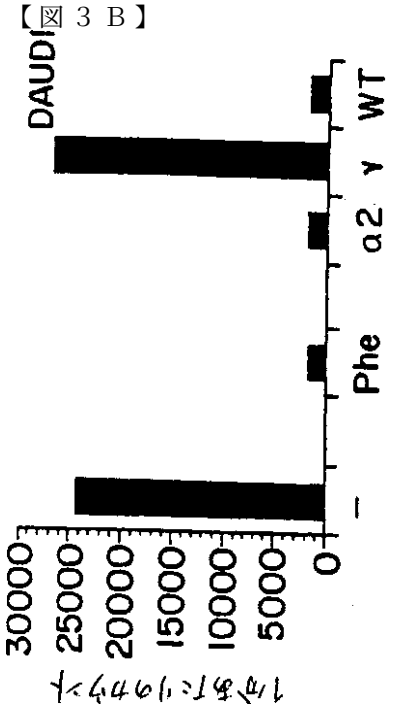

FIG. 3B

【図３Ｃ】

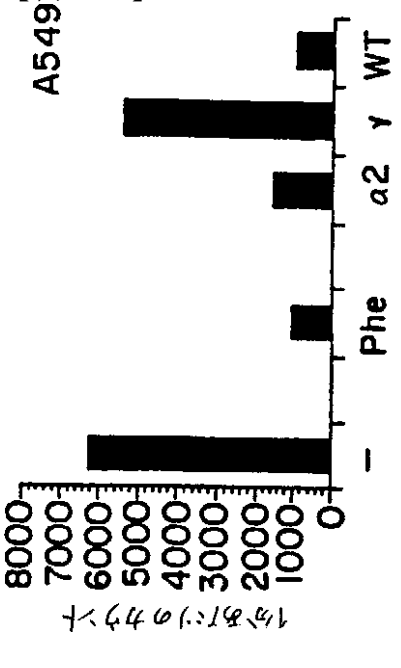

FIG. 3C

【図３Ｄ】

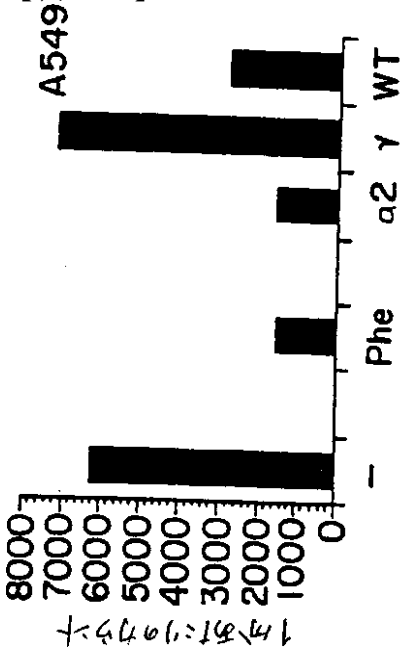

FIG. 3D

【図４Ａ】

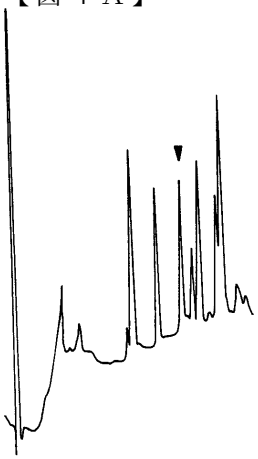

FIG. 4A

【図４Ｂ】

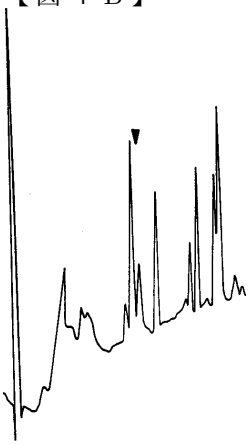

FIG. 4B

【図５】

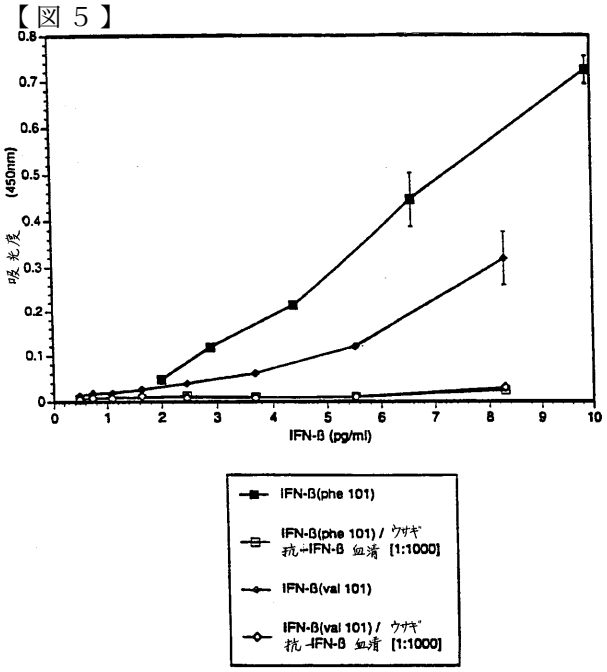

FIG. 5

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61K 48/00	***(2006.01)***	A61K	37/66	G
A61P 31/12	***(2006.01)***	A61K	48/00	
		A61P	31/12	

(72)発明者 チョウ, イー. ピンチャン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１２９, チャールスタウン, エイス ストリート ナンバー７０６ １９７
(72)発明者 ペピンスキー, アール. ブレーク
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１７２, ウォータータウン, パーカー ストリート ナンバー２ ６９

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 特開昭５６－１５４４９９（ＪＰ, Ａ）
Nucleic Acids Research, 1980, Vol.8, No.13, pp.2885-2894
Gene, 1980, Vol.10, pp.11-15

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/09
C12N 15/22
C07K 14/565
A61K 38/21
A61K 48/00
A61P 31/12
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq