

修正  
補充  
年 月 日  
86. 7. -8

附件

本 告 公

申請日期	84 年 10 月 4 日
案 號	84110504
類 別	C07K14/52. 16/64, C12N15/19, A61K38/19

A4  
C4

(以上各欄由本局填註)

464656

發 明 專 利 說 明 書 (修正本)  
新 型

一、發明 名稱	中 文	誘使干擾素-γ製造之多肽、單株抗體及用於對干擾素-γ敏感疾病的藥劑
	英 文	Interferon-gamma production inducing polypeptide, monoclonal antibody, and agent for interferon-gamma susceptible disease
二、發明 創作人	姓 名	(1) 牛尾真平 (2) 鳥越角二 (3) 谷本忠雄
	國 籍	(1) 日本                      (2) 日本                      (3) 日本
	住、居所	(1) 日本國岡山縣岡山市福成一丁目一六六番六號  (2) 日本國岡山縣倉敷市藤戶町藤戶一三四三番地の五  (3) 日本國岡山縣岡山市山崎三一二番地の八八
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 林原生物化學研究所股份有限公司 株式会社林原生物化学研究所
	國 籍	(1) 日本
	住、居所 (事務所)	(1) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號
	代 表 人 姓 名	(1) 林原健

裝  
訂  
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

年 月 日  
86. 7. -8 補充

464656

申請日期	84 年 10 月 4 日
案 號	84110504
類 別	

A4  
C4

(以上各欄由本局填註)

# 發 明 專 利 說 明 書

~~新 型~~

一、 <del>發明名稱</del> <del>新型</del>	中 文	
	英 文	
二、 <del>發明人</del> <del>創作</del>	姓 名	(4) 岡村春樹 (5) 國方敏夫 (6) 谷口睦子
	國 籍	(4) 日本                      (5) 日本                      (6) 日本
	住、居所	(4) 日本國大阪府茨木市中穗積二丁目一二番三二號  (5) 日本國岡山縣岡山市神田町二丁目八番四九號  (6) 日本國岡山縣岡山市平井五丁目三番三〇-五號
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

464656

修正  
補充  
年月日  
86.7.8

申請日期	84年10月4日
案號	84110504
類別	

A4  
C4

(以上各欄由本局填註)

# 發 明 專 利 說 明 書

~~新 型~~

一、 <del>發明名稱</del> <del>新型</del>	中 文	
	英 文	
二、 <del>發明人</del> <del>創作</del>	姓 名	(7) 河野惠三 (8) 福田惠溫 (9) 栗本雅司
	國 籍	(7) 日本                      (8) 日本                      (9) 日本  (7) 日本國岡山縣赤磐郡瀬戶町沖一五五番地の六
	住、居所	(8) 日本國岡山縣岡山市阿津二一八九番地  (9) 日本國岡山縣岡山市学南町二丁目七番二五號
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

修正  
年 月 日  
86. 7. -8 補充

464656

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
IPC分類：

A6  
B6

本案已向：

國(地區)	申請專利, 申請日期:	案號:	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1995年 9月 18日	262,062/1995	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1995年 9月 29日	274,988/1995	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1994年 11月 15日	304,203/1994	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1995年 2月 23日	58,240/1995	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1995年 3月 10日	78,357/1995	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權

有關微生物已寄存於： \_\_\_\_\_, 寄存日期： \_\_\_\_\_, 寄存號碼： \_\_\_\_\_

(請先閱讀封面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明(1)

### 發明背景

本發明是有關新穎的多肽，其可誘導免疫勝任細胞產製 $\gamma$ -干擾素(下文縮寫成IFN- $\gamma$ )，一種與多肽具特異性之單株抗體，及用於敏感疾病之作用物，其中含多肽為有效組份。

### 先前技藝

IFN- $\gamma$ 是一種蛋白質，其具抗病毒，抗致癌及免疫調控活性，且由經抗原或突變原刺激之免疫勝任細胞所產製。由於這些生物活性，預期IFN- $\gamma$ 在發現之初可充作抗腫瘤劑，並在臨床試驗上致力研究充作惡性腫瘤之治療劑，一般而言包括腦部腫瘤。目前已商品化之IFN- $\gamma$ 可粗略地分類成2大類，即由免疫勝任細胞所產生之天然IFN- $\gamma$ s，及由可編碼天然IFN- $\gamma$ s之大腸桿菌DNAs引入微生物而製備之轉形細胞所產製之重組體IFN- $\gamma$ s。於上一臨床嘗試中，此種IFN- $\gamma$ s任一者均可充作“外源IFN- $\gamma$ ”而投予至患者。

在這些IFN- $\gamma$ s中，天然IFN- $\gamma$ s之產製通常是在添加有可誘導IFN- $\gamma$ s產製之IFN- $\gamma$ 之營養培養基中培養已發展之免疫勝任細胞，並純化所產生之IFN- $\gamma$ s。已知，IFN- $\gamma$ 誘導劑之型式大大地影響IFN- $\gamma$ 之產率，IFN- $\gamma$ 純化之簡易化，及最終產物之安全性。一般而言，可使用之突變原如刀豆素(CoNA)，*Lens culinaris*, *phytolacca americana*-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(2)

na, 內毒素及脂多醣。然而這些突變原依據其來源及純化方法有其分子及品質多樣性之問題, 且在欲求劑量及固定 I F N -  $\gamma$  誘導能力上有生產上的困難。此外, 這些突變厚大部份投予至活體時會誘生不佳的副作用, 且其中某些甚至會顯出毒性。因此, 此種突變厚直接投予至活體實質上難以誘導 I F N -  $\gamma$  之產製。

本發明者在老鼠肝中發現一種可誘導 I F N -  $\gamma$  產製之物質, 此係經由在由哺乳動物產生之細胞動素上研究而得。其利用各種純化方法分離物質, 包括以管柱層析為主要技術, 研究特色及特點, 並顯示其實際上是一種具下列物化特性之蛋白質

## (1) 分子量:

在硫酸十二酯鈉聚丙稀鹽胺凝膠電泳上 (S D S - P A G E) 呈現  $19,000 \pm 5,000$  道耳吞之分子量;

## (2) 等電點 (p I)

在色譜聚焦上呈現  $4.8 \pm 1.0$  之等電點;

## (3) 部份胺基酸序列

具有 S E Q I D N o. 4 及 5 所示之部份胺基酸序列; 及

## (4) 生物活性

可誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$ 。

可結論道, 其實際上是一種新穎的物質, 因為目前尚知具有這些物化特性之蛋白質。本發明者繼續在老鼠肝細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(3)

胞上研究，並發現此物質之DNA由471個鹼基對所組成，且編碼SEQ ID No. 3所示之胺基酸序列。

SEQ ID NO:3:

AAC	TTT	GGC	CGA	CTT	CAC	TGT	ACA	ACC	GCA	GTA	ATA	CGG	AAT	ATA	AAT	48
Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn	
1				5					10					15		
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	GTT	GAC	AAA	AGA	CAG	CCT	GTG	TTC	GAG	GAT	ATG	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	
			20					25					30			
ACT	GAT	ATT	GAT	CAA	AGT	GCC	AGT	GAA	CCC	CAG	ACC	AGA	CTG	ATA	ATA	144
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile	
			35			40						45				
TAC	ATG	TAC	AAA	GAC	AGT	GAA	GTA	AGA	GGA	CTG	GCT	GTG	ACC	CTC	TCT	192
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	
			50			55					60					
GTG	AAG	GAT	AGT	AAA	AYG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT	240
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Xaa	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	
					70					75				80		
TCC	TTT	GAG	GAA	ATG	GAT	CCA	CCT	GAA	AAT	ATT	GAT	GAT	ATA	CAA	AGT	288
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	
				85				90						95		
GAT	CTC	ATA	TTC	TTT	CAG	AAA	CGT	GTT	CCA	GGA	CAC	AAC	AAG	ATG	GAG	336
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu	
				100				105						110		
TTT	GAA	TCT	TCA	CTG	TAT	GAA	GGA	CAC	TTT	CTT	GCT	TGC	CAA	AAG	GAA	384
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu	
			115				120					125				
GAT	GAT	GCT	TTC	AAA	GTC	ATT	CTG	AAA	AAA	AAG	GAT	GAA	AAT	GGG	GAT	432
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp	
						135					140					
AAA	TCT	GTA	ATG	TTC	ACT	CTC	ACT	AAC	TTA	CAT	CAA	AGT				471
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser				
					150					155						
145																

依據這些發現，本發明者進一步在人類肝細胞上研究，且得到一種編碼另一新穎物質之DNA，此物質可誘導免疫勝任細胞產製IFN- $\gamma$ 。其顯示此事實上是一種多肽，且解碼與DNA發其具有SEQ ID No. 1所示之胺基酸序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(4)

SEQ ID NO:1

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1			5						10					15	
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
			20					25					30		
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
		35					40					45			
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
	50					55					60				
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Xaa	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
				85					90					95	
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys
			100					105					110		
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu
		115					120					125			
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
	130					135					140				
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp			
145					150					155					

其將 DNA 引入大腸桿菌中以表現多肽，並可在培養基中以相當高產率產製之。

如所述，多肽具有誘導免疫勝任細胞產製 IFN- $\gamma$  之特性，且預期可應用於各種領域上以為 IFN- $\gamma$  之誘導劑，抗病毒劑，抗腫瘤劑，抗菌劑，免疫調控劑，及血小板加強劑。一般而言，當欲將多肽納入藥物中，發展出可將生物活性多肽有效地純化成具相當高純度者之方法，以及同時分析許多樣品是不可避免的。雖然使這些純化及分析可行之最適合的物質是單株抗體，但尚未獲得與多肽具特異性者。

近來，已發展出含有細胞動素為有效組份之某些藥物，如  $\alpha$ -干擾素， $\beta$ -干擾素， $\alpha$ -IFN，TNF- $\beta$ ，間白素 2 及間白素 1 2，以及 IFN- $\gamma$ ，其他的則對

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(5)

其確實用法尚在開發中。這些藥物可充作抗腫瘤劑，抗病毒劑，抗菌劑，及免疫調控劑，及若必要時可配合其他的藥物。

和化學合成藥物不同的，上述藥物可長期地且容易地投予至患者而不致誘生不良的副作用，此也為最大特色，但缺點是治療效果通常很低，若單獨使用時無法實質上緩和或治癒疾病，此點和疾病型式及接受治療之症狀大大有關。因此，此種藥物目前已知，可在治療如惡性腫瘤之嚴重疾病時充作化學合成劑之添加劑，或充作延長病患壽命之方法。

發明要點

基於上述，本發明目的是提出一種新穎的多肽，其可誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$ 。

本發明另一目的是提出可編碼此多肽之 D N A。

本發明進一步目的是提出一種可複製的重組體 D N A，含有 D N A 及自我複製的載體。

本發明又一目的是提出一種轉形細胞，由重組體 D N A 引入適合的宿主而得。

本發明另一目的是提出利用轉形細胞製備多肽之方法。

本發明另一目的是提出與多肽具特異性之單株抗體。

本發明另一目的是提出可產製單株抗體之融合瘤。

本發明進一步目的是提出製備單株抗體之方法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(6)

