

(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2014-523238

(P2014-523238A)

(43) 公表日 平成26年9月11日(2014.9.11)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 07 K 19/00 (2006.01)	C 07 K 19/00	4 B 0 6 4
C 07 K 14/56 (2006.01)	C 07 K 14/56	4 B 0 6 5
C 07 K 14/565 (2006.01)	C 07 K 14/565	4 C 0 8 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-515209 (P2014-515209)	(71) 出願人	513316120 サイル プロテインズ ゲーエムベーハー ドイツ, 06120 ハレ, ハインリヒ ダメローーエステーエル. 1
(86) (22) 出願日	平成24年6月15日 (2012.6.15)	(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
(85) 翻訳文提出日	平成26年1月24日 (2014.1.24)	(74) 代理人	100124453 弁理士 資延 由利子
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/061459	(74) 代理人	100135208 弁理士 大杉 阜也
(87) 國際公開番号	W02012/172058	(74) 代理人	100152319 弁理士 曽我 亜紀
(87) 國際公開日	平成24年12月20日 (2012.12.20)		
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2011/002962		
(32) 優先日	平成23年6月15日 (2011.6.15)		
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)		

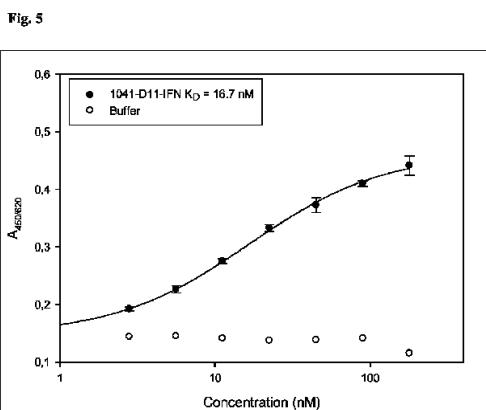
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】インターフェロンと標的化修飾ユビキチンタンパク質とを含むヒト融合タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、薬学的に活性な成分が抗体模倣物に融合されている融合タンパク質に関する。具体的には、本発明は、インターフェロン又はその生物学的に活性な変異タンパク質と、特異的な標的ドメインとして修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質とを含む融合タンパク質に関する。さらに、本発明は、医薬に使用される、特に、がん又は感染性疾患の治療に使用されるこれらの融合タンパク質とともに、及びがん治療薬とともに、薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物に関する。加えて、本発明は上記融合タンパク質を作製する方法に関する。

【選択図】図 5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の部分を含む融合タンパク質：

- (i) インターフェロン又はその生物学的に活性な変異タンパク質、
- (ii) 標的分子に結合可能な修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質、及び、
- (iii) 任意にリンク。

【請求項 2】

インターフェロンが、インターフェロン-アルファ (IFN- α) 又はインターフェロン-ベータ (IFN- β)、又はヒトインターフェロン-アルファ若しくはヒトインターフェロン-ベータである、請求項 1 に記載の融合タンパク質。 10

【請求項 3】

IFN- α が、IFN- α 2a、IFN- α 2b、IFN- α 2c、IFN- α 6、IFN- α 14、IFN- α 4、IFN- α 5、及びこれらのいずれかの生物学的に活性な変異タンパク質からなる群より選択される、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質が、 $K_d = 10^{-7}$ の標的分子に対する特異的な結合親和性を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。 20

【請求項 5】

修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質が、ヘッドトゥテイル配置で互いに連結されている 2 つの単量体ユビキチンユニットを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。 20

【請求項 6】

各修飾単量体ユビキチンユニットが、配列番号 1 により規定されるアミノ酸配列、又は配列番号 9 1 により規定されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。 30

【請求項 7】

前記修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質の各単量体ユビキチンユニットが、配列番号 1 又は配列番号 9 1 の領域 2 ~ 8 及び / 又は領域 6 2 ~ 6 8 における 1 ~ 8 個のアミノ酸の置換によって他方の単量体ユビキチンユニットにおける修飾とは独立的に修飾されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。 30

【請求項 8】

単量体ユビキチンユニットにおける置換が、

(1) 第 1 単量体ユニットにおいて、6、8、6 3、6 4、6 5、及び 6 6 のアミノ酸位置の群より選択される少なくとも 1 つ又は複数の位置における置換、並びに、

第 2 単量体ユニットにおいて、6、8、6 2、6 3、6 4、6 5、及び 6 6 のアミノ酸位置の群より選択される少なくとも 1 つ又は複数の位置における置換、任意に更に 2 アミノ酸位置における置換、又は、

(2) 第 1 単量体ユニットにおいて、2、4、6、6 2、6 3、6 4、6 5、及び 6 6 のアミノ酸位置の群より選択される少なくとも 1 つ又は複数の位置における置換、並びに、

第 2 単量体ユニットにおいて、6、8、6 2、6 3、6 4、及び 6 6 のアミノ酸位置の群より選択される少なくとも 1 つ又は複数の位置における置換、任意に更に 6 5 アミノ酸位置における置換、並びに、

任意に、他のアミノ酸の更なる修飾、又は置換、

を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。 40

【請求項 9】

修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質において 1 ~ 7 アミノ酸が更に修飾されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

更に修飾された前記 1 ~ 7 アミノ酸が、第 1 单量体ユビキチンユニットの 2、4、8、3 3、3 6、3 8、6 2、4 4、7 0、及び 7 1 位、並びに第 2 单量体ユビキチンユニッ 50

トの 2、10、16、34、36、44、51、53、65、70、及び 71 位における 1 つ又は複数のアミノ酸から選択される、請求項 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

リンカーが存在せず、IFN、又は IFN- と、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質とが、互いに直接的に融合されている、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 12】

IFN 若しくは IFN- 、又はその生物学的に活性な変異タンパク質が、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質の C 末端に位置されている、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 13】

IFN 若しくは IFN- 、又はその生物学的に活性な変異タンパク質が、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質の N 末端に位置されている、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

リンカーが存在し、IFN 若しくは IFN- 、又はその生物学的に活性な変異タンパク質と、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質とがリンカーを介して接続されている、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

融合タンパク質の N 末端から C 末端までの部分が以下の順である、請求項 14 に記載の融合タンパク質：

20

修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質 - リンカー - IFN 若しくは修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質 - リンカー - IFN- 、又は修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質 - リンカー - IFN 若しくは IFN- の生物学的に活性な変異タンパク質。

【請求項 16】

融合タンパク質の N 末端から C 末端までの部分が以下の順である、請求項 14 に記載の融合タンパク質：

IFN 若しくは IFN- 、又はその生物学的に活性な変異タンパク質 - リンカー - 修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質。

【請求項 17】

前記リンカーが以下のアミノ酸配列：GIG (配列番号 3)、RIG (配列番号 73)、SGGGG (配列番号 4)、SGGGGIG (配列番号 5)、SGGGGSGGGGI (配列番号 6)、SGGGGSGGGG (配列番号 7)、SG、(SGGG (配列番号 88))_n (n は 1 ~ 10 である) 及び (GGGS (配列番号 87))_n (n は 1 ~ 10 である) から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 14 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 18】

標的分子がフィプロネクチンのエキストラドメイン B (ED-B) である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 19】

修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質が、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 74、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77 及び配列番号 19 ~ 36、又は配列番号 74 ~ 77 に記載の 1 つ又は複数のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性を呈するアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 20】

融合タンパク質が、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列

50

番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 5、配列番号 5 6、配列番号 5 7、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 6 1、配列番号 6 2、配列番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 6 7、配列番号 6 8、配列番号 6 9、配列番号 7 0、配列番号 7 1、配列番号 7 2、配列番号 7 8、配列番号 7 9、配列番号 8 0、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 4、配列番号 8 5、及び配列番号 3 7 ~ 7 2、又は配列番号 7 8 ~ 8 5 に記載の 1 つ又は複数のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を呈するアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 2 1】

医薬に使用される請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 2】

がん又は感染性疾患の治療に使用される請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 3】

がん治療薬との併用投与用である、医薬に使用される、又はがん治療に使用される請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 4】

がん治療薬が、C H O P、ビンプラスチニン、シタラビン、ベバシズマブ、腫瘍ワクチン、放射性医薬品、細胞増殖抑制剤のナノ粒子配合物等からなる群より選択され、又はベバシズマブ、C H O P、及びビンプラスチニンからなる群より選択される、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 2 7】

- 請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、
- 請求項 2 5 に記載のポリヌクレオチド、又は、
- 請求項 2 6 に記載のベクター、

30

を含む宿主細胞。

【請求項 2 8】

- 請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、又は、
- 請求項 2 5 に記載のポリヌクレオチド、又は、
- 請求項 2 6 に記載のベクター、又は、
- 請求項 2 7 に記載の宿主細胞、

を含み、薬学的に許容可能な担体を更に含む、医薬組成物。

【請求項 2 9】

C H O P、ビンプラスチニン、シタラビン、ベバシズマブ、腫瘍ワクチン、放射性医薬品、細胞増殖抑制剤のナノ粒子配合物等からなる群より選択され、又はベバシズマブ、C H O P、及びビンプラスチニンからなる群より選択される 1 つ又は複数のがん治療薬を更に含む、請求項 2 8 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 3 0】

複合製剤の形態、又はキットの部品の形態である、請求項 2 8 又は 2 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質を作製する方法であって、

(a) 単量体ユビキチンタンパク質に由来する、別々に修飾された二量体ユビキチンタン

50

パク質の集団を準備する工程であって、前記集団が、ヘッドトゥテイル(head-to-tail)配置であることができ、ともに連結された2つの修飾ユビキチンモノマーを含む二量体ユビキチンタンパク質を含み、前記二量体タンパク質の各单量体が、配列番号1又は配列番号91の1~8アミノ酸の置換によって別々に修飾されている工程と、

(b) 潜在的なリガンドとして標的分子を準備する工程と、
 (c) 別々に修飾されたタンパク質の前記集団を前記標的分子と接触させる工程と、
 (d) スクリーニング作業によって修飾二量体ユビキチンタンパク質を同定する工程であって、前記修飾二量体ユビキチンタンパク質が、 $K_d = 10^{-7} M$ の特異的な結合親和性で前記標的分子に結合する工程と、

(e) 前記結合親和性により、前記修飾二量体ユビキチンタンパク質を単離する工程と、
 (f) IFN若しくはIFN- γ 、又はその生物学的に活性な変異タンパク質を工程e)で得られた修飾二量体ユビキチンタンパク質に融合する工程と、

を含む、方法。

【請求項32】

標的分子が、フィブロネクチンのエキストラドメインB(ED-B)である、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

請求項1~20のいずれか1項に記載の融合タンパク質を調製する方法であって、

(a) 請求項1~20のいずれか1項に記載の融合タンパク質をコードする核酸を調製する工程と、

(b) 前記核酸を発現ベクターに導入する工程と、

(c) 前記発現ベクターを宿主細胞に導入する工程と、

(d) 宿主細胞を培養する工程と、

(e) 宿主細胞を、前記ベクターから融合タンパク質が発現される培養条件に供する工程であって、それによって請求項1~20のいずれか1項に記載の融合タンパク質を產生する工程と、

(f) 任意に、工程(e)において產生された融合タンパク質を濃縮又は単離する工程と、

を含む、方法。

【請求項34】

工程(e)において產生された融合タンパク質が封入体の形態である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

封入体を単離する工程と、

前記封入体を可溶化する工程であって、それによって可溶性融合タンパク質を得て、前記工程において得られた可溶性融合タンパク質を、少なくとも2回のクロマトグラフィー工程によって更に精製する工程と、

を更に含む、請求項34に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬学的に活性な成分が抗体模倣物に直接的に又はリンカーを介して融合されている融合タンパク質に関する。具体的には、本発明は、薬学的に活性な成分としてインターフェロン又はその生物学的に活性な変異タンパク質と、抗体模倣物として修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質とを含む融合タンパク質に関する。さらに、本発明は、医薬に使用される、特にがん又は感染性疾患の治療に使用されるこれらの融合タンパク質に関する。また、本発明は、そのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及びそのようなポリヌクレオチドを含むベクターとともに、上述の融合タンパク質、ポリヌクレオチド、又はベクターを含む宿主細胞を提供する。さらに、本発明は、そのような融合タンパク質、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞と組み合わせて薬学的に許容可能

10

20

30

40

50

な担体を含む医薬組成物に関する。さらに、本発明は、上記融合タンパク質を作製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫グロブリンではないアミノ酸からなる結合分子に対する要求が高まりつつある。現在に至るまで、抗体が最も良く確立された結合分子群であるが、免疫グロブリン分子には大きな欠点があることから、高い親和性及び特異性でリガンドを標的とする新しい結合分子が今なお必要とされている。抗体は非常に容易に产生でき、ほとんどの全ての標的を対象とし得るもの、非常に複雑な分子構造を有する。より容易に取り扱うことが可能なより小さい分子によって、抗体を代用することが絶えず求められている。これらの代替結合剤を、例えば、疾患の診断、予防及び治療の医療分野において有用に使用することができる。

10

【0003】

相対的に規定された3次元構造を有するタンパク質は、通常、足場タンパク質(protein scaffolds)と呼ばれ、上記の代替結合剤の設計の出発物質として使用され得る。これらの足場タンパク質は、典型的には、特異的な又はランダムな配列変異を許容する1つ又は複数の領域を含み、そのような配列のランダム化は、特異的結合分子が選択され得るタンパク質ライブラリーを作製するのに実施されることが多い。抗体よりもサイズが小さく、標的抗原に対する親和性が抗体に匹敵するか、又はより良好である分子は、薬物動態特性及び免疫原性の点で抗体よりも優れていると予想される。

20

【0004】

修飾ユビキチンに基づく特異的ターゲッティングタンパク質

ユビキチンは、配列保存性の高い、小さな単量体の細胞質タンパク質であり、原虫から脊椎動物に至るまでの全ての既知の真核細胞に存在する。ユビキチンのポリペプチド鎖(配列番号1を参照)は、非常にコンパクトな / 構造に折り畳まれた76アミノ酸となり(非特許文献1)、ポリペプチド鎖のほぼ87%が水素結合による二次構造エレメントの形成に関与している。二次構造は、3回転半のアルファヘリックスター、及び4本鎖からなる逆平行シートである。更なる構造的特徴は、アルファヘリックスとシートとの間のタンパク質内部における際立った疎水性領域である。ユビキチンは、多くの種間で高度に保存されているタンパク質である。

30

【0005】

その小さいサイズのため、ユビキチンの人工的な調製は、化学合成によってもバイオテクノロジー手法によっても実施することができる。その有利なフォールディング特性に起因して、ユビキチンは、大腸菌(*Escherichia coli*)等の微生物を使用する遺伝子工学によりその細胞質基質又はペリプラズム空間のいずれかにおいて比較的大量に产生することができる。

【0006】

特許文献1は、Affillin(商標)(Scil Proteins GmbHの登録商標)とも呼ばれるユビキチンタンパク質に基づく人工結合タンパク質の作製を記載している。特許文献2は、予め規定されたリガンドに対する結合能が新たに生じた多量体ユビキチンを同定する方法に言及している。

40

【0007】

抗体又はその他の代替足場タンパク質に比べ、ユビキチンタンパク質に基づく人工結合タンパク質は、高い標的親和性及び特異性、小さいサイズ、高い安定性、低免疫原性、及び費用対効果の高い製造という多くの利点を有している。さらに、ユビキチン足場タンパク質は、遺伝的及び化学的修飾を許容する。

【0008】

フィブロネクチンのエキストラドメインB

フィブロネクチン(FN)は、健康な組織及び体液中に大量に発現される、重要な高分子量細胞外マトリクス糖タンパク質群である。それらの主な役割は、多くの異なる細胞外

50

マトリクスへの細胞接着の促進である。培養物中での非形質転換細胞の表面上のフィブロネクチンの存在、及び形質転換細胞の場合におけるそれらの不在により、フィブロネクチンは重要な接着タンパク質として同定された。フィブロネクチンは、多数の様々な他の分子、例えば、コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン及びフィブリリンと相互作用し、細胞の形状及び細胞骨格の形成を制御する。さらに、フィブロネクチンは、胚発生の間の細胞遊走及び細胞分化を担う。また、フィブロネクチンは、マクロファージ及びその他の免疫細胞の遊走を促進することで創傷治癒に、及び血管の損傷領域へ血小板を接着させることによる凝血塊の形成に重要な役割を果たす。

【0009】

フィブロネクチンのエキストラドメイン B (ED-B) は、一次 RNA 転写物の選択的スプライシングによってフィブロネクチン分子へと挿入される小さなドメインである。この分子は、細胞外マトリクスのフィブロネクチン分子中に存在するか、又は除去されており、新しい血管の周辺に大量に発現するが、ほぼ全ての正常な成体組織（子宮及び卵巣を除く）において検出不能であることから、血管形成及び組織再構築と関連する最も選択的なマーカーの一つとなっている。ED-B は、主にがんに関与することが知られている。ED-B の高発現は、乳がん、非小細胞肺がん、結腸直腸がん、膵臓がん、ヒト皮膚がん、肝細胞がん、頭蓋内髄膜腫 (intracranial

meningioma)、神経芽細胞種を含む多くのヒト固体がん実体の原発巣、及び転移部において検出された（非特許文献 2）。さらに、ED-B を診断剤と結合させ、診断ツールとして有利に使用することができる。一例として、アテローム性動脈硬化プラークの分子画像化及びがん検出におけるその使用が挙げられる。さらに多くの診断用途が想定される。

【0010】

フィブロネクチンのヒトエキストラドメイン B (ED-B) の 91 アミノ酸のアミノ酸配列は配列番号 2 に示される。このタンパク質の発現には、開始メチオニンを追加しなければならない。ED-B は、哺乳類、例えば、齧歯類、ウシ、靈長類、肉食動物、ヒト等に大量に存在する。ヒト ED-B と 100% の配列同一性を有する動物の例として、ラット (Rattus norvegicus)、ウシ (Bos taurus)、マウス (Mus musculus)、ウマ (Equus caballus)、アカゲザル (Macaca mulatta)、イヌ (Canis lupus familiaris)、及びチンパンジー (Pan troglodytes) が挙げられる。

【0011】

ED-B は新生血管構造に特異的に蓄積し、がんにおける分子介入の標的となる。フィブロネクチンの ED-B ドメインに対する抗体又は抗体フラグメントの多くが、がん及び他の適応症の有力な治療薬として当該技術において知られている（例えば、特許文献 3、特許文献 4、特許文献 5、特許文献 6 を参照）。フィブロネクチンの ED-B ドメインに特異的なヒト一本鎖 Fv 抗体フラグメントは、実験的腫瘍モデル及びがん患者の両方において腫瘍新生脈管構造 (neovasculature) を選択的に標的とすることが確認されている。さらに、IL-12、IL-2、IL-10、IL-15、IL-24、又は GM-CSF とともに抗 ED-B 抗体又は抗 ED-B 抗体フラグメントを含むコンジュゲートが、特に、がん、血管形成、又は新生物性成長の阻害に対する医薬の製造の標的薬剤として記載されている（例えば、特許文献 7、特許文献 8、特許文献 9 を参照）。細胞毒性剤又は免疫賦活剤等の適切なエフェクター機能に抱合させた抗 ED-B 抗体又は抗 ED-B 抗体フラグメントによる固体腫瘍の新生脈管構造の選択的ターゲッティングは、動物実験においては成功することが判明している。膵臓がんの治療に關し、インターロイキン-2 部分と抗 ED-B 抗体部分とを含む融合タンパク質を小分子と併用した（例えば、特許文献 10 を参照）。

【0012】

特許文献 11 及び特許文献 12 は、フィブロネクチンのエキストラドメイン B (ED-B) に対して高親和性結合を有する修飾ユビキチンに基づく多量体タンパク質を開示している。これらの出願は、腫瘍脈管系に対して高効率なターゲッティングを示す抗 ED-B 結合分子を記載している。

10

20

30

40

50

【0013】

インターフェロン

インターフェロンアルファ（略語：IFN-アルファ又はIFN-）はサイトカインである。異なる遺伝子によってコードされた、10を超える異なるサブタイプがヒトに存在する。全てのIFN-アルファサブタイプは、IFN-ベータとともに、2つのサブユニット、IFNAR1及びIFNAR2で構成されるIFN-アルファ受容体（IFNAR）に結合する。IFNAR分子は、ほとんどの細胞種に存在し、それらの細胞をIFN-アルファシグナルに対して応答性としている。IFN-アルファとその受容体との間の相互作用は種特異性が高い。医薬における使用に関して、特にインターフェロンIFN-アルファ2a及びIFN-アルファ2bが着目されている。両インターフェロンは、IFN-アルファ受容体に対して高親和性を示す。

【0014】

インターフェロンアルファの役割ががんにおいて研究されている。IFN-アルファ2a又は2bを含む医薬は、当初、有毛細胞白血病及び慢性骨髄性白血病のような適応症に使用されていた。IFN-アルファは、今もなお腎細胞癌及び皮膚リンパ腫の治療において使用されているが、IFN-アルファに比べてその他の治療法の有効性が高められている。治療反応を得るには、高用量のIFN-アルファを使用しなければならず、高い毒性を引き起こす。IFN-アルファは、抗がん活性及び抗ウイルス活性を含む多くの細胞効果を有する。IFN-アルファ療法は、治療結果を達成するのに何カ月にも亘って適用しなければならないことが多い。それでもなお、IFN-アルファは、ヒトにおける転移性腫瘍に対して治療効果を有する可能性のある非常に数少ないがん治療法の一つである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】国際公開第04/106368号

【特許文献2】国際公開第2011/073214号

【特許文献3】国際公開第97/45544号

【特許文献4】国際公開第07/054120号

【特許文献5】国際公開第99/58570号

【特許文献6】国際公開第01/62800号

【特許文献7】国際公開第06/119897号

【特許文献8】国際公開第07/128563号

【特許文献9】国際公開第01/62298号

【特許文献10】国際公開第07/115837号

【特許文献11】国際公開第2011/073208号

【特許文献12】国際公開第2011/073209号

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Vijay-Kumar et al., 1987 Apr 5; J. Mol. Biol., 194(3):531-44

【非特許文献2】Menrad and Menssen, 2005 Expert Opin Ther Targets 9:491-500

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

がんは、世界的に主要な死因の1つであることから、がん治療の薬剤の改良の必要性が高まっている。現在のがん治療薬及び放射線治療は、選択性が乏しいことが欠点である。ほとんどのがん治療薬は、腫瘍部位に蓄積しないため、腫瘍内で十分な濃度を達成することができない。このため重大な副作用を生じる。さらに、多くのがん治療薬の毒性プロファイルにより投与量が制限され、このため有益な効果も制限されている。がん治療薬が単独で投与された場合には、組織透過性が乏しく、また腫瘍取り込みも乏しいことが多いため、健康な組織にがん治療薬が蓄積する。言うまでもなく、効果的にがんを治療する強い

