

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-525784

(P2005-525784A)

(43) 公表日 平成17年9月2日(2005.9.2)

(51) Int.Cl.⁷

C12N 15/09
A61K 38/21
A61P 31/12
A61P 35/00
A61P 37/02

F 1

C 12 N 15/00 Z N A A
A 61 P 31/12
A 61 P 35/00
A 61 P 37/02
A 61 P 43/00 105

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 B 06 4
4 C 08 4
4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-521781 (P2003-521781)	(71) 出願人	500183630 ペプジェン コーポレイション アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 02, アラメダ, ハーバー ベイ パ ークウェイ 1265
(86) (22) 出願日	平成14年8月12日 (2002.8.12)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月10日 (2004.2.10)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/025691	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02003/016472	(72) 発明者	ヴィラレーテ, ロレリー エイチ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 01, アラメダ, ギボンス ドライブ 2930
(87) 國際公開日	平成15年2月27日 (2003.2.27)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/311,866		
(32) 優先日	平成13年8月12日 (2001.8.12)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】ハイブリッドインターフェロン／インターフェロン- τ タンパク質、組成物、および使用方法

(57) 【要約】

本発明は、インターフェロン - τ タンパク質から構成されるハイブリッドインターフェロン融合タンパク質に関し、ここで、インターフェロン - τ のC-末端領域が、インターフェロン - τ のC末端領域によって置換されている。インターフェロン融合タンパク質をコードする核酸配列、このような配列を含む発現ベクター、およびこのインターフェロン融合タンパク質の治療適用もまた記載される。治療適用としては、抗ウイルス適用、抗細胞増殖適用、および抗炎症適用が挙げられる。本発明のインターフェロン融合ポリペプチドの1つの利点は、これらが、細胞を処置するために用いられる場合、より低い細胞傷害性の副作用を有することである。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

インターフェロン /インターフェロン - ハイブリッドタンパク質であって、該タンパク質は、以下：

インターフェロンタンパク質の C 末端領域が、インターフェロン - の C 末端領域で置換されている、インターフェロンタンパク質、
を含み、

ここで、該ハイブリッドタンパク質は、該インターフェロンタンパク質の細胞毒性に対して低下した細胞毒性を有する、ハイブリッドタンパク質。

【請求項 2】

前記インターフェロンタンパク質が、I 型インターフェロンタンパク質である、請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 3】

前記 I 型インターフェロンタンパク質が、インターフェロン - である、請求項 2 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 4】

前記インターフェロン - タンパク質が、ヒトインターフェロン - である、請求項 3 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 5】

前記ヒトインターフェロン - が、ヒトインターフェロン - D である、請求項 4 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 6】

前記インターフェロンタンパク質は、C 末端の約 0 ~ 30 個のアミノ酸が置換されている、請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 7】

前記インターフェロンタンパク質は、C 末端の約 1 ~ 10 個のアミノ酸が置換されている、請求項 6 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 8】

前記インターフェロンタンパク質は、C 末端の最後の 4 個のアミノ酸が置換されている、請求項 7 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 9】

前記ヒトインターフェロン - D の C 末端領域が、残基 163 ~ 166 にわたる配列に対応する、請求項 5 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 10】

前記インターフェロン - の C 末端領域が、インターフェロン - の残基 163 ~ 172 にわたる配列に対応する、請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 11】

前記インターフェロンタンパク質が、ヒトインターフェロン - D であり、そして該ヒトインターフェロン - D の C 末端領域が、残基 163 ~ 166 にわたり、そしてインターフェロン - の C 末端領域が、インターフェロン - の残基 163 ~ 172 にわたる配列に対応する、請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 12】

前記ハイブリッドタンパク質が、前記インターフェロンタンパク質の細胞毒性に対して低下した細胞毒性を有する、請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 13】

前記ハイブリッドタンパク質が、M D B K / V S V 抗ウイルス系において少なくとも約 1 × 10⁸ の抗ウイルス単位 / mg の抗ウイルス活性を有する、請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 14】

前記 I 型インターフェロンが、インターフェロン - である、請求項 1 に記載のハイブリ

10

20

30

40

50

ッドタンパク質。

【請求項 15】

前記インターフェロン - γ が、ヒツジまたはウシのインターフェロン - γ である、請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 16】

前記ハイブリッドタンパク質が、ポリエチレングリコール処理されている、請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 に記載のハイブリッドタンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 18】

インターフェロンハイブリッドタンパク質を作製する方法であって、該方法は、以下：

組換え発現系の中に請求項 17 に記載の核酸分子を置く工程；

該核酸分子の発現に、該ハイブリッドタンパク質を産生するように影響を与える工程；および

該ハイブリッドタンパク質を回収する工程、

を包含する、方法。

【請求項 19】

前記組換え発現系が、P. pastoris を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

以下：

請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質、および

薬学的に受容可能なキャリア、

を含む、薬学的組成物。

【請求項 21】

前記組成物が、リバビリンをさらに含む、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

ウイルスに感染した細胞におけるウイルス複製を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、該細胞における該ウイルスの複製を阻害するのに有効な量の請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 23】

腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、該方法は、該細胞を、腫瘍細胞の増殖を阻害するのに有効な量の請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 24】

被験体における自己免疫疾患を処置する方法であって、該方法は、該疾患を処置するのに有効な量の請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質を、被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 25】

被験体における慢性炎症を処置する方法であって、該方法は、該炎症を処理するのに有効な量の請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質を、被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 26】

インターフェロンに応答性の疾患状態を処置する方法であって、該方法は、該疾患状態を処置するのに有効な量の請求項 1 に記載のハイブリッドタンパク質を、該疾患状態を有する被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 27】

前記投与する工程が、経口、局所、吸入、経鼻および注入からなる群より選択される投与方法により行われる、請求項 22 ~ 26 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本出願は、本明細書中で参考として援用される、2001年8月12日に出願された米国特許仮出願番号60/311,866に対する優先権を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、インターフェロン- α に由来するC末端領域および別のインターフェロンに由来する領域からなるハイブリッドインターフェロンタンパク質に関する。

【背景技術】

【0003】

(参考文献)

10

【0004】

【化1】

Akiyama, K. et al. (1993) A clinical trial of recombinant bovine interferon alpha 1 for the control of bovine respiratory disease in calves. *J. Vet. Med. Sci.* 55:3, 449-452.

Ausubel, F.M., et al. (1992) in *Current Protocols in Molecular Biology*.

Babiuk, L.A. (1987) Use of recombinant bovine alpha interferon in reducing respiratory disease induced by bovine herpes virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:5, 752-757.

Bacila et al. eds. (1978) *Biochemistry and Genetics of Yeast*.

Balzarini, J. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178:563-569 (1991).

20

Bartol, F.F., et al., *Biol. Reprod.* 33:745-759 (1985).

Bayne, M.L. et al., *Gene* 66:235-244 (1988).

Bazer, F.W., and Johnson, H.M., *Am. J. Reprod. Immunol.* 26:19-22 (1991).

Bazer, F.W., et al., PCT publication WO/94/10313, published 11 May, 1994.

Beames, et al., *Biotechniques* 11:378 (1991).

Benvegnu, L., et al., *Cancer* 83:901-909 (1998).

Berenguer M., et al., *Adv. Gastroenterol. Hepatol. Clin. Nutr.* 1:2-21 (1996).

30

Bitter et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:5330-5334.

Brake, A.J., et al. (1984) Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4642-4646.

Breitling, R. et al. (1989) Secretory expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* of human interferon alpha genes directed by staphylokinase signals. *Mol. Gen. Genet.* 217:2-3, 384-91.

Brierley, R.A. (1998) Secretion of recombinant human insulin-like growth factor 1 (IGF-1). *Methods Mol. Biol.* 103, 149-177.

Brocca, S., et al. (1998) Design, total synthesis, and functional overexpression of the

40

Candida rugosa lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci.* 7, 1415-1422.

Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. (2000) Heterologous protein expression in the

【0005】

【化2】

methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 45-66.

Charlier, M., et al., *Mol. Cell Endocrinol.* 76:161-171 (1991).

Cheng, et al. (1997) The clinical study on treatment of hepatic fibrosis of hepatitis B by IFN-alpha 1 and Chinese medical preparation. *Chung Kuo Chung His I Chieh Ho Tsa Chih* 17:8, 453-455.

Choo, Q.-L., et al., *Science* 244, 359-362 (1989).

Choo, Q.-L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2451-2455 (1991).

Clarke, B.E., *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 14:293-305 (2000).

Cohen et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1078.

Cotler, S.J., et al., *J. Viral Hepatitis* 7:211-217 (2000).

Crawford-Miksza, L. and David Schnurr, D. (1994) Quantitative Colorimetric Microneutralization Assay for Characterization of Adenoviruses, *J. Clinical Microbiology* 32(9):2331-2334.

Clegg, J.M. and Madden, K.R. (1989) Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *Mol. Gen. Genet.* 219, 320-323.

Clegg, J.M. and Russell, K.A. (1998) Transformations Methods. *Mol. Biol.* 103, 27-39.

Clegg, J.M., et al. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3376-3385.

Clegg, J.M., et al. (1988) Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol.* 23, 33-41.

Clegg, J.M., et al. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 111-1121.

Clegg, J.M., et al. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11:905-910.

Clare, J.J., et al. (1991) Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105, 205-212.

Cross, J.C., and Roberts, R.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3817-3821 (1991).

Dayhoff et al. (1978) in *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

De Maeyer, E. et al. (1982) Expression of a chemically synthesized human alpha 1 interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:14, 4256-4259.

Deutscher, (1990) *Methods in Enz.* 182.

Di Bisceglie, A.M., et al., *Hepatology* 16:649-654 (1992).

Dieperink, E., et al., *Am. J. Psychiatry* 157:867-876 (2000).

Ecker, D.J., et al., *J. Biol. Chem.* 264:7715-7719 (1989).

Elliott et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7080-7084

10

20

30

40

【0006】

【化3】

Ellis, S.B., et al. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1316-1323.

Feher, Z., et al., *Curr. Genet.* 16:461 (1989).

Fernandez H., et al., *Eur. J. Epidemiol.* 2:1-14 (1986).

Godkin, J.D., et al., *J. Reprod. Fertil.* 65:141-150 (1982).

Gnatek, G.G., et al., *Biol. Reprod.* 41:655-664 (1989).

Henikoff et al. (1981) *Nature* 283:835.

Higgins, D.R., et al. (1998) Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection. *Methods Mol. Biol.* 103, 41-53.

Hitzeman, R.A., et al., U.S. Patent No. 4,775,622, issued October 4, 1988.

Helmer, S.D., et al., *J. Reprod. Fert.* 79:83-91 (1987).

Hollenberg et al. (1981) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96:119.

Horiike N., et al., *C. Oncol. Rep.* 5:1171-1174 (1998).

Houglum, *Clin. Pharm.* 2:20-28 (1983).

Imakawa, K., et al., *Nature* 330:377-379 (1987).

Imakawa, K., et al., *Mol. Endocrinol.* 3:127 (1989).

Jarpe, M.A., et al., *Protein Engineering* 7:863-867 (1994).

Jimenez-Saenz, M., et al., *J. Gastroenterology and Hepatology* 15:567-569 (2000).

Jin, X.Y. (1992) A clinical investigation of rHuIFN alpha-1 in the treatment of herpes simplex virus keratitis. *Chung Hua Yen Ko Tsa Chih* 28:3, 134-137.

Julius et al. (1983) *Cell* 32:839-852

Klemann, S.W., et al., *Nuc. Acids Res.* 18:6724 (1990).

Koskinas J., et al., *J. Med. Virol.* 45:29-34 (1995).

Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492.

Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382.

Lechner, F., et al., *J. Exp. Med.* 191:1499-1512 (2000).

Liu, H., et al. (1992) An efficient screen for peroxisome-deficient mutants of *Pichia pastoris*. *J. Bacteriol.* 174, 4943-4951.

Liu, H., et al. (1995) *PER3*, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. *J. Biol. Chem.* 270, 10940-10951.

Ludwig, D.L., et al., *Gene* 132:33 (1993).

Magrin, S., et al., *Hepatology* 19, 273-279 (1994).

Maniatis, T., et al., in MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982).

Martal, J., et al., *J. Reprod. Fertil.* 56:63-73 (1979).

10

20

30

40

【化4】

Martin, E.W., in DISPENSING OF MEDICATION: A PRACTICAL MANUAL ON THE FORMULATION AND DISPENSING OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS (Mack Publishing Co., Easton, PA), 1976.

Mercereau-Pujalon *et al.* (1980) Gene 11:163.

Mullis, K.B., U.S. Patent No. 4,683,202, issued 28 July 1987.

Mullis, K.B., *et al.*, U.S. Patent No. 4,683,195, issued 28 July 1987.

Noisakran, S. and Carr, D.J.J. (2000) Plasmid DNA encoding IFN- α 1 antagonizes herpes simplex virus type 1 ocular infection through CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T Lymphocytes. *Journal of Immunology* 164(12):6435-43. 10

Noisakran, S., *et al.* (1999) Ectopic expression of DNA encoding IFN- α 1 in the cornea protects mice from herpes simplex virus type 1-induced encephalitis. *J Immunology* 162(7):4184-90.

Oeda, K., *et al.*, U.S. Patent No. 4,766,068, issued August 23, 1988.

Ott, T.L., *et al.*, *J. IFN Res.* 11:357-364 (1991).

Panthier *et al.* (1980) *Curr. Genet.* 2:109.

Pawlotsky, J-M., *et al.*, *J. Interferon and Cytokine Res.* 15:857-862 (1995). 20

Pearson, W.R. and Lipman, D.J., *PNAS* 85:2444-2448 (1988).

Pearson, W.R., *Methods in Enzymology* 183:63-98 (1990).

Pontzer C.H., *et al.* (1995) Measurement of interferons. *Meth. Neurosci.* 24:3-9.

Raemaekers, R.J.M., *et al.* (1999) Functional phytohaemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris*: correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *Eur. J. Biochem.* 65, 394-403. 30

Reilly, P.R., *et al.*, BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL, 1992.

Riesenber, D. *et al.* (1990) High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:1, 77-82.

Roberts, R.M., *et al.*, *Endocrin. Rev.* 13:432-452 (1992).

Rose and Harrison, eds. (1987) *The Yeasts* (2nd ed.).

Rutter, W.J., *et al.*, U.S. Patent No. 4,769, 238, issued September 6, 1988.

Saito, H., *et al.*, *J. Viral Hepatitis* 7:64-74 (2000).

Sambrook, J., *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scopes, (1982) Protein purification: principles and practice. Springer-Verlag, New York.