又另一目的是提出利用單株抗體純化多肽之純化方法

。本發明另一目的是提出利用單株抗體分析多肽之偵測方法。

本發明另一目的是提出針對 I F N -  $\gamma$  敏感疾病之藥物。

本發明的第一個目的可由多肽達成，其具有 S E Q I D N o . 1 之胺基酸序列或其同源的胺基酸序列。

本發明第二目的由編碼多肽之 D N A 達成。

本發明第三目的由可複製的重組體 D N A 達成，其含有 D N A 及自我複製之載體。

本發明第四目的由轉形細胞可達成，轉形細胞得自可複製的重組體 D N A 引入適合的宿主而成。

本發明的第五目的由蛋白質之製法可達成，其中包括將重組體 D N A 引入宿主中，於營養培養基中培養轉形細胞，並自生成之培養基中收集所形成之蛋白質。

本發明的第六個目的由與多肽具特異性之單株抗體可達成，此多肽具有 S E Q I D N o . 1 中之胺基酸序列或與之同源之胺基酸序列，且其可誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  。

本發明的第七個目的由可產生單株抗體之融合瘤可達成。

本發明的第八個目的可由製備單株抗體之方法而達到，此方法包括在試管內培養可產製抗體之融合瘤，即於營

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(7)

養培養基中，或於活體內即於動物體內，並自生成之培養物或體液中收集抗體。

本發明的第九個目的由多肽之純化方法達成，此方法包括將單株抗體與包括有多肽及供多肽吸附之雜質之混合物接觸，並吸附抗體中之多肽。

本發明第十個目的可由多肽之偵測方法達成，此方法包括樣品與單株抗體接觸，以免疫學上與之反應。

本發明的第十一個目的由藥學作用物可達成，其中含有多肽為有效組份。

附圖說明

第1圖為肽片段之HPLC溶離型式，其由衍自老鼠之蛋白質經胰蛋白酶化而得。

第2圖為本重組體DNA PHIGIF之結構圖。

第3圖為本重組體DNA PKGFHH2之結構圖。

第4圖為西方墨點圖，其中顯示本純化的多肽及人類間白素12與本單株抗體H-1mAb之反應性。

HI G I F c D N A : 編碼本多肽之cDNA,

K G F H H 2 c D N A : 編碼本多肽之cDNA,

P t a c : t a c 啓動基因,

r r n B T 1 T 2 : 核糖體RNA操縱子之絡結基因

G S T : 穀胱甘肽S轉移酶基因

A m R : 氨基青黴素抗受基因

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(8)

p B R 3 2 2 o r i : 大腸桿菌之複製起始點

發明說明

如上文所討論的，依據本發明之多肽具有異於傳統多肽之胺基酸序列，且當單獨或加上輔因子作用在免疫勝任細胞時可誘導 I F N -  $\gamma$  之產製。

依據本發明之 D N A 可表現本多肽之產製，即將 D N A 引入可自我複製之載體中以形成重組體 D N A，且通常是將重組體 D N A 引入可無困難增殖但無法產製多肽之宿主中。

一般而言，依據本發明之可複製的重組體 D N A 可表現本多肽之產製，即將其引入可無困難增殖但無法產製多肽之宿主中。

轉形細胞當培養時可產製本多肽。

本多肽可以欲求之量容易地獲得，即依本發明方法培養轉形細胞。

本發明以新穎多肽之發現為基礎，其可誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$ 。在研究由哺乳動物產生之細胞動素中，本發明者發現，在老鼠的肝中存在有可誘導 I F N -  $\gamma$  產製之新穎的蛋白質。其利用二種以上的純化方法分離控制，包括主要的管柱層析，並決定部份胺基酸序列。依據序列，其利用分離自老鼠肝細胞的 m R N A 為模板，化學合成引子，並在引子存在下以轉錄作用一聚合酶鏈反應 ( R T - P C R ) 處理蛋白質，以收集編碼部份蛋白

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(9)

質之DNA片段。利用此DNA片段為探針，其致力研究另外製備自mRNA的一個cDNA庫，並得到由471個鹼基對所組成之DNA片段，且有SEQ ID No. 3之鹼基序列。鹼基序列之解碼顯示，分離自老鼠肝之蛋白質由157個胺基酸所組成，且具有SEQ ID No. 3之胺基酸序列，在此符號“Xaa”表示“甲硫胺酸”或“蘇胺酸”。

依據這些發現，本發明者進一步研究衍自人類肝細胞之mRNA，且發現此存在有一個新基因，其編碼的多肽可誘導免疫勝任細胞產製IFN- $\gamma$ 。此基因含有如SEQ ID No. 2所示之鹼基序列，且其解碼顯示其編碼的多肽具有如SEQ ID No. 1所示之胺基酸序列，在此符號“Xaa”表示“異白胺酸”或“蘇胺酸”。

## SEQ ID NO:2:

TACTTTGGCA	AGCTTGAATC	TAAATTATCA	GTCATAAGAA	ATTTGAATGA	CCAAGTCTC	60
TTCATTGACC	AAGGAAATCG	GCCTCTATTT	GAAGATATGA	CTGATTCTGA	CTGTAGAGAT	120
AATGCACCCC	GGACCATATT	TATTATAAGT	ATGTATAAAG	ATAGCCAGCC	TAGAGGTATG	180
GCTGTAAC TA	TCTCTGTGAA	GTGTGAGAAA	ATTTCAAYTC	TCTCCTGTGA	GAACAAAATT	240
ATTTCTTTTA	AGGAAATGAA	TCCTCCTGAT	AACATCAAGG	ATACAAAAAG	TGACATCATA	300
TTCTTTTCAGA	GAAGTGTCCT	AGGACATGAT	AATAAGATGC	AATTTGAATC	TTCATCATA C	360
GAAGGATACT	TTCTAGCTTG	TGAAAAAGAG	AGAGACCTTT	TAAACTCAT	TTTGAAAAAA	420
GAGGATGAAT	TGGGGGATAG	ATCTATAATG	TTCCTGTTTC	AAAACGAAGA	C	471

用來解析SEQ ID No. 1及2中胺基酸序列及鹼基酸序列之技術綜合於下：

- (1) 自老鼠肝細胞中分離出可誘導免疫勝任細胞產製IFN- $\gamma$ 之蛋白質，並混合傳統化方法以高度純化之，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(10)

方法中以層析法為主要技術：

(2) 所生成之經純化的蛋白質以胰蛋白酶水解，並自生成之混合物中分離出2個多肽片段，並決定胺基酸序列；

(3) 自老鼠肝細胞中，收集mRNA並充作逆轉錄作用一聚合酶鏈反應(RT-PCR)之模板，並在以上述部份胺基酸序列為基礎化學合成之寡核苷酸為引子存在下得DNA片段。利用以這些部份胺基酸序列為基礎化學合成之寡核苷酸為探針來篩選片段，之後收集可編碼部份蛋白質之DNA片段；

(4) cDNA庫予以標記，並與在mRNA為模板製備之生成的cDNA庫雜交，再篩選出可呈現強雜交作用之轉形細胞；

(5) 自轉形細胞中分離cDNA，其鹼基序列決定並解碼之。經解碼的胺基酸序列與部份胺基酸序列比較顯示，蛋白質具有SEQ ID No. 3之胺基酸序列，且於老鼠中，SEQ ID No. 3之鹼基序列可編碼胺基酸序列；

(6) 製備具SEQ ID No. 3鹼基序列之DNA片段，標記之並以DNA庫雜交之，後者是利用衍自人類肝細胞之mRNA為模板而製備，之後選出可呈現強裂雜交作用之轉形細胞；及

(7) 自轉形細胞中製備cDNA，決定鹼基序列並解碼之，結果顯示本多肽是一種人類多肽，包括具SEQ

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(11)

I D N o . 2 鹼基序列所編碼之 S E Q I D N o . 1 胺基酸序列者。

經由長期研究，本發明者發現，本多肽可誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$ ，且由 S E Q I D N o . 1 可證知其與傳統已知之多肽不同。本多肽包括天然的及重組體多肽，只要其具有 S E Q I D N o . 1 之胺基酸序列或與之同質者。以不改變本多肽固有的生物活性之其他胺基酸置換 S E Q I D N o . 1 中一個以上的胺基酸，可得與 S E Q I D N o . 1 胺基酸序列同質之變型。依據 D N A 欲引入之宿主（即使使用的是相同的 D N A），及用於含有 D N A 之轉形細胞之培養溫度及 p H 條件及組份，也可形成變型，其中其在 S E Q I D N o . 1 近 N - 及 / 或 C - 末端處缺乏一個以上的胺基酸，或在 S E Q I D N o . 1 近 N - 末端處經由 D N A 表現後宿主內部酵素之修飾含有額外的一個以上的胺基酸，但仍可保持多肽之固有生物特性。本多肽包括此種變型，只要其可誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$ 。

本多肽之製備可在培養基中培養含編碼多肽之 D N A 之轉形細胞，再自生成之培養基中收集所產製之多肽。本發明中可使用之轉形細胞，其可由如具 S E Q I D N o . 2 鹼基序列之 D N A，與之同質之鹼基序列，及與鹼基序列互補者引入宿主中而得。利用遺傳密碼之簡併性，可以其他鹼基置換這些鹼基序列中的一個以上的鹼基，而不改變本多肽之胺基酸序列。為表現宿主中經由使用此

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 12 )

D N A 之多肽之產製，編碼本多肽或其變型之鹼基序列，其中一個以上的鹼基可為其他鹼基置換。

任何 D N A 均可應由於本發明中，只要其具有這些鹼基序列之一，不論其來源為何，即來自天然來源或人工合成。天然來源包括如人類肝細胞，由此可得到含有具 S E Q I D N o . 6 鹼基序列之 D N A 之基因。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ( 13 )

SEQ ID NO:6:

```

GCCTGGACAG TCAGCAAGGA ATTGTCTCCC AGTGCATTTT GCCCTCCTGG CTGCCAACTC 60
TGGCTGCTAA AGCGGCTGCC ACCTGCTGCA GTCTACACAG CTTCCGGGAAG AGGAAAGGAA 120
CCTCAGACCT TCCAGATCGC TTCCTCTCGC AACAACTAT TTGTCGCAGG AATAAAG 177
ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA ATG 225
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met
1 5 10
AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA GCT GAA GAT GAT GAA AAC 273
Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn
20 25 30
CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA 321
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile
35 40 45
AGA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT 369
Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro
50 55 60
CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG 417
Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg
65 70 75 80
ACC ATA TTT ATT ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG 465
Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met
85 90 95
GCT GTA ACT ATC TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA AYT CTC TCC TGT 513
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys
100 105 110
GAG AAC AAA ATT ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC 561
Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile
115 120 125
AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA 609
Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly
130 135 140
CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT 657
His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe
145 150 155 160
CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA 705
Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
165 170 175
GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA 753
Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu
180 185 190
GAC TAGCTA TTAAAATTC ATGCCGGGCG CAGTGGCTCA CGCCTGTAAT CCCAGCCCTT 812
Asp
TGGGAGGCTG AGGCGGGCAG ATCACCAGAG GTCAGGTGTT CAAGACCAGC CTGACCAACA 872
TGGTGAACC TCATCTCTAC TAAAAACT AAAAAATTAGC TGAGTGTAGT GACGCATGCC 932
CTCAATCCCA GCTACTCAAG AGGCTGAGGC AGGAGAATCA CTTGCACTCC GGAGGTAGAG 992
GTTGTGGTGA GCCGAGATTG CACCATTGCG CTCTAGCCTG GGCAACAACA GCAAACTCC 1052
ATCTCAAAA AATAAATAAA TAAATAACA AATAAAAAAT TCATAATGTG AAAAAAAAAA 1112
AAAAAAAA 1120

