

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-254695

(P2004-254695A)

(43) 公開日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 29/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 37/02	4 B O 6 5
A 6 1 P 37/02	C O 7 K 1/22	4 C O 8 4
C O 7 K 1/22	C O 7 K 14/47	4 H O 4 5
	審査請求 有 請求項の数 14 O L (全 27 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2004-90279 (P2004-90279)	(71) 出願人	591091353
(22) 出願日	平成16年3月25日 (2004.3.25)		イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド
(62) 分割の表示	特願平5-243987の分割		YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY LIMITED
原出願日	平成5年9月2日 (1993.9.2)		イスラエル国、レホボト、ピーオー ボックス 95 (番地なし)
(31) 優先権主張番号	103052	(74) 代理人	100065226
(32) 優先日	平成4年9月3日 (1992.9.3)		弁理士 朝日奈 宗太
(33) 優先権主張国	イスラエル (IL)	(74) 代理人	100117112
(31) 優先権主張番号	106591		弁理士 秋山 文男
(32) 優先日	平成5年8月4日 (1993.8.4)	(74) 代理人	100129551
(33) 優先権主張国	イスラエル (IL)		弁理士 田村 良介
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターフェロン- α / β 結合タンパク質、その製造法およびそれを含有する医薬組成物

(57) 【要約】

【課題】 インターフェロン- α / β 結合タンパク質、そのムテイン体および融合タンパク質、それらの塩ならびに機能を有する誘導体および活性画分、該タンパク質の製造法、該タンパク質をコードするDNA分子、該DNA分子を含む発現媒体、該媒体で形質転換された宿主細胞、前記タンパク質の組換え体および前記タンパク質を含有する医薬組成物。

【解決手段】 本発明によれば、新規の可溶性IFN- α / β 結合タンパク質、その製造法およびそれを含有する医薬組成物が提供され、過剰量のIFN- α またはIFN- β が存在する状態をともなう疾患などの予防、治療、診断などに有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I F N - α / β 結合タンパク質であって、ヒト血清から得ることができ、ヒト血清から得た場合、分子量が約 50 k D である I F N - α / β 結合タンパク質またはその融合タンパク質もしくは塩。

【請求項 2】

ヒト血清をクロマトグラフィーのカラムに通し、引き続き精製を行なうことによりヒト血清から I F N - α / β 結合タンパク質を単離することを含んでなる I F N - α / β 結合タンパク質の製造法。

【請求項 3】

I F N - α 2 が結合したクロマトグラフィーのカラムを用いる請求項 2 記載の製造法。

【請求項 4】

I F N - β が結合したクロマトグラフィーのカラムを用いる請求項 2 記載の製造法。

【請求項 5】

抗 - I F N - α / β 結合タンパク質抗体が結合したクロマトグラフィーのカラムを用いる請求項 2 記載の製造法。

【請求項 6】

請求項 1 記載の I F N - α / β 結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む D N A 分子。

【請求項 7】

請求項 6 記載の D N A 分子を含んでなり、形質転換宿主細胞内で I F N - α / β 結合タンパク質または同じ生物学的活性を有するタンパク質を発現することのできる複製可能な発現媒体。

【請求項 8】

請求項 7 記載の発現媒体で形質転換された宿主細胞。

【請求項 9】

原核細胞である請求項 8 記載の形質転換宿主細胞。

【請求項 10】

真核細胞である請求項 8 記載の形質転換宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 8 記載の形質転換宿主細胞を培養し、I F N - α / β 結合タンパク質を回収することを含んでなる組換え可溶性 I F N - α / β レセプタータンパク質の製造法。

【請求項 12】

請求項 1 記載の組換え I F N - α / β 結合タンパク質。

【請求項 13】

請求項 1 または 12 記載の I F N - α / β 結合タンパク質を含有する医薬組成物であって、糖尿病、自己免疫疾患、移植拒絶およびエイズからなる群より選択される過剰量の I F N - α または I F N - β が内在的に合成されたり、外から投与されたような状態を治療するための医薬組成物。

【請求項 14】

状態が自己免疫疾患または炎症である請求項 13 記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インターフェロン - α / β 結合タンパク質 (I F N - α / β 結合タンパク質)、そのムテイン体および融合タンパク質およびその塩、ならびにそれらの機能を有する誘導体および活性画分、のみならずその製造法およびそれを含有する医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

I 型インターフェロン（インターフェロン- α およびインターフェロン- β 、（I F N- α および I F N- β ））は、ウイルス感染に対する耐性を付与する能力により規定される、構造的に関連したサイトカインのファミリーの構成要素である。I 型 I F N の他の多くの生物学的活性が報告されており、そのなかには細胞増殖の阻害やクラス I M H C 抗原の誘導およびその他のいくつかの免疫調節活性⁽¹⁾が含まれる。I F N- α および I F N- β は、C 型肝炎^(2、3) およびウイルス性疣贅^(4、5) などの種々のウイルス性疾患のみならず毛様細胞性白血病⁽⁶⁾、慢性骨髄性白血病⁽⁷⁾ およびカポジ肉腫⁽⁸⁾ などのある種の悪性疾患の治療に有用である。

【0003】

他のサイトカインのばあいと同様に、I F N- α はあらゆる I F N- α のサブタイプのみならず I F N- β にも特異性を示す細胞表面レセプターと結合することにより、その生物学的活性を発揮する⁽⁹⁾。ヒト I F N- α のレセプターは同定され、ダウディ（Daudi）細胞よりクローン化された⁽¹⁰⁾。クローン化されたレセプターは1つの膜貫通ドメイン、1つの細胞外ドメインおよび1つの細胞内ドメインをもっていた。マウス細胞中で発現すると、このレセプターによりマウス細胞にヒト I F N- α B への応答性が付与されたが、他の I F N- α および I F N- β 種には有意に応答せず、I F N- β および種々の I F N- α のサブタイプへの応答にはさらなる成分が関与しているかもしれないことが示唆された。

【0004】

いくつかの他の研究により、I F N- α および I F N- β の結合に関係するさらなる成分またはレセプターサブユニットの存在が示された^(11~13)。さらに前記のレセプター⁽¹⁰⁾が、すべての I F N- α および I F N- β 種の結合に関与していることが主張された⁽¹⁴⁾。

【0005】

個々の細胞に結合しているレセプターの細胞外リガンド結合ドメインに対応する可溶性サイトカインレセプターが過去に同定されている。これらの中にはとくに I L-6、I F N- γ ^(15、16、17)、T N F⁽¹⁸⁾、I L-1^(19、20)、I L-4⁽¹⁹⁾ および I L-2⁽²¹⁾ の可溶性のレセプターが含まれる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

免疫疾患の予防、治療、診断などのために有用な、新規なタンパク質が望まれていた。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、I F N- α / β 結合タンパク質、そのムテイン体および融合タンパク質およびその塩、その機能を有する誘導体ならびに活性画分を提供する。

【0008】

本明細書中では前記したレセプター⁽¹⁰⁾は「I F N- α R A」とよび、その可溶性類縁体は「s I F N- α R A」とよぶ。

【0009】

I F N- α / β 結合タンパク質は、天然のソースから作られてよい。すなわち、健常人もしくは患者からえられた血清または尿のようなヒトの体液由来であってよい。

【0010】

I F N- α / β 結合タンパク質は、組換え D N A 法により作られてもよい。

【0011】

このように本発明はまた I F N- α / β 結合タンパク質の製造法をも提供する。

【0012】

前記製造法の1つは、I F N- α または I F N- β が結合したカラムに体液を通すことによりヒト体液から結合タンパク質を単離し、結合した I F N- α / β 結合タンパク質を溶出することを含んでなる。結合タンパク質はそののち、サイズ排除クロマトグラフィー

10

20

30

40

50

の工程により均一にまで精製される。

【0013】

他の方法は、抗IFN- α / β レセプター抗体が結合したカラムに体液を通すことによりヒト体液より結合タンパク質を単離し、カラムについた結合タンパク質を溶出することを含んでなる。

【0014】

好ましくはヒト体液は尿またはヒト血清である。

【0015】

既知のIFN- α RAの可溶性型とは対照的に、IFN- α / β 結合タンパク質はヒトIFN- α 2、IFN- α B、IFN- α CおよびIFN- β の生物学的活性を阻害する。IFN- α / β 結合タンパク質のアミノ酸配列分析により、その配列はIFN- α RAを含む他の既知のタンパク質のいずれとも異なることが明らかになっている。 10

【0016】

これらの発見のゆえに本発明のIFN- α / β 結合タンパク質がIFN- α / β レセプターの成分であるかまたは新規IFN- α / β レセプターの可溶性型であるということが可能である。

【0017】

さらに本発明は、IFN- α / β 結合タンパク質、融合タンパク質、ムテイン体またはそれらの活性画分をコードするヌクレオチド配列を含むDNA分子、該DNA分子を含む複製可能な発現媒体、それらで形質転換された宿主および該形質転換宿主の発現によって作られたタンパク質に関する。「DNA分子」という語は、ゲノムDNA、cDNA、合成DNAおよびそれらの組合せを含む。 20

【0018】

また本発明は、前記DNA分子とハイブリダイズし、IFN- α / β 結合タンパク質と同じ生物学的活性を有するタンパク質をコードするDNA分子に関する。

【0019】

また本発明は、IFN- α / β 結合タンパク質を含んでなる、過剰量のIFN- α またはIFN- β が内在的に合成されたり、外から投与されたような状態を治療するための医薬組成物に関する。

【発明の効果】

30

【0020】

本発明によれば、新規の可溶性IFN- α / β 結合タンパク質、その製造法およびそれを含む医薬組成物が提供される。該タンパク質は、過剰量のIFN- α またはIFN- β が存在するような状態をとまなう疾患などの予防、治療、診断などに有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

抗IFN- α RAモノクローナル抗体を用いて、ヒト血清および尿中の既知の⁽¹⁰⁾IFN- α レセプターの可溶性型を同定した。IFN- α 治療中の毛様細胞性白血病患者の血清中には検出可能なレベルのsIFN- α RAが見出されたが、一方健常人血清中のsIFN- α RAのレベルは検出限界を下回っていた。このことは、IFN治療がsIFN-RAの流出または遊離を増大させるかもしれないということを示唆する。健常人コントロールの血清と比較してIFN- α の治療を受けている患者の血清中には50KのIFN- α 結合タンパク質が同様に増大することが観察された。 40

【0022】

血清中に見出される可溶性IFN- α RAは、組換えIFN- α RAに対して作ったモノクローナル抗体21.4を用いて行なったウェスタンブロッティングによって決定したところ分子量55Kのタンパク質であった。同じ手法を用いることにより、類似のサイズの可溶性IFN- α RAがヒトダウディ細胞の培養培地中にも存在することが示唆された。正常尿を用いてえられた結果からは、尿には血清および細胞培養培地中からの可溶性レセプターの分子量よりも約10K低い分子量を有するsIFN- α RAが含まれることが示された 50