Sears, I.B., *et al.* (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* 14, 783-790. 40

【化5】

- Shaw, K.J., et al., *DNA* 7:117 (1988).
- Shen, L.P., et al., *Sci. Sin.* 29:856 (1986).
- Shen, S., et al. (1998) A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 216, 93-102.
- Shepherd, et al. (1998) Prospective randomized trial of two dose levels of interferon alpha with zidovudine for the treatment of Kaposi's sarcoma associated with human immunodeficiency virus infection: a Canadian HIV Clinical Trials Network Study. *J. Clin. Oncol.* 16:5, 1736-1742.
- Shindo, M., et al., *Hepatology* 9:715-719 (1989)
- Singh et al. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11:4049-4063
- Singh, A. et al. (1984) Synthesis, secretion and processing of alpha-factor-interferon fusion proteins in yeast. *Nucleic Acids Res.* 12:23, 8927-8938.
- Smith et al. (1985) *Science* 229:1219-1229.
- Skinner et al., eds. (1980) *Biology and Activities of Yeast* (Soc. App. Bacteriol. Symp. Series No. 9).
- Stewart, H.J., et al., *Mol. Endocrinol.* 2:65 (1989).
- Strathern et al., eds. (1981) *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*.
- Thill, G.P., et al. (1990) Positive and negative effects of multicopy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*. In: *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Genetics of Microorganisms* (Heslot, H., et al., Eds.), Vol. 2, pp. 477-490. Societe Francaise de Microbiologie, Paris.
- Trepo, C., *J. Viral Hepatitis* 7:250-257 (2000).
- Tyrring, et al., *Interferon: Principles and Medical Applications*, 1st Edition, Section VIII., pgs 399-408, 1992.
- Tschopp, J.F., et al. (1987). Expression of the LacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* 15, 3859-3876.
- Vallet, J.L., et al., *Biol. Reprod.* 37:1307 (1987).
- Van Heeke, G., et al. (1996) High yield expression and secretion of the ovine pregnancy recognition hormone interferon- τ by *Pichia pastoris*. *J. Interferon and Cytokine Res.* 16:119-126.
- Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York).
- Walter, M.R., et al. (1998) Review of recent developments in the molecular characterization of recombinant alpha Interferons on the 40th anniversary of the discovery of interferon. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 13:3, 143-154.
- Waterham, H.R., et al. (1996). The *Pichia pastoris* PER6 gene product is a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis and has sequence similarity to the

【化6】

Zellweger syndrome protein PAF-1. Mol. Cell. Biol. 16, 2527-2536.

Waterham, H.R., et al. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene 186, 37-44.

Whaley, A.E., et al., J. Biol. Chem. 269:10864-10868 (1994).

White, C.E., et al. (1995) Large-scale expression, purification and characterization of small fragments of thrombomodulin: the roles of the sixth domain and of methionine 388. Protein Eng. 8, 1177-1187.

Wu, D.A., et al., DNA 10:201 (1991).

10

(発明の背景)

インターフェロン (IFN) は、種々の細胞型の増殖および機能に対する多面発現効果を示す構造的および機能的に関連したタンパク質のファミリーである。1957年の抗ウイルス剤としてのこれらの発見以来、IFNは、ナチュラルキラー細胞活性の調節および主要組織適合性抗原発現の調節を含む、種々の強力な免疫調節効果、ならびに悪性細胞に対する抗増殖活性を示すことが示されている (Walterら、1998)。

【0010】

主要なクラスのIFNは、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ およびIFN- δ （これらはまた、I型（酸安定）と命名される）、およびIFN- ϵ （II型と命名される、酸不安定）である。以下の表Iは、主要なクラスのIFNの局面をまとめた。

【0011】

【表1】

表1

インターフェロンの概要

局面	I型	I型	I型	II型
型	α および ω	β	τ	γ
により合成される：	白血球	線維芽細胞	栄養膜	リンパ球
抗ウイルス性	+	+	+	+
抗増殖性	+	+	+	+
妊娠シグナル伝達	-	-	+	-

30

タンパク質のIFN- α ファミリーは、現在、1個の偽遺伝子および同じタンパク質をコードする2個の遺伝子を含む、少なくとも14個の遺伝子からなることが知られている。従って、14個の遺伝子から作製される12個の別々のIFNタンパク質が存在する。種々のIFN- α サブタイプは、アミノ酸配列レベルで約80%の同一性を共有する。

40

【0012】

インターフェロン-1(IFN-1)（インターフェロン- α D(IFN-D)としても公知）は、広範な研究目的および臨床目的のI型インターフェロンである。最近の報告は、ヒトおよび動物における種々のウイルス疾患の処置における組換えIFN-Dの効力を実証する (Noisakran および Carr, 2000; Noisakranら、1999)。ヒトIFN-Dにおける臨床目的および研究目的に起因して、異なる発現系が、開発および使用されている。

50

【0013】

1982年の組換えヒトIFN-D(rHuIFN-D)の発現は、Methylphillus methylotrophus系およびE.coli系について記載されており、これらに系の両方は、lacプロモーターを利用した(De Maeyer, 1982)。1984年に、Genentechの科学者は、因子プレプロシグナル配列と融合したIFN-D遺伝子が、比較的低い生物学的活性を有した分泌IFN-Dタンパク質を生じる、Saccharomyces cerevisiae系を報告した(Singh, 1984)。数年後の1989年に、スタフィロキナーゼ非相同発現-分泌シグナルを用いる、E.coliおよびBacillus subtilis(B.subtilis)におけるヒトインターフェロン遺伝子の分泌発現が開発された(Breitling, 1989)。これらの研究において、E.coli系ではなく、B.subtilis系のみが、rHuIFN-Dを培養培地中へ分泌し得た。E.coli中のrHuIFN-Dの細胞内発現に対する有意な改良が、E.coliにおいて、減少した比増殖速度で、タンパク質のより効率的発現を可能にする、発酵の間の流加培養様式における規定培地の使用により、1990年に報告された。しかし、11年間にわたって、ヒトIFN-Dの産生における、さらなる有意な改良は存在しない。

【0014】

同定された最初のIFN-_Iは、18~19kDaタンパク質としてのヒツジIFN-(OvIFN-_I)であった。数種のアイソフォームが、受胎産物(胚および周囲の膜)ホモジネートにおいて同定された(Martalà, 1979)。次いで、受胎産物培養培地中に放出された低分子量タンパク質が精製され、そして熱不安定、およびプロテアーゼに対して感受性の両方であることが示されている(Godkinnà, 1982)。OvIFN-_Iは、本来、ヒツジにおける母認識(maternal recognition)の臨界期の間に、ヒツジ受胎産物の栄養外胚葉により初めに產生される、最初の分泌タンパク質であったからである。引き続いての実験は、OvIFN-_Iが、反芻動物(例えは、ヒツジおよびウシ)における妊娠に対する生理学的応答の確立のために必須の妊娠認識ホルモンであることを決定した(BazérおよびJohnson, 1991)。

【0015】

N末端アミノ酸配列を表す合成オリゴヌクレオチドを用いるヒツジ胚盤胞ライブラリーをプロービングすることにより得られたIFN-_IcDNA(Imakawaら、1987)は、ヒト、マウス、ラットおよびブタ由来のIFN-_Iと45~55%相同であり、そしてウシIFN-_IIIと70%の相同である、予想されるアミノ酸配列を有し、現在IFN-_Iと呼ばれている。異なるアイソフォームを表し得るいくつかのcDNA配列が報告されている(Stewartら、1989; Kleemannら、1990; およびCharlier, M.ら、1991)。全ては、約1kbであり、23個のアミノ酸リーダー配列および172個のアミノ酸成熟タンパク質をコードする585塩基のオープンリーディングフレームを有する。同格でアミノ末端およびカルボキシル末端を有する4つのらせん状の束としてIFN-_Iの予想される構造は、I型 IFNとしてのその分類をさらに支持する(Jarpeら、1994)。

【0016】

IFN-_Iは、I型IFNに古典的に関連する活性の多くを表す(上記表1を参照のこと)一方で、IFN-_Iと他のI型IFNとの間でかなりの差異を示す。殆どの顕著な差異は、上で詳述した、妊娠におけるその役割である。ウイルス誘導もまた異なる。IFN-_Iを除く、全てのI型のIFNは、ウイルスおよびdsRNAにより容易に誘導される(Robertsら、1992)。誘導されたIFN-_I発現およびIFN-_I発現は、一過性であり、約数時間続く。対照的に、IFN-_I合成は、一旦誘導されると、数日間にわたって維持される(Godkinnà, 1982)。1細胞あたり、I型IFNよりも300倍よりも多いIFN-_Iが产生される(CrossおよびRoberts, 1991)。

【0017】

10

20

30

40

50

他の差異は、IFN-遺伝子の調節領域に存在し得る。例えば、ヒト栄養膜細胞株JARの、ウシIFN-についての遺伝子でのトランスフェクションは、抗ウイルス活性を生じた一方で、ウシIFN-遺伝子でのトランスフェクションは、抗ウイルス活性を生じなかつた。このことは、IFN-遺伝子発現に関する固有のトランス作用性因子を意味する。IFN-の近位のプロモーター領域(126~転写開始部位)が、IFN-およびIFNの近位のプロモーター部位と非常に相同である一方で；-126~-450の領域は、相同ではなく、そしてIFN-発現のみを増強するという観察(CrossおよびRoberts、1991)はこのことと一致する。従って、他のI型IFNと比較した場合、異なる調節因子が、IFN-発現に関するようである。

【0018】

IFN-発現はまた、種の間で異なり得る。例えば、IFN-発現は、反芻動物における受胎産物の発生の特定の段階(主に、13~21日)に制限される(Godkinら、1982)が、予備的な研究は、ヒト形態のIFN-が妊娠を通して構成的に発現されること(Whaleyら、1994)を示唆する。

【0019】

有意に、インターフェロンの有用性が、毒性により制限されている。癌およびウイルス疾患の処置におけるインターフェロンの使用は、重篤な副作用を生じた。IFN-をtherapy for chronic hepatitis C in United States in 1991 and in Japan in 1992(Saitoら、2000)のように導入した。しかし、臨床的効力を生じるのに対する十分な投薬量(すなわち、約 1×10^6 単位/処置以上の量での)のIFN-の使用は、通常、熱、頭痛、嗜眠、関節痛および筋痛により特徴付けられる「インフルエンザ様」症候群に関連する(Tyringら、1992)。 $5 \sim 10 \times 10^6$ 単位/処置以上の投薬量で、他の毒性(例えば、恶心、嘔吐および食欲不振)はより頻繁になる。神経精神病学的症状はまた、IFN-処置(Dieperinkら、2000)と関連して報告されている。さらに、いくつかの研究は、IFN-処置の効力が、用量依存ではなく(Saitoら、2000)、そしてIFN-での処置が、新生物またはウイルス性肝炎を有する患者における自己免疫疾患の発症または悪化と関連することを示唆する(Jimenez-Saenzら、2000)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

従って、高い抗ウイルス活性および低い細胞毒性を有するインターフェロンタンパク質の要求がある。本発明は、これらの要求を満たすように設計される。

【課題を解決するための手段】

【0021】

(発明の要旨)

従って、1つの局面では、本発明の目的は、インターフェロンタンパク質を含むインターフェロン/インターフェロン-ハイブリッドタンパク質(ここで、このインターフェロンタンパク質のC末端領域は、インターフェロン-のC末端領域により置換される)を提供することである。1つの実施形態では、本発明は、非-インターフェロンタンパク質を含む非-インターフェロン/インターフェロン-ハイブリッドタンパク質(ここで、この非-インターフェロンタンパク質のC末端領域は、インターフェロン-のC末端領域により置換される)を提供する。別の実施形態では、インターフェロンタンパク質は、I型インターフェロンタンパク質である。このI型インターフェロンタンパク質は、インターフェロン-であり得る。好ましくは、インターフェロン-は、ヒトインターフェロン-である。1つの実施形態では、ヒトインターフェロン-は、ヒトインターフェロン-Dである。さらに別の実施形態では、インターフェロンタンパク質は、インターフェロン-である。

【0022】

10

20

30

40

50

ひとつの実施形態では、ハイブリッドタンパク質は、以下の工程を包含するアッセイにおいて、ネイティブのインターフェロン（例えば、インターフェロン- α ）に対して低い細胞傷害性を示し得る：少なくとも2000の抗ウイルス単位/1mLのハイブリッドを含む培養培地中で7日間、PBM Cの第1のサンプルをインキュベートする工程；抗ウイルス単位/1mLとしてネイティブIFN- α と同じ濃度を有する培養培地中で7日間、第2のPBM Cをインキュベートする工程；および第1のサンプル中に残存する生細胞のパーセンテージを、第2のサンプル中に残存する生細胞のパーセンテージと比較して、それにより、生細胞のより高いパーセンテージが、培養培地中のIFN種の相対的に低い毒性を示す工程。

【0023】

10

本発明の1つの実施形態では、インターフェロンタンパク質は、置換されたC末端領域を有さないが、代わりに、全長のインターフェロンタンパク質上に加えられたインターフェロン- α のC末端領域を有する。従って、インターフェロンタンパク質は、0個のアミノ酸が置換されたC末端を有する。別の実施形態では、インターフェロンタンパク質は、約1個～30個の間のアミノ酸が置換されたC末端を有する。さらに別の実施形態では、インターフェロンタンパク質は、置換されたC末端に約1個～10個の間のアミノ酸を有する。好ましくは、インターフェロンタンパク質は、最後の4個のアミノ酸が置換されたC末端を有する。関連する実施形態では、ヒトインターフェロン- α DのC末端領域は、残基163～166にわたる配列に対応する。

【0024】

20

1つの実施形態では、ハイブリッドタンパク質は、インターフェロン- α の残基163～172にわたる配列に対応するインターフェロン- α のC末端領域を含む。好ましくは、インターフェロンタンパク質は、ヒトインターフェロン- α Dであり、そしてヒトインターフェロン- α DのC末端領域は、残基163～166にわたり、そしてインターフェロン- α のC末端領域は、インターフェロン- α の残基163～172にわたる配列に対応する。

【0025】

30

1つの実施形態では、ハイブリッドタンパク質は、インターフェロンタンパク質または非インターフェロンタンパク質の細胞毒性に対して、低下した細胞毒性を有する。別の実施形態では、ハイブリッドタンパク質は、インターフェロンタンパク質または非インターフェロンタンパク質の抗ウイルス活性に対して増加した抗ウイルス活性を有する。関連する実施形態では、ハイブリッドタンパク質は、少なくとも約 1×10^8 個の抗ウイルス単位/1mgのMDBV/VSV抗ウイルス系の抗ウイルス活性を有する。別の実施形態では、ハイブリッドタンパク質は、少なくとも約 2×10^8 個の抗ウイルス単位/1mgのMDBV/VSV抗ウイルス系の抗ウイルス活性を有する。

【0026】

40

本発明は、インターフェロン- α タンパク質が、反芻動物のインターフェロン- α であることを企図する。1つの実施形態では、インターフェロン- α は、ヒツジまたはウシのインターフェロン- α である。本発明はまた、上記のハイブリッドタンパク質のいずれかが、ポリエチレングリコール処理され(pegylated)得ることを企図する。

