

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6736665号

(P6736665)

(45) 発行日 令和2年8月5日(2020.8.5)

(24) 登録日 令和2年7月17日(2020.7.17)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113 1 0 0 Z

C 1 2 N 15/67 (2006.01)

C 1 2 N 15/67 Z N A Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 14 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-514761 (P2018-514761)
 (86) (22) 出願日 平成28年5月27日(2016.5.27)
 (65) 公表番号 特表2018-516599 (P2018-516599A)
 (43) 公表日 平成30年6月28日(2018.6.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2016/005647
 (87) 国際公開番号 W02016/195332
 (87) 国際公開日 平成28年12月8日(2016.12.8)
 審査請求日 平成30年1月23日(2018.1.23)
 (31) 優先権主張番号 10-2015-0076197
 (32) 優先日 平成27年5月29日(2015.5.29)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 韓国 (KR)

(73) 特許権者 517249886
 コーロン ライフ サイエンス インコー
 ポレイテッド
 KOLON LIFE SCIENCE,
 INC.
 大韓民国07793ソウル、カンソグ、マ
 ゴク ドンロ110
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鮫島 睦
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生
 (74) 代理人 100170520
 弁理士 笹倉 真奈美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ボックスウイルス由来のプロモーターおよびそれを含むベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のポリヌクレオチド；および

配列番号 2 および配列番号 3 のポリヌクレオチドからなる群から選択される 1 以上のポリ
 ヌクレオチドを含み、前記 2 以上のポリヌクレオチドが 5' から 3' 方向で結合している
 核酸分子であって、ここで、哺乳動物細胞において標的遺伝子の転写を誘導できるプロモ
 ーターである、核酸分子。

【請求項 2】

5' から 3' 方向で、配列番号 1 のポリヌクレオチドの 3' 末端に結合している配列番
 号 2 および配列番号 3 のポリヌクレオチドからなる群から選択される 1 以上のポリヌクレ
 オチドを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

少なくとも 1 つの末端で制限酵素認識部位をさらに含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

配列番号 9 または配列番号 10 のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の核酸分子

【請求項 5】

哺乳動物細胞の細胞質において発現される標的遺伝子のプロモーターである、請求項 1
 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

10

20

請求項 1 - 5 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 7】

ウイルスである、請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 8】

ポックスウイルス科のウイルスに由来する、請求項 7 に記載のベクター。

【請求項 9】

ポックスウイルス科のウイルスが、オルソポックスウイルス、アビポックスウイルス、パラポックスウイルス、カプリポックスウイルス、およびスイポックスウイルス属のウイルスからなる群から選択される、請求項 8 に記載のベクター。

【請求項 10】

ポックスウイルスが、ワクチニアウイルスである、請求項 8 に記載のベクター。

【請求項 11】

核酸分子に結合している標的遺伝子をさらに含む、請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 12】

標的遺伝子が、腫瘍抗原、免疫応答誘導因子、腫瘍増殖抑制因子、アポトーシス誘導因子、または腫瘍組織におけるウイルスの活性の増強を助けることができる因子をコードするポリヌクレオチドである、請求項 11 に記載のベクター。

【請求項 13】

請求項 1 - 5 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクターで形質転換された、ヒトを除く宿主。

【請求項 14】

請求項 1 - 5 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクターで形質転換された、細胞株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポックスウイルス由来のプロモーター、プロモーターを含むベクター、プロモーターを使用して導入遺伝子を発現するための方法、および疾患の予防または治療におけるベクターの使用に関する。本発明に係るプロモーターは、導入遺伝子の強い発現の誘導のために使用され得る。

【背景技術】

【0002】

遺伝子治療は、DNA および RNA などの遺伝物質を人体に投与することにより、遺伝的欠陥、感染症、腫瘍、心臓血管疾患等などの様々な疾患を治療するまたは予防するための方法である。有効な遺伝子送達、ならびに遺伝子発現の誘導もしくは調節は、遺伝子治療において重要である。遺伝子を細胞に送達するために使用される物質は、ベクターと呼ばれる。遺伝子送達ベクターは、非ウイルスベクターとウイルスベクターの2つのカテゴリーに大きく分けられる。

【0003】

哺乳動物における遺伝子送達または遺伝子発現のためのウイルスベクターとして、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、およびポックスウイルスが使用されてきた。その中でも、ポックスウイルスは、大きい挿入容量、格別な遺伝子送達および発現効率、および高い安全性を有し、かつ、高い力価を有するウイルスの製造およびを可能にするので、遺伝子送達および治療薬剤開発のために広く使用されている。

【0004】

ポックスウイルス科に属するウイルスは、オルソポックスウイルス、アビポックスウイルス、パラポックスウイルス、カプリポックスウイルス、スイポックスウイルス等を含む。そして、オルソポックスウイルスに属するウイルスは、天然痘ウイルス、ワクチニアウイルス等を含む。オルソポックスウイルスに属するワクチニアウイルスは、天然痘の予防

10

20

30

40

50

のために使用されてきた。そして、オルソポックスウイルスに属するワクチニアウイルスは、遺伝子工学技術を使用する遺伝子送達ベクターとして近年開発されている。

【0005】

ワクチニアウイルスベクターの主要な利点は、他のウイルスと比較して大きい遺伝子が導入され得ることであり（例えば、アデノ随伴ウイルスと比較して少なくとも10倍大きい遺伝子が導入され得る）かつ、様々な細胞がウイルスに感染し得ることである。さらに、ワクチニアウイルスは、有効な免疫応答を誘導できるので、ワクチンベクターとして使用するために理想的であると考えられている。例えば、B a v a r i a n N o r d i c c o m p a n y は、がんワクチンとしてMVAベクターを使用してPSAまたはPAPなどの腫瘍抗原を発現する前立腺腫瘍患者に臨床試験を行っている。さらに、炭疽菌ワクチン、出血熱ウイルスワクチン、および流行性口内炎ウイルスワクチン等が開発されてきた。近年、ワクチニアウイルスも、腫瘍溶解性ウイルスとして開発されており、かつ臨床試験において研究中である。一例として、腫瘍溶解性ウイルスJX-594が、S i l l a j e n（旧名：J e n n e r e x）により開発されてきており、肝腫瘍、結腸腫瘍、小児腫瘍、および黒色腫患者への様々な臨床試験が行われ、または完了している。

10

【0006】

理想的な遺伝子送達ベクターは、高い形質導入効率で標的細胞に遺伝子を送達し、かつ標的遺伝子の高い発現レベルを示し、その結果、良好な治療効果が達成され得るものである。また、ベクターの操作および製造は単純なものである。特に、抗原または治療遺伝子の発現を通して治療効果を高めるために、遺伝子の発現レベルは高いものである。このために、遺伝子送達ベクターによる高い形質導入効率および強いプロモーターによりコントロールされる高いレベルの遺伝子発現が必要とされる。

20

【0007】

遺伝子発現のために使用される一般的なプロモーターは、HCMV、EF-1アルファ、CAGおよびpGKプロモーターを含む。しかしながら、ポックスウイルスの場合、遺伝子転写は細胞質で行われ、従って、上記プロモーターは、ワクチニアウイルスベクターでは機能せず、ポックスウイルス由来のプロモーターが使用されるものである。代表的なポックスウイルス由来のプロモーターは、p7.5、pE/L、pHybおよびp11プロモーターを含む。