```

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(14)

製備步驟如下：在蔗糖梯度緩衝溶液上將商品化之人類肝 mRNA 並添加 poly(A) 分級分離，以分離山終純化的 mRNA。令逆轉錄酶及聚合酶作用在充作模板之 mRNA 上，以形成雙股 cDNA，將 cDNA 引入適合的可自我複製載體內，再將生成的重組體 DNA 引入適合的宿主內，如大腸桿菌。於營養培養基中培養生成之轉形細胞，以集落雜交方法收集經增殖之轉形細胞，其中含有可編碼本多肽之 DNA。依據本發明之 DNA，可由傳統方法處理轉形細胞而得。如，為人工產製本 DNA，其製備可在以 SEQ ID No. 2 之鹼基序列為基礎下化學合成，或將編碼 SEQ ID No. 1 胺基酸序列之 DNA 引入適合的載體中以形成重組體 DNA，重組體 DNA 引入適合的宿主內，於營養培養基中培養生成之轉形細胞，自培養物中分離增殖的細胞，並自細胞中收集含有主題 DNA 之質體。

一般而言，DNA 以重組體 DNA 型式引入宿主中。此種重組體 DNA 通常含有 DNA 及自我可複製的載體。具其一般可以重組體 DNA 技術容易地製備，此指若只有 DNA 時。此種自我可複製之載體實例有質體載體，如 pKK223-2，pGEX-2T，pRL- $\gamma$ ，pBtrp2 DNA，pUB110，YEp13，Ti 質體，Ri 質體及 pBI121。在這些載體中，pKK223-2，pGEX-2T，pRL- $\lambda$ ，pBtrp2 DNA，pUB110 及 YEp13 適用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 15 )

於當本 D N A 於原核細胞中表現時，如酵母及其他如大腸桿菌及枯草桿菌微生物，而在質體，R i 質體及 p B I 1 2 1 適用於在動物及植物細胞中表現。

為將本 D N A 引入這些載體中，可任意使用本領域中所使用之傳統方法：含有本 D N A 及可自我複製載體之基因以限制酶及／或超音波解離，再連接生成之 D N A 片段及載體片段。為解離基因及載體，可特異作用在核苷酸上之限制酶，更特別的是 I I 型限制酶，如 S a u 3 A I，E c o R I，H i n d I I I，B a m H I，S a l I，X b a I，S a c I 及 P s t I，有助於 D N A 片段及載體片段之連接。為連接 D N A 片段及載體片段，其於必要時先回冷，再以 D N A 連接酶於活體內或於試管內處理。如此得到的重組體 D N A 可容易地引入適合的宿主中，且此經由轉形細胞之培養便 D N A 可無限制地複製。

本發明中可使用的重組體 D N A 可引入適合的宿主中，如酵母及其他如大腸桿菌及枯草桿菌之微生物中：當以大腸桿菌微生物為宿主時，其可在重組體 D N A 及鈣離子存在下培養，而當以枯草桿菌為宿主時，可採用勝任細胞方法及原生質體方法。為選殖主題轉形細胞，其可由集落雜交法選擇，或在營養培養基中培養所有的轉形細胞，再篩選出所產生之多肽可誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  者。

如此得到的轉形細胞，當在營養培養基中培養時，可

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 16 )

於細胞內或細胞外產生本多肽。此種營養培養基之實例有一般呈液態型式者，其中含碳源，氮源，及礦物質，以及胺基酸及／或維生素為微量營養物。可用於本發明之碳源包括糖類，如澱粉，澱粉水解產物，葡萄糖，果糖及蔗糖。可用於本發明之氮源包括含氮之有機及無機化合物，如氨及其鹽類，尿素，硝酸鹽，蛋白腴，酵母浸膏，脫脂大豆，玉米浸漬液及牛肉浸膏。轉形細胞接種至營養培養基中，並在 25 - 65 °C 及 pH 5 - 8 下培育約 1 - 10 天，且在需氧條件下以攪動一需氣方法等進行，以得含本多肽之培養物。雖然培養物可完整地充作 I F N -  $\gamma$  誘導物，但其若必要時可接受超音波震盪及／或細胞溶解酵素以瓦解細胞，再過濾或離心生成之懸浮液以移去完整的細胞及細胞雜屑，並進一步純化生成的含有本多肽之上清液。可用於本發明之純化方法，如通常用於純化具生物活性物質領域者，即濃縮，鹽析，透析，分離沈降，凝膠過濾層析，離子交換層析，疏水性層析，親和力層析，色譜聚焦，凝膠電泳，及等電電泳，及若必要時二種以上可混合使用。所生成的含有本多肽之純化溶液可濃縮及／或冷凍乾燥成液體或固體，以符合最終用途。

如上所述，本多肽具有誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  之活性。因為此，本多肽可任意充作治療及／或預防劑，如用於病毒疾病如 A I D S 及性病濕疣；惡性腫瘤如腎癌，肉芽腫，蕈樣真菌病及腦部腫瘤；及免疫失調症，如風濕性關節炎及過敏症。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(17)

本多肽可在營養培養基中共存，以誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$ ，或可直接投予至哺乳動物中以治療及／或預防 I F N -  $\gamma$  敏感性疾病。在前者，分離自哺乳動物周邊血液之白血球，或已開發之免疫勝任細胞如 H B L - 3 8 細胞，M o 細胞，Jurkat 細胞，H u T 7 8 細胞，E L 4 細胞及 L 1 2 - R 4 細胞可懸浮於營養培養基中，其內含有每毫升約 0.1 毫微克至約 1 微克，較好約 1 - 1 0 0 毫微克本多肽，以誘導 I F N -  $\gamma$  之產製。若必要時，此種營養培養基中可添加 T - 細胞刺激物，如突變原，間白素 - 2 及抗 - C D 3 抗體，且細胞在約 3 0 - 4 0  $^{\circ}$ C 及 p H 約 5 - 8 下培養約 1 - 1 0 0 小時，同時培養基再以新鮮的更換之。I F N -  $\gamma$  可以一般用於純化具生物活性物質之一種以上的傳統方法自生成之培養物中得到，如濃縮，鹽析，透析，分離沉澱作用，凝膠過濾層析，離子交換層析，色譜聚焦法，凝膠電泳，及等電電泳。

為治療及／或預防 I F N -  $\gamma$  敏感疾病，本 I F N -  $\gamma$  誘導劑可直接投予至哺乳動物：如，I F N -  $\gamma$  誘導劑於調和成適合型式後可口服至哺乳動物，或皮內，皮下，肌內，靜脈內或腹膜內注入哺乳動物中。可以本多肽投予之哺乳動物並不限於人類，也包括其他動物如老鼠，大鼠，倉鼠，兔子，狗，貓，牛，馬，山羊，綿羊，豬及猴子。由於本多肽具有強的 I F N -  $\gamma$  可誘導力及極低的毒性，僅以少量即可容易地誘導 I F N -  $\gamma$  產製，而以相當高劑量投予至哺乳動物時也不會造成嚴重的副作用。因

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(18)

此，本多肽可有益地平穩誘導欲求量之 I F N -  $\gamma$ ，而勿需嚴格控制劑量水平。勿庸多言，本多肽達到藥物所需求的安全性。

依據本發明之單株抗體可特異地與具特異胺基酸序列之多肽反應。

依據本發明之融合瘤當於試管內培養時可產生單株抗體。

依據本發明單株抗體之製備，可促進抗體以欲求劑量產製。

本發明多肽之純化方法，可自含有多肽及雜質之混合物中以相當高品質型式有效率地回收。

在本發明的一個偵測方法中，僅多肽可與樣品免疫上反應。當以適當的技術偵測免疫反應水平時，多肽可定性或定量地分析。

依據本發明之單株抗體包括與具有 S E Q I D N o . 1 胺基酸序列或與之同質之多肽特異者，而與其來源，源頭及種類無關。同質之胺基酸包含以其他胺基酸置換 S E Q I D N o . 1 中一個以上的胺基酸而得者，將一個以上的胺基酸加入 S E Q I D N o . 1 胺基酸 N - 及 / 或 C - 末端者，或在 S E Q I D N o . 1 胺基酸序列之 N - 及或 C - 末端中喪失一個以上胺基酸者，而實質上並未喪失免疫勝任細胞之 I F N -  $\gamma$  產製誘導活性。

依據本發明之單株抗體，可利用多肽或其抗原片段而

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(19)

得：如，利用可無限增殖之哺乳動物細胞及收集自以片段免疫之哺乳動物之抗體一產製細胞可製備融合瘤而得抗體，選出可產生單株抗體之融合瘤純系，並於活體內或試管內培養純系。

充作抗原之多肽可由培養轉形細胞而得，此中已引入可編碼 S E Q I D N o . 1 胺基酸序列之 D N A 及其同質者，且通常其可完整地或以部份純化製式被使用。抗原片段可以化學方法製備，或由完全或部份純化之多肽經酵素水解而得，或在 S E Q I D N o . 1 胺基酸序列為基礎下以肽成法合成之。

本發明中可使用之免疫接種方法包括有傳統的，如抗原單獨的或配合適量的佐劑，靜脈內，皮內，皮下，或腹膜內注入哺乳動物，並在預先期間中給予。任何的哺乳動物均可應用於本發明中並無特殊限制，只要可得到欲求的抗體產製細胞即可，和動物種類，體重及性別無關。一般而言，齧齒類如大鼠，老鼠及倉鼠均可使用，且由此可選擇最適合的動物，同時評估與上述可無限增殖哺乳動物之相容性。依據所使用動物之種類及體重，抗原之總劑量通常在每雙動物約 5 - 500 微克範圍，並以 1 - 2 週之間隔投予 2 - 5 次。於最後一次投藥後 3 - 5 天，取出動物之脾臟並分散或脾細胞懸浮為抗體一產製細胞。

在上述中所得之抗體產製細胞及哺乳動物細胞，經融合成為含有主題融合瘤之細胞融合混合物。可無限增殖之哺乳動物細胞包括來自老鼠骨髓瘤之細胞株，如 P 3 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 20 )

NS 1 - Ag 4 - 1 細胞 ( ATCC TIB 18 ) ,  
 P 3 - X 6 3 - Ag 8 細胞 ( ATCC TIB 9 ) ,  
 SP 2 / O - Ag 1 4 細胞 ( ATCC CRL  
 1 5 8 1 ) , 及其空變株。本發明中可使用之細胞融合方法包括利用電脈衝及細胞融合一促進劑之傳統方法, 如聚乙二醇及仙台 ( Sendai ) 病毒 ( HVJ ) : 如抗體一產製細胞及此種哺乳動物細胞, 以約 1 : 1 至 1 : 1 0 之比例懸浮於含有融合促進劑之融合介質中, 並在約 3 0 - 4 0 °C 下培育約 1 - 5 分鐘。傳統的介質, 如最低營養要求培養基 ( MEM ) , RPM 1 6 4 0 培養基, 及 Iscove's 經修飾的 Dulbecco's 培養基 ( IMDM ) , 可有益地充作融合培養基而勿需添加如牛血清一類之血清。