【0027】

40

別の局面では、本発明は、上記のハイブリッドタンパク質のいずれかをコードする核酸分子を含む。さらに別の局面では、本発明は、インターフェロンハイブリッドタンパク質を作製する方法を包含する。この方法の実施に関する工程は、以下の工程を包含する：上記の核酸分子のいずれかを、組換え発現系に配置する工程；核酸分子の発現に作用して、ハイブリッドタンパク質を産生させる工程；およびハイブリッドタンパク質を回収する工程。1つの実施形態では、組換え発現系としては、P.pastorisが挙げられる。

【0028】

50

さらに別の局面では、本発明は、上記のように調製されたハイブリッドタンパク質、および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を含む。この組成物はまた、リバビ

リンを含み得る。

【0029】

本発明はまた、1つの局面において、ウイルスに感染した細胞におけるウイルス複製を阻害する方法を包含する。この方法は、細胞を、細胞中のウイルスの複製を阻害するのに有効な量のハイブリッドタンパク質と接触させる工程を包含する。

【0030】

腫瘍細胞の増殖を阻害する方法もまた企図される。この方法は、腫瘍細胞を、それらの増殖を阻害するのに有効な量のハイブリッドタンパク質と接触させる工程を包含する。

【0031】

本発明の別の局面は、被験体における自己免疫疾患を処置する方法を包含する。この方法は、被験体に、この疾患を処置するのに有効な量の上記のように調製された任意のハイブリッドタンパク質を投与する工程を包含する。10

【0032】

本発明のさらに別の局面は、被験体における慢性炎症を処置する方法を包含する。この方法は、被験体に、炎症を処置するのに有効な量の上記のように調製された任意のハイブリッドタンパク質のいずれかを投与する工程を包含する。

【0033】

本発明のさらに別の局面は、インターフェロンに応答性の疾患状態を処置する方法を包含する。この方法は、この疾患状態を有する被験体に、この疾患状態を処置するのに有効な量の上記のように調製された任意のハイブリッドタンパク質を投与する工程を包含する20。

【0034】

上記の方法のいずれかにおいて、投与は、経口、局所、吸入、経鼻および注入からなる群より選択される投与方法により実施され得る。

【0035】

本発明のこれらおよび他の目的および特徴は、以下の発明の詳細な説明を、添付の図面と共に読む場合に、より完全に理解される。

【0036】

(発明の詳細な説明)

(I. 定義)

他に示されない限り、本明細書中で用いられる全ての専門用語および科学用語は、本発明の当業者が用いるのと同じ意味である。従事者は、特に、当該分野の定義および用語について、Sambrookら、1989およびAusubel FMら、1993の指示に従う。本発明は、これらが変化し得るように、記載される特定の方法論、プロトコル、および試薬に制限されないことが理解される。30

【0037】

本明細書中で引用される全ての文献および特許は、本発明と共に用いられ得る組成物および方法論を記載および開示する目的のために、本明細書中で参考として明確に援用される。

【0038】

「異種」核酸構築物または「異種」核酸配列は、それが発現される細胞に対してネイティブではない配列の部分を有する。制御配列に関して、異種とは、現在調節している同じ遺伝子発現を調節するようには、天然において機能しない制御配列(すなわち、プロモーターまたはエンハンサー)をいう。一般的に、異種核酸配列は、それらが存在する細胞またはゲノムの一部に対して内因的ではなく、そして感染、トランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどにより細胞に加えられていない。「異種」核酸構築物は、ネイティブの細胞において見出される制御配列/DNAコード配列の組み合わせと同じかまたは異なる、制御配列/DNAコード配列の組み合わせを含み得る。40

【0039】

50

本明細書中で用いられる場合、用語「ベクター」とは、異なる宿主細胞の間での転移のために設計された核酸構築物をいう。「発現ベクター」とは、外来の細胞において異種DNAフラグメントを取り込みそして発現する能力を有するベクターをいう。多くの原核生物発現ベクターおよび真核生物発現ベクターが市販されている。適切な発現ベクターの選択は、当業者の知識の範囲内である。

【0040】

本明細書中で用いられる場合、「発現カセット」または「発現ベクター」は、標的細胞においてか、またはインビトロで、特定の核酸の転写を可能にする一連の規定の核酸エレメントを用いて、組換え的かまたは合成的に生成された核酸構築物である。組換え発現カセットは、プラスミドDNA、染色体DNA、ミトコンドリアDNA、色素体DNA、ウイルス、または核酸フラグメントへと取込まれ得る。代表的には、発現ベクターの組換え発現カセット部分としては、とりわけ、他の配列、転写されるべき核酸配列、およびプロモーターが挙げられる。10

【0041】

本明細書中で用いられる場合、用語「プラスミド」とは、クローニングベクターとしても用いられる、環状二本鎖(ds)DNA構築物をいい、これは、多くの細菌およびいくつかの真核生物における染色体外自己修復遺伝子エレメントを形成する。

【0042】

本明細書中で用いられる場合、用語「選択可能なマーカーをコードするヌクレオチド配列」とは、宿主細胞において発現し得るヌクレオチド配列をいい、そして、ここで、選択可能なマーカーの発現が、発現された遺伝子を含む細胞に、対応する選択剤の存在下で増殖する能力を与える。20

【0043】

本明細書中で用いられる場合、用語「プロモーター」および「転写開始因子」とは、下流の遺伝子の転写を指向するように機能する核酸配列をいう。プロモーターは、一般的に、標的遺伝子が発現される宿主細胞に適切である。プロモーターは、他の転写調節核酸配列および翻訳調節核酸配列（「制御配列」ともいわれる）と共に、所定の遺伝子を発現するために必要である。一般的に、転写調節配列および翻訳調節配列としては、プロモーター配列、リボソーム結合配列、転写開始配列および転写終結配列、翻訳開始配列および翻訳停止配列、ならびにエンハンサー配列または活性化因子配列が挙げられるが、これらに限定されない。30

【0044】

「キメラ遺伝子」または「異種核酸構築物」は、本明細書中で規定される場合、異なる遺伝子の部分（調節エレメントを含む）で構成され得る非ネイティブ遺伝子（すなわち、宿主に導入された遺伝子）をいう。宿主細胞の形質転換のためのキメラ遺伝子構築物は、代表的に、異種タンパク質コード配列に（または選択マーカーキメラ遺伝子においては、形質転換宿主細胞に抗生物質耐性を付与するタンパク質をコードする選択マーカー遺伝子に）作動可能に連結された転写調節領域（プロモーター）で構成される。宿主細胞への形質転換のための本発明の代表的なキメラ遺伝子は、構成性または誘導性の転写調節領域、タンパク質コード配列、およびターミネーター配列を含む。キメラ遺伝子構築物はまた、標的タンパク質の分泌が所望される場合、シグナルペプチドをコードする第2のDNA配列を含み得る。40

【0045】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係で配置される場合、「作動可能に連結されている」。例えば、分泌リーダーをコードするDNAは、それが、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドのためのDNAに作動可能に連結されており；プロモーターまたはエンハンサーは、それが、コード配列の転写に影響を与える場合、その配列に作動可能に連結されており；または、リボソーム結合部位は、それが、翻訳を促進するように配置されている場合、コード配列に作動可能に連結されている。一般的に、「作動可能に連結されている」は、連結されるDNA配列が、連続的であり50

、分泌リーダーの場合は、連続的かつリーディングフェーズ内であることを意味する。しかし、エンハンサーは、連続的である必要はない。連結は、便利な制限部位でのライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の実施法に従って使用される。

【0046】

本明細書中で使用する場合、用語「遺伝子」は、ポリペプチド鎖の生成に関するDNAのセグメントを意味し、コード領域の前後の領域（例えば、5'非翻訳（5'UTR）または「リーダー」配列および3'UTRまたは「テイラー」配列、ならびに個々のコードセグメント（エキソン）の間の介在配列（イントロン））を含んでも含まなくともよい。
10

【0047】

本明細書中で使用する場合、「組換え体」は、異種核酸配列の導入によって改変された細胞もしくはベクター、または細胞が、そのように改変された細胞に由来することに対する言及を含む。従って、例えば、組換え細胞は、人為的介入の結果として、その細胞のネイティブ（非組換え）形態内では、同一形態において見出されない遺伝子を発現するか、またはそうでなければ異常に発現されるか、発現抑制されるか、もしくは発現されないネイティブ遺伝子を発現する。

【0048】

細胞への核酸配列の挿入の関係で、用語「導入された」は、「トランسفェクション」、または「形質転換」もしくは「形質導入」を意味し、そして核酸配列が、その細胞のゲノム（例えば、染色体、プラスミド、プラスチド、またはミトコンドリアDNA）に組み込まれ得るか、自己レプリコンに変換されるか、または一過的に発現される（例えば、トランسفクトされたmRNA）場合、真核生物細胞または原核生物細胞への核酸配列の組み込みに対する言及を含む。
20

【0049】

本明細書中で使用する場合、用語「発現」は、ポリペプチドが、遺伝子の核酸配列に基づいて生成されるプロセスをいう。このプロセスは、転写および翻訳の両方を含む。

【0050】

用語「シグナル配列」は、細胞外への成熟形態のタンパク質の分泌を促進する、そのタンパク質のN末端部分のアミノ酸配列をいう。成熟形態の細胞外タンパク質は、シグナル配列を欠いている。シグナル配列は、分泌プロセスの間に切断される。
30

【0051】

用語「宿主細胞」は、ベクターを含み、発現構築物の複製および／または転写、あるいは転写および翻訳（発現）を支持する細胞を意味する。本発明において使用するための宿主細胞は、原核生物細胞（例えば、E.coli）または真核生物細胞（例えば、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、両生類細胞、または哺乳動物細胞）であり得る。

【0052】

本明細書中で使用する場合、用語「活性」および「生物学的に活性」は、特定の標的タンパク質に付随する生物学的活性（例えば、酵素活性）をいう。所定のタンパク質の生物学的活性は、当業者によりそのタンパク質に代表的に属された任意の生物学的活性をいう。
40

【0053】

「C型肝炎ウイルスまたはHCV」とは、非A型非B型肝炎（NANBH）を引き起こす病原性型、およびそれらに由来する弱毒化型または欠損妨害粒子のウイルス種をいう。HCVゲノムは、RNAを含む。RNA含有ウイルスは、報告によれば組み込まれたヌクレオチドあたり $10^{-3} \sim 10^{-4}$ のオーダーで、比較的高い比率の自然突然変異を有する。遺伝子型の異質性および流動性は、RNAウイルスにおいて固有のものであるので、毒性または無毒性であり得るHCV種の中で複数の型／亜型が存在する。種々のHCV型または単離体の増幅、同定、検出、および単離は、文献において証明される。

【0054】

状態を「処置すること」とは、その状態の症状を低減し、かつ／またはその状態の重篤度を低下させるのに有効な治療的物質を投与することをいう。

【0055】

「経口」とは、口による投与または胃もしくは腸中への直接的投与（胃投与を含む）を含む任意の経路をいう。

【0056】

「OASレベル」とは、血中2'，5'-オリゴアデニレートシンテターゼ(OAS)タンパク質の濃度または活性をいう。

【0057】

「酵母」は、子囊胞子由来(*ascosporogenous*)酵母(*Endomycetales*)、担子胞子由来(*basidiosporogenous*)酵母、および不完全真菌に属する酵母(*Blastomycetes*)を意図する。子囊胞子由来酵母は、2つのファミリー(*Spermophthoraceae*および*Saccharomycetaceae*)に分かれる。後者は、以下の4つのサブファミリーから構成される：*Schizosaccharomycoideae*(例えば、*Schizosaccharomyces*属)、*Nadsonioideae*、*Lipomycoideae*、および*Saccharomycoideae*(例えば、*Pichia*属、*Kluyveromyces*属、および*Saccharomyces*属)。担子胞子由来(*basidiosporogenous*)酵母としては、*Leucosporidium*属、*Rhodoспоридиум*属、*Sporidiobolus*属、*Filobasidium*属および*Filobasidiella*属が挙げられる。不完全菌類に属する酵母は、2つのファミリー(*Sporobolomyctaceae*(例えば、*Sporoholomyces*属、*Bullera*属)および*Cryptococcaceae*(例えば、*Candida*属))に分けられる。本発明にとって特に興味深いものは、*Pichia*属、*Kluyveromyces*属、*Saccharomyces*属、*Schizosaccharomyces*属、および*Candida*属内の種である。特に興味深いのは、*Pichia*種*P. pastoris*である。酵母の分類は将来変わり得るので、本発明の目的のためには、酵母は、*Skinner*らに記載されるとおりに規定されるべきである。前述のものに加えて、当業者は、おそらく酵母の生物学および酵母遺伝学の取り扱いに精通している。例えば、*Bacilla*ら；*Rose*および*Harrison*；*Strathern*ら；(本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。

【0058】

本発明のヌクレオチド配列は、酵母プロモーターに作動可能に連結される場合、酵母宿主細胞において目的の生物学的に活性な成熟異種タンパク質を產生するために有用である。このように、本発明のハイブリッド前駆体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、酵母宿主細胞への導入のために発現カセット中に提供される。これらの発現カセットは、ハイブリッド前駆体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に連結された転写開始領域を含む。このような発現カセットは、調節領域の転写調節下にあるようにするためのヌクレオチド配列の挿入のための複数の制限部位を備える。この発現カセットは、選択マーカー遺伝子をさらに含み得る。

【0059】

クローニングベクターまたは発現ベクターは、さらなるエレメントを含み得、例えば、発現ベクターは、2つの複製系を有し得、それにより2つの生物において(例えば、発現のためにヒトまたは昆虫の細胞、ならびにクローン化および増幅のために原核生物細胞において)維持されることを可能にする。

【0060】

クローニングベクターおよび発現ベクターは両方とも、そのベクターが1つ以上の選択された宿主細胞において複製することを可能にする核酸配列を含む。さらに、発現ベクターの組み込みのために、発現ベクターは、宿主細胞ゲノムに相同な少なくとも1つの配列、好ましくは発現構築物に隣接する2つの相同的な配列を含む。この組み込みベクターは、

10

20

30

40

50

ベクター中の包含のために適切な相同配列を選択することにより、宿主細胞における特定の位置に指向され得る。組み込みベクターのための構築物は、当該分野において周知である。

【0061】

クローニングベクターおよび発現ベクターは、代表的には選択マークを含む。代表的な選択マーク遺伝子は、(a) 抗生物質またはその他の毒素(例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、ゼオシン(zeoocin)またはテトラサイクリン)に対する耐性を付与するか、(b) 栄養素要求性欠損を捕うか、または(c) 天然培地から利用可能でない必須の栄養素を供給する、タンパク質をコードする(例えば、BacilliについてD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子)。