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

発明の開示

技術的課題

本発明の目的は、高い発現レベルで標的遺伝子を発現できるポックスウイルスのための遺伝子発現調節核酸分子を提供することである。

【0009】

本発明のさらに別の目的は、遺伝子発現調節核酸分子を含むベクターを提供することである。

【0010】

40

本発明のさらなる目的は、遺伝子発現調節核酸分子および核酸分子に結合された標的遺伝子が導入されているベクターを含む組成物、ならびに疾患の治療もしくは予防のための組成物の使用を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、標的遺伝子の発現を強く誘導できるポックスウイルス由来のプロモーター、プロモーターを含むプラスミドベクター、およびプラスミドベクターとポックスウイルス（変異体ポックスウイルスを含む）との相同組み換えにより得られたポックスウイルスベクター、およびそれらを生成するための方法に関する。それはまた、治療遺伝子または抗原が導入されたポックスウイルスベクターである、抗腫瘍薬またはワクチンの使用に関する

50

る。

【 0 0 1 2 】

本発明に係る遺伝子発現調節核酸分子、すなわちプロモーターは、知られた他のボックスウイルスプロモーターと比較して高いレベルの遺伝子発現を誘導できるプロモーターを指す。従って、それらがボックスウイルスベクターにおいて使用される場合、プロモーターのコントロール下の標的遺伝子の発現レベルは増加され得、かつプロモーターを含有するベクターの治療効果は増強され得る。ボックスウイルスベクター、好ましくはワクチニアウイルスベクターが遺伝子治療のために使用される場合、プロモーターの選択は、ベクターにより送達される遺伝子の発現を増強するために重要である。

【 0 0 1 3 】

以下に、本発明はより詳細に記載される。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

本発明の一態様では、高い効率で標的遺伝子を発現できる、ボックスウイルス例えばワクチニアウイルス由来の遺伝子発現調節核酸分子（すなわちプロモーター）が提供される。

【 0 0 1 5 】

本発明に係るプロモーターは、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 のポリヌクレオチドからなる群から選択される 2 以上のポリヌクレオチドを含む核酸分子であってもよい。また、それは、配列番号 1 のポリヌクレオチドを含む核酸分子であってもよく；かつ配列番号 2 および配列番号 3 のポリヌクレオチドからなる群から選択される 1 以上のポリヌクレオチドであってもよい。それは、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 のポリヌクレオチドからなる群から選択される 2 以上の異なるポリヌクレオチドを組み合わせかつ連結させることにより形成された核酸分子であってもよい。例えば、本発明に係る核酸分子は、5' から 3' 方向に、配列番号 1 および配列番号 2 の融合核酸分子、配列番号 1 および配列番号 3 の融合核酸分子、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 の融合核酸分子、配列番号 1、配列番号 3 および配列番号 2 の融合核酸分子、配列番号 2 および配列番号 1 の融合核酸分子、配列番号 2、配列番号 1 および配列番号 3 の融合核酸分子、ならびに配列番号 2、配列番号 3 および配列番号 1 の融合核酸分子であってもよい。

【 0 0 1 6 】

配列番号 1 の核酸分子は、ワクチニアウイルスの I 1 L 遺伝子プロモーターに由来し、下記表 1 で示される核酸配列を含む。配列番号 2 の核酸分子は、ワクチニアウイルスの E 3 L 遺伝子プロモーターに由来し、下記表 1 で示される核酸配列を含む。配列番号 3 の核酸分子は、ワクチニアウイルスの B 1 9 R 遺伝子プロモーターに由来し、下記表 1 で示される核酸配列を含む。

【 0 0 1 7 】

一実施形態では、本発明に係る核酸分子は、5' から 3' 方向で、配列番号 1 のポリヌクレオチドの 3' 末端に結合している配列番号 2 および配列番号 3 のポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも 1 以上のポリヌクレオチドを含んでもよい。例えば、それは、配列番号 9 または 10 のポリヌクレオチドを含む核酸分子であり得る。

【 0 0 1 8 】

【表 1】

プロモーター名	配列 (5'→3')	配列番号:
p I 1 L	TTTGTATTTAAAAGTTGTTTGGTGA ACTTAAATGGCGG	1
p E 3 L	TGAATAAAAAAAAAATGATAAAATAAA TTAGTTTTATTA	2
p B 1 9 R	TGTGTGTAAAAAACTGATATTATA TAAATATTTTAGTGCCGTATAA	3
p I 1 L-E 3 L	TTTGTATTTAAAAGTTGTTTGGTGA ACTTAAATGGCGGTGAATAAAAAAA ATGATAAAATAAATTAGTTTTATTA	9
p I 1 L-B 1 9 R	TTTGTATTTAAAAGTTGTTTGGTGA ACTTAAATGGCGGTGTGTGTAAAAA AACTGATATTATATAAATATTTTAG TGCCGTATAA	10

10

【 0 0 1 9 】

本明細書中で使用されるように、「ボックスウイルス」という用語は、ボックスウイルス科に属するウイルスを指す。好ましい実施形態によれば、本発明に係るボックスウイルスは、オルソボックスウイルス、アピボックスウイルス、パラボックスウイルス、カプリボックスウイルス、およびスイボックスウイルス、好ましくは天然痘ウイルスおよびワクチニアウイルスを含むオルソボックスウイルス、およびさらに好ましくはワクチニアウイルスを含んでもよい。

20

【 0 0 2 0 】

本発明に係るボックスウイルスは、野生型ボックスウイルスまたは様々な変異体ボックスウイルスを含む。ウイルスの変異型は、いくつかの遺伝子が欠失され、置換され、または挿入されたものであってもよい。例えば、ワクチニアウイルスの場合、特定の遺伝子の存在または非存在のみに依存して腫瘍細胞において複製する抗腫瘍薬として開発が試みられている。従って、様々な変異型のウイルス並びに野生型ウイルスが、使用されてもよい。

30

【 0 0 2 1 】

本発明に係るボックスウイルスベクターは、標的遺伝子のポリヌクレオチドをさらに含む。

【 0 0 2 2 】

本発明の一実施形態では、標的遺伝子は、発現が本発明に係るプロモーターのコントロール下で誘導される遺伝子であり、かつ遺伝子送達または遺伝子発現を通して治療効果を有するために使用されてもよい。例えば、標的遺伝子は、腫瘍抗原 [例えば M U C 1、h T E R T、癌胎児性抗原 (C E A)]、免疫応答インデューサー [例えばインターロイキン (I L) - 1 2、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)、または可溶性 P D - 1]、腫瘍増殖抑制因子 [例えば血管内皮増殖因子 (V E G F) インヒビター、ピルビン酸キナーゼアイソザイム M 2 (P K M 2) インヒビター、またはピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ (P D K) インヒビター]、アポトーシス誘導因子 [例えば T R A I L、チミジンキナーゼ (T K)、またはシトシンデアミナーゼ (C D)]、または腫瘍組織においてウイルスの活性の増加に役立ち得る因子 [例えばマトリックスメタロプロテアーゼ (M M P)、ヒアルロニダーゼ、またはリラキシン] をコードするポリヌクレオチドであってもよい。