為選擇主題融合瘤, 生成的細胞融合混合物轉移至篩選培養基中, 如 HAT 培養基, 並在約 3 0 - 4 0 °C 下培育約 3 天至 3 週使融合瘤以外的細胞死亡。融合瘤以一般方式培養, 再分析分泌於培養基中之抗體與多肽之反應活性。此種分析法實例為傳統偵測抗體之方法, 如酵素免疫分析法, 放射免疫分析法, 及生物分析法。如 "Tan-Clone-Kotai-Jikken-Manual (Experimental Manual for Monoclonal Antibody)", 由 Sakuji TOYAMA 及 Tamie ANDO 編輯, 由 Kodansha Scientific, Ltd., Tokyo, Japan 出版, pp. 105-152 (1991), 此中描述各種方法。融合瘤其產生與多肽具特異性之抗體, 可利用有限稀釋法容易地選殖得到依據本發明之融合瘤。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(21)

依據本發明之單株抗體，可經由活體內即動物內，或試管內培養融合瘤而得。培養時可採用培養哺乳動物細胞之傳統方法，如：若在活體內培養時，可自動物之腹水及／或血液中收集單株抗體。下文所述之融合瘤 H-1 及 H-2 具有加強單株抗體產製之能力，且具有可在活體內及試管內容易地培養之特色。用來純化抗體的傳統方法，一般可用於自培養物，動物腹水及血液中收集單株抗體之用。此種實例包括：鹽析，透析，過濾，濃縮，離心，分離沈降，凝膠過濾層析，離子交換層析，親和力層析，高性能液相層析 (HPLC)，凝膠電泳，及等電電泳，且若必要時可二種以上組合使用。所生成之純化的單株抗體可濃縮或乾燥成液體或固體產物型式以符合其最終用途。

本發明之單株抗體即可用於在免疫親和力層析上純化本多肽。此一純化技術包括將單株抗體與含有多肽及雜質如多肽以外之蛋白質之混合物接觸，以將多肽吸附在抗體上，並自抗體解吸附多肽。這些步驟通常在水性介質中進行。單株抗體使用時通常呈在凝膠水不溶性載劑上之固化型式，其再充填於圓柱管柱內。轉形細胞之培養物或其部份純化產物充填至管柱，以將多肽實質地吸附在單株抗體上。改變抗體周圍的 pH 值可將多肽容易地自抗體上解析。如，於使用 IgG 類單株抗體之例子時，經吸附之多肽可解析空在酸性 pH 下自管柱中溶離，通常是 pH 2-3，而於使用 IgM 類單株抗體時，多肽在鹼性 pH 下解析並自管柱中溶離，此通常為 pH 10-11。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(22)

依據本發明之純化方法，可使多肽達到相當高的純化水平，但僅最少的勞力費用及時間。如上述，多肽具有誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  之活性，且經純化之多肽可充作細胞培養中之 I F N -  $\gamma$  誘導劑以產生 I F N -  $\gamma$ ，並用於治療及／或預防病毒疾病，如 A I D S 及性病濕疣，惡性腫瘤如腎癌，肉芽腫，蕈樣真菌病，及腦腫瘤，以及免疫疾病如風濕性關節炎及過敏。若多肽具有加強殺手細胞細胞毒性之活性時，其可配合問白素 2 及／或腫瘤壞死因子使用以改善治療作用，並減少在惡性腫瘤過繼性免疫療法中之副作用，此中之惡生腫瘤包括固體腫瘤如肺癌，腎癌，及乳癌。

依據本發明之單株抗體在各種領域中有相當廣的應用性，此指在需多肽偵測之領域。當用於經標記之免疫分析法時，如放射免疫分析法，酵素免疫分析，及螢光免疫分析，單株抗體可立即且正確地定性及定量偵測樣品中之多肽。在此分析中，單株抗體以放射性同位素，酵素及／或螢光物質在使用前予以標記之。抗體可與多肽特異地反應，以呈現免疫反應，並由偵測對這些經標記物質之免疫反應水平可正確地偵測樣品中少量的多肽。與生物分析比較，經標記之免疫分析法有下列特色：其可同時分析許多樣品，減少分析時間及勞力花費，並以相當高之正確性提供數據。因此，本偵測方法可用於控制多肽之產製步驟及對終產物進行品質管制。雖然本發明並未詳述本身和此發明無關之標記單株抗體之技術或標記分析法，這些技術則詳

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 23 )

述於 "Enzymeol Immunoassay" 由 P. Tijssen, 編輯, Eiji ISHIKAWA 翻譯, Tokyo-Kagaku-Dojin 出版, pp. 196-348 (1989)。

本用於敏感疾病之作用物, 當投予至人體時可誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$ , 並對 I F N -  $\gamma$  敏感疾病展現治療及 / 或預防作用。當多肽具有加強殺手細胞毒性之活性或誘導殺手細胞形成時, 其可在治療嚴重疾病上展現強的作用, 包括惡性腫瘤。

用於本發明之多肽具有 S E Q I D N o . 1 之胺基酸序列 (此中 "X a a" 符號代表 "具白胺酸" 或 "蘇胺酸") 或其同質的胺基酸序列, 且可誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$ 。此種同質的胺基酸序列實例包括相當於 S E Q I D N o . 1 胺基酸序列, 其中一個以上的胺基酸以其他的胺基酸序替換, 及其中一個以上胺基酸加至 N - 及 / 或 C - 末端者, 以及其中一個以上在 N - 及 / 或 C - 末端中的胺基酸是缺失者。任何的多肽, 如以細胞培養分離自天然來源者及以重組體 D N A 技術及肽合成法人工合成者, 均可用於本發明中, 只要其具有這些胺基酸序列及特性中性一者。

就經濟觀點而言, 重組體 D N A 技術可有益地應用於本發明中: 依據技術, 編碼這些胺基酸序列之 D N A, 可引入衍自微生物及動物之適合的宿主中以得轉形細胞, 其再以一般方式培養於營養培養基中, 且生成之培養物純化細胞動素之傳統技術純化, 以得主題多肽。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(24)

如上述，多肽具有誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  之特性。當投多至動物，本作用物對於敏感性疾病可誘導體內免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$ ，且在 I F N -  $\gamma$  敏感性疾病上展現令人滿意的治療及／或預防作用。具有 S E Q I D N o . 1 胺基酸序列之多肽具有加強殺手細胞胞毒性之特性，如 N K 細胞，L A K 細胞（淋巴激素－活化之殺手細胞），胞毒 T - 細胞，及可誘導殺手細胞之形成，以及具有誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  之特性，如此殺手細胞可治療及／或預防多肽－敏感性疾病。因此“敏感性疾病”一語在本發明書中表示疾病一般包括 I F N -  $\gamma$  敏感性疾病，且可為 I F N -  $\gamma$  s 及／或殺手細胞所直接或間接處理及／或預防者，如：病毒疾病如肝炎，疱疹症候群，濕疣，及 A I D S，細菌性疾病，如念珠菌病及瘧疾；固態惡性腫瘤如腎癌，蕈樣真菌病，及慢性肉芽腫病，血液細胞惡性腫瘤如成人 T 細胞白血病，慢性骨髓性白血病，及惡性白血病；及免疫疾病如過敏及關節炎。當多肽配合間白素 3 使用，其可在白血病及骨髓瘤，以及治療惡性腫瘤時因照射及化學治療劑誘導之白血球減少症及白栓減少之治療或舒緩上展現強烈作用。

本作用物可廣泛用於治療及／或預防上述敏感性疾病，而充作抗腫瘤劑，抗病毒劑，抗菌劑，免疫治療劑，血小板增加劑，及白血球增加劑。雖然其依據用於此目的下之作用劑型式及欲治療之敏感性疾病而大大地變化，本作用物通常加工成液體，糊狀或固體型式，其中含有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 25 )

0 . 0 0 0 0 0 1 - 1 0 0 w / w % , 較好 0 . 0 0 0 1 - 0 . 1 w / w % 的肽 , 按乾固體基礎計 ( d . s . b . ) 。

本作用物可完整使用 , 或加工或組成物型式 , 即混合以生理上可接受之載劑 , 佐劑 , 賦形劑 , 稀釋劑及 / 或穩定劑如血清白蛋白 , 明膠 , 醣包括麥芽糖及海藻糖等 , 且若必要時進一步混合以一種以上其他的生物活性物質 , 如干擾素 -  $\alpha$  , 干擾素 -  $\beta$  , 間白素 2 , 間白素 3 , 間白素 1 2 , T N F -  $\alpha$  , T N F -  $\beta$  , 卡巴醌 , 環磷醯胺 , aclarubicin , 噻噤哌 ( thiotepa ) , 馬利蘭 ( busulfan ) , ancitabine , 阿糖胞苷 , 5 - 氟尿嘧啶 , 5 - 氟 - 1 - ( 四氫 - 2 - 呋喃基 ) 尿嘧啶 , 胺甲碟哈 , 放線菌素 D , 色霉素 A 3 , 紅比霉素 , 強力霉素 , 博來霉素 , 絲烈黴菌 C , 長春新鹼 , 長春鹼 , L - 門冬醯胺酶 , 放射性金膠體 , Krestin<sup>®</sup> , Picibanil , 香菇糖 , 及 Maruyama 疫苗 。 在這些組合中 , 由多肽及間白素 2 組成者尤其有用 , 因為當多肽誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  時 , 間白素 2 可充作多肽之輔因子 。 多肽及天然或重組人類間白素 2 之組合使用可誘導 I F N -  $\gamma$  產製之規定水平 , 即使當多肽並不實質上誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  時 。

多肽及間白素 1 2 之組合使用 , 可使 I F N -  $\gamma$  產製力達到更大水平 , 此由其單獨使用是無法容易地達成的 。

用於敏感性疾病之本作用物包括呈單位劑型者 , 其表示是一種適合投藥之物理上分開及已成型之藥物 , 且含有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 26 )

呈每天劑量之多肽，或為每天劑量的  $1 / 40$  至數倍（可高達 4 倍）之劑量。此種藥物之實例有：注射劑，液劑，散劑，顆粒劑，錠劑，膠囊劑，舌下錠劑，眼用溶液劑，鼻用滴劑，及栓劑。

本作用物可口服或腸外投予至病人，如下文所述，可於試管內用來活化抗腫瘤細胞。在二種投藥中，作用物在治療及／或預防敏感疾病上展現令人滿意的作用。雖然其依敏感疾病及其症狀型式而定，本作用物可口服至患者或腸外投予至患者之皮內組織，皮下組織，肌肉，及靜脈，劑量範圍在約  $0.1 - 50$  毫克／劑，較好約／微克／劑至／毫克／劑， $1 - 4$  次／天或  $1 - 5$  次／週，共歷 1 天至 1 年。

依據本發明之作用物也可用於所謂的“抗腫瘤免疫療法中”，利用間白素 2 進行。一般而言，抗瘤免疫療法大略分類成 ( i ) 直接投予間白素 2 至有惡性腫瘤之患者體內，及 ( i i ) 引入經試管內由間白素 2 活化之抗腫瘤細胞（過繼性免疫療法）。當配合多肽投藥時，免疫治療作用可顯著地加強。在方法 ( i ) 中，多肽以約  $0.1$  微克／劑／成人至  $1$  毫克／劑／成人之量， $1 - 10$  以同時或在間白素 2 之前投予。間白素 2 之劑量通常定在約  $10,000$  至  $10,000,000$  單位／劑／成人之範圍，然依惡性腫瘤，病人的症狀，及多肽劑量而大地變化。而於方法 ( i i ) 中，將收集自有惡性腫瘤之患者之單核細胞及淋巴細胞，在間白素 2 及每  $1 \times 10^6$  這些血