。

【0023】

平行した1組の実験で、血清(図1c)および尿(図2b)を¹²⁵I-I FN-αB(分子量25K)とクロスリンクさせ、抗-I FN-α MA b No.74-3を用いて免疫沈降を行なった。分子量が約75K(血清)および約65K(尿)のI FN-α結合タンパク質のクロスリンクした産物を認めた。最初はこれらのバンドがすでに既知であるI FN-αRA⁽¹⁰⁾の可溶性の産物であると想定されたが、単離、分析の結果(下記のとおり)別のタンパク質、I FN-α/β結合タンパク質が血清および尿中に存在することが見出された。

【0024】

2つのクロマトグラフィーの工程を含む手順によって正常尿からI FN-α/β結合タンパク質を単離した。粗尿タンパク質を、アガロースにI FN-α2を結合してなるカラムに付した。カラムを洗浄し、結合タンパク質を低pHで溶出した。そののち溶出タンパク質をサイズ排除HPLCによって分離し、種々のタンパク質のピークをえて、26、27、28(図5)の画分に溶出しているそのうちの1つを¹²⁵I-I FN-α2と特異的に反応しうることより同定した。このタンパク質はさらにN-末端ミクロ配列分析により特徴づけを行ない、その結果配列番号1で示される主配列をそのN-末端ドメインに有することがわかった。

【0025】

加えて、主配列のN-末端で3つの付加的アミノ酸残基(I l e-X X X-T y r)を有するポリペプチドを少量成分として検出した(X X Xは、未同定のアミノ酸を示すが、このアミノ酸は、用いた方法によると検出不能なC y sであると考えられる。このアミノ酸がS e rであることもありうるが可能性はより低い)。前記の結果えられた配列は、既知のI FN-αRA⁽¹⁰⁾のものと完全に異なっていた。またそれは他の既知タンパク質のいずれの配列とも異なっており、ファストA(F a s t A)およびTファストA(T F a s t A)プログラム⁽²⁴⁾の両方を用いてスイスプロット(Swissprot)およびジーンバンク(Genebank)データライブラリーと比較することにより決定したところ、既知のDNA配列のいずれによってもコードされていない。よって、これは新規のタンパク質であり、I FN-α/β結合タンパク質とよぶ。この精製I FN-α/β結合タンパク質は、ウェスタンブロッティングおよび免疫沈降により決定したところMA b 21.4と反応しなかったもので、さらにそれが既知のI FN-αRAと相異なることが示された。

【0026】

I FN-α/β結合タンパク質のサンプルをブロムシアンで消化し、SDS-PAGE上に分離し、これでえられた10Kよりも小さなペプチドである消化断片の1つより配列番号2で示される内部配列がえられた(M e tが実際の配列の先頭である)。

【0027】

また結合タンパク質は、I FN-βがアガロースに結合されてなるカラムでのクロマトグラフィーと、それに続くサイズ排除クロマトグラフィーによっても、正常尿から単離された。I FN-αアガロース/スペロース12(superose 12)法からの画分26~29およびI FN-βアガロース/スペロース12法からの画分26~28をSDS-PAGEと銀染色により分析すると、分子量40,000の同一の単一バンドがえられた(図6、それぞれレーン26~29と26'~28')。このように、I FN-αまたはI FN-βアガロースのいずれかのリガンドアフィニティークロマトグラフィーとそれに続くサイズ排除クロマトグラフィーの組合せで、いずれのばあいでも均一なI FN-α/β結合タンパク質がえられた。前記したレセプター⁽¹⁰⁾はI FN-βとはあまり反応しないので、新規に単離したI FN-α/β結合タンパク質がその結合特性において既知のレセプターと異なっていることが明白である。

【0028】

I FN-α2アガロースまたはI FN-βアガロースカラムのいずれかで単離されたI FN-α/β結合タンパク質の¹²⁵I-I FN-α2への結合は、I FN-α2、I FN-αB、I FN-αCおよびI FN-βを含む種々のI型I FNによって阻害されたが、

(II型) I F N - γ によっては阻害されなかった。

【0029】

均一な尿の I F N - α / β 結合タンパク質は、その標識リガンド (¹²⁵I - I F N - α 2) への結合能を保持しており、共有クロスリンクングによって分子量60Kの複合体を形成した。その分子量は I F N - α / β 結合タンパク質と20Kの I F N - α 2との1:1複合体に相当する。クロスリンクングの反応に、非標識 I F N - α 2を過剰に添加するとシグナルが消失し、それによって本タンパク質と I F N - α との相互作用の特異性が立証された(図7)。

【0030】

さらに、精製 I F N - α / β 結合タンパク質は I F N - α 2、I F N - α B、I F N - α Cおよび I F N - β の抗ウイルス活性を阻害したが、I F N - γ の該活性は阻害せず、このタンパク質が普遍的な I 型 I F N 結合タンパク質であることが示唆された。かくのごとく、該タンパク質は I F N - α および I F N - β の生物学的活性を妨げるか変化させることのできる有用な薬剤である。均一な I F N - α / β 結合タンパク質が I 型 I F N (I F N - α および I F N - β) に結合するので、我々はこの相互作用に他のポリペプチドは何ら必要でないと結論している。このように I F N - α / β 結合タンパク質は自律性 I F N - α / β 結合タンパク質として機能しているように思われ、必ずしも、たとえば I F N - α R A および I F N - α / β レセプターの両方を含んでなるような、もっと複雑なレセプターのサブユニットではない。

【0031】

これまでに可溶性サイトカインレセプターの生理学的な役割は確証されていない。これらレセプターの2つの生成機作が提案されている：膜結合レセプターのタンパク分解性切断、たとえば可溶性 I L - 2 R (²⁵) ならびに I L - 4 (²⁶) および I L - 7 (²⁷) のばあいのような m R N A の代替スプライシングである。可溶性レセプターは、その特異的リガンドに結合し、T N F 系 (²⁸、²⁹) において見られるように生物学的活性を阻害することによるかまたは I L - 6 系 (³⁰) で立証されるようにそれらの活性を増強することによりそれらの活性を変化させる。組換え可溶性 T N F レセプター (T B P - T N F 結合タンパク質としても知られている) は、動物モデルにおいて敗血のショックを防ぐことが見出され (³¹)、また I L - 1 レセプターの可溶型はマウスの同種 (異系) 移植レシピエントにおける生体内同種 (異系) 反応性の発生に対する顕著な阻害効果を有することが見出された (³²)。

【0032】

同じように本発明の I F N - α / β 結合タンパク質は、I F N - α (³⁴) または I F N - β が異常に発現しているたとえば I 型糖尿病 (³³) および自己免疫疾患、移植拒絶、エイズならびに類似の疾患のようなばあいに I F N - α および I F N - β 活性の調節剤としての使用が見出されうる。このように本タンパク質は過剰の I F N - α または I F N - β が内在的に合成されたり外から投与されたりしているようないかなる条件下でも使用されてよい。

【0033】

I F N - α / β 結合タンパク質およびそのムテイン体、融合タンパク質、それらの塩、その機能を有する誘導体ならびにその活性画分が、哺乳動物における自己免疫疾患および他の炎症を治療することが示される。

【0034】

さらに本発明は、製薬上許容しうる担体ならびに本発明の I F N - α / β 結合タンパク質またはその活性ムテイン体、融合タンパク質、それらの塩ならびに機能を有するそれらの誘導体または活性画分を含んでなる医薬組成物に関する。

【0035】

投与法は類似製剤の投与について認められるいずれの方法によることも可能であり、治療の条件に依存する。たとえば静脈内、筋肉、皮下などの局所注射または局所投与、もしくはは注入による継続的な投与などが可能である。

【0036】

本発明の医薬組成物は、 $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 結合タンパク質またはその誘導体を製薬上許容しうる担体、安定化剤および賦形剤とともに混合して投与用に調製し、たとえば投薬バイアル内に凍結乾燥品とするなどして投薬形態に調製される。投与すべき活性成分の量は投与経路、治療されるべき疾患および患者の状態に依存するが、1回につき0.1~1 mgである。たとえば局所注射では、静脈内注入よりも体重を基礎としたタンパク量は低値しか必要としないであろう。

【0037】

ここで用いられる「ムテイン体」という語は、天然の $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 結合タンパク質の1つまたはそれ以上のアミノ酸残基が異なるアミノ酸残基に置換されたかまたは削除された、もしくは $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 結合タンパク質の天然の配列に1つまたはそれ以上のアミノ酸残基が付加された $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 結合タンパク質の類縁体であってその結果えられる産物の活性があまり変化していないものをいう。これらムテイン体は、既知の合成および/または部位特異的突然変異誘発技術もしくは他の好適な技術により調製される。

10

【0038】

「融合タンパク質」という語は、体液中での残存時間の長い別のタンパク質と融合した $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 結合タンパク質またはそのムテイン体を含むポリペプチドをいう。 $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 結合タンパク質はこのように別のタンパク質、ポリペプチドなど、たとえばイムノグロブリンまたはその断片と融合されてもよい。

【0039】

ここで用いられる「塩」という語は、 $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 結合タンパク質、ムテイン体および融合タンパク質のカルボキシル基の塩およびアミノ基の酸付加塩の両方をいう。カルボキシル基の塩は当該技術分野の既知の方法によって作られ、たとえばナトリウム、カルシウム、アンモニウム、鉄または亜鉛塩などの無機塩およびたとえばトリエタノールアミンのようなアミン類、アルギニンまたはリジン、ピペリジン、プロカインなどと形成される有機塩基との塩が含まれる。酸付加塩は、たとえば塩酸または硫酸のような無機酸との塩およびたとえば酢酸またはシュウ酸のような有機酸との塩を含む。

20

【0040】

ここで用いられる「機能を有する誘導体」は、 $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 結合タンパク質ならびにその融合タンパク質およびムテイン体の誘導体であって、当該技術分野で既知の方法で残基上の側鎖またはN-もしくはC-末端基として生じる官能基から調製されてもよく、それらが製薬上許容しうるままである、すなわちタンパク質の活性を破壊せず、それを含む成分が毒性を付与しないような限りにおいて本発明中に含まれる。これらの誘導体としては、たとえば抗原性の部位をマスクしさらに体液中での $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 結合タンパク質の残存を延長しうるポリエチレングリコール側鎖を含んでよい。他の誘導体としては、カルボキシル基の脂肪酸エステル、アンモニアまたは第1級もしくは第2級アミンとの反応によるカルボキシル基のアミド、アシル部分(moiety) (たとえばアルカノイルまたは炭素環アロイル基)とで形成されるアミノ酸残基の遊離アミノ基のN-アシル誘導体またはアシル部分とで形成される遊離水酸基(たとえばセリンまたはスレオニン残基の水酸基)のO-アシル誘導体を含む。