40

【 0 0 2 3 】

本発明に係るプロモーターは、哺乳動物細胞において標的遺伝子の転写を誘導できるプロモーター、および好ましくは、哺乳動物細胞の細胞質において標的遺伝子の転写を誘導

50

できるプロモーターである。

【 0 0 2 4 】

本発明のさらなる実施形態では、本発明に係るプロモーターを含むベクターが提供される。

【 0 0 2 5 】

ベクターは、プロモーターに結合している標的遺伝子をさらに含んでもよい。ベクターは、選択マーカーである E G F P、D s R e d、L a c Z、または G u s A などの遺伝子をさらに含んでもよい。

【 0 0 2 6 】

本明細書中で使用されるように、「ベクター」、「遺伝子送達ベクター」または「遺伝子ベクター」という用語は、標的細胞または生物に導入遺伝子を送達できる物質を指す。

【 0 0 2 7 】

ベクターは、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターの両方を包含する。非ウイルスベクターは、プラスミドであってもよい。ウイルスベクターは、ボックスウイルスベクター、好ましくはワクチニアウイルスベクターであってもよい。

【 0 0 2 8 】

本発明の別の実施形態では、本発明に係るプロモーターが導入されているボックスウイルスベクターが提供される。特定の実施形態では、本発明のプロモーターを含むプラスミドベクターと野生型ボックスウイルスまたは様々な変異体ボックスウイルスとの相同組み換えにより構築されたボックスウイルスベクターが提供される。

【 0 0 2 9 】

プラスミドベクターとボックスウイルスとの組み換えは、従来の方法により行われ得る。

【 0 0 3 0 】

本発明の別の実施形態は、プラスミドベクターまたはボックスウイルスベクターを含む宿主に関し、宿主は、微生物、哺乳動物、哺乳動物細胞、または哺乳動物由来の細胞系列であってもよく、かつ哺乳動物は、ヒトであってもよい。

【 0 0 3 1 】

本発明はまた、ボックスウイルスベクター伝播方法を提供し、当該方法は以下の工程を含む (i) 本発明に係るボックスウイルスベクターを細胞に導入する工程 (i i) ボックスウイルスベクターが産生され得るのに適した条件下で細胞を培養する工程、および (i i i) 細胞培養物からボックスウイルスベクターを回収する工程。

【 0 0 3 2 】

ボックスウイルスは、細胞から回収されてもよく、また、培養上清から回収されてもよい。1つの一般的に使用される方法は、ウイルスに感染した細胞を破壊し、次いで細胞溶解物中のビリオンを収集し、次いで当技術分野で知られた技術 (クロマトグラフィー法、超遠心分離法等) を使用してビリオンを精製することである。

【 0 0 3 3 】

本発明はまた、本発明に係るボックスウイルスと共に薬学的に許容可能な賦形剤を含む組成物に関する。

【 0 0 3 4 】

本発明に係る組成物は、様々な疾患、より具体的には遺伝的欠陥、腫瘍、心臓血管疾患および感染症を予防または治療するための遺伝子治療のために使用される。

【 0 0 3 5 】

本発明は、ボックスウイルスベクター好ましくはワクチニアウイルスに治療遺伝子または抗原を導入することにより、様々な疾患の予防または治療のための治療薬剤またはワクチンとして適用されてもよい。また、本発明は、腫瘍溶解性ウイルスの開発のために使用されてもよい。

【 0 0 3 6 】

本発明に係る組成物は、局所もしくは非経口投与、または消化管もしくは他の多数の投

10

20

30

40

50

与経路用に製剤化されてもよい。例えば、胃内、皮下、心臓内、筋肉内、静脈内、腹腔内、腫瘍内、鼻腔内、肺内および気管支内経路が、可能であってもよい。投与は、単回投与としてまたは特定の時間間隔で1以上の用量の反復投与として行われてもよい。適切な投与経路および用量は、疾患、患者、送達ベクター、または送達される標的遺伝子などの様々な因子に依存して決定されてもよい。本発明に係るウイルス粒子に基づく薬物は、 10^4 から 10^{14} p f u (プラークフォーミングユニット (p l a q u e - f o r m i n g u n i t))、有利には 10^5 から 10^{13} p f u、および好ましくは 10^6 から 10^{12} p f u の量で製剤化されてもよい。

【0037】

組成物はまた、薬学的に許容可能な希釈剤、アジュバントもしくは賦形剤、ならびに可溶化剤、安定化剤および防腐剤 (p r e s e r v a t i v e) を含んでもよい。注射のためには、水性、非水性または等張溶液中の製剤化が好ましい。これは、使用時に適切な希釈剤で再構成し得る液体または乾燥 (粉末、凍結乾燥等) 形態で単回用量としてまたは複数用量として提供されてもよい。

【0038】

本明細書中で使用されるように、「遺伝子送達」は、天然の、合成の、または組み換えの、遺伝子もしくは遺伝子フラグメントの細胞への導入 (インビボまたはインビトロ) を指し、導入された遺伝子とその機能を発揮する方法である。本発明に係る導入された遺伝子または遺伝子フラグメントは、特定の配列を有する D N A もしくは R N A、または任意の合成等価核酸を含む。

【0039】

本発明では、遺伝子送達ベクターを伝播させるために使用されるウイルスは、野生型または変異体ウイルスであってもよい。本明細書中で使用されるように、「遺伝子送達効率」はベクターの「遺伝子送達」効率を指し、指標 (例えば発現ベクターの場合、コードされたタンパク質の発現および / またはそのタンパク質の活性等) として遺伝子機能の評価を通して検出されてもよい。

【0040】

本発明のさらなる態様では、標的遺伝子を含む遺伝子送達ベクターを伝播させる工程および遺伝子送達ベクターを通して遺伝子を動物組織に導入する工程を含む、単離動物組織への遺伝子送達のための方法が提供される。

【0041】

本発明に係る遺伝子送達ベクターが遺伝子治療のための組成物として使用される場合、本発明に係る投与は、P B S (リン酸緩衝生理食塩水) および生理食塩水などの溶液中のベクター懸濁液の直接注射または血管内投与 (例えば動脈内、静脈内、または門脈内) を含む局所投与 (例えば、腫瘍内、肝内、筋肉内および大脳内投与) により行われてもよい。

【0042】

一実施形態では、遺伝子送達ベクターは、一般的に注射のための単位剤形 (水溶液、懸濁液またはエマルジョン) で製造され、薬学的に許容可能な希釈剤と遺伝子送達ベクターを混合することにより製剤化される。ここで、好ましくは酸化剤および遺伝子送達ベクターに有害であると知られた他の成分は製造中に含まれない。遺伝子送達ベクターを含む医薬組成物は一般的に、水溶液または凍結乾燥形態で、単回または複数用量単位を有する容器で密封されたアンプルまたはバイアル中に保存される。

【0043】

さらに、本発明は、1以上の本発明に係る医薬組成物が入った1以上の容器を含む医薬品パッケージまたはキットを提供する。さらに、本発明に係るベクターは、他の治療化合物とともに使用されてもよい。