10

20

30

40

50

医療的必要性が存在する。

【0018】

画期的ながん治療は抗がん剤の腫瘍標的輸送を使用する。これらの薬物は、腫瘍に対して直接的に標的化され、健康な組織に害を与えない(spare)ものでなければならない。薬学的に活性な成分と腫瘍抗原を対象とする結合タンパク質(典型的には抗体)とを含むコンジュゲートが従来技術に記載されている。しかしながら、これらのコンジュゲートは、薬学的に活性な成分の側面及び/又は結合タンパク質の側面に欠点を有する。

【0019】

当該技術分野において、結合タンパク質が上記のような通常使用される抗体の不利益を有さず、薬学的に活性な成分が傑出した抗腫瘍活性を呈するコンジュゲートに対する必要性が残されている。特に、当該技術分野において、効果的な腫瘍標的化治療薬に対する強い必要性が残されている。理想的には、結合タンパク質が通常使用される抗体の不利益を有さず、薬学的に活性な成分が傑出した抗腫瘍活性を呈する画期的なコンジュゲートが、効果的な治療薬であるとされる。これを達成するため、腫瘍標的は、高腫瘍特異性であり、腫瘍組織中に大量に存在しなければならない。腫瘍標的への結合は、高い親和性及び選択性により起こらなければならない。さらに、高い親和性標的結合に加え、腫瘍治療薬は、治療的効果を利用する高活性な機能的ドメインを有していなければならない。

10

【0020】

したがって、本発明の目的は、(i)抗体と比較して有利な標的化結合タンパク質と、(ii)改善された抗腫瘍活性を呈する薬学的に活性な成分とを含む新規な融合タンパク質を提供することである。

20

【0021】

本発明の融合タンパク質に関する利点は、疾患の特定部位、特にがん細胞へのIFN-アルファのターゲッティングである。これにより、治療の効果を高めることができる。さらに、腫瘍に対する特異的な治療効果は、分子を特定の細胞へと向けることにより高められる。したがって、本発明の融合タンパク質と関連すると予想される利点は、IFN-アルファの投与量が低くなることからIFN-アルファ単独と比べて毒性が低いことである。

30

【0022】

IFNとED-B標的化結合タンパク質との融合タンパク質の更なる利点は、腫瘍を扱う上で有益となり得る抗アボトーシス効果であるだろう。サイズの小さい融合タンパク質は、腫瘍への最適な浸透に好都合である。

30

【0023】

本発明の融合タンパク質に関する更なる利点は、薬学的に活性な成分を有さない(例えば、インターフェロン部分を有さない)結合タンパク質と比較して、またターゲッティングドメインを有さないインターフェロンと比較して、血漿中での安定性が強化されており、体内での生物学的半減期が増加されていることである。血漿半減期の延長、及び疾患標的への優れた親和性は、腫瘍における融合タンパク質の蓄積に有益である。いかなる特定の理論によっても束縛されることを望むものではないが、本発明の融合タンパク質のクリアランスの減少は、生物学的半減期の増加をもたらすと考えられる。

40

【0024】

提出された独立請求項の主題によって、上記目的が解決され、利益が達成される。本発明の好ましい実施の形態は、従属請求項、並びに以下の説明、実施例及び図面に包含される。

【0025】

上記概説は、必ずしも本発明によって解決される全ての課題を説明するものではない。

【課題を解決するための手段】

【0026】

第1の態様では、本発明は以下の部分を含む、から本質的になる、又はからなる融合タンパク質に関する:(i)インターフェロン又はその生物学的に活性な変異タンパク質、

50

(i i) 標的分子に結合可能な修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質、及び(i i i)任意にリンカー。

【0027】

第2の態様では、本発明は医薬に使用される第1の態様による融合タンパク質に関する。

【0028】

第3の態様では、本発明はがん又は感染性疾患の治療に使用される第1の態様による融合タンパク質に関する。

【0029】

第4の態様では、本発明は第1の態様に規定される融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。

【0030】

第5の態様では、本発明は第4の態様のポリヌクレオチドを含むベクターに関する。

【0031】

第6の態様では、本発明は第1の態様に規定される融合タンパク質、第4の態様に規定されるポリヌクレオチド、又は第5の態様に規定されるベクターを含む宿主細胞に関する。

【0032】

第7の態様では、本発明は第1の態様に規定される融合タンパク質、第4の態様に規定されるポリヌクレオチド、第5の態様に規定されるベクター、又は第6の態様に規定される宿主細胞を含み、薬学的に許容可能な担体を更に含む、医薬組成物に関する。

【0033】

第8の態様では、本発明は第1の態様に規定される融合タンパク質を作製する方法であって、

(a) 単量体ユビキチンタンパク質に由来する、別々に修飾された二量体ユビキチンタンパク質の集団を準備する工程であって、上記集団が、好ましくはヘッドトゥテイル配置で、ともに連結された2つの修飾ユビキチンモノマーを含む二量体ユビキチンタンパク質を含み、上記二量体タンパク質の各単量体が、配列番号1又は配列番号91の1~8アミノ酸の置換によって別々に修飾されている工程と、

(b) 潜在的なリガンドとして標的分子を準備する工程と、

(c) 別々に修飾されたタンパク質の上記集団を上記標的分子と接觸させる工程と、

(d) スクリーニング作業によって修飾二量体ユビキチンタンパク質を同定する工程であって、上記修飾二量体ユビキチンタンパク質が、 $K_d = 10^{-7} M$ の特異的な結合親和性で上記標的分子に結合する工程と、

(e) 上記結合親和性により、上記修飾二量体ユビキチンタンパク質を単離する工程と、

(f) INF-1又はその生物学的に活性な変異タンパク質を工程e)で得られた修飾二量体ユビキチンタンパク質に融合する工程と、

を含む、方法に関する。

【0034】

第9の態様では、本発明は第1の態様に規定される融合タンパク質を調製する方法であって、

(a) 第1の態様に規定される融合タンパク質をコードする核酸を調製する工程と、

(b) 上記核酸を発現ベクターに導入する工程と、

(c) 上記発現ベクターを宿主細胞に導入する工程と、

(d) 宿主細胞を培養する工程と、

(e) 宿主細胞を、上記ベクターから融合タンパク質が発現される培養条件に供する工程であって、それによって態様1~8のいずれか1項に記載の融合タンパク質を産生する工程と、

(f) 任意に、工程(e)において産生された融合タンパク質を濃縮又は単離する工程と、

10

20

30

40

50

を含む、方法に関する。

【0035】

この本発明の概要は、必ずしも本発明の全ての特徴を説明するものではない。その他の実施形態は、次の詳細な説明の総括より明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】IFN-アルファ配列の3つの異なるアラインメントを示す。一番上のアラインメントは、シグナルペプチドを有していないヒトIFN-アルファ-2a(配列番号8)、シグナルペプチドを有するヒトIFN-アルファ-2a(配列番号9)、シグナルペプチドを有していないヒトIFN-アルファ-2b(配列番号10)、及びシグナルペプチドを有していないヒトIFN-アルファ-2c(配列番号11)のアミノ酸配列を比較する。真中のアラインメントは、ヒトIFN-アルファ-2a(配列番号9)、IFN-アルファ-6(配列番号12)、IFN-アルファ-14(配列番号13)、IFN-アルファ-4(配列番号14)、及びIFN-アルファ-5(配列番号15)のアミノ酸配列を比較する。全てのIFN-アルファ形態はそれらのシグナルペプチドとともに示されている。一番下のアラインメントは、異なる種由来のIFN-アルファ配列、すなわち、ヒトIFN-アルファ-2a(配列番号9)、マウスIFN-アルファ-2(配列番号16)、ラットIFN-アルファ-1(配列番号17)、及びウサギIFN-アルファのフラグメント(配列番号18)を比較する。灰色の背景は、ヒトIFN-アルファ-2a及び各IFN-アルファ分子において同一のアミノ酸をハイライトしている。

【図2A-1】本発明の幾つかの融合タンパク質のアミノ酸配列のアラインメントを示す。図2Aは、IFN-1041-D11(配列番号37)、IFN-1255-B9(配列番号38)、IFN-1255-B10(配列番号39)、IFN-1247-G11(配列番号40)、IFN-1255-G12(配列番号41)、IFN-1247-F8(配列番号42)、IFN-1237-B10(配列番号43)、IFN-1237-H4(配列番号44)、IFN-1239-B10(配列番号45)、IFN-1246-H5(配列番号46)、IFN-1247-G1(配列番号47)、IFN-1247-H2(配列番号48)、IFN-1248-E1(配列番号49)、IFN-1249-E5(配列番号50)、IFN-1253-A11(配列番号51)、IFN-1255-A8(配列番号52)、IFN-1255-G3(配列番号53)、及びIFN-1255-H3(配列番号54)のアミノ酸配列のアラインメントを示す。図2Bは、IFN-1353-H6(配列番号78)、IFN-1351-E9(配列番号79)、IFN-1354-A8(配列番号80)、及びIFN-1351-E9_F63P(配列番号81)のアミノ酸配列のアラインメントを示す。図2A及び図2Bに提示される修飾単量体ユビキチンサブユニットは、ユビキチンF45W、すなわち、アミノ酸交換(aminoacid exchange)F45Wによって配列番号1による野生型配列とは異なるユビキチン変異タンパク質に基づく。インターフェロンアルファ2b配列は、図2A及び図2Bにおいてイタリック体で示される。標的結合に関連する置換は、ユビキチン単量体において太字及び灰色の背景を使用してハイライトされている。アミノ酸交換F45Wは、ハイライトされていない。リンカー領域には下線が引かれている。75位及び76位における交換(G75A及びG76A)は、ED-Bの結合に重要ではない(そのため、ハイライトされていない)。

【図2A-2】同上

【図2B】同上

【図3A-1】本発明の幾つかの融合タンパク質のアミノ酸配列のアラインメントを示す。図3Aは、1041-D11-IFN(配列番号55)、1255-B9-IFN(配列番号56)、1255-B10-IFN(配列番号57)、1247-G11-IFN(配列番号58)、1255-G12-IFN(配列番号59)、1247-F8-IFN(配列番号60)、1237-B10-IFN(配列番号61)、1237-H4-IFN(配列番号62)、1239-B10-IFN(配列番号63)、1246-H5-

10

20

30

40

50

I F N (配列番号 6 4)、1 2 4 7 - G 1 - I F N (配列番号 6 5)、1 2 4 7 - H 2 - I F N (配列番号 6 6)、1 2 4 8 - E 1 - I F N (配列番号 6 7)、1 2 4 9 - E 5 - I F N (配列番号 6 8)、1 2 5 3 - A 1 1 - I F N (配列番号 6 9)、1 2 5 5 - A 8 - I F N (配列番号 7 0)、1 2 5 5 - G 3 - I F N (配列番号 7 1)、及び 1 2 5 5 - H 3 - I F N (配列番号 7 2)のアミノ酸配列のアラインメントを示す。図 3 B は、1 3 5 3 - H 6 - I F N (配列番号 8 2)、1 3 5 1 - E 9 - I F N (配列番号 8 3)、1 3 5 4 - A 8 - I F N (配列番号 8 4)、及び 1 3 5 1 - E 9 - F 6 3 P - I F N (配列番号 8 5)のアミノ酸配列のアラインメントを示す。図 3 A 及び図 3 B に提示される修飾単量体ユビキチンサブユニットは、ユビキチン F 4 5 W、すなわち、アミノ酸交換 F 4 5 W によって配列番号 1 による野生型配列とは異なるユビキチン変異タンパク質に基づく。インターフェロンアルファ 2 b 配列は、図 3 A 及び図 3 B においてイタリック体で示される。標的結合に関連する置換は、ユビキチン単量体において太字及び灰色の背景を使用してハイライトされている。アミノ酸交換 F 4 5 W は、ハイライトされていない。リンカー領域には下線が引かれている。7 5 位及び 7 6 位における交換 (G 7 5 A 及び G 7 6 A) は、E D - B の結合に重要ではない (そのため、ハイライトされていない)。

10

【図 3 A - 2】同上

【図 3 B】同上

【図 4】図 2 A 及び図 3 A に示される融合タンパク質中に存在する 1 8 個の修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質部分のコンセンサス配列を示す。上記 1 8 個の修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質部分は、配列番号 1 9 ~ 3 6 により配列表において示される。図 4 は、ランダム化されたそれらのアミノ酸位置のみを列挙する。数字 2 、 4 、 6 、 8 、 6 2 、 6 3 、 6 4 、 6 5 、及び 6 6 は N 末端ユビキチン単量体 (「第 1 モノマー」) におけるアミノ酸位置を指し、数字 6 ' 、 8 ' 、 6 2 ' 、 6 3 ' 、 6 4 ' 、 6 5 ' 、及び 6 6 ' は C 末端ユビキチン単量体 (「第 2 モノマー」) におけるアミノ酸位置を指す。

20

【図 5】本発明の融合タンパク質のインターフェロン - ドメインの機能性を示す。結合は、最適線 (fitted line) で結ばれた黒丸で示される。インターフェロン / 受容体は、1 6 . 7 n M = 1 . 6 7 × 1 0 - 8 M の親和性で融合タンパク質 (1 0 4 1 - D 1 1 - I F N、配列番号 5 5) に結合する。

【図 6】異なる細胞種に関する I F N - アルファに融合された種々のがん結合タンパク質の解析を示す。第 1 列は、E D - B 発現細胞株 W i 3 8 に対する染色を示す。第 2 列は、コントロールとしての N H D F 細胞株に関する解析を示す。1 3 5 3 - H 6 - I F N 及び 1 3 5 4 - H 8 - I F N は、W i 3 8 細胞由来の E D - B 含有細胞外マトリクスに対して 5 0 n M という強い結合を示す。1 0 4 1 - D 1 1 - I F N 及び 1 2 5 5 - B 9 - I F N の検出は、1 3 5 3 - H 6 - I F N 及び 1 3 5 4 - H 8 - I F N の結合ほど強くはなかった (行 1)。N H D F 細胞に対する結合は観察されなかった (列 2)。行 5 及び行 6 において、タンパク質 U B 2 - I F N - アルファ (2 つの予め修飾された、非標的化ユビキチン単量体 (配列番号 9 1) と特異的ながんターゲッティング機能を有していないインターフェロンアルファとの融合タンパク質) I F N - アルファ及び P B S コントロールは染色を示さない。

30

【図 7】種々の濃度の 1 0 4 1 - D 1 1 - I F N 、 1 2 5 5 - B 9 - I F N 、 1 3 5 3 - H 6 - I F N 、 1 3 5 4 - A 8 - I F N 及び U B 2 - I F N の F 9 腫瘍切片に対する結合を示す。変異体 1 2 5 5 - B 9 - I F N (列 2)、1 3 5 3 - H 6 - I F N (列 3) 及び 1 3 5 4 - A 8 - I F N (列 4) は、5 0 n M の濃度での強い E D - B 結合を提供する。1 0 4 1 - D 1 1 - I F N は、より弱い E D - B 染色を示す (列 1)。非ターゲッティングタンパク質 U B 2 - I F N は、F 9 腫瘍切片では検出されなかった。抗 I F N - アルファ抗体の非特異的染色は検出されなかった (行 3)。

40

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 7】

定義

本発明を以下で詳細に説明する前に、本明細書中に記載される特定の方法論、プロトコ

50

ル及び試薬は変動し得ることから、本発明はこれらに限定されないと理解すべきである。本明細書中で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明するためのものにすぎず、添付した特許請求の範囲のみによって限定される本発明の範囲を限定することは意図されないことも理解すべきである。他に規定のない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解される意味と同じ意味を有する。

【0038】

好ましくは、本明細書中で使用される用語は、"A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Koelbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerlandに記載されているように定義される。

10

【0039】

以下の本明細書及び添付の特許請求の範囲を通じて、文脈上他の意味に解釈すべき場合を除き、「含む」という単語、及びその変化形 (the word "comprise", and variations such as "comprises" and "comprising") は、記載された整数若しくは工程又は整数若しくは工程の群を包含することを示唆するが、任意の他の整数若しくは工程又は整数若しくは工程の群を除外することを示唆しないと理解される。

【0040】

幾つかの文書（例えば、特許、特許出願、科学出版物、製造業者の仕様書、使用説明書、GenBank アクセション番号配列寄託等）が、本明細書の文章の至るところで引用されている。本明細書において、いかなる事項も、本発明が、先行発明によるそのような開示に先行する権利を与えられていないことを承認するものとして解釈されるものではない。本明細書に引用される幾つかの文献は、「引用することにより本明細書の一部をなす」ものと特徴づけられる。そのような本明細書の一部をなす引用文献の規定又は教示と本明細書において詳述される規定又は教示との間に不一致が生じた場合には、本明細書の文章を優先する。

20

【0041】

配列：本明細書において言及される全ての配列は、その内容全体及び開示とともに本明細書の一部をなす添付の配列表において開示される。

30

【0042】

「約」という用語が数値に関連して使用される場合、示される数値よりも 5 % 小さい下限及び示される数値よりも 5 % 大きい上限を有する範囲内に数値が包含されることを意味する。

【0043】

「フィプロネクチンのエキストラドメイン B」又は「ED - B」と簡略して示される用語は、配列番号 2 に対して少なくとも 70 %、任意に 75 %、更に任意に少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %若しくは 97 % の配列同一性を示し、又は最も好ましくは配列番号 2 に対して 100 % の配列同一性を示し、上記に規定される ED - B の機能性（特に、上記「腫瘍特異的タンパク質としてのフィプロネクチンのエキストラドメイン B」と題される節を参照）を有する全てのタンパク質を含む。

40

【0044】

「結合可能なタンパク質」又は「結合タンパク質」という用語は、以下に更に規定される標的分子（例えば、ED - B 等の腫瘍抗原）に対する結合ドメインを含むユビキチンタンパク質を指す。ユビキチンに基づく任意のそのような結合タンパク質は、例えば、多量体化部分、ポリペプチドタグ、ポリペプチドリンカー、及び / 又は非タンパク質性ポリマー分子等の結合ドメインではない更なるタンパク質ドメインを含んでもよい。非タンパク質性ポリマー分子の幾つかの例として、ヒドロキシエチルスター、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリアルキレンが挙げられる。

【0045】

50

抗体及びそのフラグメントは当業者に既知である。本発明の結合タンパク質は、F a b 又はs c F v フラグメント等の抗体又はそのフラグメントではない。さらに、本発明の結合ドメインは、抗体に存在するような免疫グロブリンフォールドを含まない。

【0046】

本明細書において、「リガンド」及び「標的分子」、並びに「結合パートナー」という用語は、同意語として使用され、交換可能である。リガンドは、本明細書に規定される親和性を伴ってヘテロ多量体修飾ユビキチンタンパク質に結合可能な任意の分子（例えば、抗原又はハブテン）である。

【0047】

本発明の実施に際して好ましい「標的分子」はタンパク質であり、より具体的にはタンパク質上に存在する抗原エピトープである。より好ましくは、「標的分子」は、腫瘍細胞の外側に存在するが、同一の組織種の正常細胞に存在しないか、又は腫瘍組織に存在するが、同一組織種の正常組織には存在しないタンパク質又はエピトープ等の腫瘍抗原である。本発明との関連で特に好ましい「標的分子」は、フィブロネクチンのE D - B である。

10

【0048】

「ユビキチンタンパク質」という用語は、配列番号1によるユビキチン、及び以下の規定によるその修飾タンパク質を含む。ユビキチンは真核生物において高度に保存されている。例えば、これまで調査された全ての哺乳類において、ユビキチンは同一のアミノ酸配列を有する。ヒト、齧歯類、ブタ、及び靈長類由来のユビキチン分子が特に好ましい。さらに、任意の他の真核生物起源のユビキチンを使用することができる。例えば、酵母のユビキチンは、配列番号1の配列と3個のアミノ酸が相違するのみである。一般的に上記「ユビキチンタンパク質」という用語に含まれるユビキチンタンパク質は、配列番号1に対して70%を超える、好ましくは75%を超える、好ましくは80%を超える、85%を超える、90%を超える、95%を超える、96%を超える、97%を超える、又は98%を超えるアミノ酸同一性を示す。また、本明細書において使用される場合、「ユビキチンタンパク質」という用語は、配列番号1に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、又は少なくとも98%のアミノ酸同一性を呈するユビキチン由来タンパク質も含む。

20

【0049】

「修飾ユビキチンタンパク質」という用語は、ユビキチンタンパク質の修飾、アミノ酸の置換、挿入若しくは欠失のいずれか1つ、又はこれらの組み合わせを指すが、上記の修飾のいずれか1つによって為される修飾で最も好ましいのは置換である。修飾の数は、上記修飾単量体ユビキチンユニットが、配列番号1に対して少なくとも80%、少なくとも83%、少なくとも85%、少なくとも87%及び少なくとも90%からなる群の1つのアミノ酸同一性を有するように厳密に制限される。したがって、単量体ユニットにおける置換の総数は多くても、80%アミノ酸同一性に相当する15個のアミノ酸に制限される。ヘテロ二量体ユビキチン分子における修飾アミノ酸の合計数は、ヘテロ二量体タンパク質に基づいて20%アミノ酸修飾に相当する30個のアミノ酸である。配列番号1の基本的な単量体配列を有する二量体非修飾ユビキチンタンパク質と比較した二量体修飾ユビキチンタンパク質のアミノ酸同一性は、少なくとも80%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、及び少なくとも90%からなる群の1つより選択される。

30

40

【0050】

2つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度を決定するため、例えば、S I M L o c a l s i m i l a r i t y プログラム (Xiaoquin Huang and Webb Miller, Advances in Applied Mathematics, vol. 12: 337-357, 1991) 又はC l u s t a l Wを使用することができる (Thompson et al., Nucleic Acids Res., 22(22): 4673-4680, 1994)。特に、ユビキチン誘導体と配列番号1のアミノ酸配列との間の配列同一性(%)を、これらのプログラムのいずれに

50

よっても決定することができる。好ましくは、配列同一性(%)を算出する際、S I M Local similarityプログラム又はClustalWのデフォルトパラメーターを使用する。好ましくは、配列番号1に対する修飾タンパク質の配列同一性の程度は、配列番号1の完全配列と比較して決定される。

【0051】

本発明に関連して、修飾配列とその配列の元となる配列(「親配列」とも呼ばれる)との間の配列同一性の程度は、別段の明確な指定がない限り、一般的に、非修飾配列の全長について算出される。