30

【0041】

$\text{IFN-}\alpha/\beta$ 結合タンパク質、その融合タンパク質およびそのムテイン体の「活性画分」は、本発明では該タンパク質分子自体またはそれに分子もしくは残基、たとえば糖もしくはリン酸残基が結合したもののポリペプチド鎖のすべての断片または前駆体、あるいはタンパク分子または糖残基自身の凝集物であって該画分が同一の生物学的小および/または薬物的活性を有するものをいう。

40

【0042】

下記の実施例によって本発明を示すが、もとより本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0043】

50

材料

患者血清はダン アデルカ (Dan Aderka) 博士 (イチロフ ホスピタル (Ichilov Hospital)、テル アビブ、イスラエル) より入手した。正常個体の1000-倍濃縮⁽¹⁵⁾粗尿タンパク質は、セロノ ラボラトリーズ (Serono Laboratories) (ローマ、イタリア) より入手し、アガロース ヒドラジド (シグマ社製) に固定した抗-I F N- α M A b N o.74.3は、前に述べられた⁽²²⁾ように調製しジ- N-ヒドロキシーサクシンイミジル スベレート (DSS) はピアス社より入手した。

【0044】

インターフェロン

組換え I F N- α 2 (2×10^8 ユニット/mg) はチューリッヒ大学のシー ワイズマン (C.Weismann) 博士により提供された。I F N- α 2 はクロラミン T 法⁽³⁵⁾の変法により標識した。手短に述べると、7 μ g の I F N- α 2 を 1 mg/ml のクロラミン T 存在下で 1 mCi の N a ¹²⁵ I を用いて標識し (氷上、20秒間) 4×10^7 cpm/ μ g の比活性とした。I F N- α B はチバーガイギー社より入手し、I F N- α C および I F N- β はインターラボ (Inter-Lab) 社、(ネス-ジオナ (Ness-Ziona)、イスラエル) より入手した。

【0045】

実施例 1

M A b 21.4を用いたヒト血清および尿のウェスタンブロッティング

正常ヒト血清 (N H S)、毛様細胞性白血病 (H C L) 血清および粗尿タンパク質のサンプルを、非還元条件下で⁽³⁶⁾S D S-P A G Eに付し、ニトロセルロース膜 (シュライヒャー アンド シュエル (Schleicher and Schuell) 社製、 0.45μ m) に25mM トリス、1.92mM グリシン、20% メタノール中、電氣的に転写した。転写につづいて膜をブロッキング緩衝液 (0.05% ツイーン-20および0.02% アジ化ナトリウムを含むP B S中、10% 脱脂ミルク) とインキュベートし、組換え I F N- α R A に対して調製した抗-I F N- α R A 抗体21.4と室温にて2時間インキュベートした。ニトロセルロース膜を0.05% ツイーン-20含有P B Sで洗浄し、¹²⁵I-ヤギ 抗-マウス抗体 (ブロッキング緩衝液中 0.7×10^6 cpm/ml) と4℃にて一晚インキュベートした。膜を洗浄後、乾燥してオートラジオグラフィーを行なった。

【0046】

H C L 血清は、分子量55Kの弱いバンドを示し (図1、レーンCおよびD)、一方N H S中にはこのようなバンドは認められなかった (図1、レーンB)。レーンB~Dに見られる高分子量タンパク質 (約150K) はおそらくはイムノグロブリンであろう。

【0047】

粗尿タンパク質 (1 μ l、1000-倍濃縮) の試料をS D S-P A G Eに付し、次に抗-I F N- α R A M A b 21.4を用いてウェスタンブロッティングを行なった。分子量45Kのタンパク質のバンドを検出した (図2a)。同じレーン中に見られる高分子量タンパク質 (150K) は、タンパク質配列分析によってヒトイムノグロブリンであると同定された。これは、1000-倍濃縮尿中、ヒトイムノグロブリンと2次抗体 (¹²⁵I-ヤギ 抗-マウス抗体) との交叉反応のために検出されうるものである。

【0048】

実施例 2

未処理血清および尿のクロスリンキングおよび免疫沈降

血清または尿のサンプルを、100倍過剰量の非標識 I F N- α 2 の非存在下または存在下で¹²⁵I-I F N- α B (300,000cpm) と4℃にて1時間インキュベートした。そのうちジメチルスルフォキシド (M e₂ S O) 中に溶解したD S Sを最終濃度が1mMとなるように添加し、混液を4℃にて20分間放置した。1M トリス塩酸pH7.5および1M塩化ナトリウムを最終濃度が100mMとなるように添加して反応を停止した。アガロースヒドラジドに固定した抗-I F N- α M A b 74-3⁽²²⁾ (25 μ l、7mg/ml) を添加して試料を免疫沈降させた。4℃にて一晚インキュベートしたのち、ビーズをP B Sで3回洗浄し、2%メルカプトエタノールを含むサンプル用緩衝液中に懸濁して、その上清をS D S

10

20

30

40

50

— P A G E、続いてオートラジオグラフィーにて分析した。

【0049】

免疫沈降をしなくてもH C L血清中には分子量75Kの特異的であるが弱いバンドが認められた(図1、レーンF)。クロスリンクした産物を固定化抗-I F N- α M A b 74-3を用いた免疫沈降により濃縮した。実際、おそらく25Kの¹²⁵I-I F N- α Bにクロスリンクした50Kのタンパク質からなる、中央が75K近辺の幅広いバンドが、H C L血清中に明瞭に認められた(図1、レーンHおよびJ)が、N H S中には認められなかった(図1、レーンL)。過剰の非標識I F N- α BおよびI F N- α 2の両者の存在下のばあいを除き、クロスリンク実験をくり返してこの結合の特異性を立証した。事実、75Kのバンドは有意に減少した(図1、レーンIおよびK)。特異的な(置換可能な)75Kのバンドに加えて、いくつかの置換可能でないバンド(50K、80K、97Kおよび100より大
K)が認められた。80Kのバンド(図1、レーンH~Mに明瞭に見られる)は75Kのバンドと完全には分離されえなかった。

10

【0050】

尿の40Kのタンパク質のリガンド結合能は、過剰量の非標識I F N- α Bの存在下または非存在下にて¹²⁵I-I F N- α Bと未処理尿のサンプルとをインキュベートし、そののちD S Sを用いてクロスリンクすることにより確認した。続いて抗-I F N- α M A b 74-3を用いて免疫沈降して、S D S-P A G Eを行ない、分子量65Kの特異的なクロスリンクの産物を検出した(図2b)。この複合体は、血清からえられたものより10Kだけ小さかった。

20

【0051】

実施例3

I F N- α / β 結合タンパク質の単離

製造業者の指示に従って、アフィゲル-10(Affigel-10)(1ml、バイオラッド(Bio Rad)社製)にI F N- α 2(5mg)を結合させてカラムにつめた。粗尿タンパク質(100倍濃縮、10g、250ml)を流速0.25ml/minでカラムに付した。カラムは0.5M塩化ナトリウム含有リン酸緩衝性生理食塩水(P B S)250ml、つぎにP B S(10ml)を用いて洗浄した。そののち結合したタンパク質(75 μ g)を0.25mMクエン酸p H 2.2で溶出し、直ちに1M炭酸ナトリウムで中和した。1mlずつ画分を集めた。その画分をS D S-P A G Eおよび銀染色によって分析し(図3)、タンパク量をフルオレサミンを用いて測定した
。種々の画分について、実施例2に述べたように¹²⁵I-I F N- α 2とのクロスリンク、免疫沈降、S D S-P A G Eおよびオートラジオグラフィーを行なって分析した。未処理尿中ならびにI F N- α 2-アガロースおよびI F N- β -アガロースカラムの両方から溶出した画分中にI F N- α / β 結合タンパク質が見出された(図4)。

30

【0052】

溶出画分をスペロース12カラム(1 $\times$ 30cm、ファルマシア社、スウェーデン)に一部(0.3ml、11 μ g)付した。カラムはリン酸緩衝性生理食塩水および0.02%アジ化ナトリウムで前もって平衡化しておき、流速0.5ml/minにて溶出し、1分ごとの画分を集めた(図5)。S D S-P A G Eおよび銀染色により測定すると40Kの均一なタンパク質として画分26~28(7 μ g)にI F N- α / β 結合タンパク質が溶出した(図6)。250リットルの尿から約25 μ gの純粋なタンパク質を回収した。I F N- β アガロースカラムに続いてスペロース12カラムを行なって粗尿タンパク質を精製したばあいにも、同様の結果がえられた。

40

【0053】

実施例4

タンパク質配列分析

実施例3のスペロース12カラムの画分27(4 μ gタンパク質)をP V D F膜(プロースピン(Pro-Spin)、アプライド バイオシステムズ(Applied Biosystems)社、米国)に吸着させ、その膜をモデル475 マイクロシーケンサー(アプライド バイオシステムズ社製)で、タンパク質配列分析に付した。

50

【0054】

配列番号1で示される主配列をえた。

【0055】

それに加えて前記主配列のN-末端で3つの付加的なアミノ酸残基 (I l e - X X X - T y r) を有する第2のポリペプチドを検出した (X X Xは、未同定のアミノ酸を示すが、このアミノ酸は用いられた方法によると検出不能なC y sであると考えられる。このアミノ酸がS e rであることもありうるが、可能性はより低い)。

【0056】

えられた配列は、既知のI F N - α レセプターA⁽¹⁰⁾の配列と完全に異なっており、他の既知のタンパク質のいずれとも異なっていた。また、F a s t AおよびT F a s t A^(2 4)のプログラムによってSwissprotおよびGenebankのデータベースを検索して決定したところ、既知のD N A配列によりコードされるいずれのタンパク質とも異なっていた。このように本タンパク質は、新規のタンパク質であった。

【0057】

I F N - α / β 結合タンパク質のサンプルをブロムシアンで消化し、S D S - P A G Eで分離してP V D F膜にプロットした。10Kより小さい、ペプチドの1つは配列番号2で示される内部配列を与えた (M e tが実際の配列の先頭である)。

【0058】

純粋なs I F N - α レセプターはI F N - α R Aに対応する配列を含んでいないので、実施例2に述べた尿の結合タンパク質はs I F N - α R Aではないと考えられた。血清中の主たるs I F N - α レセプターもI F N - α / β 結合タンパク質であり、s I F N - α R Aではないという可能性がある。

【0059】

実施例5

純粋なI F N - α / β 結合タンパク質のクロスリンクおよび免疫沈降

I F N - α 2またはI F N - β カラムで精製した尿のI F N - α / β 結合タンパク質またはさらにスペロース12カラムで精製した尿のI F N - α / β 結合タンパク質のサンプルを、100倍過剰量の非標識I F N - α 2の非存在下または存在下にて¹²⁵I - I F N - α 2 (10⁶cpm) と4℃で1時間インキュベートした。そののちジメチルスルホキシド (M e₂ S O) 中に溶解したD S Sを最終濃度が1mMとなるように添加し、混液を4℃にて20分間放置した。1Mトリス塩酸pH7.5および1M塩化ナトリウムを最終濃度が100mMとなるように添加して反応を停止した。アガロースヒドラジドに固定した抗-I F N - α M A b 74-3⁽²²⁾ (25 μ l、7mg/ml) を添加して試料を免疫沈降させた。4℃にて一晚インキュベートしたのち、ビーズをP B Sで3回洗浄し、2%メルカプトエタノールを含むサンプル用緩衝液中に懸濁して、その上清をS D S - P A G E (7.5%アクリルアミド)、続いてオートラジオグラフィーにて分析した。分子量約60Kの特異的なクロスリンク産物がすべての画分に見られ、過剰の非標識I F N - α 2存在下では完全に消えていた (図7)。