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 27 )

液細胞約 1 毫微克至 1 毫克多肽存在下培養。經培養一段預定時間後，自培養物中收集 N K 細胞及 L A K 細胞，再引入病人體內。可以本抗腫瘤免疫療法治療之疾病，如固體惡性腫瘤，如結腸癌，直腸癌，胃癌，甲狀腺癌，舌頭的癌症，膀胱癌，絨毛膜癌，肝癌，前列腺癌，子宮癌，喉癌，肺癌，乳癌，惡性黑色素瘤，卡波西氏肉瘤，腦瘤，神經母細胞瘤，卵巢之腫瘤，睪丸腫瘤，骨肉瘤，胰臟之癌症，腎癌，腎上腺樣瘤，血管內皮瘤，及血液細胞惡性腫瘤如白血病及惡性淋巴瘤。

以下實例解釋本發明，且此中所用的重組體 D N A 技術是本身為技藝中傳統上已知的：如，此種技術揭示於 J. Sumbrook et al. in "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2nd edition(1989), 由 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA 出版，及 Masami MURAMATSU in "Rabo-Manual for Genetic Technology"(1988), 由 Maruzen Co., Ltd., Tokyo, Japan 出版。

實例 A - 1純多肽之製備

對 600 母的 C D - 1 老鼠，8 週大於腹膜內注入 1 毫克 / 老鼠死的小棒桿菌 ( *Corynebacterium parvum* ( ATCC 11827 ) )，其已先預熱至 60 °C 歷 1 小時，老鼠再

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 28 )

以一般方式餵食 7 天，並以來自大腸桿菌經純化的脂多醣以 1 微克 / 老鼠靜脈內注射。靜脈內注射後 1 - 2 小時，老鼠犧牲以收集其血液，移去肝之後，以勻漿器瓦解肝，其係在 8 倍體積之 50 mM 磷酸鹽緩衝溶液 ( pH 7.3 ) 中，並萃取生成的懸浮液。生成的萃取物在約 8,000 rpm 下離心 20 分鐘，且約 9 升上清液摻合飽和的硫酸銨於 50 mM 磷酸鹽緩衝溶液 ( pH 7.3 ) 使飽和度達 45 w / v %。令生成的溶液在 4 °C 下靜置 18 小時，以約 8000 rpm 離心 30 分鐘以得約 19 升含有本多肽之上清液。

上清液填加至充填有約 4.6 升 "PHENYL SEPHAROSE" (一種 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala Sweden 的產品) 之管柱內，其中已用含有 1 M 硫酸銨之 50 mM 磷酸鹽緩衝溶液 ( pH 7.3 ) 平衡，且管柱以相同緩衝溶液之新鮮製劑洗滌，再以 SV (空間速率) 0.57 以 1 M 至 0.2 M 硫酸銨於 50 mM 磷酸鹽緩衝溶液 ( pH 7.3 ) 之線性梯度緩衝溶液充填。含有本多肽之流份在 0.8 M 硫酸銨處溶離，將之收集並匯集成約 4.8 升溶液，其再以膜濾器濃縮，以 20 mM 磷酸鹽緩衝溶液 ( pH 6.5 ) 在 4 °C 下透析 18 小時，並充填至裝填有約 250 毫升 "DEAE-SEPHAROSE" 之管柱 (此為 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 之產物)。管柱以相同緩衝溶液之新鮮製劑洗滌，在 SV 1.2 下以由 0 M 至 0.2 M 氯化鈉於 20 mM 磷酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 29 )

鹽緩衝溶液 ( pH 6 . 5 ) 之直線梯度緩衝溶液充填以溶離及收集約 2 6 0 毫升含有本多肽之流份，其在約 0 . 1 3 M 氯化鈉濃度下溶離。

收集含有本多肽之流份，匯集，濃縮再以 2 5 m M B i s - T r i s 緩衝溶液 ( pH 7 . 1 ) 在 4 °C 下透析 1 8 小時。經透析的溶液填加至管柱中，其內已充填約 2 4 毫升 " M O N O - P " ( 一種 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 產品 ) ，並以 1 0 v / v % polybuffer 74 ( pH 4 . 0 ) 溶離，同時 pH 值由 7 降至 4 以得約 2 3 毫升含有本多肽之溶離液。溶離液濃縮。填加至管柱中其內已充填有 " S U P E R - D E X 7 5 " ( 一種 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, 之產品 ) ，其並已用含 7 m M 磷酸氫二鈉， 3 m M 磷酸二氫鈉，及 1 3 9 m M 氯化鈉之混合溶液 ( pH 7 . 2 ) 平衡，再接受凝膠過濾層析以溶離會有本多肽在約 1 9 , 0 0 0 道耳吞處之流份，此利用相同溶液之新鮮製劑進行。流份匯集及濃縮以用於實例 A - 2 。本多肽之產率為約 0 . 6 微克 / 老鼠。

實例 A - 2多肽之部份胺基酸序列

含有實例 A - 1 經純化多肽之部份水溶液，濃縮至約 5 0 微升體積，其再與含有 3 w / v % S D S ， 6 0 v

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 30 )

／ v % 甘油及 60 毫克／毫升二硫異赤弱藻醇 25 微升溶液摻和。生成的混合物在 50 °C 下培育 30 分鐘，定點在 15 w / v % 聚炳烯醯胺凝膠上，並以一般方式電泳。生成的凝膠浸在 10 v / v % 醋酸水溶液及 50 v / v % 含 0.1 w / w % 考馬斯亮藍 R 250 之甲醇水溶液之混合溶液中以染色，再以 12 v / v % 甲醇水溶液及 7 v / v % 醋酸水溶液之混合溶液重覆洗滌凝膠，及浸泡在蒸餾水中歷 18 小時而脫染色之。以考馬斯亮藍染的含有本多肽的部份凝切出來再真空冷凍乾燥之。

經冷凍乾燥之凝膠浸於 0.6 毫升由 100 mM 碳酸氫鈉（其中含有 2 微克／毫升“TPCK TRYP SIN”），0.5 mM 氯化鈣及 0.02 v / v % Tween 20 水溶液組成之溶液中，再於 37 °C 下培育 18 小時以將蛋白質胰蛋白酶化。離心生成物以得上清液，而生成之沉澱物浸於 1 毫升含有 0.001 v / v % Tween 20 之 1 v / v % 三氟醋酸鹽水溶液中，在環境溫度下震盪 4 小時，並離心得上清液。新形成的沉澱物以 70 v / v 三氟醋酸鹽水溶液（含 0.001 % v / v Tween 20）及 50 v / v % 乙腈水溶液類似上示般相繼處理。生成之上清液及上述已得之上清液匯集並濃縮至 250 微升，其再離心過濾。

含有肽片段之生成的水溶液填加至“HPLC ODS-120T”中（此為購自 Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, 之 HPLC 管柱），其已先用 0.1 v / v 三氟醋酸鹽水溶液

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 31 )

預先平衡，管柱再以 0.1 v / v 三氟醋酸鹽水溶液洗滌，以 0.5 毫升 / 分流速填加 0.1 v / v % 三氟醋酸鹽而乙腈水溶液之濃度由 0 v / v 增加至 70 v / v %，溶離液中之肽濃度則以分光光度計在 214 毫微米及 280 毫米波長下追蹤。開始溶離後分別收集約 75 分鐘及約 55 分鐘處之流份（下文命名為“肽片段 A”及“肽片段 B”）。溶離型式示於第 1 圖中。

肽片段 A 及 B 在“MODEL 473A”上分析，此為購自 Perkin-Elmer Corp. Instrument Div, Norwalk, USA 之蛋白質定序儀，並顯示其具有 SEQ ID No. 4 及 5 之胺基酸序列。

實例 A - 3編碼蛋白質之 DNA 鹼基序列及多肽之胺基酸序列實例 A - 3 - 1完整 RNA 之製備

3 克濕的老鼠肝細胞，類似實例 A - 1 方法製備，予以稱重，浸於 20 毫升含有 6 M 異硫氰酸胍，10 mM 檸檬酸鈉，及 0.5 v / v SDS 之混合溶液中，再以均漿機瓦解之。35 毫升之離心管柱入 25 毫升含有 5.7 M 氯化銫之 0.1 M EDTA (pH 7.5)，且 10 毫升經勻漿化之細胞懸浮平覆在管內溶液的上半部份，再以 25,000 rpm 離心 20 小時以收集 RNA 流份。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 32 )

流份匯集，分配於 1.5 毫升離心管中，並與等體積的氯仿及異丁醇（= 4 = 1 按體積計）混合液混合。試管振盪 5 分鐘，並在 4 °C 下以 10,000 rpm 離心 10 分鐘，再收集所形成的水層，匯集，混合以 2.5 倍體積的乙醇，令其在 -20 °C 下靜置 2 小時以沉澱完整的 R N A s。收集沉澱物，匯集，以 75 v / v % 乙醇水溶液洗滌，並溶於 0.5 毫升蒸餾的無菌水以用於實例 A - 3 - 2 中。R N A s 之產率為約 4 毫克，d . s . b .。

實例 A - 3 - 2製備部份編碼多肽之 D N A 片段

實例 A - 3 - 1 中 1 微克的完整 R N A s，混合以 4 微升 2.5 mM 氯化鎂，2 微升由 10 × P C R 緩衝溶液，100 mM T r i s - H C l 緩衝溶液（p H 8.3）及 500 mM 氯化鉀組成之溶液，8 微升 / mM d N T P 混合液，1 微升含 1 單位 / 微升 R N a s e 抑制劑之溶液，1 微升含 2.5 單位 / 微升反轉錄酶溶液，及 1 微升 2.5 μ m 任意的六聚體，並進一步與水混合以生成總體積 20 微升。混合溶液置於 0.5 毫升反應管中，並以一般方式，相繼培育於 25 °C 下 10 分鐘，42 °C 下 30 分鐘，99 °C 下 5 分鐘，及 5 °C 5 分鐘成反轉錄酶溶液，再回收含有第一股 c R N A 之水溶液。

對 20 微升水溶液中加入 4 微升 2.5 mM 氯化鎂，8

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 33 )

微升  $10 \times \text{PCR}$  緩衝溶液， $0.5$  微升含有  $2.5$  單位 / 微升 Amplitaq DNA 聚合酶之溶液 (此購自 Peokin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA)，及各  $1$  微微莫耳的引子 1 及 2，其充作有意義引子或抗一有意義引子。混合溶液以無菌蒸餾水加至  $100$  微升，並以一般方式相繼培育，在  $94^\circ\text{C}$  下  $1$  分鐘， $45^\circ\text{C}$  下  $2$  分鐘，及  $72^\circ\text{C}$  下  $3$  分鐘，以循環方式歷  $40$  循環以擴大 DNA 片段，其部份編碼本多肽，此中則以第一股 cDNA 為模板。引子 1 及 2 為寡核苷酸，其依據 SEQ ID No. 4 及 5 中之 Pro-Glu-Asn-Ile-Asp-Ile 及 Phe-Glu-Asp-Met-Thr-Asp-Ile 胺基酸序列化學合成，具有  $5'$ -ATRTCTCTCDATRTTYTCNGG- $3'$  及  $5'$ -TTYGAR GAYATGACNGAYAT- $3'$  之鹼基序列。