【0044】

本発明に係る遺伝子送達ベクターを含む医薬組成物は、患者の臨床状態 (すなわち予防または治療される状態)、遺伝子送達ベクターを含む組成物の送達部位、標的組織、投与

10

20

30

40

50

方法、投与スケジュールおよび他の当技術分野で知られた因子を考慮して最適な臨床設計に従って患者に投与されてもよい。従って、本発明に記載される遺伝子送達ベクターの「有効量」または適切な用量は、これらの考慮事項に基づいて決定される。

【0045】

本発明の有利な効果

本発明は、ボックスウイルスについてのプロモーター、プロモーターを含むウイルスベクター、疾患の治療および予防におけるウイルスベクターの使用に関する。治療薬剤の効能は、高いレベルの遺伝子発現により増強され得る。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】図1は、実施例1のシングルプロモーターを含有するプラスミドでヒト子宮頸がん細胞（HeLa細胞）のトランスフェクション後のタンパク質ルシフェラーゼの発現レベルの比較を示すグラフである。

【図2】図2は、組み換えプロモーター、すなわち実施例2のpGL4.10-pI1L-E3L、pGL4.10-pI1L-B19R、およびpGL4.10-pI1L-I1Lを含有するプラスミドでヒト子宮頸がん細胞（HeLa細胞）のトランスフェクション後のルシフェラーゼの発現レベルの比較を示すグラフである。

【図3】図3は、DNA制限酵素NheIまたはBamHI/EcoRIで処理されたワクチニアウイルスTK(-)シャトルベクターにp7.5プロモーター（コントロール群）を導入することにより得られたpSP72-p7.5-LucのDNAフラグメントのサイズを示す。

【図4】図4は、制限酵素NheI/HindIIIで同時に処理されたワクチニアウイルスTK(-)シャトルベクターに実施例3のI1L-E3Lプロモーターを導入することにより得られたpSP72-pI1L-E3L-LucのDNAフラグメントのサイズを示す。

【図5】図5は、制限酵素NheI/HindIIIで同時に処理されたワクチニアウイルスTK(-)シャトルベクターに実施例3のI1L-B19Rプロモーターを導入することにより得られたpSP72-pI1L-B19R-LucのDNAフラグメントのサイズを示す。

【図6】図6は、コントロール群プロモーターまたは実施例3で得られた組み換えプロモーターが導入されているワクチニアウイルスTK(-)-p7.5-Luc、TK(-)-pI1L-E3L-Luc、およびTK(-)-pI1L-B19R-LucのゲノムDNAのPCR確認を示す。

【図7】図7は、コントロール群プロモーターまたは実施例3で得られた組み換えプロモーターが導入されているワクチニアウイルスTK(-)-p7.5-Luc、TK(-)-pI1L-E3L-Luc、およびTK(-)-pI1L-B19R-Lucの、RT-PCRにより確認されるルシフェラーゼ、GFPおよびベータアクチンのmRNA発現レベルを示す。

【図8】図8は、コントロール群プロモーターまたは実施例3で得られた組み換えプロモーターが導入されているワクチニアウイルスTK(-)-p7.5-Luc、TK(-)-pI1L-E3L-Luc、およびTK(-)-pI1L-B19R-LucのゲノムDNAの確認のためのサザンプロットの結果を示す。

【図9】図9は、コントロール群プロモーターまたは実施例3で得られた組み換えプロモーターが導入されているワクチニアウイルスTK(-)-p7.5-Luc、TK(-)-pI1L-E3L-Luc、およびTK(-)-pI1L-B19R-Lucで処理された、ヒト子宮頸がん細胞系列HeLaまたはヒト結腸がん細胞系列SW620におけるルシフェラーゼ発現レベルの比較解析を示す。

【図10a-c】図10a-10cは、コントロール群プロモーターまたは実施例3で得られた組み換えプロモーターを導入することにより構築されたワクチニアウイルスTK(-)-p7.5-Luc、TK(-)-pI1L-E3L-Luc、およびTK(-)-

10

20

30

40

50

p I 1 L - B 1 9 R - L u c のベクターマップを示す。

【 0 0 4 7 】

本発明を実施するための最良な形態

以下、本発明を実施例によってより詳細に説明する。以下の実施例は、その範囲を限定することなく本発明をさらに説明することを意図する。

【実施例】

【 0 0 4 8 】

実施例 1 : プロモーターの調製

1 - 1 : プロモーター遺伝子の取得およびプラスミドの構築

各プロモーターを遺伝子合成を通して得た。ヌクレオチド配列は、下記であった。遺伝子合成は Macrogen に依頼し、かつ Bioautomation, Inc. の M M 1 9 2 E をシンセサイザーとして使用した。プロモーター遺伝子は、WRゲノムDNA配列 (GenBank : A Y 2 4 3 3 1 2 . 1) に基づき、かつ各プロモーターの配列は下記表 2 で示される。

【表 2】

プロモーター名	配列 (5'→3')	配列番号:
p I 1 L	TTTGTATTTTAAAAGTTGTTTGGT GAACTTAAATGGCGG	1
p E 3 L	TGAATAAAAAAAAAATGATAAAATA AATTAGTTTTTATTA	2
p B 1 9 R	TGTGTGTAAAAAAAAACTGATATTA TATAAATATTTTAGTGCCGTATA A	3
p F 1 1 L	GGTAAAATTATATAAAAAGTGAA AAACAATATTATTTTATCGTTG GTTGTTT	4
p C 1 1 R	AATTAACAATATATTATAGTTTA TATTACTGAATTAATAATATAAA ATTCCCA	5
p 7. 5	TCCAAACCCACCCGCTTTTTATA GTAAGTTTTTTCACCCATAAATAA TAAATACAATAATTAATTTCTCG TAAAAGTAGAAAATATATTCTAA TTTATTGCACGG	6
p E / L	AAAATTGAAATTTTATTTTTTTTT TTTTTGGAATATAAATAGCTAGCT CGAG	7
p 1 1	ATATAGTAGAATTTTCATTTTGTT TTTTTCTATGCTATAAAT	8

【 0 0 4 9 】

プラスミド構築について、K p n I および X h o I 配列を p E / L および p I 1 L プロモーター配列の末端に加え、かつ N h e I および H i n d I I I 配列を他のプロモーター配列の末端に加えた。それぞれの p E / L および p I 1 L プロモーター遺伝子を K p n I および X h o I で消化した p G L 4 . 1 0 [l u c 2] ベクター (P r o m e g a 、 U S A) に挿入し、プラスミド p G L 4 . 1 0 - p E / L および p G L 4 . 1 0 - p I 1 L を得た。

【 0 0 5 0 】

p 7 . 5、p 1 1、p E 3 L、p C 1 1 R、p F 1 1 Lおよびp B 1 9 Rプロモーター遺伝子をNhe IおよびHind IIIで消化したp G L 4 . 1 0 [l u c 2]ベクターにそれぞれ挿入し、プラスミドp G L 4 . 1 0 - p 7 . 5、p G L 4 . 1 0 - p 1 1、p G L 4 . 1 0 - p E 3 L、p G L 4 . 1 0 - p C 1 1 R、p G L 4 . 1 0 - p F 1 1 Lおよびp G L 4 . 1 0 - p B 1 9 Rを生成した。