【0060】

実施例6

クロスリンク実験における¹²⁵I - I F N - α 2の各種I型I F Nでの置き換え

均一なI F N - α / β 結合タンパク質 (40ng) を3~670倍過剰量の非標識I F N - α 2、I F N - α B、I F N - α C、I F N - β またはI F N - γ の非存在下または存在下にて¹²⁵I - I F N - α 2 (10⁶cpm) と4℃にて1時間インキュベートした。そののちジメチルスルフォキシド (M e₂ S O) 中に溶解したD S Sを最終濃度が1mMとなるように添加し、混液を4℃にて20分間放置した。1Mトリス塩酸pH7.5および1M塩化ナトリウムを最終濃度が100mMとなるように添加して反応を停止した。アガロースヒドラジドに固定した抗-I F N - α M A b 74-3⁽²²⁾ (25 μ l、7mg/ml) を添加して試料を免疫沈降させた。4℃にて一晚インキュベートしたのち、ビーズをP B Sで3回洗浄し、2%メルカプトエタノールを含むサンプル用緩衝液中に懸濁して、その上清をS D S - P A

GE (7.5% アクリルアミド)、続いてオートラジオグラフィーにて分析した (図6)。¹
²⁵I-I FN- α 2 の I FN- α / β 結合タンパク質との結合の阻止において、すべての I 型 I FN が等しく有効であることを見出した。この結果より、I FN- α / β 結合タンパク質が、前記した I FN- α B のみに特異的な I FN- α RA⁽¹⁰⁾とは異なることが示された。

【0061】

実施例7

I FN- α / β 結合タンパク質による I FN- α および I FN- β 活性の阻害

実験は、I FN 活性測定に用いられる細胞変性効果 (CPE) 阻害分析⁽³⁷⁾に基づいて行なった。抗ウイルス活性は、ヒト I FN- α 、I FN- β および I FN- γ の NIH 参照標準に対して検量した。下記の手順を用いた：

96-平底ウェルプレート中、10% FCS 添加 MEM 100 μ l 中に 20,000 細胞/ウェルを播種して WISH 細胞 (ヒト羊膜細胞、ATCC CCL-25) のコンフルエントな細胞単層を調製した (1日目)。プレートを 5% CO₂ 存在下、37°C でインキュベートした。2日目に標準 I FN- β (10 μ l、1000 U/ml) を別のプレート中 (65 μ l) に連続的に2倍希釈した。可溶性 I FN- α / β R (10 μ l、4 μ g/ml、I FN- α カラムならびにスペロース12カラムにて精製) を標準 I FN- β 希釈液中に添加した。1000 U/ml の I FN- α を中和するに足る抗-I FN- α 中和モノクローナル抗体 (25 μ l、No. 9-3⁽²²⁾) を I FN- α 2 アガロースカラムからリークした I FN- α 2 を中和するために各ウェルに加えた。混液を 37°C にて 90 分間放置したのち、WISH 細胞の入ったプレートに移し、直ちに水疱性口内炎ウイルス (VSV、50 μ l、220 PFU/細胞) を用いて攻撃した。プレートを 37°C で一晩インキュベートした。標準 I FN- β に対して検量し、分析を行なった。3日目、ウイルスの攻撃から約 20 時間後に、細胞変性効果を顕微鏡下で評価し、単層をクリスタルバイオレットにて染色した (図9)。

【0062】

I FN- α / β 結合タンパク質は、I FN- β の抗ウイルス活性を完全に阻害することが見出された (図7、E)。阻害の程度に基づいて、最小力価 2.5×10^5 抗-I FN- β ユニット/mg レセプターを計算した。平行した実験で、I FN- β カラムで精製した I FN- α / β 結合タンパク質によって I FN- α 2 を同じように中和した。実験は抗-I FN- β 中和ポリクローナル抗体存在下で行なった (図9、I)。別の実験により I FN- α / β 結合タンパク質は、I FN- β を阻害すると同程度に I FN- α B および I FN- α C の抗ウイルス活性を阻害することが明らかになった (図10)。

【0063】

実施例8

マウスの免疫、細胞融合およびスクリーニング

Balb/c マウスに尿の I FN- α / β 結合タンパク質の均一なサンプル (1 μ g/マウス/インジェクション) を 4 回注射する。転化 sRIA (後述) によって最高の力価を示すマウスを融合用を選択する。脾臓リンパ球を NSO-1 ミエローマ変異 (NSO) 細胞 (シー ミルスタイン (C. Milstein)、MRC、ケンブリッジ、英国により提供) と融合する。転化 sRIA により抗-I FN- α / β R 抗体の存在に関してハイブリドーマの上清を調べる。96-ウェルプレートをアフィニティで精製したヤギ抗-マウス抗体で被覆し、続いてハイブリドーマの上清さらに¹²⁵I-I FN- α / β R を添加する。平行して、I FN- α / β 抗ウイルス活性の中和に関してハイブリドーマを調べる。抗-I FN- α / β R 抗体を分泌していると認められたハイブリドーマを限界希釈法によってクローン化しさらにもう一度クローン化する。

【0064】

実施例9

I FN- α / β 結合タンパク質の組換え生産

組換え I FN- α / β 結合タンパク質を生産するために、ポリペプチドの配列を、配列番号3で示されるペプチド配列 (256 パーミューテーション) および配列番号4で示される

10

20

30

40

50

ペプチド配列（192パーミュテーション）に対応する2つのオリゴヌクレオチド配列に逆翻訳する。

【0065】

プローブを $[^{32}\text{P}]$ で5'-標識し、遺伝子およびIFN- α/β 結合タンパク質のmRNAに対応するcDNAを含む、遺伝子およびcDNAライブラリーをスクリーニングするのに用いる。陽性クローンを単離し、それらの配列を決定し、それらに相補的な配列が含まれていたばあいには、全長のmRNAに対応するcDNAクローンを単離するべく、より特異的なプローブとしてそれらを用いる。

【0066】

単離したcDNAは、至適なオリゴヌクレオチドを用いて部位特異的突然変異誘発に付し、IFN- α/β 結合タンパク質の最後の必須コドンの後ろに終止コドンとポリアデニル化部位を挿入する。そののちこの構築体を当該技術分野においてよく知られている技術⁽³⁸⁾によって適切に構築した発現ベクター内に挿入する。2本鎖のcDNAをホモポリメリックテイリングまたはリストラクションリンキングにより、合成DNAリンカーまたは平滑末端ライゲーション法を用いてプラスミドベクターに連結する。DNA分子を連結するためにDNAリガーゼを用い、望まない連結を防ぐためにアルカリホスファターゼでDNA鎖を処理する。

【0067】

また別の方法としては、配列番号3で示されるペプチドに対応するオリゴヌクレオチドの混合物をオリゴ(dT)またはcDNAライブラリーの構築に用いた入フェージ内にある2つのフランキング配列のうち1つに対応するオリゴマーと混ぜ合わせる。cDNAライブラリー全体からのDNAの鋳型を用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)用のプライマーとして混合物を用いる。実施例4で述べたポリペプチドをコードする領域が存在しているかどうかを確認するために、配列を分析することによって増幅したDNAのバンドの特徴づけを行なう。それから、当該技術分野において知られた方法によって、可溶性IFN- α/β RのmRNAよりなるcDNAを発現ベクターに導入して組換えタンパク質を生産し、精製する。

【0068】

IFN- α/β 結合タンパク質を含んでなる融合タンパク質たとえばIgG₁重鎖の定常部を含むタンパク質の産生は、下記のように行なうことができる：IFN- α/β 結合タンパク質のDNAを至適なオリゴヌクレオチドを用いて部位特異的突然変異誘発に付し、コード配列のすぐ後ろに特徴的な制限酵素切断部位を導入する。IgG₁重鎖の定常部をもつプラスミド、たとえばpRKC04₂Fc₁⁽³⁹⁾を同様の部位特異的突然変異誘発に付して、融合タンパク質の方の翻訳がなされるようにIgG₁重鎖のAsp216の可能な限り近くに同じ特徴的制限酵素切断部位を導入する。前記の特徴的な制限酵素切断部位で消化することにより、5'非翻訳配列とIFN- α/β 結合タンパク質をコードする配列よりなるdsDNA断片を調製する。変異させたpRKC04₂Fc₁も同様に消化して、プラスミドとIgG₁配列を含む大きな断片を作る。そののち2つの断片を連結して、N-端にIFN- α/β 結合タンパク質とIgG₁、重鎖の約227のC末端アミノ酸（ヒンジ領域ならびにCH2およびCH3ドメイン）よりなるポリペプチド前駆体をコードする新規プラスミドを作成する。融合タンパク質をコードするDNAは、適切な制限酵素を用いた消化によってプラスミドより単離し、有効な発現ベクターに挿入することができる。

【0069】

IFN- α/β 結合タンパク質、そのムテイン体または融合タンパク質の発現を可能とするために、発現ベクターはまた、遺伝子発現、およびタンパク質の生産が可能となるように所望のタンパク質をコードするDNAに連結した転写および翻訳を調節する情報を含んだ特異的なヌクレオチド配列をも含んでなるものとする。最初に、遺伝子を転写させるために、ポリメラーゼが結合して転写の過程が開始される、RNAポリメラーゼによる認識が可能なプロモーターを前につけねばならない。このようなプロモーターとして相異なる効率で働く種々のものが用いられている（強いプロモーターや弱いプロモーター）。そ

10

20

30

40

50

れらは、原核および真核細胞それぞれに対して相異なる。

【0070】

本発明において使用可能なプロモーターは、たとえばλバクテリオファージの*i n t*プロモーター、pBR322のβ-ラクタマーゼ遺伝子の*b l a*プロモーターおよびpBR325のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のCATプロモーターなどの構成性プロモーターもしくは、λバクテリオファージの主たる右側および左側プロモーター（*P_L*および*P_R*）や大腸菌*t r p*、*r e c A*、*l a c Z*、*l a c I*、*o m p F*、および*g a l*プロモーターまたは*t r p-l a c*ハイブリッドプロモーターなどの誘導性プロモーターであってよい（グリック、ビーアール（Glick,B.R.）（1987）J.Ind.Microbiol. 1:277-282）。

10

【0071】

大量のmRNAを作り出す強いプロモーターを使用することのほかに、原核細胞において高レベルの遺伝子発現をなしとげるために、mRNAの効率よい翻訳を保証するようにリボソーム結合部位を用いることも必要である。1つの例としては、開始コドンから16S RNAの3'-末端配列と相補的な配列を適性に配置したシャイン-ダルガーノ配列（SD配列）がある。