所生成的 PCR 產物取一部份在  $2\text{w} / \text{w}\%$  瓊脂糖凝膠上電泳，移轉至耐綸膜上，以  $0.4\text{N}$  氫氧化鈉固定，以  $2 \times \text{SSC}$  洗滌，風乾，浸泡於含有  $5 \times \text{SSPE}$ ， $5 \times$  登哈氏溶液， $0.5\text{w} / \text{w}\%$  SDS 及  $100$  微克 / 毫升經變性的鮭魚精子 DNA 之預雜交溶液中，並在  $65^\circ\text{C}$  下培育  $3$  小時。依據 SEQ ID No. 4 之 Phe-Glu-Glu-Met-Asp-Pro 胺基酸序列合成具有鹼基序列： $5'$ -TTYGAR GARATGGAYCC- $3'$  之寡核苷酸為探針 1，再以  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 34 )

A T P 及 T 4 聚核苷酸激酶標記之。

SEQ ID NO:4:

Ile	Ile	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile
1				5					10					15	
Gln	Ser	Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys							
			20					25							

耐綸膜浸於含有 1 微微莫耳探針 1, 5 × S S P E, 5 × 登哈氏溶液, 0. 5 w / v % S D S, 及 1 0 0 微克 / 毫升經變性的鮭魚精子 D N A 之溶液中, 並在 4 5 ° C 下培育 2 4 小時以達成雜交作用。生成之耐綸膜以 6 × S S C 洗滌, 再以一般方式放射自顯, 且顯示 P C R 產物含有主題 D N A 片段。

留下的 P C R 產物與 5 0 毫微克 " p T 7 B L U E T " 混合 (此為一種購自 Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan, 質體載體), 並加上適量的 T 4 連接酶, 並進一步混合以 1 0 0 m M A T P 使濃使為 / m M, 再於 1 6 ° C 下培育 1 8 小時以將 D N A 片段嵌入質體載體中。重組體 D N A 如此得到後引入大腸桿菌 N o V a B l u e 株中, 此種一種購自 Pharmcia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 之大腸桿菌微生物, 以得到轉形細胞, 其再接種至含有 1 0 克 / 升細菌蛋白胨, 2. 5 克 / 升氯化鈉, 1 5 克 / 升細菌瓊脂, 1 0 0 毫克 / 升氮芞青黴素, 4 0 毫克 / 升 X - G a l 及 2 3. 8 毫克 / 升異丙基 - β - D - 硫半乳糖 - 吡喃糖苷 (下文縮寫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 35 )

或 " I P T G " ) 之培養盤內，並在 37 °C 下培育 24 小時以形成集落。耐綸膜以一般方式平覆在培養盤上，並令其靜置約 30 秒以將集落粘附其上。再掀去盤上的耐綸膜，並在含有 0.5 N 氫氧化鈉及 1.5 M 氯化鈉之溶液中浸泡 7 分鐘以達成細胞溶解。之後，耐綸膜進一步在 0.5 M T r i s - H C l 緩衝溶液 ( p H 7.2 ) 中浸泡 3 分鐘，其中含有 1.5 M 氯化鈉，以 2 × S S C 洗滌，浸於 0.4 N 氫氧化鈉中 20 分鐘以固定 D N A，以 5 × S S C 洗滌，風乾，浸於含有 5 × S S P E，5 × 登哈氏溶液，0.5 w / v % S D S 及 100 微克 / 毫升變性鮭魚精子 D N A 之預雜交溶液中，並在 65 °C 培育 3 小時。在耐綸膜上形成之集落以一般方式以探針 1 雜交，以 6 × S S C 洗滌，並如上述地放射自顯之，再選擇轉形細胞，其可與探針 1 強烈雜交。

轉形細胞在 L - 肉汁 ( p H 7.2 ) 中培育，其中含有 100 微克 / 毫升氨苄青黴菌，並在 37 °C 下培育 18 小時，再收集培養物中之細胞，並以傳統的鹼 - S D S 方法收集重組體 D N A。以二去氧法分析顯示重組體 D N A 含有一個 D N A 片段，其中含有的鹼基序列相當於 S E Q I D N o . 3 中由 85 至 281 之鹼基位置。

實例 A - 3 - 3m R N A 之製備

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 36 )

0.05 毫升含有實例 A - 3 - 1 完整 R N A s 之水溶液置試管中，摻合 0.5 毫升含有 1 m M E D T A 及 0.1 w / v % S D S 之 10 m M T r i s - H C l 緩衝溶液 ( p H 7.5 )，再以無菌蒸餾水加至 1 毫升。在此混合物中加入 1 毫升 "OLIGOTEX-dT30" SUPER" 及 oligo-d(T)<sub>30</sub> 乳液 (購自 Nippon Roche K.K., Tokyo, Japan, 再於 65 °C 下培育 5 分鐘以使 R N A s 變性，之後在冰冷卻浴中冷卻 3 分鐘。生成之混合物摻合 0.2 毫升 5 M 氯化鈉，在 37 °C 下培育 10 分鐘，再於 25 °C 下以 10,000 r p m 離心 10 分鐘。呈團塊之沉澱物懸浮於 0.5 毫升無菌蒸餾水中，並在 65 °C 下培育 5 分鐘以自 oligo-d(T)<sub>30</sub> 乳液中萃取 m R N A。m R N A 之產率為約 5 微克。

實例 A - 3 - 4製備 c D N A 庫

c D N A 庫製備自實例 A - 3 - 3 之 m R N A，係利用 "cDNA SYNTHESIZING SYSTEM PLUS" 一極 c D N A 選殖套組購自 Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA。步驟如下：在 1.5 毫升的反應管中相繼加入 4 微升合成第一股 c D N A 之溶液，1 微升焦磷酸鹽緩衝溶液，1 微升人類胎盤核糖核酸酶抑制劑，2 微升去氧核昔三磷酸混合液，及 1 微升

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 37 )

oligo-d(T)<sub>16</sub>引子。生成的混合物混合 2 微升實例 A - 3 - 3 之 mRNA，以無菌蒸餾水加至 19 微升，混合以 1 微升含有 20 單位反轉錄酶之溶液，並在 42 °C 下培育 40 分鐘以得含有第一股 cDNA 之反應混合物。

如此得到之混合物，混合 37.5 微升合成第二股 cDNA 之溶液，0.8 單位衍自大腸桿菌之核糖核酸酶 H，23 單位 DNA 聚合酶，及以無菌蒸餾水加至 100 微升。生成之混合物相繼培育，在 12 °C 下 60 分鐘及 22 °C 下 60 分鐘，混合以二單位 T4 DNA 聚合酶，並在 37 °C 下培育 10 分鐘以得含有第二股 cDNA 之反應混合物。在反應混合物中加入 4 微升 0.25 M

EDTA (pH 8.0) 以懸浮反應，且生成的混合物以一般方式酶及氯仿萃取，並以乙醇處理以沉澱主題

cDNA，再且收沉澱物。

在如此得到之 cDNA 中加入 2 微升 L / K 緩衝溶液，250 微微莫耳 EcoRI 承受子，及 2.5 單位 T4 DNA 連接酶，（此此次序加入），且生成的溶液以無菌蒸餾水加至 20 微升，再於 15 °C 下培育 16 小時以連接 EcoRI 承受子於 cDNA 二端。反應混合物與 2 微升 0.25 M EDTA 混合以滅活剩下的酵素，並接受分子篩層析以移去完整的 EcoRI 承受子。在生成物中加入 40 微升 L / K 緩衝溶液，80 單位 T4 聚核苷酸激酶，且混合物以無菌蒸餾水加至 400 微升，再於 37 °C 下培育 30 分鐘以甲基化 EcoRI 解離位置。生成的混

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 38 )

合物以酚及氯仿萃取，並以乙醇處理以沉澱主題 DNA，之後回吸 DNA。在 DNA 中加入 1.5 微升 L / K 緩衝溶液，其中含適量的入 g t 1 0 臂，及 2.5 單位 T 4 DNA 連接酶，且生成的溶液以無菌蒸餾水加至 1.5 微升，在 15 °C 下培育 16 小時以達成連接作用，再接受傳統的試管內包裝法以得含有重組體入 DNA 之噬菌體。

實例 A - 3 - 5重組體 DNA 之選殖

大腸桿菌 NM 5 1 4 株之種子培養物以一般方式以實例 A - 3 - 4 之噬菌體感染，經感染的細胞接種至瓊脂盤上 ( pH 7.0 )，其中含有 10 克 / 升細菌 - 蛋白胨，5 克 / 升細菌酵母等提取物，10 克 / 升氯化鈉及 1.5 克 / 升細菌瓊脂，並在 37 °C 下培育 16 小時以形成噬菌斑。瓊脂盤上覆以耐綸膜，並令其靜置約 30 秒以將噬菌斑粘附其上。耐綸膜自盤中掀去，再相繼浸於含有 0.5 M 氫氧化鈉及 1.5 M 氯化鈉之水溶液中歷 7 分鐘，及於 0.5 M T r i s - H C l 緩衝溶液 ( pH 7.0 ) ( 其中含有 1.5 M 氯化鈉 ) 歷 3 分鐘。耐綸膜以 2 × S S C 洗滌，風乾，浸於 0.4 N 氫氧化鈉中 20 分鐘，以 5 × S S C 洗滌，風乾，浸於含有 5 × S S P E，5 × 登哈氏溶液，0.5 w / v % S D S 及 100 微克 / 毫升變性的鮭魚精子 DNA 之溶液中，並在 65 °C 下培育 3 小

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 39 )

時。之後，生成的耐綸膜在含有下列之溶液中培育：充作探針 2 之得自實例 A - 3 - 2 之適量的 DNA 片段，並以 "READY PRIME DNA LABELLING SYSTEM" (一種購自 Amersham Corp., Div, Amersham International, Arlington Heights, USA 之 DNA 標記套組) 標記， $5 \times$  SSPE， $5 \times$  登哈氏溶液， $0.5 w/v\%$  SDS，及 100 微克 / 毫升經變性的鮭魚精子 DNA，且混合物在  $60^\circ\text{C}$  下培育 20 小時以達成雜交作用。生成物接受類似上述之放射自顯術，以選出可與探針 2 強烈雜交之噬菌體 DNA 純系。

以傳統技術，純系在大腸桿菌中擴大，再自細胞中萃取重組體 DNA。重組體 DNA 以 EcoRI 限制酶解離。質體載體 pUC19 (ATCC 37254) 以相同的限制酶解離，且生成的經解離的 DNA 片段及質體片段以 DNA 連接酶連接以得重組體 DNA，其再以傳統勝任細胞方法引入大腸桿菌 JM109 株 (ATCC 53323)，以得轉形細胞。

實例 A - 3 - 6決定 DNA 之鹼基序列及多肽之胺基酸序列

實例 A - 3 - 5 之轉形細胞接種至 L - 肉汁 (pH 7.2) 中，並在  $37^\circ\text{C}$  下培養 18 小時，利用震盪條件進行。生成的增殖細胞收集，再以傳統的鹼 - SDS 方法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(40)