10

【0062】

「IFN-」とは、米国特許第5,939,286号(その全体が本明細書中に明確に援用される)に示されるIFN-配列、または図10に示されるIFN-配列およびヒツジIFN-配列に対して、70%より高いか、または好ましくは約80%より高いか、またはより好ましくは約90%より高いか、そしてなおより好ましくは約95%より高いアミノ酸相同性を有するインターフェロンタンパク質のファミリーの任意の1つをいう。アミノ酸相同性は、例えば、デフォルトパラメーターを用いるALIGNプログラムを使用して決定され得る。このプログラムは、配列比較プログラムのFASTAバージョン1.7パッケージに見出される(PearsonおよびLipman 1988; Pearson, 1990; William R. Pearson, Department of Biological Chemistry, Box 440, Jordan Hall, Charlottesville, VAから入手可能なプログラム)。

20

【0063】

「IFN-」とは、図10に示されるIFN-Dアミノ酸配列を含むインターフェロンタンパク質のファミリーの任意の1つ、およびこのタンパク質の活性に有意に影響しないアミノ酸置換および変更(例えば、中性アミノ酸置換)を有するタンパク質をいう。好ましくは、この配列は、図10のIFN-D配列、および図10に示される配列に対して約70%より高いか、または好ましくは約80%より高い、またはより好ましくは約90%より高い、そしてなおより好ましくは約95%より高いアミノ酸配列相同性を有するタンパク質を含む。アミノ酸相同性は、例えば、上記のような、デフォルトパラメーターを用いるALIGNプログラムを使用して決定され得る。

30

【0064】

本明細書中で使用される場合、用語「IFN発現」とは、上記のIFN遺伝子の転写および翻訳をいい、その産物は、前駆体RNA、mRNA、ポリペプチド、翻訳後プロセシングされたポリペプチド、およびそれらの誘導体を含む。例として、IFN発現についてのアッセイとしては、標準的な細胞変性保護アッセイ、ウェスタンプロット分析およびノーザンプロット分析ならびにIFN mRNAについての逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)が挙げられる。

30

【0065】

本明細書中で使用される場合、用語「IFNの生物学的活性」および「生物学的に活性なIFN」とは、IFN、またはIFNの任意のフラグメント、誘導体、もしくはアナログに関連する生物学的活性(例えば、酵素活性)、そして具体的には、標準的な細胞変性保護アッセイを使用して測定され得る抗ウイルス活性が挙げられる。

40

【0066】

本明細書中で使用される場合、IFNに関連するタンパク質に対して用語「の改変形態」とは、ネイティブタンパク質の誘導体または改変体形態を意味する。すなわち、あるタンパク質「の改変形態」は、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失または挿入(アミノ酸置換が特に好ましい)を含む誘導ポリペプチド配列を有する。このアミノ酸置換、挿入または欠失は、そのポリペプチド配列内の任意の残基において起こり得、これは、そのタンパク質の生物学的活性に干渉する。改変体タンパク質または誘導体タンパク質をコードす

50

る対応する核酸配列は、その遺伝子またはコード配列の「変異」形態または「改変」形態とみなされ、かつ本発明の範囲内に包含される。

【0067】

「改変体」は、以下によりネイティブポリペプチドから誘導されるポリペプチドを意図する：ネイティブタンパク質のN末端および/またはC末端に対する1つ以上のアミノ酸の欠失（いわゆる短縮）または付加；ネイティブポリペプチドにおける1つ以上の部位における1つ以上のアミノ酸の欠失または付加；あるいはネイティブポリペプチドにおける1つ以上の部位における1つ以上のアミノ酸の置換。このような改変体は、例えば、遺伝子多型または人的操作から生じ得る。このような操作の方法は、一般的に当該分野で公知である。

10

【0068】

例えば、このポリペプチドのアミノ酸配列改変体は、ハイブリッドIFNのいずれかをコードするクローン化DNA配列における変異により調製され得る。変異誘発およびスクレオチド配列変更のための方法は、当該分野で周知である。例えば、WalkerおよびGaaststra編（1983）；Kunkelら（1985）；Kunkelら（1987）；ならびにSambrookら（1989）を参照のこと。目的のタンパク質の生物学的活性に影響を及ぼさない適切なアミノ酸置換に関する手引きは、Dayhoffら（1978）のモデル（本明細書中に参考として援用される）に見られ得る。保存的置換（例えば、1つのアミノ酸を、同様の特性を有する別のアミノ酸と交換すること）が好ましくあり得る。保存的置換の例としては、Gly <=> Ala、Val <=> Ile <=> Leu、Asp <=> Glu、Lys <=> Arg、Asn <=> Gln、およびPhe <=> Trp <=> Tyrが挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0069】

ハイブリッドIFNの改変体を構築する際に、改変体が所望の活性を有し続けるように改変が行われる。明らかに、改変体タンパク質をコードするDNAにおいてなされた任意の変異は、その配列をリーディングフレームからはずして配置してはならず、そして好ましくは二次mRNA構造を生成し得る相補的領域を生じない。

30

【0070】

従って、本発明のタンパク質は、ハイブリッドIFN/IFN-αおよびそれらの改変体を含む。これらの改変体は、ネイティブタンパク質に対して実質的に相同であり、かつ機能的に等価である。ネイティブタンパク質のアミノ酸配列に対して、そのアミノ酸配列の少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、そして最も好ましくは少なくとも約95%が同一である場合、ネイティブタンパク質の改変体は、ネイティブタンパク質に対して「実質的に相同」である。改変体は、わずか1個、2個、3個、または4個のアミノ酸によって異なり得る。「機能的に等価」は、その改変体の配列が、ネイティブIFNと実質的に同じ生物学的活性を有するタンパク質を产生する鎖を規定することを意図する。実質的な配列バリエーションを含むこのように機能的に等価な改変体もまた本発明に包含される。従って、ハイブリッドIFNタンパク質の機能的に等価な改変体は、治療的に有用であるのに十分な生物学的活性を有する。「治療的に有用」は、治療目的（例えば、1型単純疱疹ウイルス誘導脳炎に対する保護）を達成するのに有効であることを意図する。

40

【0071】

機能的等価性を決定するための方法が、当該分野で利用可能である。生物学的活性は、IFNタンパク質の活性を測定するために特別に設計されたアッセイを使用して測定され得、これらとしては、本発明において記載されるアッセイおよび米国特許第6,204,022号（その全体が、本明細書に明確に参考として援用される）に記載されるアッセイが含まれる。さらに、生物学的に活性なネイティブタンパク質に対して惹起された抗体は、機能的に等価な改変体に結合する能力について試験され得、ここで有効な結合は、ネイティブタンパク質のコンホメーションと類似のコンホメーションを有するタンパク質の指標である。

50

【0072】

(I I . ハイブリッドインターフェロン融合タンパク質)

本発明は、IFN- の C 末端領域により付与される減少した毒性に関する知見を利用する。この知見は、IFN- 由来の C 末端部分および非インターフェロン I 型ポリペプチドに由来する N 末端部分を有するハイブリッドインターフェロン融合タンパク質を产生するために使用されるキメラ DNA 構築物を支持する。このような非インターフェロン I 型ポリペプチドの例としては、IFN- 、および IFN- の種々のアイソフォームが挙げられる。

【0073】

図 10 を参照して、このようなハイブリッドインターフェロン融合タンパク質またはポリペプチド HVV (キメラ核酸分子によりコードされ得るか、またはネイティブの化学的ライゲーションにより產生され得る) は、IFN- D のアミノ酸 1 位 ~ アミノ酸 163 位を含む N 末端、および IFN- のアミノ酸 163 位 ~ アミノ酸 172 位までを含む C 末端を有する。N 末端セグメントは、非インターフェロンポリペプチドの N 末端アミノ酸配列を含み、これは、キメラ核酸分子の 5' 末端セグメントによりコードされ得る。C 末端セグメントは、IFN- ポリペプチドの C 末端アミノ酸配列を含み、これは、キメラ核酸分子の 3' 末端セグメントによりコードされ得る。

【0074】

上流が非インターフェロンに対応する配列であり、そしてその下流が IFN- に対応するアミノ酸残基位置の最適の接合点は、本明細書中に記載される機能的アッセイ (例えば、実施例 5 に記載される抗ウイルスアッセイおよび実施例 6 に記載される毒性アッセイ) と組み合わせて、IFN- (163 ~ 172) 内かまたはそれを超えて伸張するより長い領域およびより短い領域に対応するペプチドまたはペプチドをコードする DNA 配列を使用して、本明細書中に記載される方法により同定され得る。例えば、ヒト IFN- D のアミノ酸 1 ~ 166 および IFN- の最後の 10 個の C 末端アミノ酸を含む本発明のハイブリッドまたはキメラインターフェロンが、IFN- に関連するか通常は IFN- に起因する生物学的活性と共に、インターフェロン に関連する低い毒性を有することが企図される。例えば、IFN- / IFN- ハイブリッドは、例えば IFN- の毒性を低減し得るが、IFN- 抗ウイルス特性を妨害しないか全く増加させない。

【0075】

本発明の好ましい実施形態は、N 末端セグメントの配列がヒト IFN- D に由来し、そして C 末端セグメントがヒツジ IFN- に由来する融合タンパク質である。他の適切な IFN 配列は、GenBank または他の公の配列保存機関から得られ得る。

【0076】

上で指摘したように、本発明のハイブリッドインターフェロン融合タンパク質組成物について企図される考慮すべき利点は、例えば、治療剤として認められているネイティブ非 I 型インターフェロンと比較して、この組成物の減少した毒性である。このハイブリッド組成物は、IFN- の減少した細胞傷害性と共に、認められている非 I 型 IFN と同じ生物学的活性を有し得る。

【0077】

(I II . ハイブリッドインターフェロンタンパク質の产生)

本発明は、一局面において、非インターフェロン /インターフェロン ハイブリッドタンパク質を产生する方法を包含する。P. pastoris 発現宿主が、適切な核酸配列を含むベクターで形質転換される場合、大量の比較的純粋で機能的に活性な非インターフェロン /インターフェロン ハイブリッドタンパク質の产生が可能であることが発見されている。本発明を実施する際の工程が以下に考慮される。

【0078】

本発明において有用な配列、方法および組成物は、以下に見出され得る：米国特許第 5,958,402 号 (1999 年 9 月 28 日発行)；同第 5,942,223 号 (1999 年 8 月 24 日発行)；1999 年 8 月 24 日；同第 5,738,845 号 (1998 年 50

4月14日発行) ; 同第5, 939, 286号(1999年8月17日発行) ; 同第6, 204, 022号(2001年3月20日発行) ; 同第5, 906, 816号(1999年5月25日発行) ; 同第6, 060, 450号(2000年5月9日発行) ; および同第6, 372, 206号(2002年4月16日発行) ; (それぞれが、その全体を本明細書中に参考として援用される)。本発明において有用なさらなる配列、方法および組成物は、同時係属中の米国特許出願番号09/910, 406(2001年7月19日出願) ; および同10/137, 127(2002年5月2日出願)に見出され得る。

【0079】

(A. P. pastoris宿主細胞)

非インターフェロン/インターフェロンハイブリッドタンパク質の発現のために選択された宿主は、好ましくは酵母である。本発明の方法において使用される酵母は、Pichia属内の種である。特に興味深いものは、Pichia種P. pastorisである。1つの代表的なP. pastoris株は、X-33である。

【0080】

P. pastorisは、アルコールオキシダーゼの産生を誘導することにより、その唯一の炭素源としてメタノールを代謝し得る(Cregg, 1993)。大部分のP. pastoris発現株は、1つ以上の栄養素要求性変異を有し、これにより、形質転換の際に適切な選択マーカー遺伝子を含む発現ベクターの選択が可能となる。形質転換の前に、これらの株は、天然培地で増殖するが、最少培地で増殖するためには、適切な栄養素を補給する必要がある。本発明のP. pastoris株には、野生型の比率(wild-type rate)のメタノールで増殖する株(Mut⁺)が含まれ、そしてAOX遺伝子の1つまたは両方における欠失のためにメタノールを利用する能力が変化した株もまた含まれる。外因性タンパク質の分解を低減する際に有効であり得るプロテアーゼ欠損株もまた企図される(Brierley, 1998; およびWhiteら, 1995)。

【0081】

本発明の実施に適切な酵母および他の微生物宿主の選択は、当該分野の技術範囲内である。発現のための酵母宿主を選択する場合、適切な宿主は、とりわけ、良好な分泌能、低いタンパク質分解活性、および全体的生長力を有することが示されている宿主を含み得る。酵母および他の微生物は、一般的に、以下を含む種々の供給源から入手可能である: the Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California(Berkeley, CA); the American Type Culture Collection(Manassas, VA); Northern Regional Research Laboratories(Peoria, IL); およびInvitrogen(San Diego, CA)のような製造供給元。

【0082】

(B. 酵母発現ベクター)

本発明における使用のための発現ベクターは、酵母における作動のために設計されたキメラ遺伝子(または発現カセット)を含み、これは、その発現カセットから上流および下流に随伴配列を有する。これらの随伴配列は、プラスミド起源またはウイルス起源であり、そしてそのベクターが細菌から所望の酵母宿主にDNAを移動させるのを可能にするのに必要な特徴をそのベクターに提供する。適切な形質転換ベクターは、以下に記載される。発現プラスミドの適切な構成要素(転写イニシエーターおよび翻訳イニシエーター、シグナル配列、ハイブリッドIFNのコード配列、ならびに適切な転写ターミネーターおよび翻訳ターミネーターを含む)もまた、以下に考察される。1つの例示的な構築物は、図5A~5Cに示されるpPICZ - HVVプラスミド配列である。

【0083】

(i. 転写イニシエーターおよび翻訳イニシエーター)

本発明のヌクレオチド配列は、酵母プロモーターに作動可能に連結された場合の酵母宿

10

20

30

40

50

主細胞において目的の生物学的に活性な成熟異種タンパク質を産生するのに有用である。このようにして、本発明のハイブリッド前駆体ポリペプチドをコードするスクレオチド配列は、酵母宿主細胞中への導入のための発現力セットにおいて提供される。これらの発現力セットは、ハイブリッド前駆体ポリペプチドをコードするスクレオチド配列に連結した転写開始領域を含む。このような発現力セットは、スクレオチド配列を調節領域の転写調節下にあるように挿入するための複数の制限部位を備える。

【0084】

転写開始領域（酵母プロモーター）は、RNAポリメラーゼに結合部位を提供して、そのコード配列の下流（3'側）の翻訳を開始する。このプロモーターは、構成性プロモーターまたは誘導性プロモーターであり得、そして特定の酵母宿主に対してネイティブでもアナログでも外因性でも異種でもよい。さらに、このプロモーターは、天然配列でもあるいは合成配列でもよい。外因性は、転写開始領域が導入される目的のネイティブ酵母においてその転写開始領域が見出されないということを意味する。10