【0052】

「二量体」は、本発明において、2つの単量体ユビキチンタンパク質を含むタンパク質と見なされる。二量体が2つの別々に修飾された単量体を含む場合、それは「ヘテロマニ二量体(heteromeric-dimer)」又は「ヘテロ二量体(hetero-dimer)」と呼ばれる。したがって、本発明の「ヘテロ二量体」は、その特定の標的分子(例えば、ED-B等の腫瘍抗原又は任意の他の抗原)に対して組み合わされた結合特性(結合ドメイン)を呈する2つの別々に修飾された単量体ユビキチンタンパク質の融合体と見なされる。

【0053】

本発明の修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質は、各単量体ユビキチンタンパク質を個別にスクリーニングし、その後それら2つを組み合わせることによって得られるのではなく、共同で標的分子に対して結合活性を呈する第1単量体ユニット及び第2単量体ユニットからなるヘテロ二量体タンパク質をスクリーニングすることによって得られることが強調される。組み合わされた二量体修飾ユビキチンタンパク質のみが本明細書に記載の優れた結合特性を有し、上記サブユニットの各々は、標的分子に対して非常に限られた結合親和性を呈すると予想される。

【0054】

最も有力な結合ユビキチン分子に関する配列情報を取得した後は、任意のその他の方法、例えば化学合成により又は遺伝子工学的方法、例えば2つの既に同定された単量体ユビキチンユニット同士を連結することによりこれらの分子を得ることができる。

【0055】

結合活性を有するヘテロ多量体結合タンパク質(例えば、ヘテロ二量体タンパク質)を作製する上で別々に修飾されたユビキチン単量体の多量体化の利点は、標的分子(例えば、ED-B等の腫瘍抗原)に対して新たに高親和性結合特性を生じるように修飾することができるアミノ酸残基の合計数の増加にある。主な利点は、更に多くのアミノ酸が修飾されても、標的分子(例えば、ED-B等の腫瘍抗原)に対する上記の新たに創出された結合タンパク質の足場の安定性全体を低下させることなく、タンパク質の化学的完全性(protein-chemical integrity)が維持されることである。修飾残基を2つの単量体ユビキチンタンパク質に配分できることから、標的分子に対する新規な結合部位を作製するように修飾することができる残基の合計数が増加する。それゆえ、修飾ヘテロ二量体タンパク質において許容される修飾数は、修飾単量体ユビキチン分子における修飾数の二倍である。ユビキチン系標的分子結合タンパク質のモジュール構造は、上記修飾アミノ酸を2つの単量体ユビキチン分子上に含めると、修飾アミノ酸の総数を増加することができる。本発明の方法は、標的分子(例えば、ED-B等の腫瘍抗原)に対して1つの特異性を有するヘテロ二量体ユビキチン分子の同定を提供する。

【0056】

したがって、結合パートナーに対して共通の結合部位を有するヘテロ二量体の使用は、それらの修飾残基の総量が、二量体を形成する2つの単量体ユニットに割り当てられることから、最終的な結合分子のタンパク質の化学的完全性に過度に影響を与える修飾残基数を増加する可能性を広げる。標的分子(例えば、ED-B等の腫瘍抗原)に結合する上記ヘテロ二量体修飾ユビキチンタンパク質は、タンパク質ライブラリーに存在する。

【0057】

上記修飾ユビキチンが、各単量体タンパク質を単独で用いるよりも標的分子(例えば、

10

20

30

40

50

E D - B 等の腫瘍抗原)に対してより一層効率的に結合可能となるように、両結合領域は、ヘテロ二量体修飾ユビキチンタンパク質表面上のアミノ酸の連続領域として形成される結合部位を形成する。本発明によれば、最も有力な結合ユビキチン分子をスクリーニングした後に2つの単量体タンパク質同士を連結するのではなく、既にヘテロ二量体ユビキチンが存在する状態でスクリーニング作業が行われる。最も有力な結合ユビキチン分子に関する配列情報を取得した後は、任意の他の方法、例えば化学合成により又は遺伝子工学的方法、例えば既に同定された単量体ユビキチンユニット同士を連結することにより、これらの分子を得ることができる。

【0058】

本発明によれば、1つのリガンドに結合する2つの別々に修飾されたユビキチン単量体は、例えば、遺伝学的方法を使用して、ヘッドトゥテイル融合により互いに連結されている。この別々に修飾された融合ユビキチン単量体は、両方の「結合ドメイン領域」がともに作用する場合にのみ有効である。本明細書において、「結合ドメイン領域」は、標的への結合に関与する、配列番号1又は配列番号91の領域2~8及び領域62~68、好ましくは2、4、6、8、62、63、64、65、66、68アミノ酸位置の1~8個のアミノ酸、好ましくは少なくとも3個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも5個のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも6個のアミノ酸において修飾されたアミノ酸を有するユビキチン単量体上の領域と規定される。

10

【0059】

「ヘッドトゥテイル融合」は、第1タンパク質のC末端を第2タンパク質のN末端に融合するものと理解される。ヘッドトゥテイル融合において、単量体は、いかなるリンカーも伴わず、すなわち、直接的なペプチド結合により直接的に接続されてもよい。代替的には、ユビキチン単量体の融合を、リンカーを介して行うことができる。

20

【0060】

本明細書で使用される「リンカー」という用語は、共有結合若しくは非共有結合(例えば、水素結合を介する)、イオン相互作用若しくはファンデルワールス相互作用のいずれかにより少なくとも2つの他の分子を結び付ける分子、例えば、5'末端において1つの相補配列、及び3'末端において他の相補配列にハイブリダイズし、そのようにして2つの非相補配列を結び付ける核酸分子を指す。「リンカー」は、本出願との関連において、第1ポリペプチドと少なくとも更なるポリペプチドとを接続する部分として理解される。第2ポリペプチドは、第1ポリペプチドと同一であってもよく、又は異なってもよい。

30

【0061】

本明細書において、ペプチドリンカーが好ましい。これは、ペプチドリンカーは、第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとを接続するアミノ酸配列であることを意味する。ペプチドリンカーは、ペプチド結合によって第1ポリペプチド及び第2ポリペプチドへと接続される。典型的には、ペプチドリンカーは、1~20個のアミノ酸、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個のアミノ酸の長さを有する。ペプチドリンカーのアミノ酸配列は、ヒトに対して免疫原性でないことが好ましい。例えば、少なくともアミノ酸配列GIG(配列番号3)を有するリンカー、又はアミノ酸配列SGGGG(配列番号4)を有するリンカー、又は任意の他のリンカー、例えばGIG(配列番号3)、RIG(配列番号73)、SGGGGG(配列番号4)、SGGGGIG(配列番号5)、SGGGGSGGGIG(配列番号6)、SGGGGSGGGG(配列番号7)、SG、(SGGG)_n(すなわち、nは配列番号88の繰り返しであり、ここで、nは1~10である(例えば、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10であってもよい))若しくは(GGGS)_n(すなわち、nは配列番号87の繰り返しであり、ここで、nは1~10である(例えば、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10であってもよい))、又は任意の他のペプチドリンカーを使用することができる。また、2つのユビキチン単量体を遺伝学的に融合する他のリンカーは当該技術分野において既知であり、これらを使用することもできる。

40

50

【0062】

同様に、ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質は、本発明の融合タンパク質においていかなるリンカーも併わずに直接的にインターフェロンに接続されてもよい。代替的には、ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質のインターフェロンへの融合を、配列番号3、4、5、6、7、及び73により規定されるリンカー等のリンカーを介して行うことができる。2つのタンパク質を遺伝学的に融合する他のリンカーは当業者に既知である。

【0063】

本発明の修飾ユビキチンタンパク質は、標的分子（例えば、ED-B等の腫瘍抗原）に対する新規な結合親和性を有する操作された人工のタンパク質である。これは、野生型ユビキチンにおいて或る特定のアミノ酸を置換することによって、標的にに対する結合親和性が新たに創出されたことを意味する。ユビキチン単量体において1～8アミノ酸を置換し、2つの修飾ユビキチン単量体を連結した後、これらの新規な人工タンパク質、すなわちヘテロ二量体ユビキチンは、それ以前には存在しなかった結合能を有する。

10

【0064】

また、「置換」という用語は、例えば、元のアミノ酸への化学基若しくは残基の置換又は付加によるアミノ酸の化学的修飾も含む。ベータシート領域の少なくとも1つのベータシート鎖に位置するアミノ酸、又はベータシート鎖に隣接する3アミノ酸以内に位置するアミノ酸を含むタンパク質の少なくとも1つの表面露出領域におけるアミノ酸の置換が極めて重要である。

20

【0065】

本発明によれば、標的分子（例えば、ED-B等の腫瘍抗原）に対して特異的な新規の結合ドメインを作製するアミノ酸の置換を、任意の所望のアミノ酸を用いて行うことができる。すなわち、標的分子に対する新規な結合特性を生じる修飾には、所望の任意のアミノ酸をこの目的に使用することができるよう、アミノ酸がそれぞれ、置換されたアミノ酸と同様の特定の化学特性又は側鎖を有することに注意する必要はない。

20

【0066】

本発明によれば、選択されたアミノ酸の修飾工程は、好ましくはランダム突然変異誘発、すなわち、選択されたアミノ酸のランダム置換による遺伝子レベルでの突然変異誘発によって行われる。好ましくは、ユビキチンの修飾は、各タンパク質に属するDNAを改変するのに遺伝子工学的方法を用いて実施される。好ましくは、その後、原核生物又は真核生物においてユビキチンタンパク質の発現を実施する。

30

【0067】

特に、置換は、ユビキチンタンパク質のベータシートの4つのベータ鎖の表面露出アミノ酸、又はベータシート鎖に隣接する3アミノ酸以内の表面露出アミノ酸において行われる。通常、各ベータ鎖は、5～7個のアミノ酸からなる。例えば、配列番号1を参照すれば、ベータ鎖は、通常、アミノ酸残基2～7、アミノ酸残基12～16、アミノ酸残基41～45及びアミノ酸残基65～71を含む。付加的にかつ好ましく修飾され得る領域は、ベータシート鎖に隣接する3アミノ酸以内（すなわち、1、2、又は3アミノ酸）の位置を含む。付加的かつ好ましく修飾され得る上記好ましい領域は、特にアミノ酸残基8～11、アミノ酸残基62～64及びアミノ酸残基72～75を含む。好ましい領域は、2つのベータ鎖同士を連結するベータターンを含む。1つの好ましいベータターンは、アミノ酸残基62～64を含む。ベータシート鎖に密接する最も好ましいアミノ酸は8位のアミノ酸である。さらに、アミノ酸置換に一層好ましい例は36、44、70、及びノ又は71位である。例えば、付加的にかつ好ましく修飾され得るこれらの領域は、アミノ酸62、63、及び64（3アミノ酸）、又はアミノ酸72、73（2アミノ酸）、又はアミノ酸8（1アミノ酸）を含む。

40

【0068】

好ましい実施形態において、アミノ酸残基はアミノ酸置換によって改変される。しかしながら、欠失及びノ又は挿入も可能である。付加され得るアミノ酸の数は、単量体ユビキチンサブユニットにおいて1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸に制限され

50

、したがって、二量体ユビキチンタンパク質に関しては 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 個のアミノ酸に制限される。欠失され得るアミノ酸の数は、単量体ユビキチンサブユニットにおいて 1、2、3、4、5、6、7、又は 8 個のアミノ酸に制限され、したがって、二量体ユビキチンタンパク質に関しては 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 個のアミノ酸に制限される。1 つの実施形態において、アミノ酸の挿入は為されない。更なる実施形態においては、欠失は行われない。また他の実施形態においては、幾つかの欠失（例えば、ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 個の欠失）が、幾つかの挿入（例えば、ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 個の挿入）と組み合わされている。
10

【0069】

本発明の修飾ユビキチンタンパク質が、請求項で特定され、本明細書中に説明される上記置換に加えて、1 つ又は複数のアミノ酸の欠失及び／又は付加をも含む場合には、野生型ヒトユビキチン（配列番号 1）に与えられるアミノ酸位置を、対応するタンパク質同士で分配するために、上記修飾ユビキチンについてアライメントさせなければならない。融合タンパク質の場合（以下を参照）、各単量体ユビキチンサブユニットのナンバリング（及びアライメント）は同じ方法で行われ、すなわち、例えば、二量体のアライメントは、各々のサブユニットの 1 位のアミノ酸から開始される。
20

【0070】

単量体ユビキチン、好ましくは哺乳類、例えばヒト由来の単量体ユビキチンにおいて、ベータ鎖に存在するアミノ酸の少なくとも 10 %（約 2 アミノ酸に相当する）、好ましくは少なくとも 20 %（約 4 アミノ酸に相当する）、更に好ましくは少なくとも 22 %（約 5 アミノ酸に相当する）を本発明に従って修飾、好ましくは置換し、以前には存在しなかった結合特性が生じることができる。ベータ鎖における修飾に加えて、特に、ベータ鎖に密接する更なるアミノ酸を修飾することができる。最大で約 30 %、又は最大で約 25 % が修飾、好ましくは置換される。1 つのベータ鎖において、概して 1 ~ 4 個のアミノ酸が修飾される。1 つの実施形態において、2 つのベータ鎖のアミノ酸が修飾される。好ましくは、第 1 ベータ鎖及び第 4 ベータ鎖、例えば、アミノ酸残基 2 ~ 7 又はアミノ酸残基 6 5 ~ 7 1 の領域において 6 個のアミノ酸のうち 3 個のアミノ酸が修飾されることが好ましい。
30

【0071】

ヘテロ二量体の構成ユニットとして使用される本発明による修飾単量体ユビキチンの修飾アミノ酸は、最小でアミノ酸の 6 % から最大で合計アミノ酸の 20 % を占める（約 5 ~ 約 15 アミノ酸に相当する）。これを考慮すれば、配列番号 1 に対する修飾ユビキチンタンパク質の配列同一性は少なくとも 80 % である。本発明の更なる実施形態において、配列番号 1 のアミノ酸配列に対するアミノ酸レベルでの配列同一性は、少なくとも 83 %、少なくとも 85 %、少なくとも 87 %、及び更には少なくとも 90 %、少なくとも 92 % 又は少なくとも 95 % である。また、本発明は、配列番号 1 のアミノ酸配列と比較して、97 % を超えるアミノ酸配列同一性の修飾ユビキチンタンパク質を含む。
40

【0072】

本発明の更なる実施形態において、ユビキチンは、配列番号 1 の領域 2 ~ 8 及び／又は領域 6 2 ~ 6 8 において、好ましくは 2、4、6、8、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6、及び／又は 6 8 位から選択される、5 個又は 6 個又は 7 個のアミノ酸において修飾される。その他の実施形態において、これらの位置において修飾されるユビキチンは、既に前修飾（pre-modified）されていた。例えば、更なる修飾として、アミノ酸 7 4 及び／又は 7 5 及び／又は 7 6 における、及び／又はアミノ酸 4 5 における修飾を含むことができ、これにより新規な結合特性に影響を与えることなく、より良好な安定性又はタンパク質の化学的特性（protein-chemical properties）を生じる。修飾ユビキチン単量体は、配列番号 1 のユビキチンの合計 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 個及び最大

10

20

30

40

50

15個のアミノ酸のアミノ酸が修飾、好ましくは置換されることで得られる。一例によれば、14個の置換及び欠失を有する修飾単量体ユビキチンが得られた。ユビキチンのアミノ酸の合計数に基づけば、これは約20%の割合に相当する。これは、通常は、はるかに低い割合で十分にタンパク質のフォールディングを妨げてしまうことから、予想外であった。

【0073】

「ベータシート構造」は、本質的にシート様であり、ほぼ完全に引き延ばされていることによって定義される。ポリペプチド鎖の連続したセグメントから形成されるアルファヘリックスとは対照的に、ベータシートはポリペプチド鎖の異なる領域により形成され得る。このようにして、一次構造において離れた領域を、互いに接近させることができる。ベータ鎖は、典型的には5～10アミノ酸（通常、ユビキチンにおいては5～7残基）の長さを有し、ほぼ完全に引き延ばされた構造を有する。ベータ鎖同士は一方の鎖のC-O基と他方の鎖のNH基の間に（その逆の場合も同様である）互いに水素結合を形成するよう互いに接近している。ベータシートは、複数の鎖から形成され、Cアルファ原子の位置がシート状平面の上方又は下方の間で交互に入れ替わるシート様構造を有する。アミノ酸側鎖はこのパターンに従い、それにより交互に（alternatively）上端又は下端に向く。ベータ鎖の配向性により、このシートは平行シート又は逆平行シートに分類される。本発明によれば、両方とも突然変異可能であり、請求されるタンパク質の調製に使用することができる。

【0074】

ベータ鎖及びベータシート構造の突然変異誘発に関して、表面に近いユビキチンにおいてベータ鎖又はベータ鎖（ベータシートの1つの鎖である）に隣接する3アミノ酸以内の位置を選択する。利用可能なX線結晶構造により、表面露出アミノ酸を同定することができる。結晶構造が利用可能でない場合には、コンピューター解析を試み、そのようにして利用可能な一次構造から表面露出ベータシート領域及び個々のアミノ酸位置の接近性を予測するか、又は3次元タンパク質構造をモデル化し、潜在的な表面露出アミノ酸に関する情報を得ることができる。その更なる開示を、例えば、非特許文献1から得ることができる。

【0075】

しかしながら、ベータシートにおける修飾又はベータ鎖に隣接する3アミノ酸以内の位置の修飾を実施することは可能であり、突然変異が誘発されるアミノ酸位置の時間かかる前選択（pre-selection）を省略することができる。ベータシート構造又はベータシート鎖に隣接する3個以内のアミノ酸をコードするこれらのDNA領域は、それらのDNA環境から単離され、ランダム突然変異誘発に供され、その後、予めそれらが除去されたタンパク質をコードするDNA中へと再度組み込まれる。その後、所望の結合特性を有する変異体に対する選択作業を行う。

【0076】

本発明のその他の実施形態においては、ベータ鎖、又は表面に近いベータ鎖に隣接する3個以内のアミノ酸は上述のように選択され、これらの選択された領域内において突然変異が誘発されるアミノ酸位置が同定される。その後、このようにして選択されたアミノ酸位置に、部位特異的突然変異誘発によってDNAレベルで突然変異を誘発することができ、すなわち、特定のアミノ酸をコードするコドンが別の予め選択された特定のアミノ酸をコードするコドンによって置換されるか、又はこの置換がランダム突然変異誘発との関連で実施される。ここで、置換されるアミノ酸部位は規定されるが、新規ないまだ決定されていないアミノ酸をコードするコドンは規定されない。

【0077】

「表面露出アミノ酸」は、周囲の溶媒に接触可能なアミノ酸である。タンパク質におけるアミノ酸の接触性がモデルトリペプチドGly-X-Glyにおけるアミノ酸の接触性に比べて8%を超える場合、そのアミノ酸は「表面露出」と呼ばれる。これらのタンパク質領域又は個々のアミノ酸位置は、それぞれ、本発明により選択される潜在的な結合ペー

10

20

30

40

50

トナーに対する好ましい結合部位でもある。さらに、Caster et al., 1983 Science, 221, 709-713及びShrake & Rupley, 1973 J. Mol. Biol. 79(2):351-371を参照されたい。それらは完全な開示が引用することにより本出願の一部をなすものとする。

【0078】

新たに生じた人工結合部位領域におけるアミノ酸置換によって、親タンパク質及び互いのタンパク質とは異なるユビキチン足場タンパク質の多様性は、各配列セグメントのターゲット突然変異誘発によって生み出され得る。この場合、極性、電荷、溶解性、疎水性又は親水性等の或る特定の特性を有するアミノ酸を、他の特性を有する各アミノ酸により、それぞれ置き換え又は置換することができる。置換の他に、「突然変異誘発」及び「修飾」及び「置き換え」という用語は、挿入及び/又は欠失も含む。また、タンパク質レベルにおいて、当業者に既知の方法によるアミノ酸側鎖の化学的改変によって修飾を実施することができる。

10

【0079】

「ランダムに修飾されたヌクレオチド配列又はアミノ酸配列」は、幾つかの位置がヌクレオチド又はアミノ酸による挿入、欠失又は置換に供された、特徴を予測することのできないヌクレオチド配列又はアミノ酸配列である。多くの場合、挿入されたランダムなヌクレオチド（アミノ酸）は、「完全にランダム」であろう（例えば、ランダム化合成又はPCR媒介突然変異誘発の結果として）。しかしながら、ランダム配列は、共通の機能的特徴（例えば、発現産物のリガンドとの反応性）を有する配列も含むことができ、またランダム配列は、最終発現産物が、例えば、異なるアミノ酸の分布においても完全にランダムな配列であるという意味でランダムであってもよい。

20

【0080】

本発明によれば、「 K_d 」（又はその代替的な綴りである「 K_D 」）という用語は、本発明によれば $10^{-7} \sim 10^{-12}$ Mの範囲にある特異的な結合親和性を規定する。 10^{-5} 以下の値は、定量化可能な結合親和性と見なすことができる。本出願によれば、 $10^{-7} \sim 10^{-11}$ Mは例えばクロマトグラフィー用途に好ましく、又は $10^{-9} \sim 10^{-12}$ Mは例えば診断又は治療用途に好ましい。更に好ましい結合親和性は、 $10^{-7} \sim 10^{-10}$ M、好ましくは 10^{-11} Mの範囲である。結合親和性を決定する方法はそれ自身既知であり、例えば以下の方法から選択することができる：ELISA、表面プラズモン共鳴（SPR）に基づく技術（例えばBiacore（商標）により提供される）、蛍光分光法、等温滴定熱量測定（ITC）、超遠心分析法、FACS。

30

【0081】

「融合タンパク質」という用語は、機能的成分又はエフェクター成分に融合された本発明の結合タンパク質又は非結合タンパク質を含む融合タンパク質に関する。1つの実施形態において、本発明は、インターフェロン等の機能的ドメイン又はエフェクタードメインに融合されたターゲッティング部分として本発明のヘテロ二量体結合タンパク質を含む融合タンパク質に関する。本発明の融合タンパク質は、非ポリペプチド成分、例えば、治療的又は診断的に関連のある放射性核種の、例えば、非ペプチドリンカー、非ペプチドリガンドを更に含んでもよい。また、例えば、糖、オリゴ糖、又は多糖、脂肪酸等の小さい有機物又は非アミノ酸系化合物を含んでもよい。本発明の1つの好ましい実施形態において、ヘテロ二量体ユビキチン系ED-B結合分子は、治療的に関連のある特性を有するタンパク質又はペプチドに共有結合的に又は非共有結合的に抱合される。目的のタンパク質を支持体に共有結合的に及び非共有結合的に付着する方法は、当該技術分野において既知であり、したがって本明細書では更に詳細には記載しない。