【0072】

真核性宿主のために、宿主の性質によって、異なる転写および翻訳調節配列を用いてもよい。これらの配列は、調節シグナルが高いレベルで発現する特定の遺伝子に結合する、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルスおよびSVなどのウイルスのソースなどからえてもよい。例としては、ヘルペスウイルスのTKプロモーター、SV40初期プロモーター、酵母*g a l 4*遺伝子プロモーターなどがあげられる。遺伝子の発現を調節できるように、抑制および活性化を許容する転写開始調節シグナルを選択してもよい。

20

【0073】

本発明のIFN-α/β結合タンパク質もしくはその断片またはそれらのムテイン体もしくは融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列、および作動可能に連結された転写および翻訳調節シグナルからなるDNA分子を、所望の遺伝子配列を宿主細胞染色体に組み込むことができるベクターに挿入する。それらの染色体へ導入されたDNAを安定に組み込んでいる細胞を選択しうるように、発現ベクターを含有する宿主細胞の選択を許容する1つまたはそれ以上のマーカーを用いる。マーカーは栄養要求性宿主に原栄養性（prototrophy）、たとえば抗生物質または銅などの重金属に対する殺菌耐性（biocide resistance）などであってよい。選択しうるマーカー遺伝子は発現されるべくDNA遺伝子配列に直接連結されうるか、またはコトランスフェクションによって同じ細胞へ導入されうるかいずれでもよい。追加の要素も一本鎖結合タンパク質mRNAを至適に合成するために必要とされるかもしれない。これらの要素は転写プロモーター、エンハンサーおよび終止シグナルに加えてスプライスシグナルを含んでもよい。このような要素を取り込むcDNA発現ベクターにはオカヤマ、エイチ（Okayama,H.）により、（1983）Mol.Cel.Biol.3:280に記載されたものを含む。

30

【0074】

好ましい実施態様では、導入されるDNA分子はレシピエント宿主（recipient host）において自律複製しうるプラスミドもしくはウイルス性ベクター中に取り込まれる。特定のプラスミドまたはウイルス性ベクターを選択するのに重要な因子には、ベクターを含有するレシピエント細胞を認識し、かつベクターを含有しないレシピエント細胞から選択することができる容易性、特定の宿主における所望のベクターのコピー数、および異なる種の宿主細胞間をベクターが「シャトル」しうるかが望ましいかどうかということが含まれる。

40

【0075】

好ましい原核性のベクターには、たとえばpBR322、ColE1、pSC101、pACYC184などの大腸菌において複製可能なプラスミドなどのプラスミド（マニアティス（Maniatis）ら、op.cit.参照）、pC194、pC221およびpT127などのバチルス属のプラ

50

スミド（グリックザン、ティー（Gryczan,T.），“The Molecular Biology of the Bacilli”，Academic Press, NY（1982）,p307～329）、p I J 101を含むストレプトミセス属のプラスミド（ケンダル、ケー ジェイ（Kendall,K.J.）ら、（1987）J.Bacteriol.169:4177-4183）、φ C 31などのストレプトミセス属のバクテリオファージ（チャター、ケーエフ（Chater,KF）ら、“Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology”，Akademiai Kiado,Budapest,Hungary（1986）,p45～54）およびシュードモナス属のプラスミド（ジョン、ジェー エフ（John,J.F.）ら、（1986）Rev.Infect.Dis.8:693-704）およびイザキ、ケー（Izaki,K.）（1978）Jpn.J.Bacteriol.33:729-742参照）が含まれる。

【0076】

好ましい真核性プラスミドには、B P V、ワクシニア、S V 40、2-ミクロンサークル（2-micron circle）など、またはそれらの誘導体が含まれる。これらのプラスミドは当該技術分野においてよく知られている（ボツシュタイン、ディー（Botstein,D.）ら、（1982）Miami Wint.Symp.19:265-274；ブローチ、ジェイアール（Broach,J.R.），“The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces:Life Cycle and Inheritance”，Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY,p.445～470（1981）；Broach,J.R.,（1982）Cell 28:203-204；ボロン、ディー ピー（Bollon,D.P.）ら、（1980）J.Clin.Hematol.Oncol.10:39-48；およびマニアティス、ティー（Maniatis,T.），“Cell Biology:A Comprehensive Treatise,Vol.3:Gene Expression”，Academic Press,NY,p.563～608（1980）参照）。

【0077】

一旦、構成体（construct（s））を含有するベクターまたはD N A配列が発現用に調製されれば、発現ベクターは適した宿主細胞中に、形質転換、トランスフェクション、リポフェクション、接合、原形質融合、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、ダイレクトマイクロインジェクションなどのさまざまな種類の適した手段のいかなるものによって導入してもよい。

【0078】

本発明に用いられる宿主細胞は原核細胞であってもよいし真核細胞であってもよい。好ましい原核性宿主には、大腸菌、バチルス属、ストレプトミセス属、シュードモナス属、サルモネラ属およびセラチア属などのバクテリアなどが含まれる。最も好ましい原核性宿主は大腸菌である。とくに重要なバクテリア性の宿主には、大腸菌K 12株294（A T C C 31446）、大腸菌X 1776（A T C C 31537）、大腸菌W 3110（F⁻、ラムダ⁻、原栄養性（A T C C 27325）、およびネズミチフス菌または霊菌などの腸内細菌、および種々のシュードモナス種が含まれる。このような条件下では、本発明のタンパク質はグリコシル化されない。原核性宿主は発現プラスミドにおいてレプリコンおよび制御配列と適合しなければならない。

【0079】

しかしながら、本発明のI F N-α／β結合タンパク質はおそらくグリコシル化されたタンパク質であるので、原核性宿主よりも真核性宿主が好ましい。好ましい真核性宿主はたとえば、ヒト、サル、マウスおよびチャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞などの哺乳動物細胞である。それらの細胞では正しい部位でのグリコシル化に加えて正しい折りたたみ構造形成および正しいジスルフィド結合形成を含むタンパク質分子に翻訳後に修飾が与えられるため好ましい。また、酵母細胞および昆虫細胞は高いマンノースグリコシル化を含む翻訳後のペプチドの修飾を行ないうる。強力なプロモーター配列と酵母においておよび昆虫細胞において所望のタンパク質の産生に利用できる多コピー数のプラスミドとを利用する多数の組換えD N Aストラテジーが存在する。酵母細胞はクローン化された哺乳動物遺伝子産物上のリーダー配列を認識し、リーダー配列を担うペプチドを分泌する。

【0080】

ベクターを導入後、宿主細胞は、ベクター含有細胞を選択的に生長させる、選択培地で生長させる。クローン化された遺伝子配列の発現により、I F N-α／β結合タンパク質

10

20

30

40

50

、融合タンパク質またはムテイン体、またはそれらの断片が生産される。ついで、発現されたタンパク質は、抽出、沈殿、クロマトグラフィー、電気泳動などを含むいかなる通常の手順によって、または、カラムにつめられたゲルマトリックス上に固定された抗-I F N- α / β 結合タンパク質モノクローナル抗体を用いる、アフィニティークロマトグラフィーによって、単離および精製がなされる。前記組換え I F N- α / β 結合タンパク質を含有する粗調製品をカラムに通し、それによって夾雑物は通過するであろうけれども I F N- α / β 結合タンパク質は特異な抗体によってカラムに結合されるであろう。洗浄後、本発明のタンパク質は高いまたは低い pH、たとえば pH 11 または pH 2 でゲルから溶出される。

【0081】

10

[参考文献]

1. Taylor, J.L. and Grossberg, S.E. (1990), Recent Progress in interferon research: molecular mechanisms of regulation, action, and virus circumvention, *Virus Research* 15, 1-26.

2. Bisceglie A.M., Martin, P., Kassianides, C., Lisker-Melman, M., Murray, L., Waggoner, J., Goodman, Z., Banks, M.S. and Hoofnagle, J.H. (1989). Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *NEJM* 321, 1506-1510.

20

3. McDonnell, W.M. and Elta G.H. (1992) Acute Hepatitis C infection: Interferon finally succeeds. *Gastroenterology (US)*, 103: 1359-60.

4. Friedman-Kien, A.E., Eron, L.J., Conant, M., Growdon, W., Badiak, H., Bradstreet, P.W., Fedorczyk, D., Trout, R. and Plesse, T.F. (1988), Natural Interferon alpha for treatment of Condylomata Acuminata, *J. Am. Med. Assn.* 259, 533-538.

5. Mains, J. and Handley, J. (1992) Interferon: Current and future Clinical Use in infectious Disease Practice. *Int. J. Std. AIDS*, 3: 4-9.

30

6. Berman, E., Heller, G., Kempin, S., Gee, T., Tran, L. and Clarkson, B. (1990), Incidence of response and long term follow up in patients with Hairy Cell Leukemia treated with recombinant interferon alpha-2 a, *Blood* 75, 839-845.

7. Talpaz M., Kantarjian, H.M., McCredie, K.B., Keating, M.J., Trujillo, J. and Gutterman (1987), Clinical Investigation of human alpha interferon in Chronic Myelogenous Leukemia, *Blood* 69, 1280-1288.

8. De Wit, R., Schattenkerk, J.K.M.E., Boucher, C.A.B., Bakker, P.J.M., Veenhof, K.H.N. and Danner, S.A. (1988), Clinical and virological effects of high-dose recombinant- α in disseminated Aids-related Kaposi's sarcoma, *Lancet* 2, 1214-1222.

40

9. Branka, A.A. and Baglioni, C. (1981) Evidence that types I and II Interferons have different receptors. *Nature*, 294:768-770.

10. Uze G., Lutfalla, G. and Gresser, I. (1990), Genetic transfer of a functional human interferon α receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA, *Cell* 60, 225-234.