處理，以得含有依據本發明 DNA 之重組體 DNA。利用螢光光度計在自動定序儀上分析，結果顯示重組體 DNA 含有 SEQ ID No. 3 之鹼基序列。鹼基序列解碼顯示，其編碼 SEQ ID No. 3 之胺基酸序列。胺基酸序列含有 SEQ ID No. 4 及 5 之部份胺基酸序列（相當於 SEQ ID No. 3 中由 79 至 103 位及由 26 至 43 位置之胺基酸，且此表示於老鼠中具有 SEQ ID No. 3 胺基酸序列之多肽也可為 SEQ ID No. 3 中之 DNA 所編碼，其中符號 "Xaa" 表示 "甲硫胺酸" 或 "蘇胺酸"。

## SEQ ID NO:5:

Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu
1				5				10						15	
Pro	Gln														

於下列實例 A - 4 至 A - 7 中，編碼另外多肽之 cDNA，其可誘導免疫勝任細胞產製 IFN- $\gamma$ ，可利用 SEQ ID No. 3 中之鹼基序列 DNA 片段為探針製備自人類肝 mRNA。cDNA 分析其鹼基序列並解碼以決定多肽之胺基酸序列。令 cDNA 在大腸桿菌中表現，再研究所形成多肽之特色及特性。

實例 A - 4

編碼多肽 DNA 鹼基序列及多肽之胺基酸序列

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 41 )

實例 A - 4 - 1c D N A 之製備

c D N A 庫製備自添加有 " P O L Y A " 之人類肝 R N A ，此為 Clonatec-BIOSOFT, Paris Cedex, France 之產品，利用 " cDNA SYNTHESIZING SYSTEM PLUS " 進行 S ，此為一種 c D N A 選殖套組，購自 Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA 。步驟如下：在 1 . 5 毫升反應試管中相繼加入 1 0 微升合成第一股 c D N A 之溶液，2 . 5 微升 / m M 焦磷酸鈉，2 . 5 微升含有 1 微克 / 升人類胎盤核糖核酸酶抑制劑之溶液，5 微升含有微克 / 升去氧核糖核苷三磷酸混合物之溶液，2 . 5 微升溶液（含有 1 微克 / 升 oligo-dT 引子），5 微升人類肝 R N A 添加有 poly(A) ，再以無菌蒸餾水加至 4 5 微升。之後，生成的混合物與 5 微升溶液混合，其中含有 1 0 0 單位反轉錄酶，並在 4 2 ° C 下培育 4 0 分，以得含有第一股 c D N A 之反應混合物。

對反應混合物中加入 9 3 . 5 微升合成第二股 c D N A 之溶液，4 單位衍自大腸桿菌之核糖核酸酶 H ，1 1 5 單位 D N A 聚合酶，並以無菌蒸餾水加至 2 5 0 微升。生成的混合物相繼培育，在 1 2 ° C 下 6 0 分鐘，2 2 ° C 下 6 0 分鐘，及 7 0 ° C 下 1 0 分鐘，混合以 1 0 單位 T 4 聚合酶，再於 3 7 ° C 下培育 1 0 分鐘。對反應混合物中加入 1 0 微升 0 . 2 5 M E D T A ( p H 8 . 0 ) 以懸浮反應，且生成的混合物以一般方式以酚及氯仿萃取，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 42 )

並以乙醇處理以沉澱主題之第二股 c D N A ，再回收沉澱物。

對所得的第二股 c D N A 中加入 2 微升 L / K 緩衝溶液 ( p H 8 . 0 ) ， 2 5 0 微微莫耳 E c o R I 承接子，及 2 . 5 單位 T 4 D N A 連接酶，且生成的溶液以無菌蒸餾水加至 2 0 微升，並在 1 5 ° C 下培育 1 6 小時以將 E c o R I 承接子連接至 c D N A 二端。生成的混合物再與 2 微升 0 . 2 5 M E D T A 混合以懸浮溶液，並接受分子篩層析以移去完整的 E c o R I 承接子。對生成物中加入 4 0 微升 L / K 緩衝溶液 ( p H 8 . 0 ) 及 8 0 單位的 T 4 聚核苷酸激酶，且混合物以無菌蒸餾水加至 4 0 0 微升，再於 3 7 ° C 下培育 3 0 分鐘以甲基化 E c o R I 解離位置。生成的混合物以酚及氯仿萃取，並以乙醇處理以沉澱主題 c D N A ，再回收 c D N A 。在 c D N A 中加入 1 . 5 微升 L / K 緩衝溶液 ( p H 8 . 0 ) ，其中含有適量的  $\lambda$  g t 1 0 臂，及 2 . 5 單位 T 4 D N A 連接酶，且生成的溶液以無菌蒸餾水加至 1 5 微升，在 1 5 ° C 下培育 1 6 小時以達成連接作用，並接受傳統的試管內包裝方法以得含有重組體入 D N A 之噬菌體。

實例 A - 4 - 2重組體 D N A 之選殖

大腸桿菌 N M 5 1 4 株之種子培養物，以一般方式以實例 A - 4 - 1 之噬菌體感染，且經感染的細胞接種於瓊

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 43 )

脂盤上 ( pH 7 . 0 ) ，其中含有 1 0 克 / 升細菌蛋白胰  
 ， 5 克 / 升細菌 - 酵母浸膏 ， 1 0 克 / 升氯化鈉 ， 及 1 5  
 克 / 升細菌瓊脂 ， 並在 3 7 ° C 可培育 6 小時以形成噬菌斑  
 。 依據傳統方法 ， 瓊脂盤覆以耐綸膜 ， 並令其靜置約 3 0  
 秒以將噬菌斑粘附其上 。 之後 ， 耐綸膜自盤上掀去 ， 並相  
 繼浸於含有 0 . 5 N 氫氧化鈉及 1 . 5 M 氯化鈉之水溶液中  
 歷 7 分鐘 ， 及 0 . 5 M 含有 1 . 5 M 氯化鈉之 T r i s  
 - H C l 緩衝溶液 ( pH 7 . 0 ) 中 3 分鐘 。 耐綸膜以  
 2 × S S C 洗滌 ， 風乾 ， 浸於 0 . 4 N 氫氧化鈉中 2 0 分  
 ， 再以 5 × S S C 洗滌 ， 風乾 ， 浸於含有 5 × S S P E ，  
 5 × 登哈瓦溶液 ， 0 . 5 w / v % S D S 及受性的鮭魚精  
 子 D N A 之溶液中 ， 再於 6 5 ° C 下培育 3 小時 。 為選殖主  
 題重組體 D N A ， 具有 S E Q I D N o . 3 鹼基序列  
 之 D N A 片段 ， 以 " R E A D Y P R I M E D N A L A B E L L I N G S Y S T E M  
 " ( 一種購自 Amersham Corp., Div., Amersham Intern-  
 ational, Arlington Heights, USA 的 D N A 標記套組 )  
 標以  $^{32}P$  ， 以得探針 3 。 此步驟如下：將 2 5 毫微克製備  
 自實例 A - 3 - 5 方法之 D N A 片段置於 1 . 5 毫升反應  
 管中 ， 並以 4 5 微升無菌的蒸餾水加至 4 5 微升 ， 在 9 5  
 ° C 下培育 3 分鐘 ， 再轉至另一反應試管中 。 加 5 微升 [  $\alpha$   
 -  $^{32}P$  ] d C T P 溶液至反應試管中 ， 再於 3 7 ° C 下培育  
 3 0 分鐘標記之 。 之後 ， 生成的含有經標記 D N A 片段之  
 產物接受傳統的分子篩層析以移去完整的 [  $\alpha$  -  $^{32}P$  ] 。  
 上述耐綸膜浸於含有 5 × S S P E ， 5 × 登哈氏溶液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( 44 )

， 0 . 5 w / v % S D S 及 1 0 0 微克 / 毫升變性鮭魚精子 D N A 之混合物溶液中，且混合物在 6 0 ° C 下培育 2 0 小時以達成雜交作用。再於環境溫度下於 6 × S S C 中培育 2 0 分鐘及 2 × S S C 2 0 分鐘。生成物洗滌並接受類似上述之放射自顯術，以選出可與探針 3 強烈雜交之噬菌體 D N A 純系。以傳統技術，D N A 純系在大腸桿菌中擴大，再萃取出細胞內之重組體 D N A 。重組體 D N A 以 E c o R I 解離。質體載體 p U C 1 9 ( A T C C 3 7 2 5 4 ) 以相同的限制酶解離，且經解離之 D N A 片段及質體片段以 D N A 連接酶連接，以得重組體 D N A ，其再以傳統的勝任細胞方法引入大腸桿菌 J M 1 0 9 株內 ( A T C C 5 3 3 2 3 ) ，以得到含有本 D N A 之轉形細胞。

#### 實例 A - 4 - 3

#### 決定多肽之鹼基序列及胺基酸序列

實例 A - 4 - 2 之轉形細胞接種至含有 5 0 微克 / 毫升氨基青黴素之 L - 肉汁 ( p H 7 . 2 ) 中，並在 3 7 ° C 下以震盪條件培養 1 8 小時。經增殖之細胞以離心收集，並以傳統的鹼 - S D S 方法處理以萃取重組體 D N A 。鹼基序列在自動定序儀上利用螢光光度計分析，結果顯示重組體 D N A 含有 S E Q I D N o . 6 之鹼基序列。估計自鹼基序列之胺基酸序列也示於 S E Q I D N o .

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

## 五、發明說明 ( 45 )

6，且此顯示本多肽具有胺基酸序列如 SEQ ID No. 1 中所示，且多肽中 SEQ ID No. 2 鹼基序列之 DNA 所編碼。所 SEQ ID No. 6 中，以 "X a a" 表示之胺基酸表示 "異白胺酸" 或 "蘇胺酸"。

實例 A - 5製備可複製之重組體 DNA 及轉形細胞

對 0.5 毫升反應試管中加入 8 微升 25 mM 氯化鎂，10 微升 10 × PCR 緩衝溶液，8 微升 1 mM d N T P 混合物，0.5 微升含有 2.5 單位 / 微升 AmpliTaq DNA 聚合酶之溶液，及 1 毫微克實例 A - 4 - 2 之重組體 DNA。生成的混合物混以適量的 2 寡核苷酸，充作序列引子或抗 - 有意義引子，其具有由 5' - C G A G G G A T C C T A C T T T G G C A A G C T T G - 3' 及 5' - C A A G G A A T T C C T A G T C T T C G T T T T G - 3' 代表之鹼基序列，後者係依據近 SEQ ID No. 1 中 N - 及 C - 末端鹼基序列而化學合成，並以無菌蒸餾水加至 100 微升。生成的混合物以一般方式相繼培育，在 94 °C 下 1 分鐘，60 °C 下 2 分鐘，及 72 °C 之 3 分鐘，且此培育循環重覆 40 次以得 PCR 產物，其再以 BamHI 及 EcoRI 解離可得到一段 Bam-HI - EcoRI DNA 片段生成的 BamHI - EcoRI DNA 片段混

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( 46 )

合以適量的無菌蒸餾水。溶液與 10 毫微克 " p G E X - 2 T " 質體載體混合，其購自 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, 先前已用限制酶 BamHI 及 EcoRI 解離，10 微升 10 × 連接緩衝溶液及適量的 10 mM ATP, 以得 1 mM 終濃度，再於 16 °C 下培育 18 小時以得可複製之重複體 DNA PHIGIF。