40

【0082】

インターフェロンの「生物学的に活性な変異タンパク質」という用語は、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17又は配列番号18の配列変異体であり、配列番号8～18による天然インターフェロン分子と同一の生物学的機能を呈するポリペプ

50

チドを包含する。そのような「生物学的に活性な変異タンパク質」分子は、天然に生じたものでもよく、又は人工的に創出されたポリペプチドであってもよい。本出願と関連して、「インターフェロンの生物学的に活性な変異タンパク質」という用語は、配列番号8～18（特に配列番号8又は10）のいずれか1つに示されるアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性（例えば、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%）を呈し、配列番号8～18（特に、それぞれ配列番号8又は10）のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を有する、天然に生じるインターフェロン分子と同様に活性を呈するポリペプチドを特に指す。配列番号8～18（好ましくは配列番号8又は10）によるアミノ酸配列の配列変異体は、上記配列変異体が配列番号8又は10によるアミノ酸配列を有するヒトインターフェロン（特に、インターフェロンアルファ又はインターフェロンベータ、より好ましくはインターフェロンアルファ2a又は2b）の活性の少なくとも90%を呈する場合、本発明の目的のための「インターフェロンの生物学的に活性な変異タンパク質」ポリペプチドと見なされる。活性は、例えば、本出願の実施例3において説明される受容体結合アッセイにより、又は本出願の実施例8に詳述されるIREレポーター遺伝子アッセイにより決定され得る。

10

20

30

40

50

【0083】

本発明による「医薬組成物」は、種々の活性成分、並びに希釈剤及び／又は担体が互いに混合されている組成物の形態で存在してもよく、又は有効成分が部分的若しくは全体的に明らかに異なる形態で存在する併用製剤の形態をとってもよい。そのような組み合わせ又は併用製剤の例として、キットの部品が挙げられる。

【0084】

本発明による「組成物」は、少なくとも2種の薬理学的に活性な化合物を含む。これらの化合物は、同時、又は1分から数日の時間的隔たりにより個別に投与することができる。化合物は、同一経路又は異なった経路で投与することができる。例えば、一方の活性化合物の経口投与及び他方の活性化合物の非経口投与が可能である。また、活性化合物は、1つの薬剤、例えば、1つの輸液において、又は個別に配合された両方の化合物を含むキットとして配合されてもよい。また、両方の化合物が2以上の包装中に存在することも可能である。

【0085】

本発明による「併用製剤」は、医薬活性剤、好ましくは細胞毒性剤又は細胞増殖抑制剤又は抗がん剤とともに本発明の融合タンパク質を含む。

【0086】

本発明の実施形態

本発明を以下に更に説明する。以下の一節において、本発明の種々の態様をより詳細に規定する。規定される各態様は、特にそれとは反対の指示がない限り、任意の他の態様と組み合わせられてもよい。特に、好ましい又は有利であると示される任意の特徴は、特にそれとは反対の指示がない限り、任意の他の好ましい又は有利であると示される任意の特徴と組み合わせられてもよい。

【0087】

第1の態様では本発明は、以下の部分を含む、から本質的になる、又はからなる融合タンパク質に関する：

- (i)インターフェロン又はその生物学的に活性な変異タンパク質、
- (ii)標的分子に結合可能な修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質、及び、
- (iii)任意にリンカー。

【0088】

第1の態様の好ましい実施形態において、インターフェロンは、インターフェロン・アルファ（IFN-）又はインターフェロン・ベータ（IFN-）である。特に好ましい実施形態では、インターフェロンは、IFN-2a、IFN-2b、IFN-2c、IFN-6、IFN-14、IFN-4、IFN-5、及びこれらのいずれ

かの生物学的に活性な変異タンパク質からなる群より選択される IFN - である。IFN - アルファ 2 がより好ましく、IFN - アルファ 2 b が更に好ましい。IFN - アルファ 2 a 及び IFN - アルファ 2 b は同一の受容体に対して特に高い親和性を有することから、両 IFN - アルファ分子がターゲッティング部分に対する融合パートナーとして使用され得る。

【0089】

第1の態様の好ましい実施形態において、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質は、 $K_d = 10^{-7}$ 、好ましくは $K_d = 10^{-8}$ 、より好ましくは $K_d = 10^{-9}$ 、更に好ましくは $K_d = 10^{-10}$ 、最も好ましくは $K_d = 10^{-11}$ の標的分子に対する特異的な結合親和性を有する。

10

【0090】

第1の態様の好ましい実施形態において、標的分子は腫瘍抗原である。特に好ましい実施形態において、標的分子はフィプロネクチンのエキストラドメインB (ED - B) である。

【0091】

第1の態様の好ましい実施形態において、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質は、ヘッドトゥテイル配置で互いに連結された2つの単量体ユビキチンユニットを含む。幾つかの実施形態において、これら2つの単量体ユビキチンユニットは、直接的に、すなわちリンカーを伴わずに連結される。代替的には、これら2つの単量体ユビキチンユニットは、リンカー配列により連結されてもよい。好ましくは、上記リンカーは、以下のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、から本質的になる、又はからなる：GIG (配列番号3)、RIG (配列番号73)、SGGGG (配列番号4)、SGGGGGIG (配列番号5)、SGGGGSGGGGIG (配列番号6)、SGGGGGSGGGG (配列番号7)、ジペプチドリンカー SG、(SGGG)_n (すなわち、nは配列番号88の繰り返しであり、ここで、nは1～10である (例えば、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10であってもよい))、又は(GGGS)_n (すなわち、nは配列番号87の繰り返しであり、ここで、nは1～10である (例えば、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10であってもよい))。

20

【0092】

ユビキチンの修飾領域

30

修飾領域は、基本的には、それらが結合パートナーとしての標的分子に接触可能であるかどうか、及びタンパク質の全体構造が推定上、修飾に耐性を示すかどうかで選択され得る。ユビキチン分子内のアミノ酸の修飾には2つの領域が特に好ましい。第1の好ましい領域はアミノ酸2～8の間であり、第2領域はアミノ酸62～68の間である。

【0093】

また、表面露出ベータ鎖における修飾以外に、タンパク質の他の表面露出領域における修飾を、好ましくはベータ鎖に隣接する3アミノ酸以内の位置で実施することもできる。これらの修飾された領域は、新たに生じるED - Bに対する高い結合親和性に関与する。

【0094】

本発明の他の任意の実施形態において、タンパク質における4つのベータ鎖のうち1つ若しくは2つ、好ましくは2つにおけるアミノ酸、又は好ましくは4つのうち2つのベータ鎖に隣接する3アミノ酸以内の位置が修飾されて新規の結合特性を生じる。また、4つのベータ鎖のうち3つ若しくは4つにおける修飾、又はベータ鎖の3つ若しくは4つに隣接する3アミノ酸以内の位置における修飾を、ED - B結合の創出のために任意に行ってもよい。

40

【0095】

アミノ末端鎖及びカルボキシ末端鎖におけるアミノ酸、又はアミノ末端鎖及びカルボキシ末端鎖に隣接する3アミノ酸以内の位置におけるアミノ酸が修飾、好ましくは置換されてED - Bに対する新規な結合部位を生じることが特に好ましい。これに関して、カルボキシ末端ベータシート鎖に隣接する4アミノ酸以内が (例えば、62、63、及び64位

50

において)修飾、好ましくは置換され、またアミノ末端ベータシート鎖に隣接する1アミノ酸以内が(例えば、8位において)修飾、好ましくは置換されることが特に好ましい。

【0096】

哺乳類ユビキチン、好ましくはヒトユビキチンの2、4、6、8、62、63、64、65、66、及び68位のうちの3以上の少なくとも3個の表面露出アミノ酸における修飾、好ましくは置換が特に好ましい。これは、結合パートナーとしての標的分子に関して以前は存在しなかった結合親和性を有する修飾タンパク質の作製に重要である。

【0097】

第1の態様の好ましい実施形態において、上記修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質における各単量体ユビキチンユニットは、配列番号1又は配列番号91の領域2～8及び/又は領域62～68より選択される、好ましくは2、4、6、8、62、63、64、65、66、及び68位より選択される1～8個のアミノ酸、好ましくは少なくとも3個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも5個のアミノ酸、及び最も好ましくは(preferably)少なくとも6個のアミノ酸の置換により、他方の単量体ユビキチンユニットにおける修飾とは独立的に修飾される。任意に、上記アミノ酸残基のうち1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個が修飾され、任意にアミノ酸残基の付加を組み合わせができる。その他の位置も同様に置換に好適である可能性がある。ユビキチン単量体の修飾により、がん標的に対する高特異的結合が生み出され、かつユビキチンの構造が維持されることが重要である。

10

【0098】

第1の態様の好ましい実施形態において、各修飾単量体ユビキチンユニットは、配列番号1又は配列番号91により規定されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%(例えば少なくとも83%、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%又は少なくとも97%)のアミノ酸配列同一性を有する。

20

【0099】

第1の態様の好ましい実施形態において、単量体ユビキチンユニットにおける置換には、アミノ酸領域2～8、及びアミノ酸領域62～66における置換が含まれる。特に、両第1単量体ユニットについて、少なくとも6、62、63、64、65、66のアミノ酸位置の1つ又は複数における置換、及びその他のアミノ酸の任意の更なる修飾、好ましくは置換が好ましい。

30

【0100】

したがって、1つの実施形態において融合タンパク質は、概して第1ユビキチン単量体及び第2ユビキチン単量体において異なるアミノ酸置換を有する上記ユビキチン単量体の融合ヘテロ二量体であり、表1に示されるものが好ましい。

【0101】

表1：腫瘍への特異的ターゲッティングに関連するユビキチン単量体における好ましい置換(それぞれ、配列番号19、20、21、74、75、76、及び77)

【表1】

変異体 Variant	ユビキチン単量体1 Ubiquitin-Monomer 1												ユビキチン単量体2 Ubiquitin-Monomer 2											
	2	4	6	8	62	63	64	65	66	2	4	6	8	62	63	64	65	66						
1041-D11			W	W		R	K	F	P	R		T	Q	W	S	N	W	E						
1255-B9	T	W	H		N	F	K	L	S			H	Q	G	W	Q	A	P						
1353-H6	V	W	H		N	F	K	L	S			H	Q	G	W	Q	A	P						
1351-E9	K	W	H		N	F	K	L	S			H	Q	G	W	Q	A	P						
1354-A8	R	W	H		N	P	K	L	S			H	Q	G	W	Q	A	P						
1351-E9_F	K	W	H		N	P	K	L	S			H	Q	G	W	Q	A	P						
Preferred						K								Q										
	好み																							

【0102】

第1の態様の好みの実施形態において、単量体ユビキチンユニットにおける置換は、(1)第1単量体ユニットにおいて、6、8、63、64、65、及び66のアミノ酸位置の群より選択される少なくとも1つ又は複数の位置における置換、並びに、

第2単量体ユニットにおいて、6、8、62、63、64、65、及び66のアミノ酸位置の群より選択される少なくとも1つ又は複数の位置における置換、任意に更に2アミノ酸位置における置換、又は、

(2)第1単量体ユニットにおいて、2、4、6、62、63、64、65、及び66のアミノ酸位置の群より選択される少なくとも1つ又は複数の位置における置換、並びに、

第2単量体ユニットにおいて、6、8、62、63、64、及び66のアミノ酸位置の群より選択される少なくとも1つ又は複数の位置における置換、任意に更に65アミノ酸位置における置換、並びに、任意に、他のアミノ酸の更なる修飾、好ましくは置換を含む。

【0103】

第1単量体ユニットの2、4、6、62、63、64、65、及び66のアミノ酸位置の群より選択される1つ又は複数の位置における好みのアミノ酸置換は、図4に示されるコンセンサス配列から同定され得る(8位に示されるロイシン残基は、野生型配列に存在するアミノ酸である)。さらに、第2単量体ユニットの6、8、62、63、64、65、及び66のアミノ酸位置の群より選択される1つ又は複数の位置における好みのアミノ酸置換は、図4に示されるコンセンサス配列から同定され得る。第1単量体の64のアミノ酸位置がリジン(K)によって置換され、第2単量体の8のアミノ酸位置がグルタミン(Q)によって置換されていることが最も好み。

【0104】

したがって、1つの実施形態において、融合タンパク質は、第1ユビキチン単量体の2、4、6、及び62～66のアミノ酸位置の群より選択される1つ又は複数の位置におけるアミノ酸置換、並びに第2ユビキチン単量体の6、8、62～64及び66のアミノ酸位置の群より選択される1つ又は複数の位置、また任意に65位におけるアミノ酸残基の置換を有する上記ユビキチン単量体の遺伝学的に融合されたヘテロ二量体であり、好みは

第1ユビキチン単量体における置換は、

2位におけるグルタミン(Q)からスレオニン(T)(又は置換なし)、

4位におけるフェニルアラニン(F)からトリプトファン(W)(又は置換なし)、

6位におけるリジン(K)からヒスチジン(H)、

62位におけるグルタミン(Q)からアスパラギン(N)、

63位におけるリジン(K)からフェニルアラニン(F)、

64位におけるグルタミン酸(E)からリジン(K)、

10

20

30

40

50

65位におけるセリン(S)からロイシン(L)、及び、
66位におけるスレオニン(T)からセリン(S)であり、

第2ユビキチン単量体における置換は、

6位におけるリジン(K)からヒスチジン(H)、アスパラギン酸(D)又はロイシン(L)、

8位におけるロイシン(L)からグルタミン(Q)又はプロリン(P)、

62位におけるグルタミン(Q)からグリシン(G)又はトリプトファン(W)、

63位におけるリジン(K)から芳香族側鎖を有するアミノ酸、好ましくはトリプトファン(W)又はチロシン(Y)、

64位における、グルタミン酸(E)から側鎖に-NH₂基、又は-NH-基を含むアミノ酸、好ましくはグルタミン(Q)又はヒスチジン(H)、

任意に、65位におけるセリン(S)から多量の側鎖を有していないアミノ酸、好ましくはアラニン(A)又はアスパラギン酸(D)、及び、

66位におけるスレオニン(T)からプロリン(P)又はフェニルアラニン(F)、好ましくはアミノ酸置換Q62G及びE64Qが存在する場合、プロリン(P)である。

【0105】

生じる修飾ユビキチンヘテロ二量体がフィブロネクチンの上記エキストラドメインB(ED-B)に対するKd 10⁻⁷ Mの特異的な結合親和性を示す限り、またユビキチンタンパク質の構造安定性が破壊又は障害されていない限り、いかなる制限も伴わずに第2単量体における選択的置換(alternative substitutions)を互いに組み合わせることができる。ED-Bに対するKd 10⁻⁷ Mの特異的な結合親和性が達成される限り、その他のアミノ酸置換が可能である。

【0106】

第1の態様の好ましい実施形態において、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質において1~7アミノ酸が更に修飾されている。好ましくは更に修飾された上記1~7のアミノ酸は、第1単量体ユビキチンユニットの2、4、8、33、36、38、62、44、70、及び71位、並びに第2単量体ユビキチンユニットの2、10、16、34、36、44、51、53、65、70、及び71位における1つ又は複数のアミノ酸から選択される。

【0107】

第1の態様の幾つかの実施形態において、第1単量体ユビキチンユニットの45、75及び/又は76位、及び/又は第2単量体ユビキチンユニットの45、75及び/又は76位におけるアミノ酸が更に置換される。これらの位置における好ましい置換は、F45W、G75A及びG76Aからなる群より選択される1つ又は複数の置換である。

【0108】

本発明の特に好ましい実施形態において、前修飾されたユビキチンは、F45W、G74A及びG75Aの3つ全てのアミノ酸交換を含有する。上記前修飾されたユビキチンは、配列番号91に示され、本発明の実施に特に適している。より具体的には、配列番号1による野生型ユビキチン配列を参照する本発明の全ての実施形態は、類似の方法で配列番号91のアミノ酸配列に適用される。

【0109】

本発明の融合タンパク質

本発明は、インターフェロン又は生物学的に活性な変異タンパク質と、標的分子に結合可能な修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質とを含む融合タンパク質を提供する。がんターゲットが好ましい。

【0110】

第1の態様の幾つかの実施形態において、リンカーは存在せず、IFN、好ましくはIFN-、最も好ましくはIFN-アルファ2、更に好ましくはIFN-アルファ2a若しくはIFN-アルファ2b、又はその生物学的に活性な変異タンパク質(複数の場合もある)、及び修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質が互いに直接的に融合される。

10

20

30

40

50

【0111】

第1の態様の幾つかの実施形態において、IFN、好ましくはIFN-₁、又はその生物学的に活性な変異タンパク質は、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質のC末端に位置されている。代替的には、IFN、好ましくはIFN-₂、又はその生物学的に活性な変異タンパク質は、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質のN末端に位置されている。

【0112】

第1の態様の幾つかの他の実施形態において、リンカーは存在し、IFN、好ましくはIFN-₁、又はその生物学的に活性な変異タンパク質と、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質とがリンカーを介して接続されている。幾つかの実施形態では、融合タンパク質のN末端からC末端までの部分は以下の順である：修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質-リンカー-IFN、好ましくはIFN-₁、又はその生物学的に活性な変異タンパク質。代替的には、融合タンパク質のN末端からC末端までの部分は以下の順である：IFN、好ましくはIFN-₁、又はその生物学的に活性な変異タンパク質-リンカー-修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質。好ましくは、上記リンカーは以下のアミノ酸配列：GIG（配列番号3）、RIG（配列番号73）、SGGGGG（配列番号4）、SGGGGIG（配列番号5）、SGGGGSGGGGGIG（配列番号6）、SGGGGSGGGGG（配列番号7）、SG、（SGGG）_n（すなわちnはSGGG（配列番号88）の繰り返しであり、ここで、nは1～10である（例えば、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10であってもよい））又は（GGGS）_n（すなわちnはGGGS（配列番号87）の繰り返しであり、ここで、nは1～10である（例えば、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10であってもよい））から選択されるアミノ酸配列を含む、から本質的になる、又はからなる。

10

20

30

【0113】

第1の態様の更に好ましい実施形態において、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質は、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77及び配列番号19～36、又は配列番号74～77に記載の1つ又は複数のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を呈するアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、から本質的になる、又はからなる。

30

【0114】

第1の態様の更に好ましい実施形態において、融合タンパク質は、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、及び配列番号37～72、又は配列番号78～85に記載の1つ又は複数のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を呈するアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、から本質的になる、又はからなる。

40

【0115】

第1の態様の幾つかの実施形態において、本発明の融合タンパク質は、非ポリペプチド成分、例えば、非ペプチドリンカー、非ペプチドリガンド、例えば、治療的に関連性のある放射性核種を含んでもよい。また小さい有機物又は非アミノ酸系化合物、例えば、糖、オリゴ糖又は多糖、脂肪酸等を含んでもよい。

【0116】

50

インターフェロン部分とヘテロ二量体ユビキチン部分とを含む融合タンパク質をいかにして得るかについて幾つかの例を以下に示す：

- a) ユビキチンに存在するリジン残基を介するインターフェロンの抱合、
- b) C末端又はその他の任意の位置（例えばアミノ酸残基24又は57）に位置し得るシステイン残基を介するヘテロ二量体ユビキチンベース結合タンパク質の抱合、マレイミド選択的成分 (maleimide selectable components) による抱合、
- c) ペプチド又はタンパク新生抱合 - 遺伝学的融合（好ましくはC末端又はN末端）、
- d) 「タグ」に基づく融合 - 標的タンパク質 E D - B のC末端又はN末端のいずれかに位置するタンパク質又はペプチド。融合「タグ」、例えば、ポリイオニック (poly-ionic) (poly E / poly R)。

10

【0117】

目的のタンパク質を共有結合的に及び非共有結合的に支持体に付着するこれらの方法及び他の方法は、当該技術分野において既知であり、したがって、本明細書では更に詳細に記載しない。

【0118】

本発明の更なる実施形態において、本発明による融合タンパク質は、人工アミノ酸を含有してもよい。

【0119】

更なる実施形態は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする国際公開第2006/0404129号に記載されるようなタンパク質、ペプチド、高分子（例えば、ポリエチレングリコール）、低分子量化合物、糖等より選択される機能的成分を更に含む、本発明による融合タンパク質に関する。

20

【0120】

更なる実施形態は、血清半減期を調節する成分、好ましくはポリエチレングリコール、アルブミン結合ペプチド、及び免疫グロブリンからなる群より選択される成分を更に含む、本発明による融合タンパク質に関する。

【0121】

第2の態様において、本発明は医薬に使用される第1の態様による融合タンパク質に関する。

30

【0122】

第3の態様において、本発明はがん又は感染性疾患の治療に使用される第1の態様による融合タンパク質に関する。

【0123】

本発明の第3の態様は、以下の通り代替的に表現され得る。すなわち、本発明の第3の態様は、がん又は感染症疾患を治療する方法であって、治療量の第1の態様による融合タンパク質を、それを必要とする被験体に投与する工程を含む、方法に関する。

【0124】

第3の態様の好ましい実施形態において、がんは、黒色腫、腎細胞がん、有毛細胞白血病、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、カルチノイド腫瘍、多形性膠芽腫（脳）、乳がん、肺がん、肺の腺癌、結腸直腸がん、中皮腫、扁平上皮癌、肝臓がん、小細胞癌、大細胞癌、非小細胞肺がん、脾臓がん、及びホジキンリンパ腫からなる群より選択される。

40

【0125】

第3の態様の好ましい実施形態において、感染性疾患は、長期B型肝炎及び長期C型肝炎からなる群より選択される。

【0126】

第4の態様において、本発明は、第1の態様において規定される融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。第4の態様の更なる実施形態において、ポリヌクレオチドは、医薬に使用され、例えば、がん又は感染性疾患の治療に使用される。

50

【0127】

本発明の1つの実施形態は、がん又は感染性疾患を治療する方法であって、治療量の第4の態様によるポリヌクレオチドを、それを必要とする被験体に投与する工程を含む、方法に関する。第4の態様により治療されるがんは、好ましくは、第3の態様に関して上記に規定されるものと同一のがんのリストから選択される。同様に、第4の態様により治療される感染性疾患は、好ましくは、第3の態様に関して上記に規定されるものと同一の感染性疾患のリストから選択される。