【 0 0 5 1 】

1 - 2 : シングルプロモーターの活性の評価

実施例 1 - 1 で生成された 8 種のプラスミドそれぞれにおいて発現されるルシフェラーゼタンパク質の量は、プロモーター活性を評価するために測定した。p I 1 L、p E 3 L、p C 1 1 R、p F 1 1 L、およびp B 1 9 Rプロモーターを含むプラスミド、ならびにコントロール群として既知のp 7 . 5、p E / Lおよびp 1 1プロモーターを含有するプラスミドを使用した。

10

【 0 0 5 2 】

プラスミドのプロモーター活性を試験するために、HeLa細胞を実施例 1 - 1 において調製された 8 種のプロモーターの 1 つを含有するそれぞれのプラスミドでトランスフェクトし、次いでルシフェラーゼの発現の量を決定した。HeLa細胞を 1 0 % ウシ胎児血清を補充したMEM培地で培養し、かつ 6×10^4 細胞 / 穴で 2 4 穴培養プレートに接種した。翌日、細胞をワクチニアウイルスに感染させ、6 時間後、ウイルス感染細胞を、トランスフェクション溶液を使用してウイルスプロモーターが導入されたプラスミドでトランスフェクトした。2 4 時間後、培地を除去し、細胞溶解溶液で細胞を処理することにより得られた細胞溶解物の一部をルシフェラーゼ測定のための 9 6 穴培養プレートに移し、かつルシフェラーゼ酵素の基質であるルシフェリンを処理した。基質分解により生成された光の量は、ルシフェラーゼ測定器を使用して測定し、各プロモーターについての測定結果は、図 1 に示される。図 1 は、それぞれのプロモーターを含有するプラスミドでのヒト子宮頸がん細胞系列であるHeLa細胞のトランスフェクション後のルシフェラーゼの発現レベルの比較を示す。p 7 . 5、p E / L、およびp 1 1 は、コントロール群として以前に使用されたプロモーターであり、かつp E 3 L、p C 1 1 R、p F 1 1 L、p B 1 9 Rおよびp I 1 L は、実験群において使用される候補プロモーターである。

20

【 0 0 5 3 】

図 1 で示されるように、p I 1 L が導入されたプラスミドによる遺伝子の発現レベルは、p 7 . 5、p E / Lまたはp 1 1プロモーターが導入されたコントロールプラスミドと比較して約 3 倍高く、p E 3 Lまたはp B 1 9 Rが導入されたプラスミドによる遺伝子発現の量は、コントロール群と同様であった。

30

【 0 0 5 4 】

1 - 3 : 組み換えプロモーター遺伝子の取得

プロモーターの活性を高めるために、組み換えプロモーターは、実施例 1 - 2 におけるシングルプロモーターとして最も高い活性を示したI 1 Lプロモーターと比較的高い活性を示したE 3 LまたはB 1 9 Rプロモーターとを組み合わせることにより生成した。各プロモーターは、実施例 1 - 1 と同様にして合成し、かつそのヌクレオチド配列は、下記のようにした。

40

【 0 0 5 5 】

【表 3】

プロモーター名	配列 (5'→3')	配列番号:
p I 1 L - E 3 L	TTTGTATTTTAAAAGTTGTTTGGTGAACCTT AAATGGCGGTGAATAAAAAAATGATAAA ATAAATTAGTTTTATTA	9
p I 1 L - B 1 9 R	TTTGTATTTTAAAAGTTGTTTGGTGAACCTT AAATGGCGGTGTGTGTAAAAAACTGATA TTATATAAATATTTTAGTGCCGTATAA	10
p I 1 L - I 1 L	TTTGTATTTTAAAAGTTGTTTGGTGAACCTT AAATGGCGGTTTGTATTTAAAAGTTGTTT GGTGAACCTTAAATGGCGG	11

10

プラスミド構築について、Nhe I および Hind III 配列を各組み換えプロモーター配列の末端に加えた。

【0056】

組み換えプロモーター遺伝子 p I 1 L - E 3 L、p I 1 L - B 1 9 R および p I 1 L - I 1 L は、Nhe I および Hind III で消化された p G L 4 . 1 0 [l u c 2] ベクターに挿入し、プラスミド p G L 4 . 1 0 - p I 1 L - E 3 L、p G L 4 . 1 0 - p I 1 L - B 1 9 R、および p G L 4 . 1 0 - p I 1 L - I 1 L を生成した。

20

【0057】

実施例 2 : プロモーター活性の評価

実施例 1 - 3 において生成された 3 種のプラスミドにおいて発現されるルシフェラーゼタンパク質の量は、プロモーター活性を評価するために測定した。

【0058】

具体的に、プラスミドのプロモーター活性を試験するために、プラスミドで HeLa 細胞のトランスフェクション後にルシフェラーゼの発現レベルを測定した。10% ウシ胎児血清を補充した MEM 培地で培養した HeLa 細胞を、 6×10^4 細胞毎穴で 24 穴培養プレートに接種した。翌日、細胞をワクチニアウイルスに感染させ、6 時間後、ワクチニアウイルスプロモーターが導入されたプラスミドは、トランスフェクション溶液を使用してウイルス感染細胞で処理した。2 時間後、細胞周囲の培地を除去し、細胞溶解物を処置することにより得られた細胞溶解物の一部をルシフェラーゼ測定のための 96 穴培養プレートに移し、ルシフェラーゼ酵素の基質であるルシフェリンで処置した。基質分解により生成された光の量は、ルシフェラーゼ測定器を使用して測定し、各プロモーターについての測定結果は、図 2 および表 4 で示される。図 2 は、比較的高い活性を有する p E 3 L または p B 1 9 R を、実施例 1 で最も高い活性を示した p I 1 L と組み合わせることにより産生された組み換えプロモーターの活性の比較を示す。

30

【0059】

図 2 で示されるように、組み換えプロモーター p I 1 L - E 3 L または p I 1 L - B 1 9 R が導入されたプラスミドは、コントロール群として p 7 . 5 プロモーターが導入されたプラスミドのものよりも約 6 倍高い遺伝子発現量を示し、かつ、p I 1 L シングルプロモーターが導入されたプラスミドのものより約 2 . 4 倍高い遺伝子発現量を示した。さらに、高いプロモーター活性を有する p I 1 L プロモーターの 2 コピーを組み合わせることにより調製された p I 1 L - I 1 L プラスミドは、p I 1 L シングルプロモーターが導入されたプラスミドと比較して約 1 . 5 倍の増加した発現レベルを示した。

40

【表 4】

プロモーター	ルシフェラーゼ活性 (unit : RLU / mg)
ベクター	10, 946
p 7. 5	1, 747, 383
p I 1 L	5, 337, 647
p I 1 L - E 3 L	11, 834, 807
p I 1 L - B 1 9 R	12, 274, 591
p I 1 L - p I 1 L	8, 661, 349

10

【0060】

実施例 1 - 2 で最も高い活性を有する p I 1 L の 2 コピーを組み合わせることにより得られた p I 1 L - I 1 L の場合、ルシフェラーゼの活性は 8, 661, 349 であり、p I 1 L と比較して 2 倍未満増加していた。しかしながら、p I 1 L を E 3 L または B 1 9 R と組み合わせる場合、活性は 2 倍以上増加した。図 1 の結果で示されるように、p 7. 5 の活性は、既存のプロモーターの中で最も高かったが、実験において使用された全てのプロモーターの活性は、p 7. 5 のものより高かったことが図 2 より確認された。