【0085】

適切なネイティブ酵母プロモーターとしては、野生型 因子プロモーター（これは、以下に詳細に記載される）、およびその他の酵母プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、このプロモーターは、*P. pastoris* グリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ（GAP）、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ（FLD1）、ペルオキシソームマトリックスタンパク質（PEX8）、およびGTPaseをコードするYPT1プロモーターを含むリストから選択される。より好ましくは、プロモーターは、アルコールオキシダーゼAOX1プロモーターである。20

【0086】

(a. AOX1プロモーター)

Pichia は、2つのアルコールオキシダーゼ遺伝子AOX1およびAOX2をコードするが、AOX1遺伝子は、酵母細胞における広範な大多数のアルコールオキシダーゼ活性の原因である（Tschoppら、1987；Ellisら、1985；およびCreggら、1989）。AOX1遺伝子の発現は、AOX1プロモーターにより転写レベルにおいて厳しく制御されている。メタノール増殖細胞において、約5%のポリ(A)⁺ RNAは、AOX1由来である；しかし、大部分のほかの炭素源で増殖する細胞において、AOX1メッセージは、検出できない（Creggら、1988）。30

【0087】

AOX1遺伝子の調節は、以下の2つの機構を含むようである：*S. cerevisiae* GAL1遺伝子の調節に類似の、抑制／脱抑制（derepression）機構および誘導機構。GAL1調節と異なり、炭素源（例えば、培地中のグルコース）の抑制がないこと、AOX1の実質的な転写は起こらない。メタノールの存在は、高レベルの転写を誘導するために不可欠である（Tschoppら、1987）。

【0088】

(b. GAPプロモーター)

ノーザンおよびレポーター活性化の両方の結果は、*P. pastoris* GAP遺伝子プロモーターが、AOX1プロモーターで見られたレベル（Waterhamら、1997）に匹敵するレベルで、グルコースでの強い構成性発現を生じることを示す。グリセロール増殖細胞およびメタノール増殖細胞におけるGAPプロモーター活性レベルは、グルコースについて観察されたレベルのそれぞれおよそ3分の2および3分の1である。GAPプロモーターを使用する利点は、メタノールが誘導に必要なく、そしてある炭素源から別の炭素源へと培養物を移す必要もなく、株の増殖がより簡単に行えることである。しかし、GAPプロモーターは、構成的に発現されるので、酵母に対して毒性であるタンパク質の産生には良い選択ではないかもしれない。40

【0089】

(c. FLD1プロモーター)

FLD1遺伝子は、グルタチオン依存性ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ（窒素源と50

しての特定のメチル化アミンおよび炭素源としてのメタノールの代謝に必要な主要な酵素)をコードする(Shenら、1998)。このFLD1プロモーターは、単一の炭素源としてメタノール(および窒素源として硫酸アンモニウム)か、または単一の窒素源としてメチルアミン(および炭素源としてグルコース)のいずれかを用いて誘導され得る。メタノールまたはメチルアミンを用いた誘導の後、P_{FLD1}は、AOX1プロモーターからメタノール誘導により得られたレベルと同様のレベルの-LacZマーカーを発現し得る。FLD1プロモーターは、メタノールまたはメチルアミン(安価な非毒性窒素源)のいずれかを使用して高レベルの発現を誘導する柔軟性を提供する。

【0090】

(d. PEX8プロモーターおよびYPT1プロモーター)

10

いくつかのP.pastoris株については、AOX1プロモーター、GAPプロモーターおよびFLD1プロモーターは、強力すぎず、高すぎるレベルの遺伝子を発現し得る。特定の外因性遺伝子については、P_{AOX1}からの高レベルの発現は、細胞の翻訳後機構を圧倒して、外因性タンパク質の有意な割合での誤った折り畳み、プロセシングされないこと、または誤った局在を引き起こし得るという証拠が存在する(Thilllら、1990; Brierley, 1998)。これらの適用および他の適用のために、適度に発現するプロモーターが望ましい。この目的のために、P.pastoris PEX8およびYPT1プロモーターが使用され得る。PEX8遺伝子は、ペルオキシソームの生物発生に不可欠なペルオキシソームマトリックスタンパク質をコードする(Liuら、1995)。これは、低いが有意なレベルでグルコースで発現され、そして細胞がメタノールに移されると適度に誘導される。YPT1遺伝子は、分泌に関するGTPaseをコードし、そしてそのプロモーターは、炭素源としてグルコース、メタノールまたはマンニトールのいずれかを含有する培地において低いが構成性レベルの発現を提供する(Searsら、1998)。

20

【0091】

(e. 代替のプロモーター)

1つの酵母プロモーターの上流活性化因子配列(これにより誘導性発現が可能になる)および別の酵母プロモーターの転写活性化領域から構成される合成ハイブリッドプロモーターもまた、酵母宿主における機能的プロモーターとして作用する。

30

【0092】

酵母認識プロモーターはまた、酵母RNAポリメラーゼに結合して、コード配列の翻訳を開始する天然に存在する非酵母プロモーターを含む。このようなプロモーターは、当該分野で利用可能である。例えば、Cohenら(1980); Mercereau-Pui galonら(1980); Pantierら(1980); Henikoffら(1981); およびHollenbergら(1981);(これらの各々が、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。

【0093】

(iii. シグナル配列およびリーダー配列)

目的のタンパク質をコードすることに加えて、発現カセットのキメラ遺伝子は、適切な場合にハイブリッドIFNタンパク質のプロセシングおよび転位を可能にするシグナルペプチドをコードし得る。

40

【0094】

本発明の目的のために、このシグナルペプチドは、酵母分泌タンパク質の成熟形態の前駆体ポリペプチドについてのN末端配列であるプレシークエンス(presquence)である。ハイブリッド前駆体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、形質転換された酵母宿主細胞において発現される場合、このシグナルペプチド配列は、目的の成熟異種タンパク質を含むハイブリッド前駆体ポリペプチドを、小胞体(ER)中に指向させるように機能する。ERの管腔内への移動は、酵母宿主細胞の分泌経路への最初の段階を示す。本発明のシグナルペプチドは、酵母宿主細胞に対して異種またはネイティブであり得る。本発明のシグナルペプチド配列は、公知の天然に存在するシグナル配列か、また

50

はシグナルペプチドの機能に不利な影響を及ぼさない上記のようなシグナル配列の任意の改変体であり得る。

【0095】

ERへの進入の間に、このシグナルペプチドは、プロセシング部位で前駆体ポリペプチドから切断される。このプロセシング部位は、インビボで酵母タンパク質分解酵素により認識される任意のペプチド配列を含み得る。このプロセシング部位は、シグナルペプチドの天然に存在するプロセシング部位であり得る。より好ましくは、天然に存在するプロセシング部位は、改変されるか、またはこのプロセシング部位は、好みのプロセシング部位となるように合成的に誘導される。「好みのプロセシング部位」は、インビボで、酵母タンパク質分解酵素により、天然に存在する部位よりも効率的に切断されるプロセシング部位を意図する。好みのプロセシング部位の例としては、二塩基性ペプチド、特に2つの塩基性残基 Lys および Arg の任意の組み合わせ（すなわち、Lys-Lys、Lys-Arg、Arg-Lys、または Arg-Arg）、最も好みは Lys-Arg が挙げられるが、これらに限定されない。これらの部位は、P. pastoris の KEX2 遺伝子によりコードされるエンドペプチダーゼにより切断される（Juliusら（1983））。KEX2 エンドペプチダーゼが、目的の成熟異種タンパク質のペプチド配列内の部位を切断する場合、他の好みのプロセシング部位は、目的のペプチド配列がインタクトであるように利用され得る（例えば、Sambrookら（1989）を参照のこと）。

【0096】

機能的シグナルペプチド配列は、酵母細胞からの異種タンパク質の細胞外分泌を起こすのに不可欠である。さらに、ハイブリッド前駆体ポリペプチドは、この分泌プロセスをさらに促進するために、酵母分泌タンパク質の分泌リーダーペプチド配列を含み得る。存在する場合、このリーダーペプチド配列は、一般的に、シグナルペプチド配列プロセシング部位の直ぐ3'側である。「分泌リーダーペプチド配列」は、前駆体ポリペプチド（本発明の目的のためには、分泌される成熟異種タンパク質を含むハイブリッド前駆体ポリペプチドである）、ERからゴルジ装置への移動、そしてゴルジ装置から、細胞膜を横切って細胞壁領域および/または増殖培地への分泌のための分泌小胞への移動を指向させるペプチドを意味する。このリーダーペプチド配列は、酵母宿主細胞に対してネイティブでも異種でもよい。

【0097】

本発明のリーダーペプチド配列は、シグナルペプチド配列の供給源として作用した同じ酵母の分泌タンパク質に対する天然に存在する配列でも、異なる酵母の分泌タンパク質に対する天然に存在する配列でも、合成配列でもよく、あるいは、リーダーペプチドの機能に不利な影響を及ぼさないそれらの任意の改変体でもよい。

【0098】

（a. S. cerevisiae - 因子プレプロペプチド）

本発明の目的のために、存在する場合のリーダーペプチド配列は、好みは、シグナルペプチド配列の供給源として作用した同じ酵母の分泌タンパク質に由来し、より好みは、-因子タンパク質に由来する。前駆体 - 因子タンパク質をコードする多数の遺伝子がクローニングされており、そしてそれらの組み合わされたシグナルリーダーペプチド配列が同定されている。例えば、Singhら（1983）を参照のこと。-因子シグナルリーダーペプチド配列は、酵母において異種タンパク質を発現するために使用されている。例えば、Elliottら（1983）；Bitterら（1984）；および Smithら（1985）を参照のこと。

【0099】

-因子（約11残基長のオリゴヌクレオチド接合フェロモン）は、約100残基長と200残基長との間、より代表的には約120～160残基長のより大きな前駆体ポリペプチドから產生される。この前駆体（プレ）ポリペプチドは、シグナル配列（約19～23（より代表的には20～22残基）、リーダー配列（プロ）（約60～66残基）、お

10

20

30

40

50

および成熟フェロモン配列の代表的に2～6のタンデム反復を含む。このシグナルペプチド配列および全長 - 因子リーダーペプチド配列が使用され得るが、本発明はまた、両方のエレメントがハイブリッド前駆体分子中に存在する場合に、シグナルペプチドと共に使用され得る短縮 - 因子リーダーペプチド配列を企図する。

【0100】

このシグナル配列のプロセシングは、3つの段階を含む。第1の段階は、小胞体におけるシグナルペプチダーゼによるプレシグナルの除去である。第2に、 $K e \times 2$ エンドペプチダーゼが、プロリーダー配列の Arg - Lys 間を切断する。この直後に、Glu - Ala 反復が、存在する場合、Ste 13 タンパク質により切断される (Brake et al., 1984)。

10

【0101】

本発明のハイブリッド前駆体ポリペプチド配列がリーダーペプチド配列（例えば、因子リーダー配列）を含む場合、そのリーダーペプチド配列3'末端にすぐ隣接したプロセシング部位があり得る。このプロセシング部位は、酵母宿主細胞にネイティブなタンパク質切断酵素が酵母分泌リーダーペプチド配列を、ここでは目的の成熟異種タンパク質のネイティブなN末端プロペプチド配列の5'末端から、または成熟異種ハイブリッドIFNについてのペプチド配列の5'末端から切断することを可能にする。プロセシング部位は、目的の成熟異種タンパク質が、正確にプロセシングされ得るように、酵母タンパク質切断酵素によりインビオで認識される、任意のペプチド配列を含み得る。このプロセシング部位のペプチド配列は、リーダーペプチド配列のネイティブプロセシング部位の天然に存在するペプチド配列であり得る。より好ましくは、この天然に存在するプロセシング部位は、改変されるか、またはこのプロセシング部位が、上記の好ましいプロセシング部位であるように、合成により得られる。

20

【0102】

(b) 別のシグナル配列)

適切なシグナル配列はまた、*P. pastoris* 酸ホスファターゼ (PHO1) および植物レクチンである *Phaseolus vulgaris* 凝集素由来の PHA-E (*Cereghino* および *Creigg*, 2000; ならびに *Raemaekers* et al., 1999) を含み得る。さらに、そのシグナル配列は、合成により得られ得るか、または当業者に利用可能なハイブリダイゼーションプローブ技術 (Sambrook et al., 1989) を参照のこと) を使用して、ゲノム cDNA または cDNA ライブラリーから決定され得る。

30

【0103】

上記のように本発明に従って、酵母シグナルペプチドおよび分泌リーダーペプチドの配列は、酵母宿主細胞の分泌経路を通じて、成熟異種IFN-Dの配列を方向付け得る、本発明のハイブリッド前駆体ポリペプチドの一部を示す。

【0104】

(iii) ハイブリッドIFNペプチドコード配列)

例示的ハイブリッドIFNコード配列は、表2-HVVに示される。コード配列の起源は、実施例1において議論されており、図1～4に例示される。

40

【0105】

適切な場合、ハイブリッドIFNペプチドをコードするヌクレオチド配列および目的の任意のさらなるヌクレオチド配列は、形質転換酵母における増大した発現のために最適化され得る。すなわち、これらのヌクレオチド配列は、改善された発現のために酵母好適コドンを使用して合成され得る。目的の酵母に好適なヌクレオチド配列を合成するための方法は、当該分野で利用可能である（例えば、米国特許第5,219,759号および同第5,602,034号（これらは、その全体が本明細書中に参考として明示的に援用される）を参照のこと）。

【0106】

さらなる配列改変は、酵母宿主におけるヌクレオチドコード配列の発現を増強すること

50

が既知である。これらとしては、以下が挙げられる：偽のポリアデニル化シグナル、エキソン - イントロンスプライス部位シグナル、トランスポゾン様反復、および遺伝子発現のために有害であり得る他のこのような十分に特徴付けられた配列などをコードする配列の排除。その配列の G - C 含量が、宿主細胞において発現される既知の遺伝子を参照して計算されるように、所定の細胞宿主に平均的なレベルに調節され得る。可能な場合、ヌクレオチドコード配列は、推定ヘアピン二次 m R N A 構造を避けるために改変される。

【0107】

(i v . 転写および翻訳のターミネーター)

発現力セットの終結調節領域は、転写開始領域に対してネイティブであってもよいし、別の供給源に由来してもよく、このことにより、この領域が酵母宿主により認識される。終結領域は、ネイティブ 因子転写終結配列の終結領域であってもよく、別の酵母により認識される終結配列（例えば、上記で言及した酵素の終結配列）であってもよい。転写終結領域は、発現を増強するために、特に、その m R N A の安定性のために選択され得る。

【0108】

好ましくは、転写ターミネーターは、M a t - (因子) 転写ターミネーターである。より好ましくは、この転写終結配列は、図 1 に示される A O X 1 転写終結領域である。

【0109】

(v . 選択マーカー)