【0128】

第4の態様の幾つかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、原核宿主細胞及び/又は真核宿主細胞における本発明の融合タンパク質の発現を可能とする発現制御配列に制御可能に連結されている。そのような発現調節配列として、当業者に既知であり遺伝子発現を誘導させるか、又は制御する、誘導性及び非誘導性、構成的、細胞周期調節性、代謝調節性のプロモーター、エンハンサー、オペレーター、サイレンサー、リプレッサー及びその他のエレメントが挙げられるが、これらに限定されない。そのような調節エレメントとして、例えば、RNAポリメラーゼIIIIによって転写されるプロモーター（例えば、snRNA U6又はscRNA 7SK遺伝子に対するプロモーター）、サイトメガロウイルスhCMV即時型初期遺伝子、SV40アデノウイルスの初期プロモーター又は後期プロモーター、例えばNBV、HCV、HSV、HPV、EBV、HTLV、MMTV又はHIV由来のウイルスプロモーター及びアクチベーター配列のような構成的発現を指示する調節エレメント；例えば、CUP-Iプロモーター、例えばtet-on又はtet-offシステム、lacシステム、trpシステムに利用されるtetリプレッサーのような誘導性発現を可能とする調節エレメント；組織特異的発現を指示する調節エレメント、例えば、cdc2、cdc25C又はサイクリンAのような細胞周期特異的発現を指示する調節エレメント；又はTACシステム、TRCシステム、ファージAの主要なオペレーター及びプロモーター領域、fd外被タンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター並びに酵母接合因子又はa接合因子のプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

20

【0129】

第5の態様において、本発明は第4の態様のポリヌクレオチドを含むベクターに関する。第5の態様の更なる実施形態において、ベクターは医薬に使用され、例えば、がん又は感染性疾患の治療に使用される。

30

【0130】

本発明の1つの実施形態は、がん又は感染性疾患を治療する方法であって、治療量の第5の態様によるベクターを、それを必要とする被験体に投与する工程を含む、方法に関する。第5の態様により治療されるがんは、好ましくは、第3の態様に関して上記に規定されるものと同一のがんのリストから選択される。同様に、第5の態様により治療される感染性疾患は、好ましくは、第3の態様に関して上記に規定されるものと同一の感染性疾患のリストから選択される。

【0131】

本発明において好適に使用されるベクターには、プラスミド、ファージミド、ファージ、コスミド、人工哺乳類染色体、ノックアウトコンストラクト又はノックインコンストラクト、ウイルス、特にアデノウイルス、ワクシニアウイルス、弱毒化ワクシニアウイルス、カナリア痘ウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、特に単純ヘルペスウイルス(HSV-I)、バキュロウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ライノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、フィロウイルス及びそれらの遺伝子操作されたもの(engineered

40

versions)、ビロソーム、「ネイキッド(naked)」DNAリポソーム、及び核酸被覆粒子、特にゴールドスフィア(gold spheres)が含まれるが、これらに限定されない。

【0132】

受容体をコードするcDNAを発現するのに、典型的には、転写を指示する強力なプロ

50

モーター、転写／翻訳ターミネーター、及び翻訳開始のためのリボソーム結合部位を含有する発現ベクター中に受容体 cDNA をサブクローニングする。好適な細菌プロモーターは当該技術分野において既知であり（例えば、大腸菌、バシラス属（*Bacillus* sp.）、及びサルモネラ（*Salmonella*））、そのような発現システムのキットが商業的に入手可能である。同様に、哺乳類細胞、酵母、及び昆虫細胞に対する真核生物発現システムが当該技術分野において既知であり、これも商業的に入手可能である。真核生物発現ベクターは、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター、又はレトロウイルスベクターであってもよい。

【0133】

第6の態様において、本発明は、第1の態様において規定される融合タンパク質、第4の態様において規定されるポリヌクレオチド、又は第5の態様において規定されるベクターを含む宿主細胞に関する。第6の態様の更なる実施形態において、宿主細胞は、医薬に使用され、例えば、がん又は感染性疾患の治療に使用される。

10

【0134】

本発明の1つの実施形態は、がん又は感染性疾患を治療する方法であって、治療量の第6の態様による宿主細胞を、それを必要とする被験体に投与する工程を含む、方法に関する。第6の態様により治療されるがんは、好ましくは、第3の態様に関して上記に規定されるものと同一のがんのリストから選択される。同様に、第6の態様により治療される感染性疾患は、好ましくは、第3の態様に関して上記に規定されるものと同一の感染性疾患のリストから選択される。

20

【0135】

第6の態様による宿主細胞は、例えば、本発明のポリヌクレオチド分子を含有する組み換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、又はコスミドDNA発現ベクターにより形質転換され得る、細菌（例えば、大腸菌又は枯草菌（*B. subtilis*））等の原核細胞；例えば、本発明のポリヌクレオチド分子を含有する組み換え酵母発現ベクターにより形質転換され得る、酵母（例えば、サッカロミセス属（*Saccharomyces*）及びピチア属（*Pichia*））のような単純な真核細胞；例えば、ポリヌクレオチド分子を含有する組み換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）により感染され得る、例えば、Sf9又はHi5細胞のような昆虫細胞系；例えばプラスミドにより注入され得る、両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル（*Xenopus*）卵母細胞；例えば、組み換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）、若しくはタバコモザイクウイルス（TMV））により感染され得る、又は本発明のポリヌクレオチド配列を含有する組み換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）により形質転換され得る、植物細胞系；又は、例えば、哺乳類細胞のゲノム由来プロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）、哺乳類ウイルス由来プロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター及びワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）、若しくは細菌細胞由来プロモーター（例えば、tet-リプレッサー結合がtet-onシステム及びtet-offシステムに利用される）を含有する組み換え発現コンストラクトによって形質転換され得る、哺乳類細胞系（例えば、COS細胞、CHO細胞、BHK細胞、HEK293細胞、VERO細胞、HeLa細胞、MDCK細胞、WI38細胞、及びNIH3T3細胞）が挙げられるがこれらに限定されない。宿主細胞としては、哺乳類から直接的に得られ、プラスミドベクターにより遺伝子導入されるか、又はウイルスベクターにより感染される、初代細胞又は二次細胞もまた有用である。本発明のポリヌクレオチドを導入するのに使用される宿主細胞及び各ベクターに依存して、ポリヌクレオチドを、例えば染色体若しくはミトコンドリアDNA中に組み入れることができ、又は例えばエピソームのように染色体外に維持することができ、又は細胞中に一時的にだけ含ませることができる。

30

【0136】

第7の態様において、本発明は、

40

第1の態様に規定される融合タンパク質、

50

第4の態様に規定されるポリヌクレオチド、

第5の態様に規定されるベクター、又は、
第6の態様に規定される宿主細胞、
を含み、薬学的に許容可能な担体を更に含む、医薬組成物に関する。

【0137】

本発明による融合タンパク質は、通常の有機合成戦略、固相支持合成技法等の多くの従来既知の技法、又は商業的に入手可能な自動化合成装置のいずれかによって調製され得る。一方、また本発明による融合タンパク質は、従来の組み換え技法単独で、又は従来の合成技法と組み合わせて調製されてもよい。

【0138】

第8の態様において、本発明は第1の態様に規定される融合タンパク質を作製する方法であって、

(a) 单量体ユビキチンタンパク質に由来する、別々に修飾された二量体ユビキチンタンパク質の集団を準備する工程であって、上記集団が、好ましくはヘッドトゥテイル配置で、ともに連結された2つの修飾ユビキチンモノマーを含む二量体ユビキチンタンパク質を含み、上記二量体タンパク質の各单量体が、配列番号1又は配列番号91の領域2～8及び/又は領域62～68、好ましくは2、4、6、8、62、63、64、65、66及び68位の少なくとも1～8個のアミノ酸、好ましくは少なくとも3個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも5個のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも6個のアミノ酸の置換によって別々に修飾されている工程と、

(b) 潜在的なリガンドとして標的分子を供給する工程と、

(c) 別々に修飾されたタンパク質の上記集団を上記標的分子と接触させる工程と、

(d) スクリーニング作業によって修飾二量体ユビキチンタンパク質を同定する工程であって、上記修飾二量体ユビキチンタンパク質が、 $K_d = 10^{-7} M$ (好ましくは $K_d = 10^{-8}$ 、より好ましくは $K_d = 10^{-9}$ 、更に好ましくは $K_d = 10^{-10}$ 、最も好ましくは $K_d = 10^{-11}$) の特異的な結合親和性で上記標的分子に結合する工程と、

(e) 上記結合親和性により、上記修飾二量体ユビキチンタンパク質を単離する工程と、

(f) IFN、好ましくはIFN- γ 、又はその生物学的に活性な変異タンパク質を工程e)で得られた修飾二量体ユビキチンタンパク質に融合する工程と、
を含む、方法に関する。

【0139】

第8の態様の好ましい実施形態において、上記置換は、

(1) 第1单量体ユニットにおいて、少なくとも6、8、63、64、65、及び66のアミノ酸位置の置換、並びに第2单量体ユニットにおいて、少なくとも6、8、62、63、64、65、及び66のアミノ酸位置の置換、任意に更に2位の置換、又は、

(2) 第1单量体ユニットにおいて、少なくとも2、4、6、62、63、64、65及び66のアミノ酸位置の置換、並びに第2单量体ユニットにおいて、少なくとも6、8、62、63、64、及び66のアミノ酸位置の置換、任意に更に65位の置換、
を含む。

【0140】

第8の態様の好ましい実施形態において、標的分子は腫瘍抗原である。特に好ましい実施形態において、標的分子はフィプロネクチンのエキストラドメインB (ED-B) である。

【0141】

任意に、DNAレベルでの遺伝子組み換え、及び原核生物若しくは真核生物、又は**in vitro**における修飾タンパク質の発現によって、修飾を行ってもよい。更なる実施形態において、修飾には化学合成工程が包含される。

【0142】

1つの実施形態において、上記別々に修飾されたタンパク質の集団は、別々に修飾された单量体ユビキチンタンパク質の各々をコードする2つのDNAライブラリーを遺伝学的に融合することにより得られる。

10

20

30

40

50

【0143】

他の実施形態において、修飾タンパク質を更に化学合成によって調製することができる。この実施形態において、この態様の工程 c) ~ d) は、その後 1 つの工程において行われる。

【0144】

第 9 の態様において、本発明は第 1 の態様に規定される融合タンパク質を調製する方法であって、

- (a) 第 1 の態様に規定される融合タンパク質をコードする核酸を調製する工程；
 - (b) 上記核酸を発現ベクターに導入する工程と、
 - (c) 上記発現ベクターを宿主細胞に導入する工程と、
 - (d) 宿主細胞を培養する工程と、
 - (e) 宿主細胞を、上記ベクターから融合タンパク質が発現される培養条件に供する工程であって、それによって第 1 の態様に規定される融合タンパク質を産生する工程と、
 - (f) 任意に、工程 (e) において産生された融合タンパク質を濃縮又は単離する工程と、
- 、
を含む、方法に関する。

10

【0145】

第 9 の態様の 1 つの実施形態において、工程 (e) において産生される融合タンパク質は、封入体の形態である。

【0146】

第 9 の態様の好ましい実施形態において、上記方法は、封入体を単離する工程と、上記封入体を可溶化する工程であって、それにより可溶性融合タンパク質を得る工程と、上記工程で得られた可溶性融合タンパク質を少なくとも 2 回のクロマトグラフィー工程によって更に精製する工程とを更に含む。好適なクロマトグラフィー工程として、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー及び陽イオン交換クロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0147】

ユビキチンの突然変異誘発方法

各配列セグメントの突然変異誘発の開始点として、例えば、当業者に既知の方法によつて調製され、改変され及び増幅され得るユビキチンの c D N A を使用することができる。

一次配列の比較的狭い領域（約 1 ~ 3 アミノ酸）におけるユビキチンの部位特異的改変には、商業的に入手可能な試薬及び方法が利用できる（"Quick

30

Change", Stratagene; "Mutagene Phagemid in vitro Mutagenesis

Kit", Bio-Rad）。より大きな領域の部位特異的突然変異誘発には、具体的な実施形態として、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）が当業者に利用可能である。この目的のため、所望の位置で変性された塩基対組成を有する合成オリゴデオキシヌクレオチドの混合物を、例えば、突然変異導入に使用することができる。これは、例えばイノシン等のゲノム D N A に天然では生じない塩基対アナログの使用によっても為され得る。

【0148】

ベータシート領域の 1 つ又は複数のベータ鎖、又はベータシート鎖に隣接する 3 アミノ酸以内の位置の突然変異誘発の出発点は、例えば、ユビキチンの c D N A であってもよく、又はゲノム D N A であってもよい。さらに、ユビキチンタンパク質をコードする遺伝子は合成的に調製されてもよい。

40

【0149】

部位特異的変異誘発法、ランダム変異誘発法、P C R 又は同様の方法を使用する変異誘発等のそれ自身既知の種々の手法を変異誘発に利用することができる。

【0150】

本発明の好ましい実施形態において、変異が誘発されるアミノ酸の位置は予め定められている。修飾されるアミノ酸の選択は、修飾されるべきアミノ酸に関する所定の制限を満たすように実施される。各場合において、一般的に、スクリーニングされる異なる突然変

50

異体のライブラリーは、それ自身既知の方法を使用して確立される。一般的に、修飾されるアミノ酸の前選択 (pre-selection) は、修飾されるユビキチンタンパク質に関する十分な構造情報が利用可能であることから、特に容易に行うことができる。

【0151】

本発明によれば、標的化突然変異誘発とともに、例えば、当該技術分野に属する、PCR、化学的突然変異誘発、又は細菌突然変異誘発株を使用する、より長い配列セグメントの突然変異誘発を使用することができる。

【0152】

本発明の1つの実施形態において、突然変異誘発は、アミノ酸コドンNNKを有するDNAオリゴヌクレオチドの集合により実施される。但し、その他のコドン(トリプレット)もまた使用することができることも理解されるべきである。突然変異は、好ましくはベータシート構造が維持される方法で行われる。一般的に、突然変異誘発は、タンパク質表面に露出される安定なベータシート領域の外側で行われる。突然変異誘発には、部位特異的突然変異誘発及びランダム突然変異誘発の両方が含まれる。一次構造における比較的狭い領域(約3~5アミノ酸)を含む部位特異的突然変異誘発は、Stratagene(商標)(Quick Change(商標))又はBio-Rad(商標)(Mutagen(商標))ファージミドin vitro突然変異誘発キット)(米国特許第5,789,166号、米国特許第4,873,192号を参照)の商業的に入手可能なキットにより作製され得る。

10

【0153】

より広い領域を部位特異的突然変異誘に供する場合、DNAカセットを調製しなければならず、突然変異が誘発される領域は、突然変異部位及び不变部位を含むオリゴヌクレオチドの集合により得られる(Nord et al., 1997 Nat.

20

Biotechnol. 8, 772-777、McConell and Hoess, 1995 J. Mol. Biol. 250, 460-470.)。ランダム突然変異誘発は、突然変異誘発株におけるDNAの伝播により、又はPCR増幅(エラープローンPCR)(例えば、Pannekoek et al., 1993 Gene 128, 135

30

140)により導入され得る。この目的のため、エラー率の高いポリメラーゼを使用する。導入される突然変異誘発の程度を高めるのに、又は異なる突然変異を組み合わせるのにそれぞれ、DNAシャッフルリングの手法によりPCRフラグメント中の突然変異を組合せることができる(Stemmer,

1994 Nature 370,

389-391)。酵素に関連するこれらの突然変異誘発戦略の総説が、Kuchner and Arnold (1997) TIBTECH

15, 523-530の総説において提供される。選択されたDNA領域におけるこのランダム突然変異誘発を実施するためにも、突然変異誘発に使用されるDNAカセットを構築しなければならない。

30

【0154】

ランダム修飾は、当該技術分野において十分に確立された既知の方法により行われる。ランダム化されたフラグメントをベクター中に適切に導入するため、本発明では、ランダムヌクレオチドはPCR媒介部位特異的突然変異誘発の原理によって発現ベクター中に導入されることが好ましい。しかしながら、その他の選択肢は当業者に既知であり、例えば、合成ランダム配列ライブラリーを同様にベクター中に挿入することが可能である。

40

【0155】

融合PCRによって突然変異体又はライブラリーを作製するのに、例えば、3回のPCR反応を実施してもよい。部分的に重複する中間体フラグメントを作製するのに、2回のPCR反応を行う。3回目のPCR反応を実施して中間体フラグメントを融合する。

【0156】

ライブラリー又は突然変異体(mutant

50

variants) の構築方法は、所望の制限部位周辺のプライマー(制限酵素認識部位プライマー)、フォワード制限プライマー及びリバース制限プライマーの第1セットと、例えば目的のコドンの上流及び下流周辺のプライマー(変異原性プライマー)、フォワード及びリバース変異原性プライマーの第2セットとを構築することを含んでもよい。1つの実施形態において、プライマーは、それぞれ目的のコドンのすぐ上流及び下流に構築される。制限プライマー及び変異原性プライマーは、第1中間体フラグメント及び第2中間体フラグメントを構築するのに使用される。2回のPCR反応により、これらの直鎖状中間体フラグメントが産生される。これらの直鎖状中間体フラグメントの各々は、少なくとも1つの目的の突然変異コドンと、フランкиングヌクレオチド配列と、消化部位とを含む。3回目のPCR反応では、2つの中間体フラグメント、並びにフォワード制限プライマー及びリバース制限プライマーを使用して直鎖状の融合産物を産生する。一方、直鎖状の産物の結合していない末端は制限酵素で消化され、直鎖状の産物に付着末端が作られる。直鎖状の産物の付着末端は、DNAリガーゼを使用して融合され、環状の産物、例えば環状ポリヌクレオチド配列を産生する。

10

【0157】

中間体フラグメントを構築するのに、2セットのフォワードプライマー及びリバースプライマーの設計及び合成を行う。第1セットはそのフランкиングヌクレオチド配列とともに制限酵素消化部位を含み、第2セットは少なくとも1つの目的の変異体コドンを含む(変異原性プライマー)。当業者であれば、変異体の数は、所望の変異アミノ酸の修飾数に対応することを認識するであろう。本発明者らは、この作業において他の制限酵素が使用される場合、この消化部位の正確な位置、並びにフォワードプライマー及びリバースプライマーの対応する配列が適宜改変され得ることを熟考した。当該技術分野における他の方法を、代替して使用してもよい。

20

【0158】

多くの場合、少なくとも1つの融合パートナーをコードするヌクレオチド配列に融合されたランダム化された核酸配列を有することにより、融合パートナーにランダム配列を繋げる必要がある。そのような融合パートナーは、例えば、発現及び/又は精製/単離及び/又は発現産物の更なる安定化を促進することができるか、又はその他の有益な効果を伴う可能性がある。

30

【0159】

本発明の一例によれば、単量体ユビキチンの領域、領域2~8及び/又は領域62~68、好ましくは2、4、6、8、62、63、64、65、66、及び/又は68位における1~8個のアミノ酸、好ましくは少なくとも3個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも5個のアミノ酸、最も好ましくは6個のアミノ酸のランダム置換を、上記位置がタンパク質のアミノ末端又はカルボキシ末端近傍に位置していることから、PCRによって特に容易に行うことができる。したがって、操作されるコドンは、対応するcDNA鎖の5'末端及び3'末端に存在する。したがって、変異原性PCR反応に使用される第1オリゴデオキシヌクレオチドは、突然変異される領域2~8のコドン、好ましくは2、4、6、及び/又は8位から離れており、ユビキチンの配列におけるアミノ末端に対するコーディング鎖に対応する。したがって、第2オリゴデオキシヌクレオチドは、突然変異される領域62~68のコドン、好ましくは62、63、64、65、66、及び/又は68位から離れており、少なくとも部分的にカルボキシ末端のポリペプチド配列の非コーディング鎖に対応する。両方のオリゴデオキシヌクレオチドにより、ポリメラーゼ連鎖反応は、鑄型として単量体ユビキチンをコードするDNA配列を使用して行うことができる。

40

【0160】

さらに、得られた增幅産物を、例えば、制限エンドヌクレアーゼの認識配列を挿入するフランкиングオリゴデオキシヌクレオチドを使用する、別のポリメラーゼ連鎖反応に添加することができる。本発明によれば、所定のハプテン又は抗原に対して結合特性を有するユビキチン変異体の単離のための後の選択工程での使用に適したなベクターシステムに、得られた遺伝子カセットを導入することが好ましい。

50

【0161】

標的分子（例えば、ED-B）に対して結合親和性を有する修飾ユビキチンタンパク質の選択及び結合親和性を担う修飾アミノ酸の決定

例えば、各単量体ユビキチンユニットにおいて選択されたアミノ酸を別々に修飾することによって、ヘテロ二量体修飾ユビキチンタンパク質をコードする少なくとも2つの異なるDNAライブラリーを確立した後、これらのライブラリーを、例えばリンクアーテchniqueによって遺伝学的に融合して、ヘテロ二量体修飾ユビキチンタンパク質をコードするDNA分子を得る。本発明によれば、これらのライブラリーのDNAはタンパク質へと発現され、そのようにして得られた修飾二量体タンパク質を、標的分子（例えば、ED-B等の腫瘍抗原）と接触させ、結合親和性が存在する場合には、パートナーと互いに任意に結合することを可能とする。

10

【0162】

ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質に関して、接触作業及びスクリーニング作業が既に行われていることは、本発明の極めて重要な側面である。この作業により、その標的分子に対して結合親和性を提供するそれらのユビキチンタンパク質に対するスクリーニングが可能となる。例えば、選択方法についての更なる詳細は、Sci

Proteinsの特許文献2、特許文献11、及び特許文献12を参照されたい。これらの参考文献は引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【0163】

本発明による接触は、好ましくは、ファージディスプレイ法、リボソームディスプレイ法、mRNAディスプレイ法又は細胞表面ディスプレイ法、酵母表面ディスプレイ法又は細菌表面ディスプレイ法等の好適な提示及び選択方法、好ましくはファージディスプレイ法により行われる。徹底した開示のため、以下の参考文献も参照されたい：Hoess, Curr. Opin. Struct. Biol. 3 (1993), 572-579、Wells and Lowmann, Curr. Opin. Struct. Biol. 2 (1992), 597-604、Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins-A Laboratory Manual (1996), Academic Press。上述の方法は当業者に既知であり、本発明によれば、その改良も含めて使用され得る。

20

【0164】

本発明によれば、修飾タンパク質が、所定の結合パートナーに対して定量可能な結合親和性を有するかどうかの決定は、好ましくは以下の1つ又は複数の方法により行うことができる：ELISA、表面プラズモン共鳴分光法、蛍光分光法、FACS、等温滴定熱量測定及び超遠心分析法。

30

【0165】

ファージディスプレイ選択法

本出願に適合されるファージディスプレイ手法の1種は、結合特性を示すユビキチン変異体についての、本発明における選択手法の例として以下に記載される。同様に、例えば、細菌上（細菌表面ディスプレイ、Daugherty et al., 1998, Protein

40

Eng. 11(9):825-832）又は酵母細胞上（酵母表面ディスプレイ、Kieke et al., 1997 Protein

Eng. 10(11):1303-10）へ提示する方法、又はリボソームディスプレイ（Hanes and Plueckthun, 1997 Proc

Natl Acad Sci U S A. 94(10):4937-4942、He and Taussig, 1997 Nucleic Acids Res. 25(24):5132-5134）若しくはcisディスプレイ（Odegrip et al., 2004 Proc Natl Acad Sci U S A.