【0061】

実施例 3 : プロモーター導入ウイルスベクター

20

3 - 1 : ウイルスベクターのためのシャトルベクター構築

組み換えプロモーターが導入されたプラスミドを使用して測定されたプロモーターの活性評価の結果が、同様にウイルスに適用され得るかどうかを試験するために、本発明に係るウイルスプロモーターおよびレポーター遺伝子ルシフェラーゼは、TK 遺伝子が除去されたウイルスシャトルベクター p S P 7 2 - T K (-) に共に導入した。

【0062】

実施例 1 - 1 でコントロール群として使用された p G L 4 . 1 0 - p 7. 5 ならびに実施例 1 - 3 で得られた p G L 4 . 1 0 - p I 1 L - E 3 L および p G L 4 . 1 0 - p I 1 L - B 1 9 R を N h e I および X b a I により切断し、プロモーターおよびルシフェラーゼ遺伝子を得た。こうして得られた遺伝子は、N h e I および X b a I により切断された p S P 7 2 - T K (-) シャトルベクターに挿入し、p S P 7 2 - T K (-) - p 7. 5 - L u c、p S P 7 2 - T K (-) - p I 1 L - E 3 L - L u c、および p S P 7 2 - T K (-) - p I 1 L - B 1 9 R - L u c が最終的に得られた。

30

【0063】

3 - 2 : 組み換えワクチニアウイルスの生成

野生型ワクチニアウイルスと共に、実施例 3 - 1 において調製された組み換えシャトルベクターを細胞に導入して組み換えウイルスを調製した。組み換えワクチニアウイルスは、相同組み換えによりワクチニアウイルスの TK 遺伝子位置に挿入することにより調製した。

【0064】

40

具体的には、10% ウシ胎児血清を補充した MEM 培地において培養した H e L a 細胞を 3×10^5 細胞 / 穴で 6 穴培養プレートに接種した。翌日、ワクチニアウイルスシャトルベクター p S P 7 2 - T K (-) - p 7. 5 - L u c、p S P 7 2 - T K (-) - p I 1 L - E 3 L - L u c、および p S P 7 2 - T K (-) - p I 1 L - B 1 9 R - L u c はトランスフェクション溶液で処理し、ワクチニアウイルスを 0.05 MOI で感染させ、4 時間後、培養培地を 5% ウシ胎児血清を補充した MEM 培地に交換し、次いで 48 時間培養した。培養した細胞を培地から除去し、凍結融解を 3 回して粗ウイルスを得て、そしてブランク単離法に 3 回供して純粋な組み換えウイルスのクローンを得た。

【0065】

こうして得られたウイルスは、TCID₅₀ 法を使用して V e r o 細胞におけるポテン

50

シー (p o t e n c y) について測定し、構造を R T - P C R、ゲノム D N A P C R、シーケンシングおよびサザンブロットにより確認し、次いで実験のために使用した。結果として、各プロモーターおよびルシフェラーゼが導入された組み換えワクチニアウイルスである T K (-) - p 7 . 5 - L u c (図 1 0 a)、T K (-) - p I 1 L - E 3 L - L u c (図 1 0 b)、T K (-) - p I 1 L - B 1 9 R - L u c (図 1 0 c) が、最終的に得られた。

【 0 0 6 6 】

3 - 3 : ウイルスポテンシー (p o t e n c y) の測定

感染性ウイルスの濃度は、培養宿主細胞の 5 0 % に感染するウイルスの希釈濃度、すなわち 5 0 % 組織培養感染量 (T C I D 5 0) により示される。ウイルスのポテンシー (p o t e n c y) は T C I D 5 0 法を使用して測定し、組み換えウイルスの特性を解析した。

10

【 0 0 6 7 】

具体的には、V e r o 細胞を 5×10^3 細胞 / 穴で 9 6 穴プレートで培養し、ウイルスは、それぞれ $1 / 10$ 、 $1 / 10^2$ 、 $1 / 10^3$ 、 $1 / 10^4$ 、 $1 / 10^5$ 、 $1 / 10^6$ 、 $1 / 10^7$ 、および $1 / 10^8$ で希釈し、次いで各穴に感染させた。4 日後、C P E (細胞変性効果) が現れた穴の数を数え、力価を算出した。ウイルス力価の結果は表 5 で示される。

【 表 5 】

ウイルス	力価 (T C I D ₅₀ / m l)
T K (-) - p 7 . 5 - L u c	6.9×10^7
T K (-) - p I 1 L - E 3 L - L u c	9.4×10^7
T K (-) - p I 1 L - B 1 9 R - L u c	8.7×10^7

20

【 0 0 6 8 】

表 5 で示されるように、3 種類全ての組み換えウイルスは同様の力価を示し、同様の生産性を有することを示した。

【 0 0 6 9 】

3 - 4 : 組み換えウイルスの構造の解析

ゲノム D N A P C R を行うためにウイルスのゲノム D N A を抽出し、T K 遺伝子の代わりに挿入された導入遺伝子のサイズを P C R により確認した。組み換えは、野生型ウイルス I H D - W との比較により確認した。

30

【 0 0 7 0 】

結果は図 6 に示される。図 6 に示されるように、野生型ウイルスの場合は 9 6 6 b p フラグメントが P C R により増幅され、組み換えウイルスの場合は遺伝子導入により増幅されるフラグメントの長さが 3 . 1 - 3 . 2 K b に増加し、D N A 構造に異常はないことを示したことを確認した。

【 0 0 7 1 】

H e L a 細胞を 3×10^5 細胞 / 穴で 6 穴培養皿で培養し、ウイルス R N A の R T - P C R を行い、上記の力価測定に供した組み換えウイルスを 0 . 0 5 M O I 処理後に 4 8 時間培養した。そして、細胞をトリゾール処理により溶解し、R N A を抽出し、c D N A をインビトロで合成した。導入遺伝子の構造は、鋳型として D N A を使用して P C R により解析し、組み換えを確認した。図 7 は、外来遺伝子が導入されていない野生型ウイルスとは異なり、ルシフェラーゼおよび E G F P の m R N A が、3 種類全ての組み換えウイルスにおいてよく発現していることを示す。

40

【 0 0 7 2 】

サザンブロットを行うために、H e L a 細胞を 2×10^6 細胞 / 穴で 7 5 T 培養皿で培養し、上記の力価測定に供した組み換えウイルスは、0 . 0 5 M O I 処理後 7 2 時間培養した。細胞培養培地を除去した後、細胞を凍結融解を 3 回してウイルスを得た。ウイルス

50

のゲノムDNAを、抽出し、HindIII制限酵素で切断し、かつバンドを0.8%アガロースから分離し、ナイロンメンブレンにトランスファーし、120℃で固定化し、DIG-ラベル化プローブとハイブリダイズさせた。洗浄およびブロッキング工程後に最終基質と接触させた後、選択的DNAバンドを同定した。サザンプロット解析の結果は、図8で示される。

【0073】

図8で示されるように、野生型ウイルスの場合、プローブは5005bpのDNAフラグメントに結合したが、組み換えウイルスの場合、プローブは遺伝子導入により1337bpに減少したDNAフラグメントに結合した。従って、導入遺伝子が導入された部位のDNA構造に異常はないことがわかった。プローブが結合する部位は青色の矢印で示される。