選択マーカーとしては、P . p a s t o r i s または S . c e r e v i s i a e のいずれかに由来する生合成経路遺伝子 H I S 4 、 S . c e r e v i s i a e に由来する A R G 4 、および S t r e p t o a l l o t e i c h u s h i n d u s t a n u s に由来する、ブレオマイシン関連薬物であるゼオシンに対する耐性を付与する S h b l e 遺伝子 (C r e g g ら , 1 9 8 5 ; C r e g g および M a d d e n , 1 9 8 9 ; ならびに H i g g i n s ら , 1 9 9 8) が挙げられる。より最近開発された生合成マーカーのセットとしては、P . p a s t o r i s A D E 1 (P R - アミドイミダゾールスクシノカルボキサミドシンターゼ) 、 A R G 4 (アルギニノスクシネートリニアーゼ) および U R A 3 (オロチジン 5 ' - ホスフェートデカルボキシラーゼ) 遺伝子が挙げられる。

【0110】

(v i . 形質転換ベクターの構築)

異種ハイブリッド I F N タンパク質についての場合のように、ハイブリッド前駆体ポリペプチドに存在する他の要素の各々は、既知の天然に存在するポリペプチド配列であり得るか、または合成により得られ得る（本明細書中に記載のエレメントの機能に有害な影響を及ぼさないそれらの任意の改変体を含む）。「有害な効果」とは、エレメントの改変形態を含むことが、そのエレメントのネイティブ形態を含むハイブリッド前駆体ポリペプチドと比較して、目的の分泌成熟異種タンパク質の成体活性の減少を生じることを意図すること。

【0111】

発現力セットを調製する際に、種々のヌクレオチド配列フラグメントが、適切な方向で、かつ適切な場合には、適切なリーディングフレーム中に配列を提供するために、操作され得る。この目的に向かって、アダプタまたはリンカーを使用して、ヌクレオチド配列を接続してもよいし、他の操作が、簡便な制限部位、余分なヌクレオチドの除去、制限部位の除去などを提供するために含められてもよい。この目的のために、インビトロ変異誘発、プライマー修復、制限、アニーリング、再置換（例えば、トランジションおよびトランスバージョン）が含められてもよい。特に、S a m b r o o k ら (1 9 8 9) を参照のこと。

【0112】

本発明の発現力セットは、レプリコン（例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス、ミニ染色体）に連結され得、従って、インビオで自発的に D N A を複製し得る発現ベクターを形成し得る。好ましくは、そのレプリコンは、プラスミドである。このようなプラスミド発現ベクターは、クローニング目的で原核生物宿主内での安定な維持、および発現目的

10

20

30

40

50

で酵母宿主細胞内への組み込みを可能にする 1 以上の複製系において、好ましくは、2 つの複製系において維持される。

【0113】

さらに、プラスミド発現ベクターは、高コピー数または低コピー数のプラスミドとして組み込まれ得る。発現カセットの複数の組み込みコピーを含む株は、ときおり、單一コピー株よりも多くの異種タンパク質を生じ得る (Clarela, 1991)。

【0114】

(B. 酵母細胞の形質転換)

酵母細胞は、種々の標準的技術 (エレクトロポレーション、微粒子ボンバードメント (micro particle bombardment)、スフェロプラスト生成法、または完全細胞法 (例えば、塩化リチウムおよびポリエチレンギリコールを伴う方法) (Crellg, 1985; Liu, 1992; Waterham, 1996; ならびに Crellg および Russell, 1998) が挙げられるが、これらに限定されない) を用いて上記の発現構築物で形質転換される。

【0115】

(C. 培養および分泌ハイブリッドIFNタンパク質の獲得)

形質転換体を、適切な栄養培地で増殖し、適切な場合、確実に内因性DNAが維持されるように、選択圧下で維持する。発現が誘導性である場合、増殖を、酵母宿主が、高密度の細胞を生じ得るようにし得、次いで発現が誘導される。例示的ハイブリッドIFNタンパク質の組換え生成物であるHVVは、実施例2に記載される。HVVの部分的精製を、実施例3に記載する。

【0116】

本発明の重要な局面に従って、形質転換 *P. pastoris* が、実施例4に開示されるように、約 2.75×10^8 U/mg ~ 約 3×10^8 U/mg の比活性を有するハイブリッドIFNタンパク質を発現および分泌し得ることが見いだされた。比活性の決定を、当業者に公知の抗ウイルスアッセイによって行い得る。例示的抗ウイルスアッセイは、実施例5に記載される。別の抗ウイルスアッセイは、PontzerおよびJohnson, 1985 (本明細書中にその全体が参考として援用される) に記載される。

【0117】

(D. 分泌ヒトIFN-Dの単離)

rHuIFN-Dを*Pichia pastoris*における分泌タンパク質として発現するという主要な利点の1つは、*Pichia*が、非常に低レベルの夾雑ネイティブタンパク質しか培養培地中に分泌しないということである。このことは、低タンパク質含有量を有する最小*Pichia*増殖培地の使用と組み合わせた場合、培地中の総タンパク質の大部分を構成する、生物学的に活性なrHuIFN-Dの効率的な分泌をもたらした。

【0118】

基本的に、この分泌発現系のまさに本質は、培地へこのタンパク質を単純に分泌して、精製プロセスにおける第1工程として作用させることを可能にする。このことにより、モレキュラーシーブおよびイオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、透析、溶媒-溶媒抽出などのような技術を用いるさらなる精製のための、直接的かつ簡単な手順が得られる。このような方法は、当該分野で公知であり、例えば、Deutscher, 1990およびScopes, 1982に記載される。

【0119】

実施例3に記載されるように、1回のモレキュラーシーブクロマトグラフィーにより、本質的に、高分子量の夾雫タンパク質を排除して、非常に高い抗ウイルス活性を有する、非常に純粋なハイブリッドIFN (図8) を残した。

【0120】

(IV. 応用)

本発明のこのハイブリッドIFNタンパク質は、種々の癌およびウイルス疾患 (他のインターフェロンが、以前に示された活性を有する癌および疾患を含む) を処置することに

10

20

30

40

50

おける有用性が見いだされる。例えば、米国特許第4,885,166号、同第4,975,276号、および同第5,939,286号（これらの各々は、それらの全体が本明細書中に明示的に参考として援用される）を参照のこと。本発明が処置を企図する1つの例示的ウイルス病は、C型肝炎ウイルス（HCV）である。

【0121】

HCVは、全世界で推定1億7000万人が罹患し、いくつかの国において人口の10%を超えており、主な公衆衛生的問題である（Lechnerら，2000）。HCVは、感染血液および血液製剤（Cuthbertら，1994；Mansellら，1995）の輸液によって主に伝播する。疾病管理予防センターは、HCVが、米国において毎年、急性肝炎の新たな160,000症例の原因であると推定している。従って、有効な抗HCV剤が医学的に早急に必要である。

【0122】

HCVは、ポジティブ鎖であり、脂質エンベロープに包まれた、Flaviviridae科の約1万のヌクレオチド長のRNAウイルスである（Chooら，1989）。HCVは、B型肝炎ウイルスとは異なり、DNA中間体がなく、従って、宿主ゲノムに組み込むことができない（Berenguerら，1996）。HCVがクローニングされたが、そのウイルスは、インビトロで培養することが困難であった（Trepo，2000）。HCVは、非常に潜伏期間が長く、感染個体の85%において慢性的感染を生じるが、この潜伏の機構は未知である（Trepo，2000）。

【0123】

HCVの処置は、炎症および肝細胞損傷の減少を助け、従って、肝硬変および肝細胞癌を予防する（Horikieら，1998；Benvegnurら，1998）。HCVについて現在利用可能な治療は、感染患者の小さな亜集団についてのみ有効である（Magrinら，1994；Chooら，1991；Chooら，1989）。IFN-αは、米国においては1991年に、日本においては1992年に、慢性C型肝炎についての治療として導入された（Saitoら，2000）。しかし、上記のように、臨床的有効性を生じるに十分な投薬量での（すなわち、約 1×10^6 単位/処置以上の量での）IFN-αの使用は、通常、多数の重篤な副作用と関連する。

【0124】

本発明のハイブリッドタンパク質の低い細胞傷害性によって、本発明のハイブリッドタンパク質は、HCVのような病気についての魅力的な候補薬物である。

【0125】

（V. 薬学的組成物）

本発明のハイブリッドインターフェロン融合タンパク質は、薬学的に有用な組成物を調製するための公知の方法に従って処方され得る。インターフェロンまたはインターフェロン様化合物を含む処方物は、以前に記載されている。一般に、本発明の組成物は、ハイブリッドインターフェロンの有効量が、組成物の有効な投与を容易にするために、適切なキャリアと合わせられるように、処方され得る。

【0126】

これらの治療において使用される組成物はまた、種々の形態にあり得る。これらとしては、例えば、固体、半固体および液体の投薬形態（例えば、錠剤、丸剤、散剤、液体溶液、または懸濁液、リポソーム、坐剤、注射用溶液、および注入用溶液）が挙げられる。好ましい形態は、意図される投与様式および治療適用に依存する。組成物はまた、好ましくは、従来の薬学的に受容可能なキャリアおよびアジュvant（これらは、当業者に公知である）を含む。好ましくは、本発明の組成物は、単位用量の形態であり、通常、患者に、1日1回以上投与される。

【0127】

ハイブリッドインターフェロン融合ポリペプチドまたは関連ポリペプチドは、任意の薬学的に受容可能な投薬形態（経口摂取、吸入、経鼻スプレー、腹腔内注射、静脈内注射、筋肉内注射、病巣内注射、または皮下注射が挙げられる）において患者に投与され得る。

10

20

30

40

50

具体的には、他のインターフェロン化合物について使用される組成物および方法は、これらの化合物の送達のために使用され得る。

【0128】

しかし、本発明の化合物の1つの主な利点は、本発明のハイブリッドIFNタンパク質の極端に低い細胞傷害性である。この低細胞傷害性のために、一般に他のインターフェロン（例えば、IFN-）化合物について利用され得る濃度よりも高い濃度で、ハイブリッドインターフェロン組成物を投与することが可能である。従って、本発明のハイブリッドインターフェロン組成物は、約 5×10^4 から 2×10^7 単位/日、約 5×10^7 単位/日まで、または好ましくは約 1×10^8 単位/日まで、さらになお好ましくは、約 1×10^{10} 単位/日までの割合で投与され得ることが企図される。別の実施形態において、本発明のハイブリッドインターフェロン組成物は、約 5×10^{11} 単位/日の投薬量にて、または好ましくは約 5×10^{12} 単位/日まで投与される。10

【0129】

全身投与のためには、高用量が好ましい。当然のことながら、本発明の組成物および方法が、他の治療剤、例えば、リバビリンと組み合わせて使用され得ることが理解されるべきである。

【0130】

リバビリン(1-D-リボフラノシル-1,2,4-トリアゾール-3-カルボキサミド)は、プリンヌクレオシドアナログであり、これは、ウイルスmRNA合成を妨害し、広範なRNAウイルスおよびDNAウイルスの複製をインビボおよびインビトロで阻害することが見いだされた(Fernandezら, 1986; Balzarinら, 1991)。リバビリンは、アミノトランスフェラーゼレベルを正常化することにおいて効果があるが、慢性C型肝炎患者における血清HCV RNA力価に対する影響はわずかしかないことが示された(Di Bisceglieら, 1992)。しかし、リバビリンの有益な効果が一過性であるとしても(Clarkら, 2000; Koskinasら, 1995)、重篤な副作用が原因で、リバビリンが、IFN-と組み合わせて耐性であることが困難であり得る(Cotlerら, 2000)。従って、本発明のハイブリッドIFNタンパク質と組み合せたりバビリンは、好ましくは、ネイティブIFN-と組み合せたりバビリンであり得る。20

【0131】

患者の状態が一旦改善されると、必要に応じて、維持用量が投与される。続いて、投与量または頻度、またはその両方が、症状の関数として、改善された状態が維持されるレベルまで減少され得る。症状が所望のレベルまで緩和された場合、処置は、中断すべきである。しかし、患者は、疾患症状の任意の再発の際に、長期間ベースで断続的な処置を必要とし得る。30

【0132】

前述から、本発明の種々の目的および特徴をどのように満たすかが理解され得る。

【0133】

【表2】

VI. 表2

本発明を支持して提供される配列

説明	配列番号
<u>HVVアミノ酸配列</u> CDLPETHSLDNRRTLMALLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGN QFQKAPAIISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFCTELYQQLN DLEACVMQEERVGETPLMNADSLAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWE VVRAEIMRSLSLSTNLQERLTKMGGDLNSP	10
<u>HVVヌクレオチド配列</u> TGTGATTTGCCAGAGACTCACTCTTGACAAACAGAAGAACCTTGAT TGCTTTGGCCCAAATGTCTAGAATCTCTCCATCCTCTTGTGTTGAT GGATAGACACGATTTCGGTTCCCACAAGAAGAATTGACGGTAA CCAATTCCAAAAGGCTCCTGCTATTCCTGTTGCACGAGTTGATT CAACAAATTTCACCTGTTACCAACTAAGGACTCTTCTGCTGCCT GGGACGAAGACTTGGAGGCTTGTGTTATGCAAGAGGGAGAGTCG GTGAGACCCCATTGATGAACGCTGATTCCATCTGGCTGTCAAGA AGTACTTCAGAAGAATTACCTTGTACTTGACCGAAAAGAAGTACTC CCCATGTGCCTGGGAAGTCGTTAGAGCCGAAATCATGAGATCTT GTCCTTGTCCACTAACTTGCAAGAGAGACTTACCAAGATGGGTGG	20
AGACTTGAACCTCTCCATAA	30

(VII. 実施例)

以下の実施例は、本明細書中に記載の発明をさらに例示し、如何様にも、本発明の範囲を限定するとは意図されない。

【0134】

(実施例1：HVVクローニングストラテジー)

HVV分子は、HuIFN-D分子(C末端由来の最後の4つのアミノ酸が、ヒツジIFN-由来のC末端の16アミノ酸と置換されている)からなるハイブリッド分子である。得られたアミノ酸コード配列を使用して、*Pichia pastoris*における発現のために最適化したコドン使用頻度で対応するDNAコード配列を生成した。そのDNAコード配列を、オリゴヌクレオチドフラグメント(長さが約150塩基対；図1～4)のG2とよばれる細菌ベクター(*Operon Technologies, Alameda, CA*)への連続的クローニングによって、合成により構築した。特異的制限酵素で消化した重複する合成オリゴヌクレオチド(長さが40bp未満)の連結によって、4つの150塩基対フラグメント(HVVフラグメント1～4)の各々に5'オーバーハングまたは3'オーバーハングを作製して、ベクターへのクローニングを簡単にした。

【0135】

A . クローニング工程 # 1

切断されるベクター： G 2

切断酵素： Xba I および Bam H I

連結されるフラグメント： フラグメント 1 (図 1)