101(9):2806-2810）、若しくはmRNAディスプレイ等の無細胞選択系を適用することができる。後者の場合、遺伝子型及び表現型の一過性の物理的な結合が、リボソームを介する適切なmRNAへのタンパク質変異体の連結により達成される。

50

【0166】

本明細書に記載されるファージディスプレイ手法において、提示された変異体のコーディングDNAはファージエンベロープ中に一本鎖の形態でパッケージングされて、同時に提示されるのに対し、ユビキチンの組み換え変異体は纖維状ファージ上に提示される。したがって、親和性濃縮の枠組みにおいて、或る特定の特性を有する変異体をライブリーから選択することができ、それらの遺伝子情報を、それぞれ、好適な細菌の感染によって増幅するか、又はその他の濃縮サイクルに付与することができる。ファージ表面上への突然変異ユビキチンの提示は、アミノ末端シグナル配列、好ましくはP e 1 Bシグナル配列、及びファージのキャプシド又は表面タンパク質への遺伝子融合によって達成され、キャプシドタンパク質p I I I又はそのフラグメントへのカルボキシ末端融合が好ましい。さらに、コードされた融合タンパク質は、例えば、アフィニティークロマトグラフィーによる検出及び/又は精製のための親和性タグ若しくは抗体エピトープ、又は親和性濃縮過程における融合タンパク質の特異的開裂のためのプロテアーゼ認識配列等の更なる機能性エレメントを含んでもよい。さらに、アンバー停止コドンは、例えば、ユビキチン変異体に対する遺伝子と、ファージキャプシドタンパク質又はそのフラグメントのコーディング領域との間に存在させてもよく、上記アンバー停止コドンは、部分的な1アミノ酸の挿入により好適なサブレッサー株において翻訳の間認識されない。

10

【0167】

標的分子(例えば、ED-B)に対する結合特性を有するユビキチン変異体の単離との関連で選択手法に好適であり、上述の融合タンパク質に対する遺伝子カセットが挿入された細菌ベクターは、ファージミドと呼ばれる。とりわけ、ファージミドは纖維状ファージ(例えば、M 1 3又はf 1)の遺伝子間領域又はその一部を含み、例えば、M 1 3 K 0 7等のヘルパーファージによりファージミドを輸送する細菌細胞の重複感染の場合に、ファージミドDNAの閉鎖鎖(closed strand)がファージキャプシド中へとパッケージングされる。このように作製されたファージミドは、細菌によって分泌され、キャプシドタンパク質p I I I又はそのフラグメントとの融合により、コードされた各ユビキチン変異体を細菌の表面上に提示する。天然p I I Iキャプシドタンパク質は、好適な細菌株に再感染できるようにファージミド中に存在し、したがって対応するDNAを増幅する可能性は保持される。このため、ユビキチン変異体の表現型、すなわち、その潜在的な結合特性とその遺伝子型との間の物理的結合が確保される。

20

【0168】

得られたファージミドを、当業者に既知の方法により、ファージ上に提示されたユビキチン変異体の標的分子(例えば、ED-B)への結合により選択することができる。この目的のため、提示されたユビキチン変異体を、例えばマイクロタイタープレート上に結合された標的物質に一時的に固定化し、結合していない変異体を分離した後に特異的に溶出することができる。溶出は、例えば100mMトリエチルアミン等の塩基性溶液によって行われることが好ましい。代替的には、溶出を、酸性条件下でのタンパク質分解又は感染細菌の直接的な添加により行うことができる。このようにして得られたファージミドを、標的分子(例えば、ED-B)に対する結合特性を有するユビキチン変異体の選択及び増幅の連続的なサイクルにより、再度増幅し、濃縮することができる。

30

【0169】

この方法で得られるユビキチン変異体の更なる特性評価を、ファージミドの形態(すなわちファージへの融合)、又は好適な発現ベクター中への対応する遺伝子カセットのクローニング後に、可溶性タンパク質の形態で行うことができる。適切な方法は当業者に既知であるか、又は上記文献に記載されている。特性評価には、例えばDNA配列の決定が含まれ、したがって単離された変異体の一次配列の決定を含めることができる。さらに、単離された変異体の親和性及び特異性を、例えば、ELISA又は表面プラズモン共鳴分光法、蛍光分光法、FACS、等温滴定熱量測定、超遠心分析法等の生化学的な標準的方法により検出することができる。安定性分析については、例えば、化学的又は物理的変性についての分光法が当業者に既知である。

40

50

【0170】

リボソームディスプレイ選択法

本発明のリボソームディスプレイ手法の更なる実施形態において、ユビキチン変異体は無細胞転写/翻訳系により調製され、対応するmRNA及びリボソームとともに複合体として提示される。この目的のため、上記DNAライブラリーは基礎として使用され、ここで、変異遺伝子は発現及びタンパク質合成の対応する制御配列との融合体の形態で存在する。遺伝子ライブラリーの3'末端における停止コドンの欠失、及び好適な実験条件(低温、高濃度Mg²⁺)により、新生タンパク質、mRNA及びリボソームからなる三成分複合体はin vitro転写/翻訳の間維持される。

【0171】

各単量体ユビキチンユニットにおいて選択されたアミノ酸を別々に修飾することによってヘテロ二量体修飾ユビキチンタンパク質を含むタンパク質ライブラリーを確立した後に、本発明によれば、修飾二量体タンパク質はED-Bと接触され、結合親和性が存在する場合には、パートナー同士の結合を可能とする。これらのタンパク質ライブラリーは、修飾タンパク質と標的タンパク質との接触が可能な方法で修飾タンパク質を提示する任意の他の方法をディスプレイ、又は使用するディスプレイ法ライブラリーの形態であってもよく、ここで、上記ディスプレイ法は、任意に、ファージディスプレイ法、リボソームディスプレイ法、TATファージディスプレイ法、酵母ディスプレイ法、細菌ディスプレイ法又はmRNAディスプレイ法である。

【0172】

10⁻⁷ ~ 10⁻¹² Mの範囲のKdの特異的な結合親和性による標的分子への結合活性に関する修飾ユビキチン変異体の選択を、当業者に既知の方法により行うことができる。この目的のため、例えば、リボソーム複合体上に提示されたユビキチン変異体を、それぞれ、例えばマイクロタイヤー盤上に結合した標的物質に一時的に固定化することができ、又は溶液中の結合後に磁性粒子へと結合させることができる。非結合変異体の分離後に、結合活性を有する変異体の遺伝子情報を、リボソーム複合体を破壊することによりmRNAの形態で特異的に溶出することができる。溶出は、50 mM EDTAを用いて行なうことが好ましい。このようにして得られたmRNAを単離し、好適な方法(逆転写酵素反応)を使用してDNAに逆転写し、このように得られたDNAを再度増幅することができる。

【0173】

in vitroでの転写/翻訳、選択、及び増幅の連続的なサイクルにより、所定のハプテン又は抗原に対して結合特性を有するユビキチン変異体を濃縮することができる。

【0174】

本発明の好ましい融合タンパク質、例えば、インターフェロン等のエフェクターに融合された、ED-Bに対して特異的なヘテロ二量体ユビキチン系結合タンパク質の使用

インターフェロン、特にインターフェロンアルファ及びインターフェロンベータが抗増殖効果、抗ウイルス効果、及び免疫調節効果を示すことから、インターフェロン、好ましくはインターフェロンアルファ又はインターフェロンベータとの融合タンパク質を、特定の治療に使用することができる。抗増殖部分としてインターフェロンと、腫瘍特異的ターゲッティングドメインとを含む融合タンパク質を、疾患部位(腫瘍)に特異的に方向付けてその部位において作用させることができ、それによりターゲッティングドメインを伴わないインターフェロンを単独で与えることによって生じ得る副作用を軽減する。さらに、ED-Bに対して特異的な修飾ユビキチンヘテロ二量体とインターフェロンとを含む本発明の融合タンパク質は、例えば、治療手段を調製するのに使用される。本発明による融合タンパク質を、例えば、直接エフェクター分子(direct effector molecules)として使用することができる。ED-B抗原が大量に現れる腫瘍の例が表2に示される。

【0175】

表2：腫瘍におけるED-Bの発生

10

20

30

40

50

【表2】

Cancer がん	References (selected examples)	参考文献 (選択例)
Renal cell 腎細胞	Johannsen et al. 2010, <u>Eur J Cancer</u> 46 (16): 2926-2935	
Melanoma 黒色腫	Frey et al. 2011 <u>Exp Dermatol</u> 20 (8):685-8.	
Lymphoma リンパ腫	Schliemann et al. 2009, <u>Leuk Res</u> 33 (12): 1718-1722	
Breast 乳房	Midulla et al. 2000 <u>Cancer Res</u> 60 (1): 164-169	10
Colorectal 結腸直腸	Midulla et al. 2000 <u>Cancer Res</u> 60 (1): 164-169	
Head and Neck 頭頸部	Birchler et al. 2003 <u>Laryngoscope</u> 113 (7): 1231-1237	
Hepatocellular 肝細胞	Menrad and Menssen 2005 <u>Expert Opin Ther Targets</u> 9 (3): 491-500	
Lung 肺	Pedretti 2009 <u>Lung Cancer</u> . 64 (1):28-33	
Osteosarcoma 骨肉腫	Kilian et al. 2004 <u>Bone</u> 35 (6): 1334-1345.	20
Pancreas 膵臓	Wagner et al. 2008 <u>Clin Cancer Res</u> 14 (15): 4951-4960	
Prostate 前立腺	Berndt et al. 2010 <u>Histochem Cell Biol</u> 133 (4):467-75	

【0176】

選択された融合パートナーにより、本発明の医薬組成物は、表2に列挙される腫瘍等のED-Bが豊富ながん又はその他の任意の腫瘍性疾患の治療を対象とするように適合される。本発明の融合タンパク質の使用に最も好ましい適応症は、腎細胞がん、黒色腫、及びリンパ腫であるが、その他の任意の適応症を治療することができる。

【0177】

上記組成物は、治療的に有効な用量を含有するように適合される。投与される用量は、治療される生物、疾患の種類、患者の年齢及び体重、並びにそれ自体既知の更なる要因に依存する。

【0178】

上記組成物は、薬学的に許容可能な担体を含有し、また任意にそれ自体既知の助剤及び賦形剤を更に含有してもよい。これらには、例えば安定化剤、界面活性剤、塩類、緩衝溶液、着色剤等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0179】

上記医薬組成物は、局所塗布用の液体製剤、クリーム、ローションの形態、エアロゾル、粉末、顆粒、錠剤、坐剤、若しくはカプセル剤の形態、乳剤又はリポソーム製剤の形態であってもよい。特に、異なる組成物の組み合わせを使用することもでき、例えば、局所塗布用の液体製剤、クリーム、ローションの形態、エアロゾル、粉末、顆粒、錠剤、坐剤、若しくはカプセル剤の形態、乳剤若しくはリポソーム製剤の形態の本発明の融合タンパク質と、リポソーム製剤のがん治療薬とを適用することができる。上記組成物は、好ましくは滅菌され、非発熱性で等張であり、それ自体既知の薬学的に通常の許容可能な添加剤を含有する。さらに、米国薬局方の規則、又はRemington's Pharmaceutical Sciences, Mac Publishing Company (1990)を参照されたい。

【0180】

10

20

30

40

50

ヒト及び獣医の薬物療法及び予防法の分野において、本発明による修飾された E D - B 結合ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質の少なくとも 1 種を含有する薬学的に有効な医薬を、それ自体知られている方法によって調製することができる。ガレヌス製剤により、これらの組成物を、注射又は点滴により非経口的に、全身的に、直腸に、腹腔内に、筋肉内に、皮下に、経皮的に、又はその他の従来利用される適用方法により投与することができる。医薬製剤の種類は、治療される疾患の種類、疾患の重症度、治療される患者及び医学分野における当業者に既知のその他の要因に依存する。

【 0 1 8 1 】

1 つの実施形態において、医薬組成物は、本発明のタンパク質若しくは融合タンパク質、又はこれらの組み合わせを含有する。その他の実施形態において、医薬組成物は、本発明のタンパク質若しくは融合タンパク質、又はこれらの組み合わせを含有し、1 つ又は複数のがん治療薬を更に含む。本発明の融合タンパク質を、細胞毒性薬と組み合わせて使用することができる。1 つの実施形態において、医薬組成物は、本発明の融合タンパク質、又は 2 以上の本発明の融合タンパク質の組み合わせを含有し、1 つ又は複数のがん治療薬を更に含む。

10

【 0 1 8 2 】

好ましい実施形態において、がん治療薬は、例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、有糸分裂阻害剤及びトポイソメラーゼ阻害剤、細胞毒性抗生物質、抗生物質等の物質群から選択されるが、これらに限定されない。好ましくは、がん治療薬は、C H O P (シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシン、及びプレドニゾロンの組み合わせ)、ビンプラスチン、シタラビン (cytarabine)、ベバシズマブ、腫瘍ワクチン、又は放射性医薬品若しくは細胞増殖抑制剤 (例えば、ドキシル及びアブラキサン) のナノ粒子配合物等、及びアジュvantからなる群より選択される。

20

【 0 1 8 3 】

本発明の融合タンパク質とベバシズマブ、C H O P、及びビンプラスチンとの組み合わせが特に好ましい。本発明の融合タンパク質とベバシズマブとの組み合わせが最も好ましい。

20

【 0 1 8 4 】

さらに、延長された半減期を有するインターフェロンを、特定の腫瘍タンパク質に対して標的化された修飾ユビキチンとの融合に使用することができる。延長された半減期を有するインターフェロンを産生する複数の技法が当該技術分野において知られている。

30

【 0 1 8 5 】

インターフェロン及び特定のウイルスタンパク質に対する結合能を有する修飾ユビキチンによる融合タンパク質は、ウイルス性疾患、特に B 型肝炎、C 型肝炎又はエイズ (H I V) の治療に使用され得る。医薬組成物が肝炎、特に B 型肝炎ウイルス (H B V) 感染症又は C 型肝炎ウイルス (H C V) 感染症の治療用に配合される実施形態において、医薬組成物は、他の医薬、好ましくはリバビリンを更に含んでもよい。延長された半減期を有するインターフェロンを、特定のウイルスタンパク質に対して標的化された修飾ユビキチンとの融合に使用することができる。延長された半減期を有するインターフェロンを産生する幾つかの技法が当該技術分野において知られている。

40

【 0 1 8 6 】

驚いたことに、インターフェロンに融合されたユビキチンヘテロ二量体の融合タンパク質において、好ましくは、融合タンパク質が配列番号 3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、及び 8 5 からなる群より選択される配列を有する場合、治療において有利に適用され得ることが判明した。本発明のインターフェロン融合タンパク質を適用することにより、非毒性であるが、なおも治療的に有効な濃度でインターフェロンを投与することが可能である。前臨床試験では、優れた腫瘍ターゲッティング効果及び望ましい生体内分布が示された。さらに、本発

50

明は、IFN-アルファ活性が融合タンパク質において有効であることを示している。インターフェロンが本発明の腫瘍ターゲッティング融合タンパク質に連結されていることから、疾患部位（例えば、腫瘍部位）において直接的に有効であり、したがって、「遊離」インターフェロン量が大幅に低減することができる（このため、血球減少症（leucopenia）、血小板減少症（thrombopenia）、肝機能不全、自己免疫疾患、鬱病等の副作用を軽減する）。さらに、インターフェロンは抗腫瘍効果で知られている。したがって、本発明の修飾ユビキチンタンパク質等の腫瘍特異的ドメインの融合により、インターフェロンを疾患部位に方向付けることができる。インターフェロンアルファ及びインターフェロンベータは、いずれのタンパク質も同一の受容体に結合し、同等の効果を有することから、特に好みしい。

10

【0187】

インターフェロンの全身性副作用は、本発明による融合タンパク質としてインターフェロンを投与することにより顕著に軽減され得る。したがって、本発明のインターフェロン融合タンパク質を使用することにより、治療効果に到達するインターフェロンの総投与量を大幅に低減することができ、特に他のがん治療薬と組み合わせて全身性の腫瘍治療に有利に使用することができる。

【0188】

更なる実施形態において、医薬組成物は、本発明の融合タンパク質に対する分離された実体を提供する、キットの部品の形態である。その他の実施形態において、医薬組成物は、1つ又は複数のがん治療薬と組み合わされた本発明の融合タンパク質に対する分離された実体を提供する、キットの部品の形態である。

20

【実施例】

【0189】

以下の実施例は、本発明の方法及び組成物をどのように作り、使用するかについての完全な開示及び説明を当業者に提供する限りにおいて提示され、本発明者らが自身の発明と見なしている範囲の制限を意図するものではない。使用される数に関する正確性を確実とする努力が為されてきたが、一部の実験誤差及び偏差が考慮されるべきである。別段の定めがない限り、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、また圧力は大気圧又は大気圧近傍である。

30

【0190】

実施例1. 本発明の融合タンパク質の発現

本発明の融合タンパク質は、ターゲッティングドメインとしての修飾ヘテロ二量体ユビキチン及び少なくとも1つのインターフェロン、好みしくはインターフェロン-アルファからなる。1つの実施形態において、融合タンパク質は、大腸菌において封入体として産生され、*in vitro*リフォールディングの後に精製される。性質決定のため、得られた融合タンパク質製剤を、純度及び均質性について解析した。細胞培養物中でのIFN-アルファ活性、IFN-アルファ受容体結合活性、標的タンパク質ED-Bに対する親和性、選択性及び細胞培養物中での特異的結合を試験した。N末端からC末端が以下の通り配置された融合タンパク質部分を有する融合タンパク質が最も好みしい：修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質-リンカー-IFN、好みしくはIFN-、又はその生物学的に活性な変異タンパク質。特に好みしくはIFN-アルファ、より好みしくはIFN-アルファ2、更に好みしくはIFN-アルファ2a又はIFN-アルファ2bである。

40

【0191】

工程1：融合タンパク質のクローニング用ベクターの產生

融合タンパク質のクローニング用ベクターとして、商業的に入手可能なベクター（例えば、InvitrogenによるpET20b）又は独占所有権を有する発現ベクター（SciL Proteins GmbH、pSCL008b、国際公開第05/061716号を参照）を、IFN-アルファに対するコーディング配列の挿入により修飾した。IFN-アルファ配列は、PCRにより増幅した。修飾ユビキチン配列の挿入を容易にするため、固有の制限酵素認識

50

部位を得られた発現プラスミド中に導入した。

【0192】

工程2：修飾ヘテロ二量体ユビキチン系ED-B融合タンパク質のクローニング

ED-B結合修飾ユビキチン系変異体とIFN-アルファとの融合タンパク質の産生のため、ED-B結合修飾ユビキチンをコードする目的の配列を、標準的な手法に従ってPCRによりプラスミドテンプレートから增幅し、工程1に記載される発現プラスミド中に挿入した。DNA配列解析により、融合タンパク質をコードする発現ベクターの正確な配列を確認した。

【0193】

工程3：修飾ヘテロ二量体ユビキチン系ED-B融合タンパク質の発現

融合タンパク質を大腸菌において産生し、封入体の形態で単離した。融合タンパク質の発現のため、クローンを培養し、各発現ベクターに対応する適切な抗生物質を含有する複合培地中で流加発酵により成長させた。IPTGの添加により発現を誘導した。誘導の2～4時間後に微生物細胞を回収し、懸濁し、そしてフレンチプレスにおける高圧分散によって破壊した。不溶性画分を採取し、発現されたタンパク質を含有する封入体を標準的な洗浄プロトコルによって単離した。

【0194】

実施例2：ユビキチン系IFN-アルファ融合タンパク質のin vitroリフォールディング及び精製

活性な融合タンパク質を、6M塩化グアニジン中に可溶化された封入体材料の急速希釈の後に、温度4でのin vitroリフォールディングにより調製し、一連のクロマトグラフィー工程によって精製した。精製には少なくとも2回のクロマトグラフィー工程を必要とする。これらのクロマトグラフィー工程は、例えば、Octyl-FF上の疎水性相互作用クロマトグラフィーにおける捕捉工程、及び/又は例えばQ-Sepharose HP上のイオン交換クロマトグラフィーを含むものであった。全ての場合において、画分をSDS-PAGE及び分析用HPLCにより純度について解析した。好適な画分を保存し、例えば、rpHPLC、SEC-HPLC、分析用親和性相互作用クロマトグラフィー(analytical

affinity interaction chromatography)、及び表面プラズモン共鳴に基づく相互作用分析(surface

plasmon resonance-based interaction analysis)を含む一連の方法によって均質性及び活性を解析した。融合タンパク質1354-A8-IFNについて、流加発酵からの発現培養物1リットル当たり150mgに及ぶ収率で活性融合タンパク質を得た。他の融合変異体について得られた収率は同等であった。非ターゲッティングUB2-IFNについて、流加発酵からの発現培養物1リットル当たり690mgに及ぶ収率で活性融合タンパク質を得た。

【0195】

実施例3. インターフェロン受容体への融合タンパク質の結合

融合タンパク質のインターフェロン部分へのインターフェロン/受容体の結合を、ELISA設定において精査した。非中和インターフェロン抗体を、Nuncマイクロウェルプレートに2～10μg/mlの濃度で4にて一晩コーティングした。PBS(pH7.4)でこのプレートを洗浄した後、ウェルをPBS中のカゼインプロッキング溶液を用いて室温にて2時間ブロックした。ウェルをPBSTで洗浄した後、融合タンパク質を適切な濃度で室温にて1時間ウェルに加えた。ウェルをPBSTで3回洗浄した。インターフェロン/受容体を、ヒトIgGのFc部分に融合した。このキメラを、0.345μg/mlの濃度でウェルに加え、室温にて1時間インキュベートした。ウェルをPBSTで洗浄した後、Fc特異的抗ヒトIgGのHrp-コンジュゲートを、PBST中の適切な希釈(例えば、1:10000)で加えた。プレートを緩衝溶液PBST300μl/ウェルで3回洗浄した。TMB基質溶液(KEM-EN-Tec)50μlを各ウェルに添加してインキュベートした。1ウェル当たり0.2M H₂SO₄を添加するこ