50

11. Colamonici, O.R. et al. (1990) Characterization of three monoclonal antibodies that recognize the interferon- α 2 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:7230-7234.
12. Platanias, L.C. et al. (1992) Expression of the IFN- α receptor in hairy cell leukemia, Brit. J. Haematology, 82:541-546.
13. Colaminici, O.R. et al. (1993) Identification of a novel subunit of the type I Interferon receptor localized to human chromosome 21, J. Biol. Chem., 268:10895-10899. 10
14. Benoit, P. et al. (1993) A monoclonal antibody to recombinant human IFN- α receptor inhibits biologic activity of several species of human IFN- α , IFN- β and IFN-omega, J. Immunol. 150:707-716.
15. Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D. and Rubinstein, M. (1989), Soluble cytokine receptors are present in normal human urine, J. Exp. Med. 170, 1409-1414.
16. Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D., Leitner, O., Revel, M. and Rubinstein, M. (1990), Purification of soluble cytokine-receptors from normal human urine by ligand-affinity and immuno-affinity chromatography, J. Chromatography 510, 331-337. 20
17. Novick, D., Engelmann, H., Revel, M., Leitner, O. and Rubinstein M. (1991), Monoclonal antibodies to the soluble IL-6 receptor: affinity purification, ELISA, and inhibition of ligand binding, Hybridoma 10, 137-146.
18. Engelmann, H., Novick, D. and Wallach D. (1990), Two tumor-necrosis-factor binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross reactivity with cell surface tumor-necrosis-factor receptors. J.Biol.Chem. 265, 1531-1536. 30
19. Maliszewski, C.R. and Fanslow, W.C. (1990), Soluble receptors for IL-1 and IL-4. Biological activity and therapeutic potential. Trends in Biotechnol. 8, 324-329.
20. Eastgate, J.A., Symons, J.A. and Duff G.W. (1990), Identification of an interleukin-1 beta binding protein in human plasma, FEBS LETTERS 260, 213-216.
21. Marcon, L., Fritz, M.E., Kurman, C.C., Jensen, J.C. and Nelson, D.L. (1988), Soluble Tac peptide is present in the urine of normal individuals and at elevated levels in patients with adult T-cell leukemia, Clin. Exp. Immunol. 73, 29-33. 40
22. Novick, D., Eshhar, Z. and Rubinstein, M. (1982), Monoclonal antibodies to human α -interferon and their use for affinity chromatography, J. Immunol. 129, 2244-2247.
23. Novick, D., Cohen, B. and Rubinstein, M. (1992), Soluble IFN- α receptor molecules are present in Body Fluids, FEBS Letters, 314:445-448.
24. Pearson, W.R. and Lipman, D.G. (1988), Improved tools for biological sequence 50

e comparison, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-2448.

25. Josimovic-Alasevic, O., Hermann, T. and Diamanstein, T. (1988), Demonstration of two distinct forms of released low-affinity type interleukin-2 receptors, Eur. J. Immunol. 18, 1855-1857.

26. Mosley, B., Beckman, M.P., March, C., J., Idzerda, R.L., Gimpel, S., D., Van denBos, T., Friend, D., Alpert, A., Anderson, D., Jackson, J., Wignall, J.M. Smith C., Gallis, B., Sims, J.E., Urdal, D., Widmer, M.B., Cosman, D. and Pari, L.S. (1989), The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane forms. Cell 59, 335-348. 10

27. Goodwin, R.G., Friend, D., Ziegler, S.F., March, C.J., Namen, A.E. and Park, L.S. (1990), Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily, Cell 60, 941-951.

28. Engelmann, H., Aderka, D., Rubinstein, M., Rotman, D. and Wallach, D. (1989), A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity, J. Biol. Chem. 264, 11974-11980. 20

29. Seckinger, P., Isaaz, S. and Dayer, J.M. (1988), A human inhibitor of tumor necrosis factor alpha, J. Exp. Med. 167, 1511-1516.

30. Novick, D., Shulman, L., Chen, L. and Revel, M. (1992), Enhancement of interleukin 6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibodies, Cytokine 4, 6-11.

31. Lesslauer, W., Taduchi, H., Gentz, R., Schlaeger, E.J., Brockhaus, M., Grau, G., Piguet, P.F., Pointaire, P., Vassalli, P. and Loetscher, H. (1991), Bioactivity of recombinant human TNF receptor fragments, J. Cell Biochem. (Suppl. 15F):15. 30

32. Fanslow, F.W., Sims, J.E., Sassenfeld, H., Morrissey, P.J., Gillis, S., Dower, S.K. and Widmer, M.B. (1990), Regulation of alloreactivity in vivo by soluble form of the interleukin-1 receptor, Science 248, 739-742.

33. Stewart, T.A. (1993) Induction of type I diabetes by interferon- α in transgenic mice, Science, 260:1942-6. 40

34. Klippel, J.H., Carrete, S., Preble, D.T., Friedman, R.M. and Grimley P.M. (1985), Serum alpha interferon and lymphocyte inclusions in systemic lupus erythematosus. Annals of the Rheumatic Diseases. 44, 104-108.

35. Hunter, M.W. (1978), Radioimmunoassay, In: The Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir (ed.) Oxford: Blackwell Press, p. 141.

36. Laemmli, U.K. (1970), Cleavage of structural protein during the assembly of head bacteriophage T4, Nature 227, 680-685. 50

37. Rubinstein S. et al., (1981) J. Virol. 37:755-758.

38. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.

39. Byrn R.A. et al., 1990, Nature (London) 344, 667-670.

【0082】

[配列の表示]

配列番号：1

10

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

起 源：ホモサピエンス、尿

配 列

Asp Ser Pro Asp Tyr Thr Asp Glu Ser Arg Thr Phe Lys Ile Arg Leu
1 5 10 15

Arg

【0083】

配列番号：2

20

配列の長さ：23

配列の型：アミノ酸

起 源：ホモサピエンス、尿

配 列

Met Val Lys Phe Pro Ser Ile Val Glu Glu Glu Leu Gln Phe Asp Leu
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Glu Glu Gln
20

【0084】

配列番号：3

30

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

起 源：ホモサピエンス、尿

配 列

Tyr Asp Ser Pro Asp Tyr Thr Asp Glu
1 5

【0085】

配列番号：4

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

起 源：ホモサピエンス、尿

40

配 列

Tyr Thr Asp Glu Ser Arg Thr Phe Lys Ile
1 5 10

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】 (a) ヒト血清を電気泳動したのち抗-I F N- α R A M A b (No.21.4) を用いてウェスタンブロッティングを行なったものを示す写真である。レーン：A：分子量マーカー (K)；B：正常ヒト血清 (N H S、5 μ l)；CおよびD：毛様細胞性白血病 (H C L) 患者からの血清 (それぞれ5 μ l、1 μ l)。(b) ¹²⁵I-標識-I F N- α B (見かけの分子量25K) と体液中の I F N- α 結合タンパク質よりなるクロスリンク

50

された複合体を電気泳動したもののオートラジオグラムを示す写真である。レーン：E：分子量マーカー（K）；F： ^{125}I -IFN- α BとクロスリンクしたHCL患者からの血清（5 μl ）；G： ^{125}I -IFN- α BとクロスリンクしたNHS（5 μl ）。（c）（b）のクロスリンクした複合体を引き続き抗-IFN- α MA b No.74-3⁽²²⁾を用いて免疫沈降（I p t n）を行なったものを電気泳動したもののオートラジオグラムを示す写真である。レーン：H～K：それぞれ非標識物なし（H、J）、過剰量の非標識IFN- α 2存在下（I）、過剰量の非標識IFN- α B存在下（K）で ^{125}I -IFN- α BとクロスリンクしたHCL患者からの血清（50 μl ）；LおよびM：それぞれ非標識物なし（L）、過剰量の非標識IFN- α 2存在下（M）で ^{125}I -IFN- α Bとクロスリンクした正常ヒト血清（50 μl ）；N：分子量マーカー（K）。 10

【図2】（a）尿のsIFN- α RAを電気泳動したのち抗-IFN- α RA MA b No.21.4を用いてウェスタンブロッティングを行なったものを示す写真である。レーン：A：分子量マーカー（K）；B：未処理の尿（1 μl ）。（b） ^{125}I -IFN- α Bと尿IFN- α 結合タンパク質をクロスリンクして複合体形成後免疫沈降を行なったものを電気泳動したもののオートラジオグラムを示す写真である。レーン：C： ^{125}I -IFN- α Bとクロスリンクして抗-IFN- α MA b No.74-3⁽²²⁾を用いて免疫沈降した10倍濃縮の尿タンパク質（100 μl ）；D：クロスリンクの前に過剰量の非標識IFN- α Bを添加した以外はCに同じ；E：分子量マーカー（K）。 10

【図3】リガンドアフィニティーで精製したIFN- α/β 結合タンパク質のSDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動）を示す写真である。粗尿タンパク質（250リットルの尿より10g）をIFN- α 2-アガロースまたはIFN- β -アガロースに付し、カラムを洗浄後pH2.2にて結合タンパク質を溶出した。溶出画分を中和し、一部を非還元条件下でSDS-PAGE（10%）ならびに銀染色により分析した。レーン：A：粗尿タンパク質（1.5 μg ）；B～E：IFN- α 2-アガロースカラムからの最終カラム洗浄画分（B）とカラム溶出画分（C～E）、C：溶出1（90ng）；D：溶出2（600ng）；E：溶出3（150ng）；F～H：IFN- β -アガロースカラムからの溶出画分、F：溶出1（450ng）；G：溶出2（120ng）；H：溶出3（45ng）。分子量マーカー（K）は、右側に示す。 20

【図4】 ^{125}I -IFN- α 2（見かけの分子量20K）とクロスリンクして複合体を形成したのち抗-IFN- α MA b No.74-3を用いて免疫沈降を行ない、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（7.5%）に付したもののオートラジオグラムを示す写真である。レーン：A、B：それぞれ過剰量の非標識IFN- α 2非存在下（A）または存在下（B）でクロスリンクした粗尿タンパク質（100 μl ）；C、D：それぞれ過剰量の非標識IFN- α 2非存在下（C）または存在下（D）でクロスリンクしたIFN- α 2-アガロースカラムの溶出2（50 μl ）；E、F：それぞれ過剰量の非標識IFN- α 2非存在下（E）または存在下（F）でクロスリンクしたIFN- β -アガロースカラムの溶出2（50 μl ）；G：分子量マーカー（K）は、右側に示す。 30

【図5】IFN- α -アガロースカラムからの尿IFN- α/β 結合タンパク質（溶出2、300 μl ）のサイズ排除クロマトグラフィーの溶出パターンである。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に前もって平衡化したスペロース12カラム（1 $\times$ 30cm、ファルマシア（Pharmacia）社、スウェーデン）で、流量0.5ml/minにて行ない、1分間（0.5ml）の画分を集めた。カラムはUVにより280nmでモニターした。カラムは示した分子量マーカー（Kで表示）にて検量した。30-炭酸脱水素酵素；67-ウシ血清アルブミン；150-イムノグロブリン。 40

【図6】精製IFN- α/β 結合タンパク質の一部の非還元条件下でのドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（10%）を示す写真である。ゲルは銀染色を行なった。レーン：16、17、24～29：IFN- α -アガロースで精製したIFN- α/β 結合タンパク質を付した図5のスペロース12カラムの16、17および24～29の各画分（30 μl ）；26'～28'：IFN- β -アガロースで精製したIFN- α/β 結合タンパク質を付したスペロース12カラムの26～28の各画分；L'：IFN- β -アガロースで精製したIF 50

N- α / β 結合タンパク質；S B：サンプル緩衝液；M：右に示すごとき分子量マーカー。

【図7】クロスリンクした複合体を抗-I F N- α M A b No.74-3⁽²²⁾を用いて免疫沈降したものを電気泳動したもののオートラジオグラムを示す写真である。レーン：A、B：I F N- α 2-アガロースで部分精製した尿I F N- α / β 結合タンパク質の一部を、それぞれ過剰量の非標識I F N- α 2の非存在下（A）、存在下（B）にて¹²⁵I-I F N- α 2（10⁶cpm）とクロスリンクしたもの；C、D：スペロース12カラム（図5参照）の画分26の均一なI F N- α / β 結合タンパク質の一部を用いて前記A、Bと同じ手順で行なったもの；E、FならびにG、H：スペロース12カラムのそれぞれ画分27ならびに28を用いてC、Dと同じ手順で行なったもの。分子量マーカー（K）は右側に示す。