10

【0074】

実施例4：組み換えウイルスによるタンパク質発現レベルの評価

実施例3-2で構築された組み換えワクチニアウイルスTK(-)-p7.5-Luc、TK(-)-pI1L-E3L-Luc、TK(-)-pI1L-B19R-Lucをヒト子宮頸がん細胞系列HeLaまたはヒト結腸がん細胞系列SW620に感染させ、それぞれのプロモーターにより調節されるルシフェラーゼの発現レベルを解析した。

【0075】

具体的に、10%ウシ胎児血清を補充したMEM培地において培養したHeLa細胞またはSW620細胞は、 2×10^5 細胞/穴で12穴培養プレートに接種した。翌日、それらは1MOIでそれぞれの組み換えウイルス(野生型WT、p7.5、I1L-E3L、およびI1L-B19R)に感染させた。6時間後、細胞を取り囲む培養培地を除去し、細胞溶解溶液を加えた。細胞溶解物の一部をルシフェラーゼ測定のための96穴培養プレートに移し、ルシフェラーゼ酵素の基質であるルシフェリンで処理した。ルシフェラーゼ測定器を使用して、基質分解により生成された光の量を測定し、結果は図9で示される。図9は、ヒト子宮頸がん細胞系列HeLaまたはヒト結腸がん細胞系列SW620が組み換えワクチニアウイルスTK(-)-p7.5-Luc、TK(-)-pI1L-E3L-Luc、およびTK(-)-pI1L-B19R-Lucに感染した後の、ルシフェラーゼの発現レベルの解析の結果を示す。

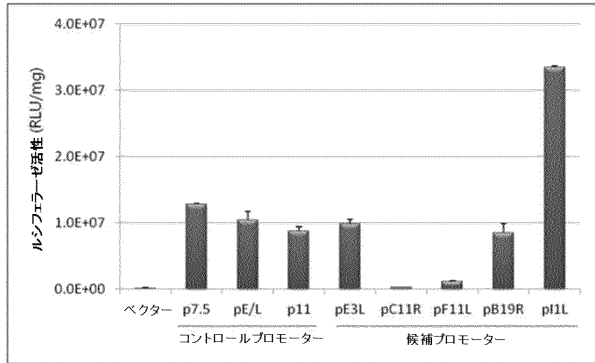
20

【0076】

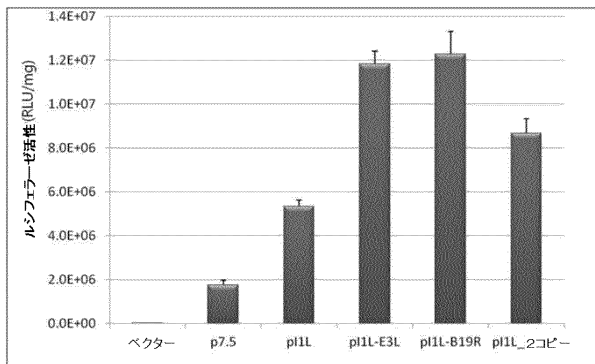
図9で示されるように、HeLaおよびSW620の両方におけるpI1L-B19Rプロモーターを含有する組み換えウイルスによるルシフェラーゼ発現レベルは、p7.5プロモーターを含有するコントロールウイルスのルシフェラーゼ発現レベルより約2倍高い。