10

20

30

40

50

とによって反応を停止した。ELISAプレートをTECANのSunrise ELISA-Readerを使用して読み上げた。参照波長として620nmを使用し、450nmで吸光度測定を行った。図5は、融合タンパク質（配列番号55）のインターフェロン部分へのインターフェロン / 受容体の見かけ上のKD値16.7nMという非常に高親和性の結合を明確に示している。この結果は、融合タンパク質のIFN-アルファ受容体結合活性が損なわれていないことを立証している。

【0196】

実施例4：BiacoreアッセイによるヒトED-Bへの融合タンパク質の結合アッセイ

当業者に既知の方法を使用して、CM5-chip（Biacore）上に固定化されたED-Bへの結合に関し、種々の濃度（例えば、0～500nM）の融合タンパク質（1041-D11-IFN）を解析した。得られたデータをBIA evaluationソフトウェア及び1:1-Langmuir-fittingにより処理した。KDは7.25nMであった。結合速度定数は $k_{on} = 4.16 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{off} = 3.01 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であった。

【0197】

実施例5：凍結 / 融解実験

ED-B ELISA：ヒトED-B及びNGFで被覆されたNUNC-medisorpプレートに加えられた増量する（increasing amounts）精製タンパク質は、ネガティブコントロールとしての役割を果たした。1ウェル当たり1～2.5μg/mlの抗原コーティングを4にて一晩行った。PBS、0.1%Tween20（pH7.4）（PBST）でプレートを洗浄した後、ウェルをブロッキング溶液（PBS（pH7.4）、3%BSA、0.5%Tween20）を使用して室温にて2時間ブロックした。ウェルを、PBSTで更に3回洗浄した。その後、種々の濃度の融合タンパク質をウェル中で室温にて1時間インキュベートした。PBSTでウェルを洗浄した後、抗Ubifabフラグメント（a-Ubi-Fab）PODコンジュゲートをPBST中の適切な希釈（例えば、1:6500）で加えた。プレートを緩衝溶液PBST300μl/ウェルで3回洗浄した。各ウェルにTMB基質溶液（KEM-EN-Tec）50μlを添加し、インキュベートした。各ウェルに0.2M H₂SO₄を添加することによって反応を停止した。ELISAプレートをTECANのSunrise ELISA-Readerを使用して読み上げた。参照波長として620nmを使用し、450nmで吸光度測定を行った。

【0198】

表3に、-80での複数回の凍結 / 融解サイクルの後のインターフェロンドメインの機能性及び本発明の融合タンパク質の親和性結合を要約する。試料アリコートを、解析前に3回まで凍結し、そして室温にて融解した。実施例1に記載される濃度依存ELISAにより、インターフェロンドメインの機能性を決定した。ヒトED-Bへの融合タンパク質の結合も、濃度依存ELISAによりアッセイした。インターフェロンドメインの機能性及び記載される融合タンパク質の結合部位の親和性のいずれについても、記載された条件後の検出可能な減少は見られなかった。

【0199】

10

20

30

40

【表3】

No of freeze/thaw steps 凍結／融解工程の回数	Functionality of the interferon-domain [KD value] インターフェロンドメインの機能性 [KD値]	Binding affinity of the fusion protein [KD value] 融合タンパク質の結合親和性 [KD値]
Initial (0x) 初回	27 nM	15.5 nM
1x freeze/thaw 凍結／融解	19 nM	16.2 nM
2x freeze/thaw 凍結／融解	23 nM	20.6 nM
3x freeze/thaw 凍結／融解	18 nM	14.6 nM

10

20

30

40

50

【0200】

実施例6：線維芽細胞に対する本発明の融合タンパク質の特異的ED-B結合

ED-Bは腫瘍及び胚細胞の基質で発現される。Wi38細胞は、ED-Bの高発現を伴う正常ヒト胚性肺線維芽細胞である。低レベルでED-Bを発現する正常成体ヒト皮膚線維芽細胞株をネガティブコントロールとして使用した。本発明の融合タンパク質のED-Bへのin vitroでの結合を解析するため、融合タンパク質1041-D11-IFN、1255-B9-IFN、1353-H6-IFN、1354-A8-F63P-IFN及びUB2-IFN（コントロール）を固定されたWi38細胞に対して調査した。

【0201】

染色実験のため、60000細胞/mlを培養し、その後、冷無水アルコールで固定し、5%ウマ血清でブロッキングし、そして50nMの融合タンパク質1041-D11-IFN、1255-B9-IFN、1353-H6-IFN、1354-A8-IFN及びUB2-IFN又はコントロールとしてのPBSとともにインキュベートした。細胞への融合タンパク質の結合を直接FITC標識抗IFN抗体（PBL、21112-3）により検出した。核をDAPIで染色した。

【0202】

解析は、IFN-アルファ融合がん結合タンパク質が、細胞外マトリクスを含むED-Bに対して高特異性で生体（vital）Wi38細胞に結合することを明確に示している（図6を参照）。特に、1353-H6-IFN及び1354-A8-IFNは、Wi38細胞に対して50nMで強い結合を示すが、正常な線維芽細胞に対してはネガティブ染色である。PBSコントロール及び非結合タンパク質UB2-IFNを用いた染色により、IFN-アルファ抗体の非特異的結合を排除することができる。ネガティブコントロール細胞種NHDfは、低レベルでED-Bフィブロネクチンを発現する、正常な初代線維芽細胞株である。NHDf細胞に対して何らの結合も観察されなかった。

【0203】

実施例7：F9腫瘍切片に対する融合タンパク質のED-B結合の特異性

ED-Bは、腫瘍血管のように新生血管構造の周辺に蓄積する（Tarli et al., 1999, Blood 94: 192-198）。種々の濃度の本発明の融合タンパク質を、F9奇形腫切片に対するED-B結合について比較した。厚さ6μmの切片を、氷冷無水アセトンで固定した。5%ウマ血清によりブロッキングした後、それぞれ、10nM及び50nMの1255-B9-IFN（配列番号56）、1041-D11-IFN（配列番号55）、1353-H6-IFN（配列番号82）、1354-A8-IFN（配列番号84）及びコントロールとして非ターゲッティングタンパク質UB2-IFN（配列番号89）及びPBSとともに、切片をインキュベートした。直接FITC標識抗IFN-アルファ抗体（PBL、21112-3）により融合タンパク質を検出した。CD31（PECAM-1）は、広く使用されている内皮細胞マーカーである。抗マウスCD31抗体（Abcam、a

b 5 6 2 9 9) 1 0 μ g / m l 及び A l e x a 5 9 4 抱合二次抗体を使用して血管を染色した。

【 0 2 0 4 】

図 7 は、 F 9 腫瘍組織に対する 1 0 n M 及び 5 0 n M 濃度での 1 2 5 5 - B 9 - I F N 、 1 3 5 3 - H 6 - I F N 、 1 3 5 4 - A 8 - I F N 及び 1 0 4 1 - D 1 1 - I F N の特異的結合を示す。非ターゲッティング融合タンパク質 U B 2 - I F N 及びコントロール切片 (P B S) において抗 I F N - アルファ抗体の非特異的染色は検出されなかった。 I F N - アルファに融合された全ての結合タンパク質により、顕著な血管との関連性 (vessel association) が示された。この結果は、融合タンパク質の高特異的ターゲッティング機能を明確に示している。

10

【 0 2 0 5 】

実施例 8 : 本発明の種々の融合タンパク質のエフェクタードメインの活性アッセイ

本発明の融合タンパク質の生理学的 I F N - アルファ活性を解析するため、 I S R E - R e p o r t e r G e n e A s s a y を確立した。 I F N - アルファは、 I S G 5 4 のようなインターフェロン刺激遺伝子 (interferon-stimulated genes) (I S G) を誘導することができる。 I S G 5 4 は、そのプロモーター中に遺伝子の誘導性発現を担うシス作用エレメント (T A G T T T C A C T T T C C C 、配列番号 8 6) を含む。このエレメントは、 I S R E エレメント (I F N 刺激応答エレメント) と呼ばれる。 I S R E エレメントの 5 つのタンデムコピーを基本的なプロモーター-エレメント (T A T A ボックス) 及び p G L 4 . 2 7 - L u c 2 プラスミド (Promega) のルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入した。子宮頸癌細胞株である H e l a 細胞に遺伝子導入を行い、細胞プールを、ハイグロマイシンを用いた選択によって維持した。本発明の I F N - アルファ融合タンパク質の I F N - アルファ活性を観察するため、受容体細胞を I S R E - R e p o r t e r G e n e A s s a y に使用した。

20

【 0 2 0 6 】

1 0 % F C S を含有する好適な培地中に細胞を再懸濁した。 5 % F C S を含有する培地中の $3 \times 1 0^5$ 細胞 / m l の密度の細胞懸濁物を、白色の 9 6 ウェル細胞培養プレートに播種した。 2 4 時間後、一定の濃度範囲 (例えば、 $3 \times 1 0^{-1 0} \sim 4 . 6 \times 1 0^{-1 4}$ M) の融合タンパク質で細胞を処理した。代謝活性を O N E - G l o (商標) ルシフェラーゼ基質 (Promega) により測定した。アッセイを検証するために、組み換えヒト I F N - アルファ 2 b (Biomol) の用量範囲を試験することによって、本発明の融合タンパク質の各試験を比較した。定量的評価は、 P L A 2 . 0 ソフトウェアによる平行線法による I F N - アルファ 2 b 標準に対する相対力値に基づく。 3 回繰り返して力値を決定した。融合タンパク質は、内部標準に対して 7 . 9 ~ 2 2 . 7 % の力値を有する。 I F N - アルファ 2 b の力値は $1 0 0 \% \pm 2 0 \%$ の範囲内にあり、 4 パラメーターロジスティック法により算出された平均 E C 5 0 は $2 . 3 \pm 0 . 4$ p M である (表 4 を参照) 。

30

【 0 2 0 7 】

表 4 に融合タンパク質の親和性及び活性解析の結果を要約する。

【 0 2 0 8 】

表 4 : 融合タンパク質の解析

40

【表4】

	標的ED-Bに対する特異的親和性 Specific affinity against target ED-B [K _D via Biacore]	ISREレポーター遺伝子アッセイ における特異的活性(比活性) [%力値] Specific activity in ISRE reporter gene assay [% potency]	IFN受容体ELISAにおける特異的活性(比活性) Specific activity in IFN receptor ELISA [K _D]	
1041-D11-IFN (SEQ ID NO: 55)	7 nM	18.7 ± 1.98	10.2 nM	
1255-B9-IFN (SEQ ID NO: 56)	76 pM	9.5 ± 1.56	7.6 nM	
1353-H6-IFN (SEQ ID NO: 82)	26 pM	7.9 ± 0.71	17.1 nM	10
1354-A8-IFN (SEQ ID NO: 84)	139 pM	22.7 ± 1.00	22.0 nM	

【配列表フリーテキスト】

【0209】

添付の配列表に示される配列番号1、2及び8～18による配列は、フリーテキスト情報を含んでいない。但し、これらの配列についても簡単な説明を以下に提示する。

配列番号1：ユビキチン

配列番号2：フィブロネクチンのエキストラドメインB(ED-B)

配列番号3：リンカー配列

配列番号4：リンカー配列

配列番号5：リンカー配列

配列番号6：リンカー配列

配列番号7：リンカー配列

配列番号8：ヒトIFN-アルファ-2a

配列番号9：シグナルペプチドを有するヒトIFN-アルファ-2a

配列番号10：ヒトIFN-アルファ-2b

配列番号11：ヒトIFN-アルファ-2c

配列番号12：ヒトIFN-アルファ-6

配列番号13：ヒトIFN-アルファ-14

配列番号14：ヒトIFN-アルファ-4

配列番号15：ヒトIFN-アルファ-5

配列番号16：マウスIFN-アルファ-2

配列番号17：ラットIFN-アルファ-1

配列番号18：ウサギIFN-アルファ

配列番号19：1041-D11、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号20：1255-B9、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号21：1255-B10、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号22：1247-G11、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号23：1255-G12、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号24：1247-F8、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号25：1237-B10、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号26：1237-H4、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号27：1239-B10、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号28：1246-H5、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号29：1247-G1、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号30：1247-H2、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号31：1248-E1、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号32：1249-E5、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

配列番号33：1253-A11、修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質

10

20

30

40

50

配列番号 3 4 :	1 2 5 5 - A 8 、 修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質	
配列番号 3 5 :	1 2 5 5 - G 3 、 修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質	
配列番号 3 6 :	1 2 5 5 - H 3 、 修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質	
配列番号 3 7 :	融合タンパク質 I FN - 1 0 4 1 - D 1 1	
配列番号 3 8 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 5 5 - B 9	
配列番号 3 9 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 5 5 - B 1 0	
配列番号 4 0 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 4 7 - G 1 1	
配列番号 4 1 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 5 5 - G 1 2	
配列番号 4 2 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 4 7 - F 8	
配列番号 4 3 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 3 7 - B 1 0	10
配列番号 4 4 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 3 7 - H 4	
配列番号 4 5 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 3 9 - B 1 0	
配列番号 4 6 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 4 6 - H 5	
配列番号 4 7 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 4 7 - G 1	
配列番号 4 8 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 4 7 - H 2	
配列番号 4 9 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 4 8 - E 1	
配列番号 5 0 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 4 9 - E 5	
配列番号 5 1 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 5 3 - A 1 1	
配列番号 5 2 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 5 5 - A 8	
配列番号 5 3 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 5 5 - G 3	20
配列番号 5 4 :	融合タンパク質 I FN - 1 2 5 5 - H 3	
配列番号 5 5 :	融合タンパク質 1 0 4 1 - D 1 1 - I FN	
配列番号 5 6 :	融合タンパク質 1 2 5 5 - B 9 - I FN	
配列番号 5 7 :	融合タンパク質 1 2 5 5 - B 1 0 - I FN	
配列番号 5 8 :	融合タンパク質 1 2 4 7 - G 1 1 - I FN	
配列番号 5 9 :	融合タンパク質 1 2 5 5 - G 1 2 - I FN	
配列番号 6 0 :	融合タンパク質 1 2 4 7 - F 8 - I FN	
配列番号 6 1 :	融合タンパク質 1 2 3 7 - B 1 0 - I FN	
配列番号 6 2 :	融合タンパク質 1 2 3 7 - H 4 - I FN	
配列番号 6 3 :	融合タンパク質 1 2 3 9 - B 1 0 - I FN	30
配列番号 6 4 :	融合タンパク質 1 2 4 6 - H 5 - I FN	
配列番号 6 5 :	融合タンパク質 1 2 4 7 - G 1 - I FN	
配列番号 6 6 :	融合タンパク質 1 2 4 7 - H 2 - I FN	
配列番号 6 7 :	融合タンパク質 1 2 4 8 - E 1 - I FN	
配列番号 6 8 :	融合タンパク質 1 2 4 9 - E 5 - I FN	
配列番号 6 9 :	融合タンパク質 1 2 5 3 - A 1 1 - I FN	
配列番号 7 0 :	融合タンパク質 1 2 5 5 - A 8 - I FN	
配列番号 7 1 :	融合タンパク質 1 2 5 5 - G 3 - I FN	
配列番号 7 2 :	融合タンパク質 1 2 5 5 - H 3 - I FN	
配列番号 7 3 :	リンカー配列 R I G	40
配列番号 7 4 :	1 3 5 3 - H 6 、 修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質	
配列番号 7 5 :	1 3 5 1 - E 9 、 修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質	
配列番号 7 6 :	1 3 5 4 - A 8 、 修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質	
配列番号 7 7 :	1 3 5 1 - E 9 _ F 6 3 P 、 修飾ヘテロ二量体ユビキチンタンパク質	
配列番号 7 8 :	融合タンパク質 I FN - 1 3 5 3 - H 6	
配列番号 7 9 :	融合タンパク質 I FN - 1 3 5 1 - E 9	
配列番号 8 0 :	融合タンパク質 I FN - 1 3 5 4 - A 8 _ F 6 3 P	
配列番号 8 1 :	融合タンパク質 I FN - 1 3 5 1 - E 9 _ F 6 3 P	
配列番号 8 2 :	融合タンパク質 1 3 5 3 - H 6 - I FN	
配列番号 8 3 :	融合タンパク質 1 3 5 1 - E 9 - I FN	50

配列番号 8 4 : 融合タンパク質 1 3 5 4 - A 8 - I F N
 配列番号 8 5 : 融合タンパク質 1 3 5 1 - E 9 _ F 6 3 P - I F N
 配列番号 8 6 : シス作用エレメント
 配列番号 8 7 : 基本リンカー配列
 配列番号 8 8 : 基本リンカー配列
 配列番号 8 9 : 融合タンパク質 U B 2 - I F N
 配列番号 9 0 : 融合タンパク質 I F N - U B 2
 配列番号 9 1 : ユビキチン変異タンパク質 (F 4 5 W / G 7 5 A / G 7 6 A) 、突然変異誘発の開始配列

【図1】

```

P01563 IFNa-2a 1 -----cdlpqthslgsrrtlmlaqmrkislfsc1kdrhdfgfpqeeefgnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdssaaaw
P01563 IFNa-2a 1 maltfallvallylsckscsvgcdlpqthslgsrrtlmlaqmrkislfsc1kdrhdfgfpqeeefgnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdssaaaw
P01563 IFNa-2b 1 -----cdlpqthslgsrrtlmlaqmrkislfsc1kdrhdfgfpqeeefgnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdssaaaw
P01563 IFNa-2c 1 -----cdlpqthslgsrrtlmlaqmrkislfsc1kdrhdfgfpqeeefgnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdssaaaw

P01563 IFNa-2a 77 det1ldkfytelyqqlndleacviqgvgvteplmkedsilavrkypqriflylkekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske
P01563 IFNa-2a 100 det1ldkfytelyqqlndleacviqgvgvteplmkedsilavrkypqriflylkekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske
P01563 IFNa-2b 77 det1ldkfytelyqqlndleacviqgvgvteplmkedsilavrkypqriflylkekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske
P01563 IFNa-2c 77 det1ldkfytelyqqlndleacviqgvgvteplmkedsilavrkypqriflylkekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske

P01563 IFNa-2a 1 maltfallvallylsckscsvgcdlpqthslgsrrtlmlaqmrkislfsc1kdrhdfgfpqeeefgnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdssaaaw
P01563 IFNa-6 1 malpfallmalvvlsccksc1cdlpqthslgsrrtlmlaqmrkislfsc1kdrhdfgfpqeeefgnqfqkaealsvlhev1qqtfnlfstkdssvaw
P01570 IFNa-14 1 malpfallmalvvlsccksc1cdlpqthslgsrrtlmlaqmrkislfsc1kdrhdfgfpqeeefgnqfqkaealsvlhemmnqgtfnlfstknssaaaw
P05014 IFNa-4 1 malpfsllmalvvlsc1cdlpqthslgsrrtlmlaqmrkislfsc1kdrhdfgfpqeeefgnqfqkaealsvlhemiqqifnlfstkdssaaaw
P01569 IFNa-5 1 malpfsllmalvvlsc1cdlpqthslgsrrtlmlaqmrkislfsc1kdrhdfgfpqeeefgnqfqkaealsvlhemiqqifnlfstkdssaaaw

P01563 IFNa-2a 100 det1ldkfytelyqqlndleacviqgvgvteplmkedsilavrkypqriflylkekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske
P05013 IFNa-6 101 det1ldkfytelyqqlndleacvmevvvvgplmkedsilavrkypqriflyltekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske
P01570 IFNa-14 101 det1ldkfytelyqqlndleacviqgvgvteplmkedsilavrkypqriflylkekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske
P05014 IFNa-4 101 eqgilekfstelyqqlndleacviqgvgvteplmkedsilavrkypqriflyltekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske
P01569 IFNa-5 101 det1ldkfytelyqqlndleacmmeqgvgvteplmkedsilavrkypqriflyltekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske

P01563 IFNa-2a 1 maltfallvallylsckscsvgcdlpqthslgsrrtlmlaqmrkislfsc1kdrhdfgfpqeeefgnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdssaaaw
P01573 IFNA2 MOUSE 1 marlaclflmliwvmswy1ic1gcdphlynlrkfalkvlagmrplf1fs1kdrqgf1gfpfekv-dngqkqaq1ipvlrdltgq1nlftskas
P05011 IFNA1 RAT 1 marlaclflmliwvsvy1accl1cdphthnlrnkvftllagmr1sp1sc1kdrqgf1gfpfekv-dngqkqaq1ipvlheltgq1nlftskes
Q75T05_RABIT(frag.) 1 -----sc1kdrqgf1gfpfekv-dngqkqaq1ipvlh1g1l1y1t1xds

P01563 IFNa-2a 96 saawdet1ldkfytelyqqlndleacviqgvgvteplmkedsilavrkypqriflylkekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske---
P01573 IFNA2 MOUSE 97 saawnat1ldsfcdndihq1nd1q1t1m1q1gvq1p1t1q1d1llavrkypqriflylkekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske---
P05011 IFNA1 RAT 97 stawdat1ldsfcdnd1q1q1s1q1a1clm1q1gvq1p1t1q1d1llavrkypqriflylkekkysspcaewvraeimrsfs1stnlqeslske
Q75T05_RABIT(frag.) 47 saawdat1ldsfcdnd1q1q1s1q1a1clm1q1gvq1p1t1q1d1llav

```

Underlined: signal peptide

【 図 2 A - 1 】

IFN-1041-D11	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1255-B9	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1255-B10	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1247-G11	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1255-G12	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1247-F8	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1237-B10	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1237-B4	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1239-B10	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1246-H5	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1247-G1	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1247-H2	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1249-E1	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1249-E5	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1253-A11	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1255-A8	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1255-G3	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1255-H3	1	mcldpqrhslgsrrtlmlagmrslsfcslkdrhdgfpqeeqgnfqkkaeipvlhemiqqifnlstksdssawdell1dkfytely
IFN-1041-D11	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1255-B9	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1255-B10	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1247-G11	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1255-G12	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1247-F8	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1237-B10	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1237-H4	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1239-B10	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1246-H5	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1247-G1	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1247-H2	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1248-E1	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1249-E5	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1253-A11	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1255-A8	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1255-G3	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt
IFN-1255-H3	91	qqndldeacvqgyvttplmkedsilavrkfqriflylkkekkyspcawvvraemrsfs1stnlqeslrskzsgggmgtwhlt