【図8】競合するI F Nの存在または非存在下で¹²⁵I-I F N- α 2とクロスリンクした均一なI F N- α / β 結合タンパク質の複合体を電気泳動したもののオートラジオグラムを示す写真である。レーン：A～D：I F N- α 2-アガロースからのI F N- α / β 結合タンパク質のそれぞれ過剰量の非標識I F N- α C存在下（3倍、A）、I F N- α B存在下（33倍、B）、I F N- α 2存在下（670倍、C）およびI F N- β 存在下（400倍、D）でのクロスリンキング；E：競合するI F N非存在下でのクロスリンキング；F：過剰量（400倍）の非標識I F N- γ 存在下でのクロスリンキング；G：分子量マーカー（右側に示す）；H～K：I F N- β -アガロースカラムからのI F N- α / β 結合タンパク質のそれぞれ過剰量の非標識I F N- α 2の非存在下（H）、存在下（670倍、I）、I F N- β 存在下（400倍、J）およびI F N- γ 存在下（400倍、K）でのクロスリンキング；L：¹²⁵I-I F N- α 2のそれ自身とのクロスリンキング（レセプター非存在）。

【図9】I F N- α / β 結合タンパク質によるI F Nの抗ウイルス活性の障害を示すウェルの写真である。I F N活性は右から左方向へと2倍希釈していった、滴定した。保護された細胞は、ウェル中暗く見えるが、一方ウイルスで溶解した細胞は、明るく見える。配列は以下のとおりである。A：標準（S t d）I F N- β （右端のウェルで20u/ml）2倍希釈；B：前記S t d I F N- β プラス中和抗-I F N- α M A b No.9-3⁽²²⁾；C：I F N- α 2-アガロースおよびスペロース12カラムで精製したI F N- α / β 結合タンパク質の画分27中に存在するリークした（leaked）I F N- α 2の滴定；D：スペロース12カラムの画分27中のリークしたI F N- α 2抗ウイルス活性のM A b 9-3を用いた中和；E：S t d I F N- β （右端のウェルで20u/ml）2倍希釈、プラス抗-I F N- α M A b 9-3プラスI F N- α / β 結合タンパク質（画分27、40ng/ウェル）、I F N- α 2-アガロースカラムからのI F N- α / β 結合タンパク質によるI F N- β の完全なかつ特異的な障害を示す；F：S t d I F N- β （右端のウェルで20u/ml）2倍希釈；G：S t d I F N- γ （すべてのウェルで10u/ml）プラスI F N- α 2カラムからのI F N- α / β 結合タンパク質（画分27、40ng）プラス抗-I F N- α M A b 9-3；H：S t d I F N- γ （右端のウェルで20u/ml）2倍希釈、プラス抗-I F N- α 2 M A b 9-3；I：S t d I F N- α 2（右端のウェルで20u/ml）2倍希釈、プラス抗-I F N- β ポリクローナル抗体プラスI F N- β アガロース/スペロース12カラムからのI F N- α / β 結合タンパク質（画分27、0.4ng/ウェル未満）、I F N- β -アガロースカラムからのI F N- α / β 結合タンパク質によるI F N- α 2の完全なかつ特異的な障害を示す；J：Iと同様のS t d I F N- α 2希釈プラス抗-I F N- β ポリクローナル抗体。

【図10】I F N- α / β 結合タンパク質によるI F N- α BおよびI F N- α Cの抗ウイルス活性の障害を示す（詳細は図9参照）ウェルの写真である。配列は以下のとおりである。A：I F N- α B（右端のウェルで20u/ml）；B：Aと同一プラス抗-I F N- α 2 M A b No.9-3、M A bがI F N- α Bを中和しないことを示す；C：I F N- α C（右端のウェルで20u/ml）；D：Cと同一プラス抗-I F N- α 2 M A b No.9-3、M A bがI F N- α Cを中和しないことを示す；ウェルE1：I F N- α B（20u/ml）プラスM A b No.9-3 プラスI F N- α / β 結合タンパク質（I F N- α 2アガ

10

20

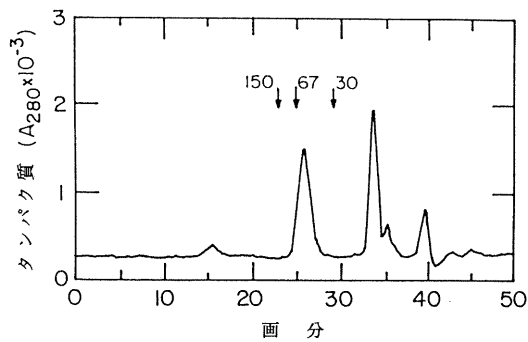
30

40

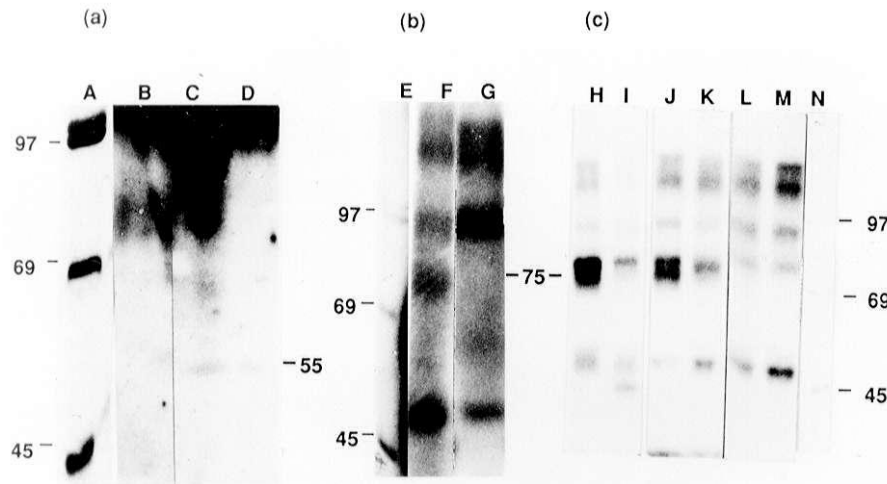
50

ロース／スペロース12カラムの画分27、 $0.1\mu\text{g}$ ）、IFN- α ／ β 結合タンパク質によるIFN- α Bの完全な阻害を示す； ウェルE 2：IFN- α C（ 20u/ml ）プラスMA b No.9-3 プラスIFN- α ／ β 結合タンパク質（IFN- α 2 アガロース／スペロース12カラムの画分27、 $0.1\mu\text{g}$ ）、IFN- α ／ β 結合タンパク質によるIFN- α Cの完全な阻害を示す； ウェルE 3：IFN- β （ 20u/ml ）プラスMA b No.9-3 プラスIFN- α ／ β 結合タンパク質（IFN- α 2 アガロース／スペロース12カラムの画分27、 $0.1\mu\text{g}$ ）、IFN- α ／ β 結合タンパク質によるIFN- β の完全な阻害を示す； ウェルE 4～E 6：MA b No.9-3 の存在下、それぞれコントロールのIFN- α B、IFN- α CおよびIFN- β （各ウェル 20u/ml ）； ウェルE 7：コントロール、ウイルスのみ。