30

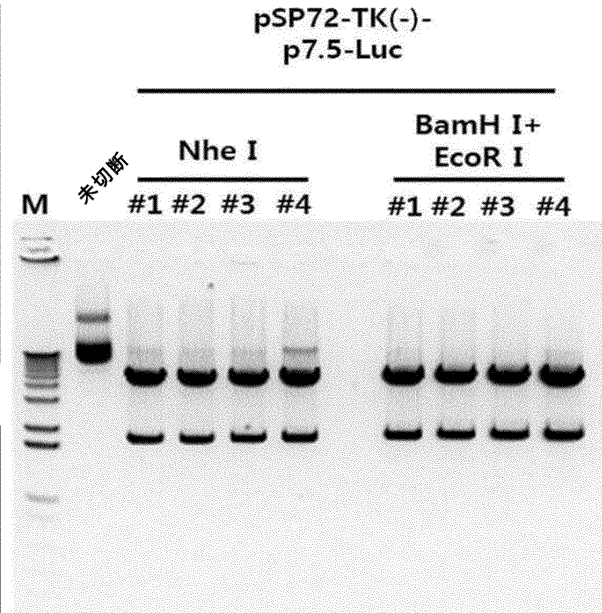
【図 1】



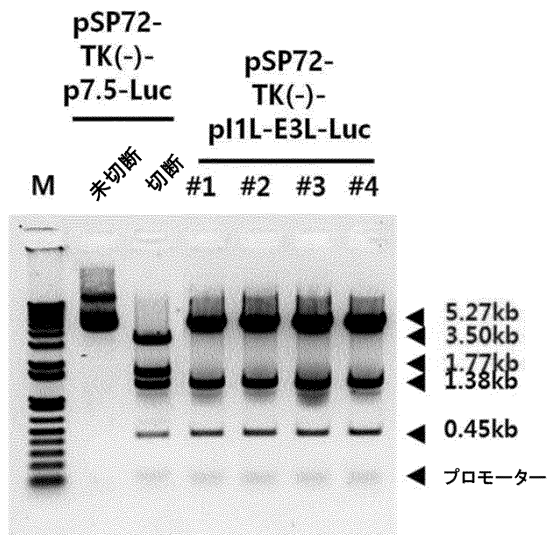
【図 2】



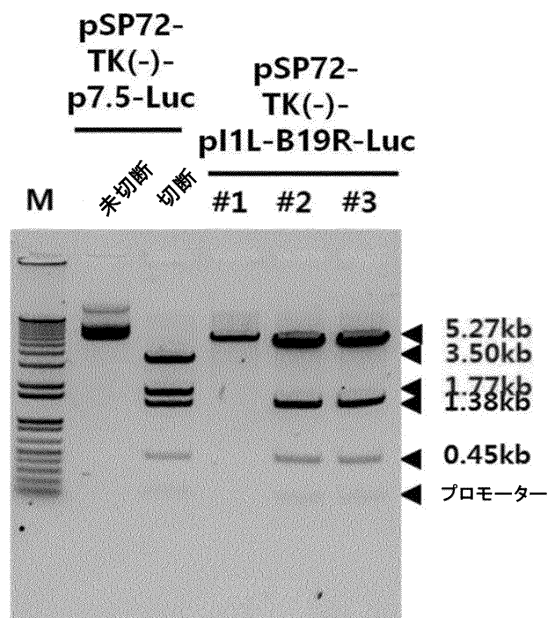
【図 3】



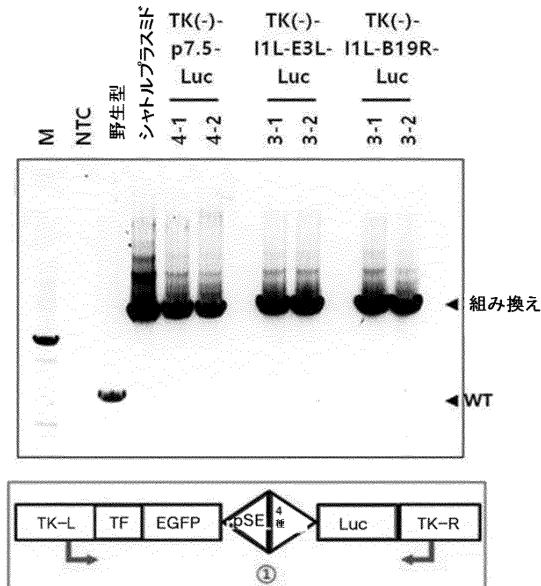
【図 4】



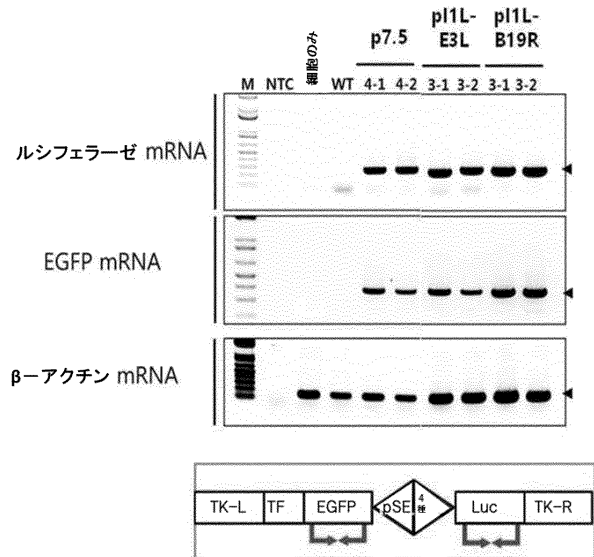
【図 5】



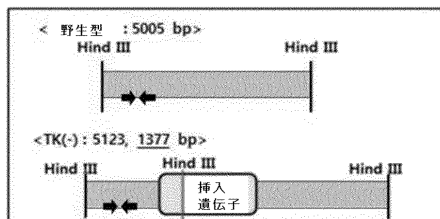
【図 6】



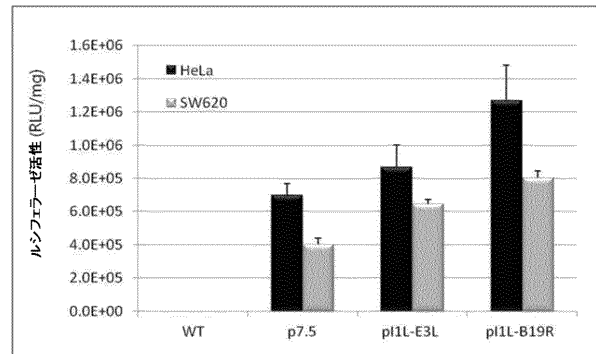
【図 7】



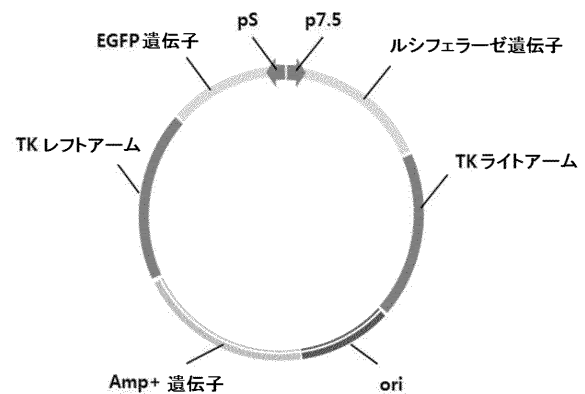
【図 8】



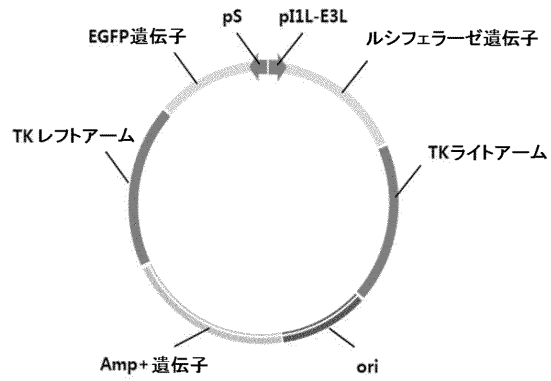
【図 9】



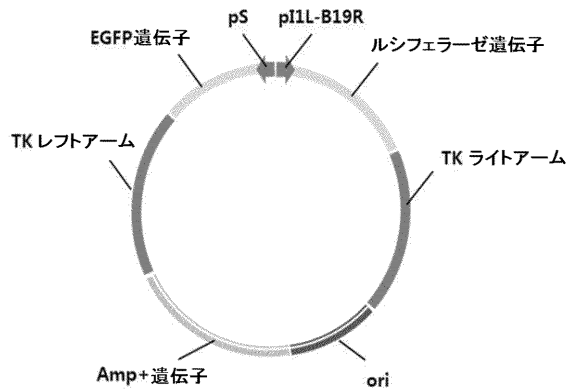
【図 10 a】



【図 10 b】



【図 10 c】



【配列表】

0006736665000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10
 A 0 1 K 67/027 (2006.01) A 0 1 K 67/027

(72)発明者 キム・スジョン
 大韓民国 0 7 0 6 2 ソウル、トンジャクク、ヨウィデパンロ 1 0 ギル 1 0 0 番、ナンバー 1 0 1 - 3 0 6
 (72)発明者 キム・ミンジョン
 大韓民国 0 2 0 3 4 ソウル、チュンナング、スクソンオンジュロ 1 8 - 1 1 番、ナンバー 4 0 2
 (72)発明者 チェ・ファンジュン
 大韓民国 0 6 9 6 4 ソウル、トンジャクク、サンドロ 2 1 8 番、ナンバー 6 0 6

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 0 9 6 7 8 (J P , A)
 特表 2 0 1 2 - 5 2 0 0 6 1 (J P , A)
 特開平 0 2 - 1 8 6 9 9 2 (J P , A)
 特表平 0 9 - 5 0 3 9 0 2 (J P , A)
 特開 2 0 1 1 - 0 4 1 5 7 8 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 2 / 1 2 2 6 4 9 (W O , A 1)
 米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 6 0 6 0 9 (U S , A 1)
 "Vaccinia virus WR, complete genome", AY243312, [online], National Center for Biotechnology Information, 2006年3月14日掲載, 2018年11月16日検索, インターネット, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY243312>
 Liu X. et al., A natural vaccinia virus promoter with exceptional capacity to direct protein synthesis., Journal of Virological Methods, 2 0 0 4 年 1 2 月, 122, 2, 141-145
 Schmitt JFC. et al., Journal of Virology, 1 9 8 8 年 6 月, 62, 6, 1889-1897
 Zhu M. et al., A cellular protein binds vaccinia virus late promoters and activates transcription in vitro., Journal of Virology, 1 9 9 8 年 5 月, 72, 5, 3893-3899
 Alcamí A. et al., The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN., Journal of Virology, 2 0 0 0 年 1 2 月, 74, 23, 11230-11239
 Smith GL. et al., Two vaccinia virus proteins structurally related to the interleukin-1 receptor and the immunoglobulin superfamily., Journal of General Virology, 1 9 9 1 年, 72, 511-518

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 PubMed
 GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
 JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)