【 図 2 A - 2 】

IFN-1041-D11 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1255-B10 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1255-B10 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1247-G11 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1255-G12 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1247-F8 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1237-B10 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1237-H4 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1239-B10 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1246-H5 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1247-G1 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1247-H1 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1248-E1 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1249-E5 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1253-A11 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1255-A8 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1255-G3 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps
IFN-1255-H3 181 gktilevepsdtienvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdynifk1h1vlvrlraaagqmgifvhtwtktileveps

IFN-1041-D11 271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwsnwlh1vlvrlraa (SEQ ID NO: 37)
271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwqaplh1vlvrlraa (SEQ ID NO: 38)
IFN-1255-B10 271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwqaplh1vlvrlraa (SEQ ID NO: 39)
271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwqaplh1vlvrlraa (SEQ ID NO: 40)
IFN-1255-G12 271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwsgef1h1vlvrlraa (SEQ ID NO: 41)
271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwhnd1h1vlvrlraa (SEQ ID NO: 42)
IFN-1237-B10 271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwhnd1h1vlvrlraa (SEQ ID NO: 43)
271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwpdns1h1vlvrlraa (SEQ ID NO: 44)
IFN-1237-H4 271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwpdns1h1vlvrlraa (SEQ ID NO: 45)
271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwyqaplh1vlvrlraa (SEQ ID NO: 46)
IFN-1246-H5 271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwyqaplh1vlvrlraa (SEQ ID NO: 47)
271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwhdf1h1vlvrlraa (SEQ ID NO: 48)
IFN-1247-H2 271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwhdf1h1vlvrlraa (SEQ ID NO: 49)
271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwyqaplh1vlvrlraa (SEQ ID NO: 50)
IFN-1249-E8 271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwyqaplh1vlvrlraa (SEQ ID NO: 51)
271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwyqaplh1vlvrlraa (SEQ ID NO: 52)
IFN-1253-A11 271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwyqaplh1vlvrlraa (SEQ ID NO: 53)
271 dtenvakaqidkegippdqgrliwagkledgrtlstdyniwyqaplh1vlvrlraa (SEQ ID NO: 54)

【习题 2 B】

IFN-1353-H6	1	mcldlpqthsgsrrtlmllaqmrriislfsc1kdrhdfgfpqeeqgnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdkdssaawdet
IFN-1351-E9	1	mcldlpqthsgsrrtlmllaqmrriislfsc1kdrhdfgfpqeeqgnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdkdssaawdet
IFN-1354-A8	1	mcldlpqthsgsrrtlmllaqmrriislfsc1kdrhdfgfpqeeqgnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdkdssaawdet
IFN-1351-E9_F63P	1	mcldlpqthsgsrrtlmllaqmrriislfsc1kdrhdfgfpqeeqgnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdkdssaawdet
IFN-1353-H6	81	lldkfytelyqqlndldeacviqgvgvtetplmkedsilavrkyfqritylkekkypscawevvraeimrsfslstnlqe
IFN-1351-E9	81	lldkfytelyqqlndldeacviqgvgvtetplmkedsilavrkyfqritylkekkypscawevvraeimrsfslstnlqe
IFN-1354-A8	81	lldkfytelyqqlndldeacviqgvgvtetplmkedsilavrkyfqritylkekkypscawevvraeimrsfslstnlqe
IFN-1351-E9_F63P	81	lldkfytelyqqlndldeacviqgvgvtetplmkedsilavrkyfqritylkekkypscawevvraeimrsfslstnlqe
IFN-1353-H6	161	slrskesggggmwiwhtltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynin nfkls hl
IFN-1351-E9	161	slrskesggggmwiwhtltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynin nfkls hl
IFN-1354-A8	161	slrskesggggmwiwhtltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynin nfkls hl
IFN-1351-E9_F63P	161	slrskesggggmwiwhtltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynin nfkls hl
IFN-1353-H6	241	vlrlraagigmqifvhtqtgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdyni gwqap hlv
IFN-1351-E9	241	vlrlraagigmqifvhtqtgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdyni gwqap hlv
IFN-1354-A8	241	vlrlraagigmqifvhtqtgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdyni gwqap hlv
IFN-1351-E9_F63P	241	vlrlraagigmqifvhtqtgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdyni gwqap hlv
IFN-1353-H6	321	lrlraa (SEQ ID NO: 78)
IFN-1351-E9	321	lrlraa (SEQ ID NO: 79)
IFN-1354-A8	321	lrlraa (SEQ ID NO: 80)
IFN-1351-E9_F63P	321	lrlraa (SEQ ID NO: 81)

【図3A-1】

1041-D11-IFN 1 mqifvw~~twt~~gktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~rkfp~~lhvlvlrlrgggigm
 1255-B9-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1255-B10-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1247-G11-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1255-G12-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1247-F8-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1237-B10-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1237-R4-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1239-B10-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1246-H5-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1247-G1-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1247-H2-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1248-E1-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1249-E5-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqd~~reg~~ippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1253-A11-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1255-A8-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1255-G3-IFN 1 mti~~w~~hltgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~
 1255-H3-IFN 1 mqifvg~~tg~~gktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~nfkls~~lhvlvlrlraa~~gigm~~

 1041-D11-IFN 81 r~~ifvtt~~tgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~wsnwe~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1255-B9-IFN 81 qifv~~ht~~tgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~gwqap~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1255-B10-IFN 81 qifv~~atpt~~tgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~gwqsp~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1247-G11-IFN 81 qifv~~rth~~tgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~gwqsp~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1255-G12-IFN 81 qifv~~tyt~~tgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~wsgef~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1247-F8-IFN 81 qifv~~lth~~tgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~wnkd~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1237-B10-IFN 81 qifv~~hbt~~tgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~whdml~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1237-H4-IFN 81 qifv~~sty~~tgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkq~~lad~~grtlsdyni~~wpgdm~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1239-B10-IFN 81 qifv~~dtpt~~tgktitlevepsdtienvkakiqd~~k~~gippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~grlpk~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1246-H5-IFN 81 qifv~~ht~~tgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~gyqap~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1247-G1-IFN 81 qifv~~tynt~~tgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~wqdf~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1247-H2-IFN 81 qifv~~dtpt~~tgktitlevepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~whdf~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1248-E1-IFN 81 qifv~~htetg~~ktl~~g~~vepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~gyqvp~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1249-E5-IFN 81 qifv~~dtptg~~ktl~~g~~vepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~drlpv~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1253-A11-IFN 81 qifv~~statg~~ktl~~g~~vepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~gwqap~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1255-A8-IFN 81 qifv~~ltdtg~~ktl~~g~~vepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~gwqsp~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1255-G3-IFN 81 qifv~~ltttg~~ktl~~g~~vepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~gwqsp~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~
 1255-H3-IFN 81 qifv~~htw~~ek~~t~~ktl~~g~~vepsdtienvkakiqdkegippdqgrliwagkqledrtlsdyni~~gyqap~~lhvlvlrlraa~~asgggg~~

【図3A-2】

1041-D11-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1255-B9-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1255-B10-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1247-G11-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1255-G12-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1247-F8-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1237-B10-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1237-H4-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1239-B10-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1246-H5-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1247-G1-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1247-H2-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1248-E1-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1249-E5-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1253-A11-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1255-A8-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1255-G3-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~
 1255-H3-IFN 161 cd~~lp~~gthls~~g~~sr~~rt~~l~~ml~~la~~qm~~rr~~is~~l~~fc~~l~~kd~~rh~~df~~g~~f~~peef~~gnqf~~q~~ka~~t~~ip~~vl~~hem~~ig~~g~~fn~~l~~fst~~kd~~ss~~aw~~det~~l~~

1041-D11-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~ms~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 55)
 1255-B9-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 56)
 1255-B10-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 57)
 1247-G11-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 58)
 1247-F8-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 59)
 1237-B10-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 60)
 1237-H4-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 61)
 1239-B10-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 62)
 1246-H5-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~cl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 63)
 1247-G1-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~cl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 64)
 1247-H2-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~cl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 65)
 1247-F8-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~cl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 66)
 1248-E1-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 67)
 1249-E5-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 68)
 1253-A11-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 69)
 1255-A8-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 70)
 1255-G3-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 71)
 1255-H3-IFN 241 ldk~~f~~ty~~ly~~g~~q~~lnd~~le~~ac~~av~~l~~q~~g~~v~~y~~tt~~pl~~mk~~ed~~si~~l~~av~~r~~ky~~f~~q~~ri~~tl~~l~~ke~~kk~~y~~sp~~ca~~ve~~vv~~ra~~ei~~im~~rs~~f~~sl~~tn~~l~~ges~~rs~~ke (SEQ ID NO: 72)

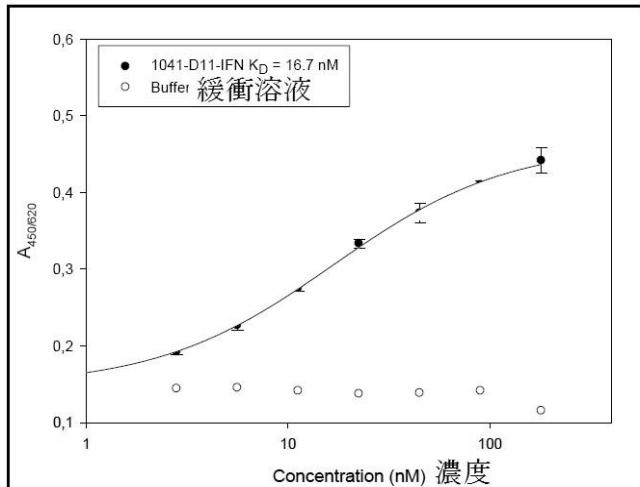
【図3B】

1353-H6-IFN 1 **mviwvhtltgktilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtsdyninfkls** lhlvlrlraagigm
 1351-E9-IFN 1 **mkiwvhtltgktilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtsdyninfkls** lhlvlrlraagigm
 1354-A8 -IFN 1 **mxiwvhtltgktilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtsdyninfkls** lhlvlrlraagigm
 1351-E9_F63P-IFN 1 **mkiwvhtltgktilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtsdyninfkls** lhlvlrlraagigm
 1353-H6-IFN 81 **qifvhtqtgktilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtsdynigwqap** lhlvlrlraasgggg
 1351-E9-IFN 81 **qifvhtqtgktilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtsdynigwqap** lhlvlrlraasgggg
 1354-A8 -IFN 81 **qifvhtqtgktilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtsdynigwqap** lhlvlrlraasgggg
 1351-E9_F63P-IFN 81 **qifvhtqtgktilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtsdynigwqap** lhlvlrlraasgggg
 1353-H6-IFN 161 **cdlpqthslgsrtrtlmlaqmrriislfscldrhdfgfpqeefnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdssaawdetl**
 1351-E9-IFN 161 **cdlpqthslgsrtrtlmlaqmrriislfscldrhdfgfpqeefnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdssaawdetl**
 1354-A8 -IFN 161 **cdlpqthslgsrtrtlmlaqmrriislfscldrhdfgfpqeefnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdssaawdetl**
 1351-E9_F63P-IFN 161 **cdlpqthslgsrtrtlmlaqmrriislfscldrhdfgfpqeefnqfqkaetipvlhemiqqifnlfstkdssaawdetl**
 1353-H6-IFN 241 **ldkfytelyqqlndleacvivgvgvtetplmkedsilavrkyfqritylkekkypscawvvraeimrsfslstnlqes**
 1351-E9-IFN 241 **ldkfytelyqqlndleacvivgvgvtetplmkedsilavrkyfqritylkekkypscawvvraeimrsfslstnlqes**
 1354-A8 -IFN 241 **ldkfytelyqqlndleacvivgvgvtetplmkedsilavrkyfqritylkekkypscawvvraeimrsfslstnlqes**
 1351-E9_F63P-IFN 241 **ldkfytelyqqlndleacvivgvgvtetplmkedsilavrkyfqritylkekkypscawvvraeimrsfslstnlqes**
 1353-H6-IFN 321 *lrske* (SEQ ID NO: 82)
 1351-E9-IFN 321 *lrske* (SEQ ID NO: 83)
 1354-A8 -IFN 321 *lrske* (SEQ ID NO: 84)
 1351-E9_F63P-IFN 321 *lrske* (SEQ ID NO: 85)

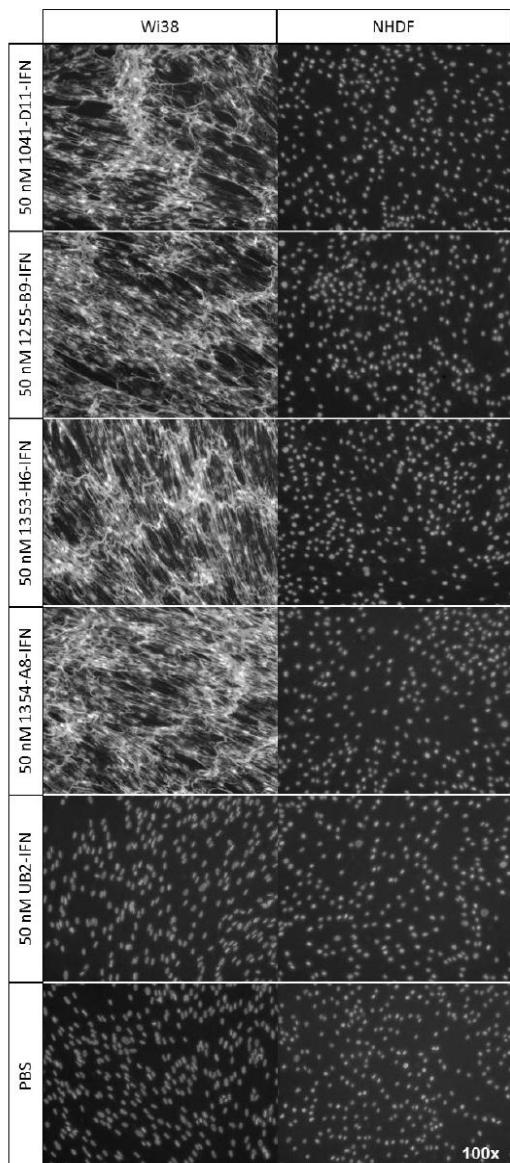
【図4】

2	4	6	8	62	63	64	65	66	6'	8'	62'	63'	64'	65'	66'
T	W	H	L	N	F	K	L	S	H	P	G	W	Q	D	P
									D	Q	W	Y	H	S	F
									L					A	

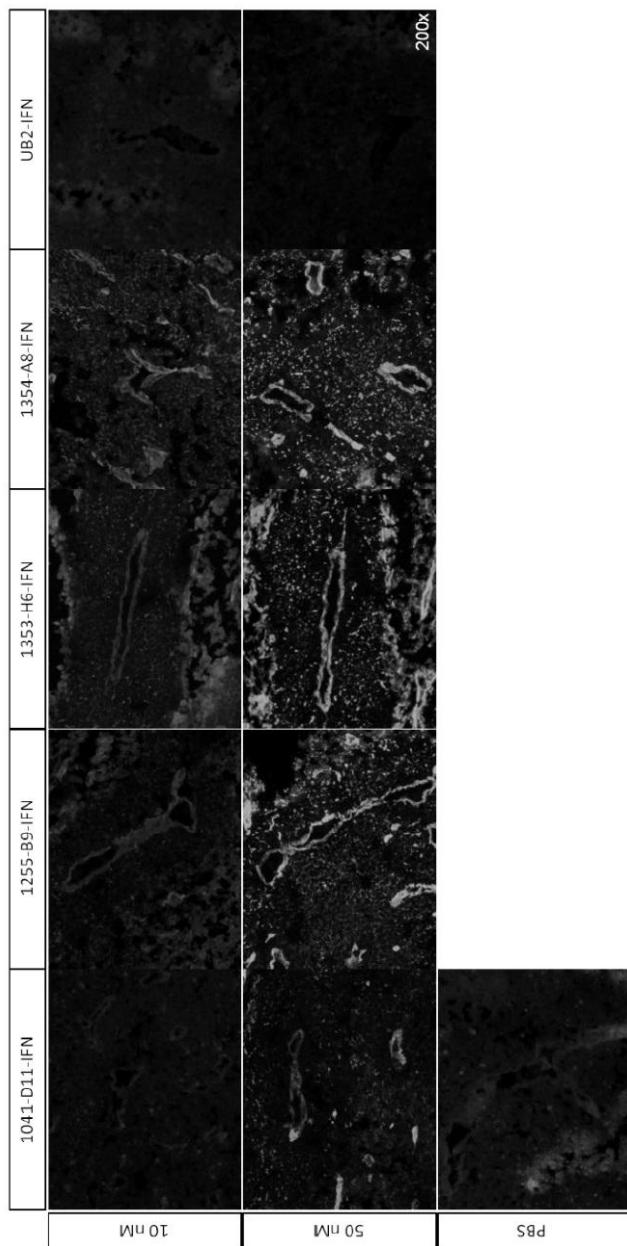
【図5】



【図6】



【図7】



【配列表】

2014523238000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/061459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/00 C12N15/10
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CARNEMOLLA BARBARA ET AL: "Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 99, no. 5, 1 March 2002 (2002-03-01), pages 1659-1665, XP002256864, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD.V99.5.1659 page 1659, column 1, paragraph 1 - page 1660, column 1, paragraph 2 page 1664, column 2, paragraph 2	1-30, 33-35
A	----- page 1659, column 1, paragraph 1 - page 1660, column 1, paragraph 2 page 1664, column 2, paragraph 2	31,32
Y	WO 2004/106368 A1 (SCIL PROTEINS GMBH [DE]; FIEDLER MARKUS [DE]; FIEDLER ULRIKE [DE]; RUD) 9 December 2004 (2004-12-09)	1-30, 33-35
A	page 13 - page 14 page 6 - page 7	31,32
	----- -/-	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" 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)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" 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

"X" 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

"V" 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

14 September 2012

24/09/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Voigt-Ritzen, Heike

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/061459

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/022759 A2 (EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE [CH]; GRABULOVSKI DRAGAN [CH]; NERI DARIO []) 28 February 2008 (2008-02-28) examples 1,3,4 page 8, paragraph 2 -----	1-35
A	SKERRA ET AL: "Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 18, no. 4, 14 September 2007 (2007-09-14), pages 295-304, XP022244962, ISSN: 0958-1669, DOI: 10.1016/J.COPBIO.2007.04.010 the whole document -----	1-35
X,P	WO 2011/073208 A1 (SCIL PROTEINS GMBH [DE]; STEUERNAGEL ARND [DE]; FIEDLER ERIK [DE]; FIE) 23 June 2011 (2011-06-23) the whole document -----	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/061459

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2004106368	A1 09-12-2004	AT 499382	T 15-03-2011	
		AU 2004242851	A1 09-12-2004	
		CA 2524899	A1 09-12-2004	
		CN 1956996	A 02-05-2007	
		DE 10324447	A1 30-12-2004	
		DK 1626985	T3 14-06-2011	
		EP 1626985	A1 22-02-2006	
		EP 2163559	A1 17-03-2010	
		EP 2295446	A1 16-03-2011	
		ES 2361409	T3 16-06-2011	
		JP 4803817	B2 26-10-2011	
		JP 2008500953	A 17-01-2008	
		JP 2011046722	A 10-03-2011	
		JP 2011201893	A 13-10-2011	
		PT 1626985	E 25-05-2011	
		US 2006099686	A1 11-05-2006	
		US 2008171851	A1 17-07-2008	
		WO 2004106368	A1 09-12-2004	
-----	-----	-----	-----	-----
WO 2008022759	A2 28-02-2008	AU 2007287807	A1 28-02-2008	
		CA 2661160	A1 28-02-2008	
		CN 101506230	A 12-08-2009	
		EP 1892248	A1 27-02-2008	
		EP 2054432	A2 06-05-2009	
		JP 2010500875	A 14-01-2010	
		KR 20090053926	A 28-05-2009	
		NZ 574889	A 25-11-2011	
		RU 2009110180	A 27-09-2010	
		US 2010119446	A1 13-05-2010	
		WO 2008022759	A2 28-02-2008	
-----	-----	-----	-----	-----
WO 2011073208	A1 23-06-2011	AU 2010332932	A1 10-05-2012	
		AU 2010332938	A1 10-05-2012	
		CA 2778871	A1 23-06-2011	
		CA 2778872	A1 23-06-2011	
		CA 2782093	A1 23-06-2011	
		EP 2367843	A1 28-09-2011	
		EP 2379581	A2 26-10-2011	
		KR 20110111304	A 10-10-2011	
		WO 2011073208	A1 23-06-2011	
		WO 2011073209	A1 23-06-2011	
		WO 2011073214	A2 23-06-2011	
-----	-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
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	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	F
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA

(72)発明者 ネルカンプ,ヨルク

ドイツ,0 6 1 2 0 ハレ,ハインリヒ-ダメロー-エステーエル. 1,ツェー/オー スキル
プロテインズ ゲーエムベーハー

(72)発明者 ハンスゲン,イルカ

ドイツ,0 6 1 2 0 ハレ,ハインリヒ-ダメロー-エステーエル. 1,ツェー/オー スキル
プロテインズ ゲーエムベーハー

(72)発明者 ランゲ,クリスチアン

ドイツ,0 6 1 2 0 ハレ,ハインリヒ-ダメロー-エステーエル. 1,ツェー/オー スキル
プロテインズ ゲーエムベーハー

(72)発明者 グローサー,マンヤ

ドイツ,0 6 1 2 0 ハレ,ハインリヒ-ダメロー-エステーエル. 1,ツェー/オー スキル
プロテインズ ゲーエムベーハー

(72)発明者 シュトイアナーゲル,アント

ドイツ,0 6 1 2 0 ハレ,ハインリヒ-ダメロー-エステーエル. 1,ツェー/オー スキル
プロテインズ ゲーエムベーハー

(72)発明者 パーチャ,アンチュ

ドイツ,0 6 1 2 0 ハレ,ハインリヒ-ダメロー-エステーエル. 1,ツェー/オー スキル
プロテインズ ゲーエムベーハー

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA23 BA24 CA01 CA11 CA20 DA01 DA02 DA06 DA11

EA04 GA11 HA01 HA08 HA11

4B064 AG01 AG09 AG10 BJ12 CA01 CA02 CA05 CA10 CA11 CA19
CC24 CE02 CE10 DA01

4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X AA90X AB01 AC14 BA01 CA44

4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 AA19 BA02 DA21 MA02 NA05 NA14
ZB261 ZB262 ZB321 ZC751

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA16 DA17 EA20 FA74
GA21