新たなベクター名： G 2 H V V 1 F 1 。

【 0 1 3 6 】

B . クローニング工程 # 2

切断されるベクター： G 2 H V V 1 F 1

切断酵素： Eco R I および Bam H I

連結されるフラグメント： フラグメント 2 (図 2)

新たなベクター名： G 2 H V V 1 F 2 。

10

【 0 1 3 7 】

C . クローニング工程 # 3

切断されるベクター： G 2 H V V 1 F 2

切断酵素： Sac I および Bam H I

連結されるフラグメント： フラグメント 3 (図 3)

新たなベクター名： G 2 H V V 1 F 3 。

【 0 1 3 8 】

D . クローニング工程 # 4

切断されるベクター： G 2 H V V 1 F 3

20

切断酵素： Eco R I および Bam H I

連結されるフラグメント： フラグメント 4 (図 4)

新たなベクター名： G 2 H V V 1 F 4 。

【 0 1 3 9 】

E . 最終チェック

切断酵素： Sac II 。

【 0 1 4 0 】

H V V 遺伝子を、 G 2 H V V 1 F 4 ベクターから切り出し、 プラスミド上の Xho I 部位および Not I 部位を利用して、 pPICZ - ベクター (Invitrogen , San Diego) に連結した。 H V V 1 - pPICZ - 構築物の配列を、 図 5 A ~ 30 5 に記載する。

【 0 1 4 1 】

(実施例 2 : P . pastoris における H V V の組換え生成)

選択されたポジティブ P . pastoris H V V 形質転換体を、 B M G Y 培地中で一晩増殖させ、 次いで、 その細胞を、 B M M Y - メタノール含有培地中で 2 の O D₆₀₀ を使用して、 誘導した。 培養物に、 誘導の 24 時間後および 48 時間後に、 1 m l の 10 % メタノールを供給した。 培養の 72 時間後に、 培養上清全体を回収し、 濾過滅菌し、 コロイド性クーマシー (Novex , San Diego , CA) で染色した 14 % トリスグリシン SDS - PAGE によって分析した。 pPICZ コントロールプラスミド形質転換体からの上清を、 ネガティブコントロールとして使用した。 図 7 に示されるように、 結果により、 クローン H V V - 16 が、 最も強力な H V V 発現を生じたことが示される。 40

【 0 1 4 2 】

(実施例 3 : H V V 精製)

図 8 は、 P . pastoris 上清からの H V V タンパク質の部分的精製を例示する。 培養上清 (20 m l 容量) を、 10 mM Tris 、 150 mM NaCl で緩衝液交換し、 HiPrep Sephacryl 26 / 60 S - 100 サイズ排除カラムにコードする前に、 最終容量 2 m l まで濃縮した (分画前) 。 サンプル注入後の最初の 120 m l のフロースルーを 1 m l / 分にて回収し、 画分 1 と称した。 20 m l の 3 つの画分を、 各々回収し、 それぞれ画分 2 、 画分 3 、 および画分 4 と称した。 画分 2 、 画分 3 、 および画分 4 を、 1 m l まで濃縮し、 14 % SDS - PAGE ゲルで泳動し、 Novex 50

ロイド状ブルー染色キットを用いて染色した。

【0143】

(実施例4: HVV抗ウイルス比活性)

HVVタンパク質を、実施例3に記載のように、サイズ排除ゲルクロマトグラフィーを用いて、HVVクローン16(図7)のP.pastoris組換え培養上清から部分的に精製した。4つの異なる精製実験(サンプルID:S-0018; S-0019; S-0063; およびS-0064)からの画分3(図8)を、各々1mlまで濃縮し、各サンプルの総タンパク質濃度および抗ウイルス活性を、以下の実施例5に記載されるように決定した。結果を、以下の表3に示す。

【0144】

【表3】

表3

HVV-16抗ウイルス比活性

サンプルID	タンパク質濃度(MG/ML)	抗ウイルス単位(AVU/ML)	抗ウイルス比活性(AVU/MG)	平均AVU/MG ± STD(N)
S-0018	0.751	2.22×10^8	2.96×10^8	$2.86 \times 10^8 \pm 0.09$ (N = 4)
S-0019	0.696	1.92×10^8	2.76×10^8	
S-0063	1.102	3.11×10^8	2.82×10^8	
S-0064	1.422	4.10×10^8	2.88×10^8	

10

20

30

(実施例5: 定量的抗ウイルスアッセイ)

Madin-Darbyウシ腎臓(MDBK)細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS)および抗生物質を補充したEagle's MEMを用いて、96ウェル平底プレート中でコンフルエントになるまで増殖させる。一旦細胞がコンフルエントに達すると、アッセイ培地は、2%FBSおよび抗生物質を補充したEagle's MEMである。VSVのチャレンジ用ウイルス調製物を、ウイルス単独での一晩(すなわち、16~24時間)のインキュベーションの後に、コンフルエントなMDBK細胞の100%CPEを与える、最適作業希釈液を決定するために、予備的に対数連続希釀において試験する。VSV希釀範囲は、96ウェルプレート中で最終総容量200μl/ウェルで、1希釀液あたり、4つの複製ウェルを使用すると、 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ /50μl/ウェルである。100%CPEを生じるウイルスの希釀液に基づいて、TCID₅₀を決定する。現在では、使用される感染性ストックウイルスは、 $10^{6.5} \sim 10^{7.5}$ TCID₅₀/mlを有する。このアッセイにおいて使用されるウイルス粒子の実際の数は、 $10^{3.5} \sim 10^{4.5}$ TCID₅₀/ウェルである。

40

【0145】

そのインターフェロンを試験するために、MDBK細胞を、コンフルエントになるまで増殖させ、その後に増殖培地を除去し、細胞を滅菌PBSで1回洗浄する。次いで、インターフェロンサンプルを含有する培地、またはコントロールとしてインターフェロンなしの培地を、上記のアッセイ培地を使用して、100μl/ウェルにて、連続10倍希釀(例えば、 $10^{-1} \sim 10^{-10}$)を三連で添加する。次いで、その細胞を、37にて1

50

8時間インキュベートする。組換えHuIFN-A(Biosource Int'l., Camarillo, CA)を、標準的インターフェロンコントロールとして使用し得る。インターフェロンインキュベーション工程の後に、細胞をPBSで洗浄で2回洗浄した後に、 $100\mu l$ / ウェルの所定のウイルス希釈液($10^3 \sim 5$ TCID₅₀ / ウェル)を添加する。ウイルスを、インターフェロン処理試験ウェルおよび非処理ウェルの両方に添加し、37にてさらに16~24時間インキュベートする。次いで、 $100\mu l$ の培地を、各ウェルから取り出し、 $100\mu l$ の0.2%ニュートラルレッド溶液(Gibco-BRL)で置換し、37にて1時間インキュベートする。全ての培地を取り出し、細胞を、PBSで2回穏やかに洗浄した後、 $100\mu l$ の酸アルコール(50%エタノール、1%酢酸)を添加する。溶解した色素のA₅₅₀を、Bio-Kinetic Reader(Bio-Tek Instruments, Winooski VT)で読み取る。保護%を、以下の式を用いて計算する：

$$\text{保護\%} = [\text{AVG(A}_{550}\text{試験ウェル)} - \text{AVG(A}_{550}\text{ウイルスコントロールウェル)}] \times 100 / [\text{AVG(A}_{550}\text{未処理細胞コントロールウェル)}]$$

1抗ウイルス単位(U)を、50%保護と規定する。インターフェロン力価(単位/m¹)を、細胞単層の50%保護を示す希釈液(サンプルの0.1mLあたり)の逆数×10として読み取る。

【0146】

一旦インターフェロンの抗ウイルス単位/m¹が、10倍希釈範囲で決定されると、このデータを使用して、このアッセイにおけるインターフェロンの2倍希釈範囲(最大10の希釈液)についての開始希釈液を決定する。これにより、試験されるインターフェロンについてのより正確な抗ウイルス単位/m¹値が与えられる。この比色アッセイは、Crawford-Mikszaおよび(1994)により刊行されたアッセイの改変であることに注意すること。

【0147】

(実施例6：末梢血単核球においてIFNアナログを試験するインピトロ毒性アッセイ)

HuIFN、OVIFN、およびIFNハイブリッドタンパク質のインピトロ毒性を、末梢血単核球(PBMC)を使用して比較した。全血の淡黄色層画分を、PBSで1:4希釈し、Nyco prep 1.077(Nycomed Pharma, Oslo, Norway)上に重層した。 $600 \times g$ で20にて20分間遠心分離した後、PBMC(界面にバンド状になっている)を、ピペットを用いて取り出した。次いで、その細胞を、PBSで1回洗浄し、96ウェルプレートにおいて 5×10^5 細胞/ウェルの濃度にてプレートした。プレートした後、その細胞を、2000U/mL~128,000U/mLのIFN、IFN、またはIFNハイブリッドタンパク質を用いて、三連にて処理した。12日間インキュベートした後、その細胞は、アネキシンVアッセイ(Pharmingen)を用いて、すぐアッセイできる状態であった。これらのアッセイは、本発明者らの実験室で慣用的に使用されており、一致した信頼性のある定量的結果を与えたことに注意のこと。

【0148】

(アネキシンVアッセイ：)

アネキシンVは、リン脂質であるホスファチジルセリン(PS)に対して高い親和性を有する、 $35 \sim 36$ kDのCa²⁺依存性のリン脂質結合タンパク質である。アポトーシス性の細胞において、膜PSを、原形質膜の内側リーフレットから外側リーフレットにトランスロケーションする。アネキシンVは、膜PSを露出しているアポトーシスの初期段階を受けている細胞に結合する。従って、生存を示す色素である(vital dye)ヨウ化プロビジウムと組み合わせた、アネキシンVを用いた染色により、初期のアポトーシス性細胞の同定が可能である。このアッセイは、アポトーシスを既に受けた細胞と、壊死の結果として死亡した細胞との間とは区別しない。

【0149】

10

20

30

40

50

3 ウェルから P B M C を採取し、Pharmingen Assay マニュアルにより具体的に示されるように、アネキシンV アッセイのために調製する。アネキシンV アッセイキットは、細胞染色に必要な試薬の全てが付属している。染色された細胞を獲得し、Becton Dickinson FACS can および Cell Quest ソフトウェアを使用して分析した。P B M C 集団内にアポトーシスの基本レベル（アネキシンVは陽性、ヨウ化プロピジウムは陰性）および壞死（アネキシンV およびヨウ化プロピジウムが二重陽性）があり、このレベルが、各ドナーによってわずかに異なることに注意することが重要である。従って、未処理集団を使用して、アポトーシスの基本レベルと死細胞の基本レベルを規定する。各サンプルについてのデータを、合計 10,000 細胞からの特異的細胞死%（アネキシンV + またはヨウ化プロピジウム + ）として示し、以下の式を用いて獲得した：

$$\% \text{ 特異的細胞死} = \frac{(\text{未処理ウェルからのアネキシンV}^* \text{ 陽性細胞 \%}) \times 100}{(\text{処理ウェルからのアネキシンV 陽性細胞 \%})}$$

* 注：ヨウ化プロピジウム染色に基づいて特異的細胞死%を計算する場合、アネキシンV 値を、ヨウ化プロピジウム値と置換すること。

【 0 1 5 0 】

（実施例 7 ）

ヒト P B M C (5×10^5 / ウェル) を、rHuIFN または r o IFN いずれかとともに 1.5×10^5 抗ウイルス U / ml にて 12 日間インキュベートし、アネキシンV - FITC およびヨウ化プロピジウムで二重染色した。特異的細胞死%を、以下の式を用いることにより計算した：

[(コントロールウェルからの AV + 細胞 % または PI + 細胞 %) / (処理ウェルからの AV + 細胞 % または PI + 細胞 %) $\times 100$] 。

【 0 1 5 1 】

【表 4】

表4

アネキシンV陽性細胞に基づく特異的細胞死%

	HVV-16	rHuIFNαD (Biosource)	rHuIFNαD (Pepgen)	BSAコントロール
AVG ± STD	12.88 ± 15.44	65.00 ± 22.49	45.46 ± 23.64	7.67 ± 14.57
メジアン	4.88	65.78	43.95	0.00
N	6	10	10	10

【 0 1 5 2 】

10

30

40

【表5】

表5

ヨウ化プロピジウム陽性細胞に基づく特異的細胞死%

	HVV-16	rHuIFNαD (Biosource)	rHuIFNαD (Pepgen)	BSAコントロール
AVG ± STD	2.08 ± 3.85	32.88 ± 15.69	19.32 ± 12.55	3.78 ± 8.19
メジアン	0.56	34.59	15.27	0.00
N	6	10	9	10

(実施例8：フローサイトメトリーにより分析された特異的細胞死%)

図9は、フローサイトメトリーにより分析した特異的細胞死%を示す。ヒトPBM C (5×10^5 /ウェル)を、rHuIFNまたはrOIFNのいずれかとともに、 $1 \cdot 5 \times 10^5$ 抗ウイルスU/m1にて、9日間、10日間、および12日間インキュベートし、次いで、アネキシンV-FITCおよびヨウ化プロピジウムで二重染色した。特異的細胞死%を、以下の式を使用することによって計算した：

[(コントロールウェルからのAV+細胞%またはPI+細胞%) / (処理ウェルからのAV+細胞%またはPI+細胞%) × 100]。列および記号は、それぞれ、アネキシンV計算値およびヨウ化プロピジウム計算値を示す。

【0153】

本明細書中で言及される全ての刊行物および特許出願は、本発明が属する当業者の技術レベルを示す。全ての刊行物および特許出願は、各個々の刊行物または特許出願が、具体的かつ個々に参考として援用されることを示すのと同程度まで、本明細書中に参考として援用される。

【0154】

本発明は、特定の実施形態に関して記載されてきたが、種々の変更および改変が、本発明から逸脱することなく行われ得ることは、当業者に明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0155】