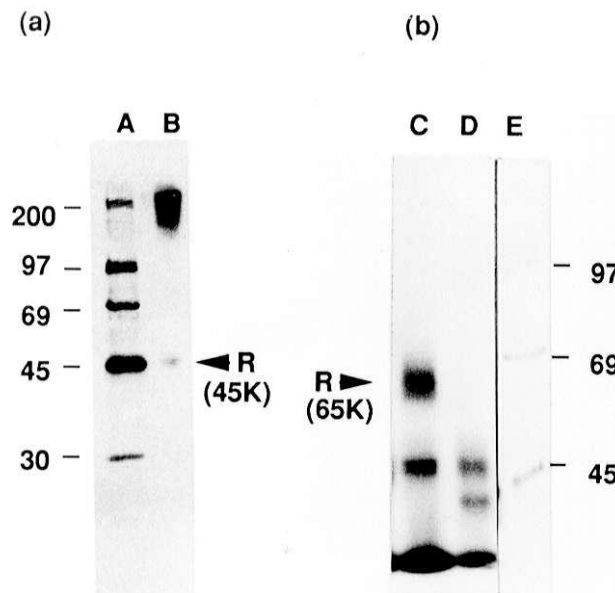
【図 5】



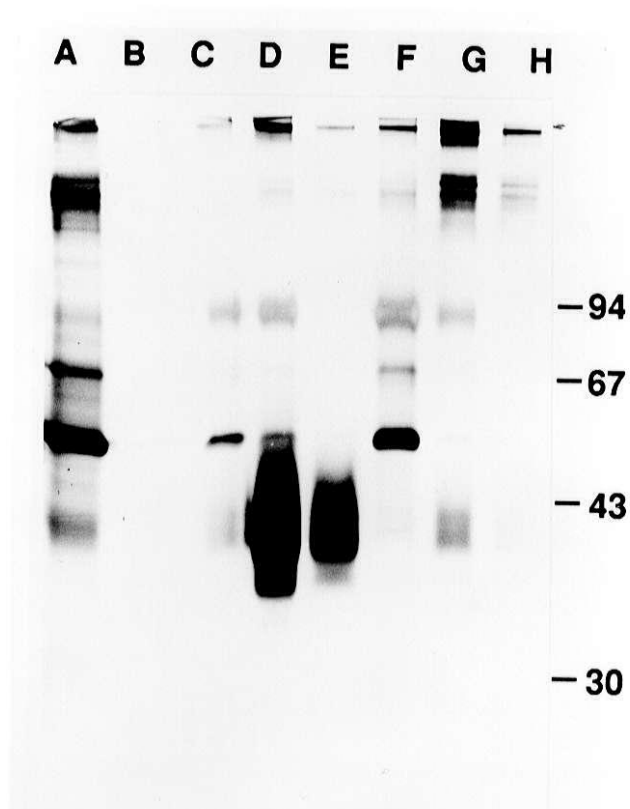
【 図 1 】



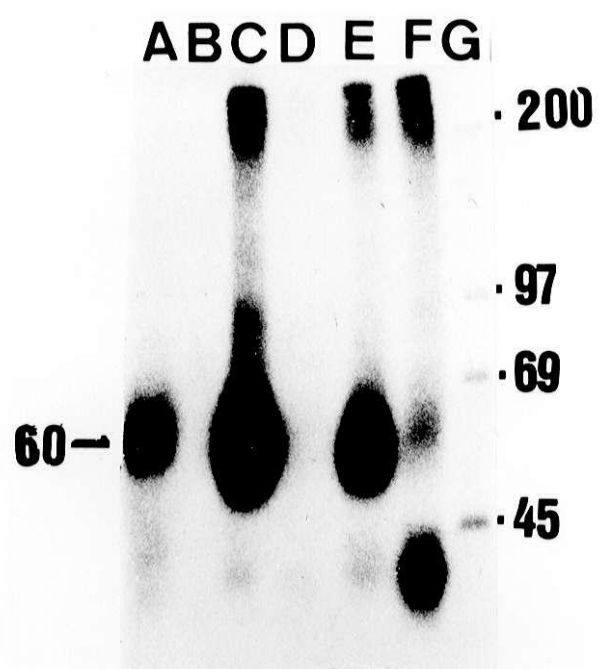
【 図 2 】



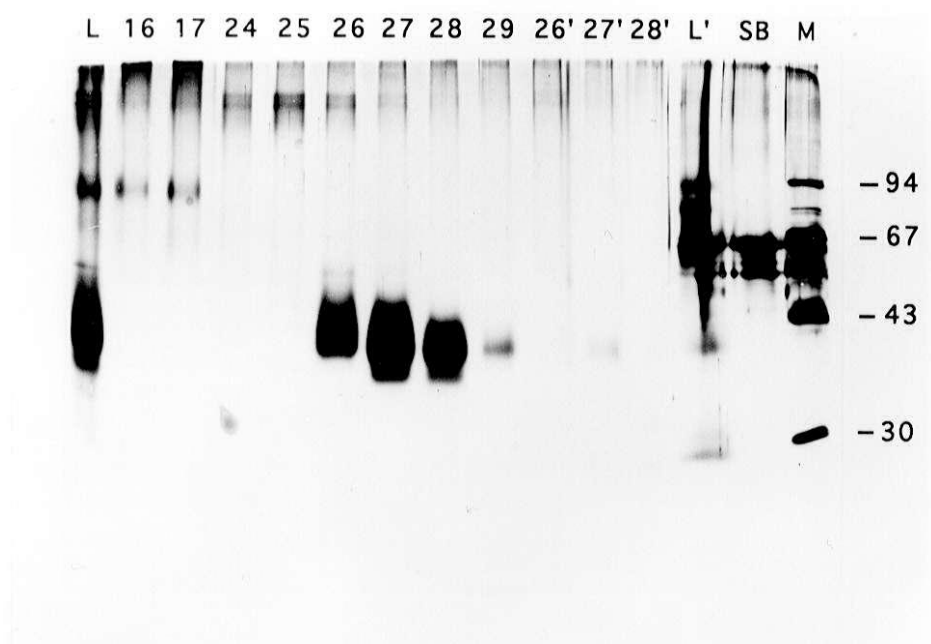
【図 3】



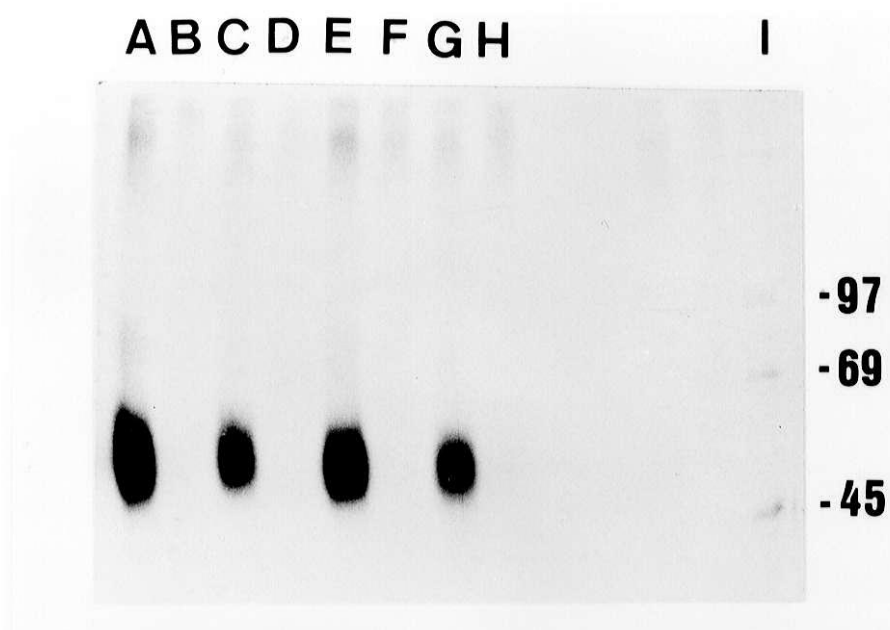
【図 4】



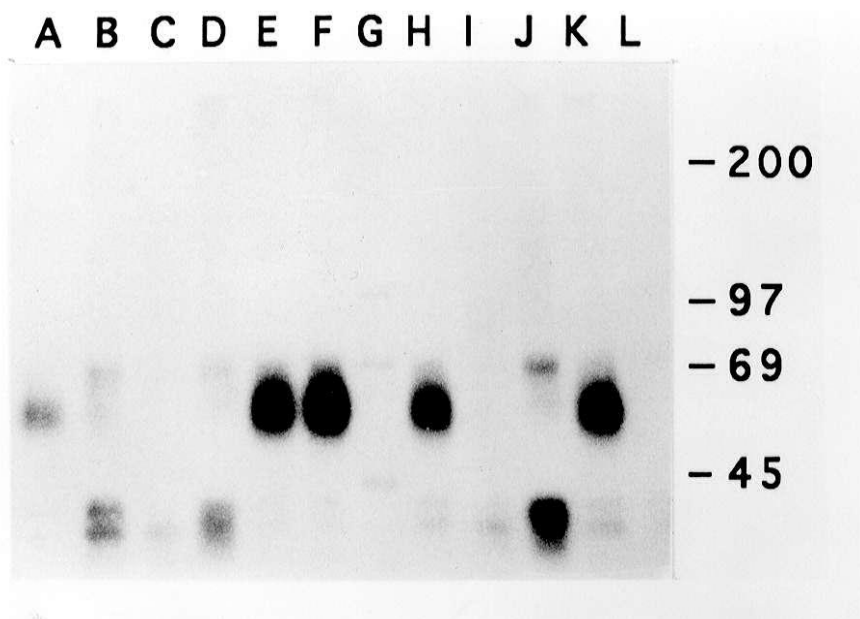
【図 6】



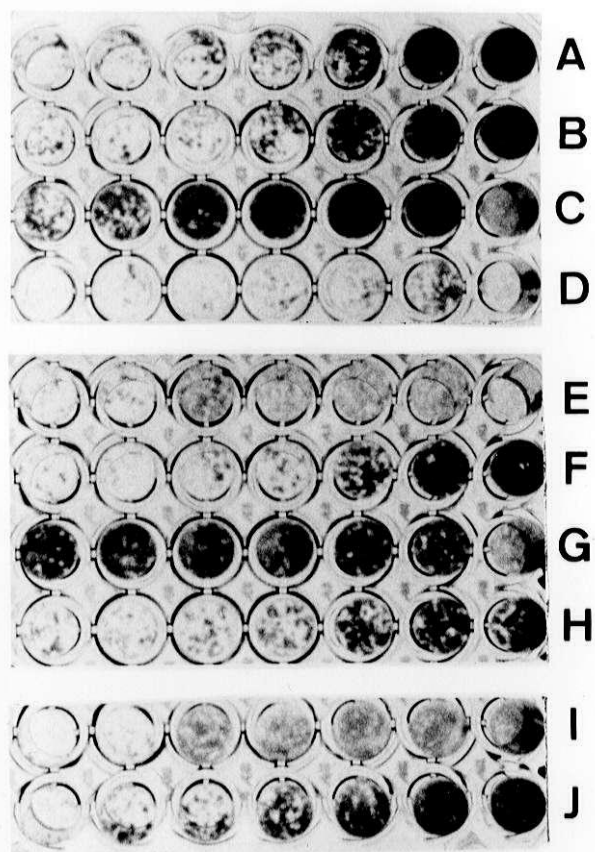
【図 7】



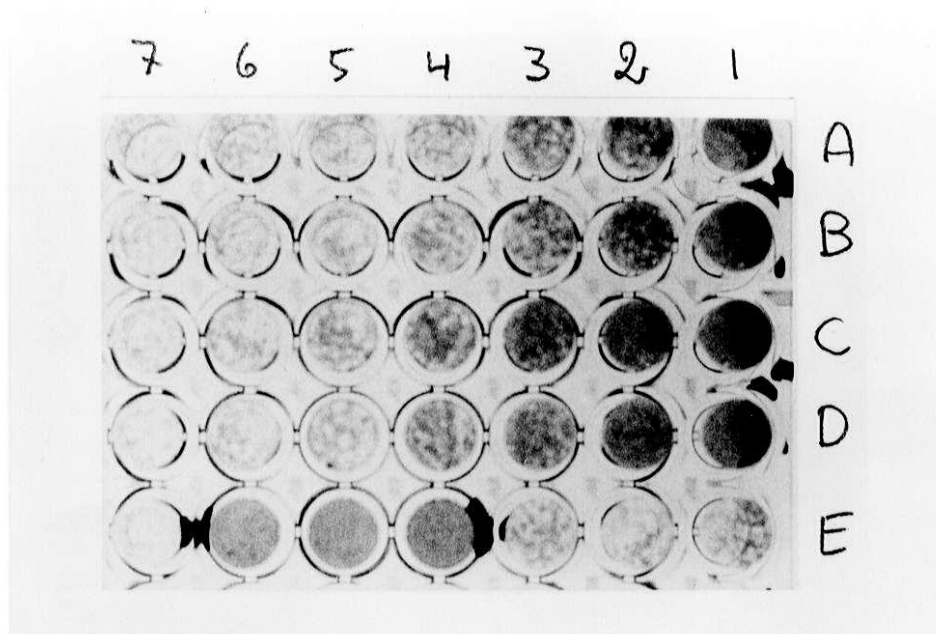
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

2004254695000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/715	
C 0 7 K 14/715	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/02	

(74)代理人 100131152

弁理士 八島 耕司

(72)発明者 メナケム ルビンシュタイン

イスラエル国、ギバート シュミュエル、ハトマー ストリート 1 6

(72)発明者 ダニエラ ノビック

イスラエル国、レホボト、ハナッシ ハリション ストリート 4 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA23 BA24 BA63 CA04 CA07 CA12 EA04 HA01 HA03
 HA14
 4B064 AG01 AG20 CA01 CA19 CC24 CE03 CE08 CE10 CE12 CE13
 DA01 DA08
 4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y AB01 AC14 BA02 BD14 CA24 CA44
 4C084 AA02 AA07 BA44 CA18 CA36 DC50 NA14 ZB071 ZB072 ZB111
 ZB112
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA42 DA16 DA17 DA51 EA22
 EA28 EA29 FA71 FA74 GA01 GA05 GA26 GA30 HA05 HA06