【図1】図1は、HVVフラグメント1を作製するために用いたオリゴヌクレオチド、および最終連結産物配列を示す。

【図2】図2は、HVVフラグメント2を作製するために用いたオリゴヌクレオチド、および最終連結産物配列を示す。

【図3】図3は、HVVフラグメント3を作製するために用いたオリゴヌクレオチド、および最終連結産物配列を示す。

【図4】図4は、HVVフラグメント4を作製するために用いたオリゴヌクレオチド、および最終連結産物配列を示す。

【図5A】図5A～5Cは、HVV-pPICZ-構築物の配列および選択した制限部位を示す。

【図5B】図5A～5Cは、HVV-pPICZ-構築物の配列および選択した制限部位を示す。

【図5C】図5A～5Cは、HVV-pPICZ-構築物の配列および選択した制限部位を示す。

【図6A】図6Aおよび6Bは、選択したHVVタンパク質情報を示す。

10

20

30

40

50

【図 6 B】図 6 A および 6 B は、選択した H V V タンパク質情報を示す。

【図 7】図 7 は、1 % メタノールでの誘導の 72 時間後の P. pastoris H V V 組換え培養上清の SDS-PAGE ゲルである。

【図 8】図 8 は、P. pastoris 上清由来の H V V タンパク質の部分精製を示す SDS-PAGE ゲルである。

【図 9】図 9 は、フローサイトメトリーにより分析した、P B M C 細胞のパーセント比細胞死を示す。

【図 10】図 10 は、選択したインターフェロンタンパク質のアミノ酸配列アライメントを示す。

【配列表】

10

SEQUENCE LISTING

```

<110> Pepgen Corporation
<120> Hybrid Interferon/Interferon Tau
      Proteins, Compositions and Methods of Use
      .
<130> 556008008W00
<140> Not Yet Assigned
<141> Filed Herewith
<150> US 60/311,866
<151> 2001-08-12
<160> 2
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
<210> 1
<211> 172
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> hybrid interferon
<400> 1
Cys Asp Leu Pro Glu Thr His Ser Leu Asp Asn Arg Arg Thr Leu Met
      5           10          15
Leu Leu Ala Gln Met Ser Arg Ile Ser Pro Ser Ser Cys Leu Met Asp
      20          25          30
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
      35          40          45
Gln Lys Ala Pro Ala Ile Ser Val Leu His Glu Leu Ile Gln Gln Ile
      50          55          60
Phe Asn Leu Phe Thr Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Asp
      65          70          75          80
Leu Leu Asp Lys Phe Cys Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
      85          90          95
Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Glu Arg Val Gly Glu Thr Pro Leu Met
      100         105         110
Asn Ala Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr
      115         120         125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
      130         135         140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
      145         150         155         160
Arg Leu Thr Lys Met Gly Gly Asp Leu Asn Ser Pro
      165         170
<210> 2
<211> 519
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> hybrid interferon
<400> 2
tgtgattgc cagagactca ctctttggac aacagaagaa ctgtatgtct tttggcccaa      60
atgtctagaa tctctccatc ctcttgttt atggatagac acgttccgg tttcccacaa      120
gaagaatttg acggtaacca attccaaaag gtcctgcta ttctgtttt gcacgagttg      180

```

20

30

40

50

attcaacaaa ttttcaactt gttcaccact aaggactctt ctgctgcctg ggacgaagac	240
ttgttgaca agttctgtac tgagcttac caacaattga acgacttggaa ggcttgtgtt	300
atgcaagagg agagagtccg tgagacccca ttgatgaacg ctgattccat cttggctgtc	360
aagaagtact tcagaagaat taccttgtac ttgaccgaaa agaagtactc cccatgtgcc	420
tggaaagtccg ttagagccgaa atcatgaga tctttgtct tgcactaa ctgcagag	480
agacttacca agatgggtgg agacttgaac tctccataa	519

【図1】

HVV フラグメント 1

合成されたオリゴのリスト：

HVV1F1T1 5'-PCTAGGCTCGAGAA-3'
 HVV1F1T2 5'-PGAGATGTGATTGCCAGAGACTCACTCTT-3'
 HVV1F1T3 5'-PTGGCAACAGAAGRACTTTGATGCTTT-3'
 HVV1F1T4 5'-PGGCAAAATGCTAGAACCTCTCCATCCTC-3'
 HVV1F1T5 5'-PTGTTTGATGGATAGACAGATTTCGGTT-3'
 HVV1F1T6 5'-PCCCACAGAAGAATTCCCTGCTCGCG-3'
 HVV1F1B1 5'-PGATCCCGAGCA-3'
 HVV1F1B2 5'-PGGAATTCTCTCTGTTGGAAACCGGAAATCGT-3'
 HVV1F1B3 5'-PGTCTATCCATCAAACAAGAGGGATGGAA-3'
 HVV1F1B4 5'-PGATTTAGACATTTGGGCAAAAGCATCA-3'
 HVV1F1B5 5'-FAAGTTCTCTGTGTCAGAAGTGAAGTCT-3'
 HVV1F1B6 5'-PCTGCAATCACATCTTCGAGC-3'

最終連結生成物：

```
[ HVV1F1T1 ] [ HVV1F1T2 ] [ HVV1F1T3
  5'-CTAGGCTCGAGAAGAGATGTGATTGCCAGAGACTCACTCTTGGACAACAGAAGAACCT
  3'-CGAGCTCTCTACACTARACGGCTCTGAGTGAGAACCTGTTGCTTCTGAA
  { HVV1F1B6 } [ HVV1F1B5 ] [ HVV1F1B2
    ] [ HVV1F1T4 ] [ HVV1F1T5 ] [ HVV1F1B3
      TTTGGCCAAATGCTAGAACCTCTCCATCTTGTGATGGATAGACACGATTTCGGTTT
      AAACGGGTTTACAGATTTAGAGAGGTAGGAGAACAAACTACCTATCTGCTAAAGCCAA
      F1B4 ] [ HVV1F1B3 ] [ HVV1F1B2
    ] [ HVV1F1B1 ]
```

Figure 1

【図2】

HVV フラグメント 2

合成されたオリゴのリスト：

HVV1F2T1 5'-PAATTGACGGTAAC-3'
 HVV1F2T2 5'-PCAATTCCAAAAGGCTCTGCTATTCTGT-3'
 HVV1F2T3 5'-PTTGACAGACTGATTCACAAATT-3'
 HVV1F2T4 5'-PTCAACTTGTTCACCACTAAGGACTCT-3'
 HVV1F2T5 5'-PTCTGCTGCTGGACGAAGACTTGTGAC-3'
 HVV1F2T6 5'-PAAGTTCTGTACTGAGCTCAGCGGAATG-3'
 HVV1F2B1 5'-PGATCCATTCCGGCT-3'
 HVV1F2B2 5'-PGAGCTCAGTACAGAACCTTGCTCAACAA-3'
 HVV1F2B3 5'-PGTCTTCTCCAGGCAGCAGAAGAGTCCT-3'
 HVV1F2B4 5'-PTAGTGGTGAACAAGTTGAAAATTGTTG-3'
 HVV1F2B5 5'-PAATCAACTCGCAAAACAGAAATA-3'
 HVV1F2B6 5'-PGCAGGAGCCCTTGGAAATTGGTACCGTCA-3'

最終連結生成物：

```
[ HVV1F2T1 ] [ HVV1F2T2 ] [ HVV1F2T3
  5'-AATTGGACGGTAACCAATTCCAAAAGGCTCTGCTATTCTGTGTTGACAGATTGAT
  3'-ACTGCCATTGGTTAAGTTTCCGAGGACGATAAAAGACAAAACGTCTCAACTA
  [ HVV1F2B6 ] [ HVV1F2B5 ] [ HVV1F2B2
    ] [ HVV1F2T4 ] [ HVV1F2T5 ] [ HVV1F2B2
      TTCAACTTGTTCACCACTAAGGACTCTTCTGCTGGACGAAGACTTGTGACAAAG
      AAAGTTGAAACAAGTGGTGAATCTGAGAAGACGACGGACCTGCTCTGAAACAACCTGTT
      2B4 ] [ HVV1F2B3 ] [ HVV1F2B2
    ] [ HVV1F2T4 ] [ HVV1F2T5 ] [ HVV1F2B2
      GAGCTCAGCGCGAATG-3'
      CTCGAGTCGGCTTACCTAG-5'
      ] [ HVV1F2B1 ]
```

Figure 2

【図3】

HVV フラグメント 3

合成されたオリゴのリスト：

HHV1F3T1	5'-PTTACCAACAATT-3'
HHV1F3T2	5'-PGAGGACTGTGGAGGCTTGTTATGC-3'
HHV1F3T3	5'-PAAGGAGGAGGATCGTCGAGACCCCATGATG-3'
HHV1F3T4	5'-PAACGCTGATTCCATCTGGCTGTCAGAAGT-3'
HHV1F3T5	5'-PACTTCAGAGAAATTGAGCTATTG-3'
HHV1F3B1	5'-PGATCAAATGAGC-3'
HHV1F3B2	5'-PTGAAATTCTTCGAAGTACTTCTGACAGCCA-3'
HHV1F3B3	5'-PGATGGAATCAGGGTTCATCATATGGGGT-3'
HHV1F3B4	5'-PCTCACCGACTCTCTCTCTGGCATAAAGT-3'
HHV1F3B5	5'-PAGCTTCAAGGACTCTTCAATTCTGGTAAAGCT-3'

最終連結生成物：

```

[ HVV1F3T1 ] [ HVV1F3T2 ] [ HVV1F3T3
5' -TTACCAACATGAAAGCCTGGAGGCTTGCTGTATGAGAGAGAGCTGGTG/
3' -TCGAATAGTTGTTACTGTGACACCTCGAACACRATACGTCTCCCTCTCAGCCACT
( HVV1F3B5 ) ( HVV1F3B4

) [ HVV1F3T4 ] [ HVV1F3T5 ] [ HVV1F3T6
ATTGATGAAACCTGATTCCATCTGGCTGCAAGAAGTACTTCAGAGAAATTCAGCTCATTTG-
TAACATACTGGCAGCTAAAGTAGAACCCGAGCTTCTCATGAGTCCTTAAAGTCGACTA
V1F3B3 ) [ HVV1F3B2 ] [ HVV1F3B1 ] [ HVV1F3B0

```

Figure 3

Figure 4

Fig. 5A

Fig. 5B

【 図 8 】

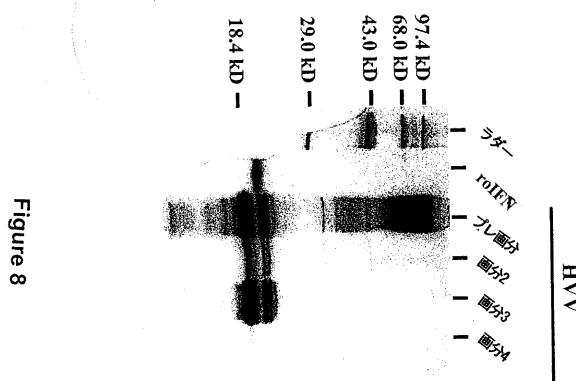


Figure 8

【 四 9 】

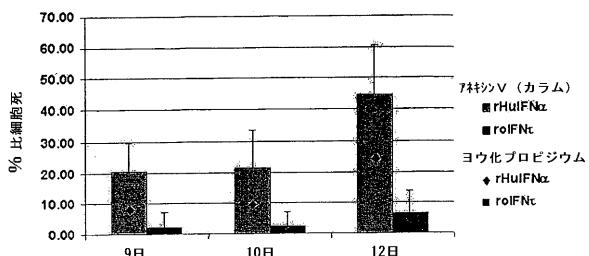


Figure 9

【 図 1 0 】

NLVHVVTAA.seqal のアライメント報告 PAM250残基x残基表を用いるClustal法を使用する
2001年5月29日 4:03 PM

Figure 10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No. PCT/US02/25691
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12P 21/06; C12N 15/09, 15/19, 15/21; C07K 14/355, 14/56; A61K 38/21 US CL : 435/69.1, 69.51, 69.7; 424/85.4, 85.7, 192.1; 514/12, 885; 530/350, 351 <small>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</small>		
B. FIELDS SEARCHED <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> U.S. : 435/69.1, 69.51, 69.7; 424/85.4, 85.7, 192.1; 514/12, 885; 530/350, 351		
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small>		
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet</small>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,174,996 B1 (JOHNSON et al) 16 January 2001 (16.01.2001), entire document	1-16, 22 and 27
Y	HORISBERGER, M. A. et al. Interferon-alpha Hybrids, Pharmac. Ther. 1995, Vol. 66, No. 3, pages 507-534, entire document	1-16, 22 and 27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.
<small>* Special categories of cited documents:</small>		
<small>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</small>		
<small>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</small>		
<small>"C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</small>		
<small>"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</small>		
<small>"E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</small>		
<small>"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</small>		
<small>"G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</small>		
<small>"H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</small>		
<small>"I&" document member of the same patent family</small>		
<small>Date of the actual completion of the international search 26 February 2003 (26.02.2003)</small>		<small>Date of mailing of the international search report 24 MAR 2003</small>
<small>Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230</small>		<small>Authorized officer Jagathesan Seharaseyam Telephone No. 703-308-0196</small>

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/25691

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST search; CAS search on MEDLINE, CAPLUS, CANCERLIT, EMBASE and BIOSIS
search terms: interferon hybrid and interferon-tau

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/25691

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

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

1. Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-16, 22 and part of 27

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

PCT/US02/25691

INTERNATIONAL SEARCH REPORT**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-16, 22 and part of 27, drawn to a special technical feature of an interferon hybrid polypeptide and a method of inhibiting viral replication.

Group II, claim(s) 17-19, drawn to a special technical feature of a nucleic acid, an expression vector containing the nucleic acid, a host cell expressing the polypeptide and a method of making.

Group III, claim(s) 20-21, drawn to a special technical feature of a pharmaceutical composition.

Group IV, claim(s) 23 and part of 27, drawn to a special technical feature of a method of inhibiting the growth of tumor cells.

Group V, claim(s) 24 and part of 27, drawn to a special technical feature of a method of treating an autoimmune disease in a subject.

Group VI, claim(s) 25 and part of 27, drawn to a special technical feature of a method treating chronic inflammation in a subject.

Group VII, claim(s) 26 part of 27, drawn to a special technical feature of a method of treating a disease condition responsive to interferon.

Inventions I-III are compositions and invention IV-VII are methods.

The compositions of Inventions I, II and III are different from each other as they are directed to nonequivalent types of compounds with different chemical characteristics. Invention I is a polypeptide. Invention II is nucleic acid and a cell containing it. Invention III is a pharmaceutical composition. Inventions IV-VII are different from each other as they are directed to nonequivalent methods. Invention IV is a method of inhibiting the growth of tumor cells. Invention V is a method of treating an autoimmune disease in a subject. Invention VI is a method of treating chronic inflammation in a subject. Invention VII is a method of treating a disease condition responsive to interferon. Each of the treatment methods are different because they treat different disease conditions or states.

The claims of these groups are directed to different inventions, which are not linked to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. The claims in the different groups lack the same or corresponding special technical features. In particular, each group is directed to different compounds and /or methods. Accordingly, the claims are not so linked by a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 so as to form a single inventive concept and lack of unity is deemed proper.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/56	
C 0 7 K 14/56	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/66	F

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 カンポス , ジャクリーン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 0 2 , ピッツバーグ , オリンダ サークル 1 4

(72)発明者 リー , ウェイン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 6 4 , ポーウェイ , ウィルダーネス ロード 1 6
5 1 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA22 BA23 BA24 CA07 DA12 EA04 GA11 GA25 HA08
4B064 AG08 AG09 AG10 AG26 CA10 CA19 CC24 CE10 DA02
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA59 DA21 MA01
MA52 MA55 MA59 MA66 NA06 NA14 ZB032 ZB072 ZB212 ZB262
ZB332
4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 DA15 DA16 DA17 EA22
FA74