重組體 DNA PHIGIF 引入大腸桿菌 p H 5 α 株中，其購自 Toyobo Co., Ltd., Tokyo, Japan, 且生成之轉形細胞 " H I G I F " 接種至含有 50 微克 / 毫升氨基青黴素之 L - 肉汁中 ( p H 7 . 2 ) , 於 37 °C 下培育 18 小時 ( 震盪條件 ) 。生成之培養物離心得經增殖之轉形細胞，其再接受傳統的鹼 - SDS 方法以萃取重組體 DNA PHIGIF。重組體 PHIGIF 在二去氧方法上分析顯示，如圖 2 " H I G I F c D N A " 或 SEQ ID No. 2 之 c D N A 連接至 T a c 啓動基因及穀胱甘肽 S - 轉移酶之基因下游位置。

#### 實例 A - 6

##### 自轉形細胞中產製多肽

實例 A - 5 中之轉形細胞 H I G I F , 接種至含有 50 微克 / 毫升氨基青黴素之 T 肉汁中 ( p H 7 . 2 ) , 並在 37 °C 下培育 18 小時，在震盪條件下可得種子培養物。18 升一份新鮮的 T - 肉汁製劑 ( p H 7 . 2 ) 置

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 47 )

於 30 升發酵缸中，接種以 1 v / v % 種子培養物，並在 37 °C 霉氣 - 攪動條件下培養。在培養中，培養物採樣並在 650 毫微米波長下追蹤吸光度，且當吸光度達到約 1.5 時，加 I D T G 至培養物中使達 0.1 mM。之後，培養物進一步再培育 5 小時，並離心以分離培養物中之細胞。細胞懸浮於含有 139 mM 氯化鈉，7 mM 磷酸氫二鈉，及 3 mM 磷酸二氫鈉之混合溶液中 ( pH 7.2 )，以一般方式以超音波處理，並離心以得上清液。

上清液填加至管柱中，其內充填有 "GLUTATHIONE SEPHAROSE 4B"，一種購自 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 之產品，其先前用含有 139 mM 氯化鈉，7 mM 磷酸氫二鈉及 3 mM 磷酸二氫鈉之混合物 ( pH 7.2 ) 平衡。管柱以相同混合溶液之新鮮製劑洗滌，並在每 1 毫升凝膠中加入 100 U 凝血酶以達成酵素解離反應，同時令管柱在環境溫度下靜置 16 小時。管柱充填以相同混合溶液之新鮮製劑溶離反應產物，且溶離液填加至充填有 "SUPERDEX 75"，一種 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 產品之管柱中，再收集相當於近 18,500 道耳吞之流份。匯集流份，濃縮並冷凍乾燥以得含有本多肽之固體產物，產率為每 1 升培養物有約 80 微克。

實例 A - 7多肽之物化特性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

款

## 五、發明說明 ( 48 )

實例 A - 7 - 1分子量

依據 U.K.Laemmli 於 Nature, Vol.227, pp.680-685 (1970), 所報告之方法, 以實例 A - 6 方法所製備之經純化的多肽在無還原劑之硫酸十二酯鈉 ( S D S ) 聚丙烯醯胺凝膠上電泳, 以主要顯示出具有 I F N -  $\gamma$  誘導力之單一蛋白質帶, 其位置相當於約 18,500  $\pm$  3,000 道耳吞。此實驗所使用之標幟蛋白質為牛血清白蛋白 ( M W = 67,000 道耳吞 ), 卵白蛋白 / M W = 545,000 道耳吞), 大豆胰蛋白酶抑制劑 ( M W = 20,000 道耳吞 ), 及  $\gamma$  - 乳白蛋白 ( M W = 14,400 道耳吞 ) 。

實例 A - 7 - 2等電點

實例 A - 6 之經純化的多肽經色譜聚焦顯示等電點為約 4.9  $\pm$  1.0。

實例 A - 7 - 3含有 N - 末端之胺基酸序列

實例 A - 6 中經純化的多肽在 " M O D E L 473

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 49 )

A 上分析，此為購自 Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA 之蛋白質定序儀，且顯示其具有結構其中肽，"Gly-Ser"，偶合至 SEQ ID NO. 7 中 N-末端胺基酸序列之酪胺基酸殘基，此係加入穀胱甘肽 S-轉移酶，及以凝血酶解離。

SEQ ID NO:7:

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser
1				5					10

實例 A - 7 - 4 ( a )生物活性

自母的 C 3 H / H e J 老鼠 ( 8 週大 ) 中萃取其脾臟，再懸浮於無血清之 R P M I 1 6 4 0 培養基中 ( p H 7 . 4 ) ，且生成的細胞以相同培養基之新鮮製劑洗滌，並浸於 G e y 溶液 ( p H 8 . 0 ) 中以達成溶血。生成的脾細胞懸浮於 R P M I 1 6 4 0 培養基中 ( p H 7 . 4 ) ，其內添加 1 0 v / v % 牛血清，使細胞密度為  $1 \times 10^7$  細胞 / 毫升。每份 1 0 毫升之細胞懸液分佈於塑膠巴氏血中，其直徑為 9 公分，再於 3 7 ° C ， 5 v / v % C O <sub>2</sub> 培育箱中培育 3 7 ° C 。以收集浮在培養物上之細胞，並以添加 1 0 v / v % 牛血清之 R P M I 1 6 4 0 培養基 ( p H 7 . 4 ) 洗滌，以用於 I F N -  $\gamma$  誘導作用之下列試驗中。

老鼠脾細胞懸浮於 R P M I 1 6 4 0 培養基中 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 50 )

pH 7.4)，其中添加有 10 v / v 牛血清以使細胞密度達  $1 \times 10^7$  細胞 / 毫升，且其每份 0.15 毫升注入 96 孔洞微滴定盤中，再於各孔洞中加入 0.05 毫升以相同培養基新鮮製劑稀釋之經純化多肽溶液，並在加或不加 0.05 毫升，2.5 微克 / 毫升刀豆球蛋白 A 或 50 單位 / 毫升間白素 2 下培育細胞，生成物再於  $37^\circ\text{C}$ ，5 v / v  $\text{CO}_2$ ，培養箱中培育 24 小時。培養完全後，生成之上清液於各孔洞中採樣 0.1 毫升，以利用酵素免疫分析法分析所形成 IFN -  $\gamma$  之活性。至於對照組，類以上一系統提出後如上述類似地處理，但此中例外處在於不使用經純化的多肽，刀豆球蛋白 A 及間白素 2。至於 IFN -  $\gamma$  標準品，使用得自 National Institutes of Health, USA 之老鼠 IFN -  $\gamma$  製劑，Gg02 - G01 - 533，且活性以國際單位 (IU) 表示。結果示於表 1。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ( 51 )

表 1

老鼠脾細胞產製之 I F N - $\gamma$ ( I U / 毫升 )			
樣品 濃度 ( 微克 / 毫升 )	樣品	樣品加 刀豆球蛋白 A	樣品加 間白素 2
10.00	12	138	118
3.33	6	8	55
1.11	5	56	16
0.37	5	21	12
0.12	5	12	10
0.04	5	11	7
0	0	4	1

實例 A - 7 - 4 ( b )

自人類淋巴細胞誘導 I F N -  $\gamma$  產製

利用有肝素之注射器，收集健康供者之血液，其再以無血清之 R P M I 1640 培養基 ( p H 7.4 ) 稀釋 2 倍，並平覆在 ficoll 上。生成物以 2,000 r p m 離心 20 分以得淋巴細胞，其再以 R P M I 1640 培養基 ( p H 7.4 ) 洗滌，其中添加有 10 v / v % 牛血清，懸浮於相同培養基之新鮮製劑上以生成  $5 \times 10^6$  細胞 / 毫升之細胞密度，再類似實例 A - 7 - 4 ( a ) 般處理，除了使用人類 I F N -  $\gamma$  準標品，G g 23 - 901 - 530 之外，此得自 National Institutes of Health,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

## 五、發明說明 ( 52 )

USA，充作 I F N -  $\gamma$  標準品。結果於表 2。

表 2

樣品 濃度 (微克/毫升)	老鼠脾細胞產製之 I F N - $\gamma$ ( I U / 毫升 )		
	樣品	樣品加 刀豆球蛋白 A	樣品加 間白素 2
10.00	191	479	1,182
3.00	169	576	1,419
1.11	168	426	1,106
0.37	150	296	739
0.12	74	193	390
0.04	36	137	324
0	1	11	24

表 1 及表 2 之結果可證知，本多肽具有誘導哺乳動物免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  之活性，包括在人類及老鼠中。在對照組中，未見任何顯著的 I F N -  $\gamma$  產製，而有以多肽進行之系統中則可觀察到顯著的 I F N -  $\gamma$  產製。當配合刀豆球蛋白 A 或間白素 2 為輔因子使用時，多肽之活性可強烈地廣大。

實例 A - 7 - 4 ( c )

以免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

## 五、發明說明 ( 53 )

以經肝素化之注射器收集健康供者之新鮮血液，並以無血清之 RPMI 1640 培養基 ( pH 7.4 ) 稀釋 2 倍。經稀釋之血液覆在 Ficoll 上，並離心以得淋巴細胞，其再以添加有 10 v / v % 胚牛血清之 RPMI 1640 培養基 ( pH 7.4 ) 洗滌，並懸浮於相同培養基之新鮮製劑中，使細胞密度達  $5 \times 10^6$  細胞 / 毫升。細胞懸浮以 0.15 毫升 / 孔洞之量分配至 96 孔洞之微滴定盤中。

以實例 B - 1 - 2 方法所得之多肽經稀釋以得添加有 10 v / v % 胚牛血清之適當濃度之 RPMI 1640 培養基 ( pH 7.4 )，經稀釋之溶液再以 0.05 毫升 / 孔洞之量分佈於微滴定盤中，再將 0.05 毫升 / 孔洞相同培養基之新鮮製劑加入，其中並添加有或無 2.5 微克 / 毫升刀豆球蛋白 A 或 50 單位 / 毫升重組人類間白素 2，微滴定盤再於 37 °C，5 v / v CO<sub>2</sub> 條件之培育箱中培育 24 小時。培育後，採出各孔洞 0.1 毫升的培養物上清液，再以傳統的酵素免疫分析法分析 IFN -  $\gamma$  含量。至於對照組，提供無多肽之系統，並如上類似地處理。結果示於表 3 中。在表中，利用 Gg 23 - 901 - 530 估 IFN -  $\gamma$ ，此為干擾素之國際標準，人類 ( Hu IFN -  $\gamma$  )，得自 National Institute of Health, Bethesda, MD, USA，並以國際單位 ( IU ) 表示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 54 )

表 3

樣品 濃度 (微克/毫升)	老鼠脾細胞產製之 I F N - $\gamma$ ( I U / 毫升 )		
	樣品	樣品加 刀豆球蛋白 A	樣品加 間白素 2
0	0	0	0
1.6	1 $\pm$ 2	92 $\pm$ 32	184 $\pm$ 12
8.0	3 $\pm$ 1	220 $\pm$ 21	397 $\pm$ 31
40.0	6 $\pm$ 4	380 $\pm$ 34	526 $\pm$ 28
200.0	14 $\pm$ 6	549 $\pm$ 105	637 $\pm$ 99

表 3 之結果顯示，淋巴細胞當有多肽作用其上時可充作產製 I F N -  $\gamma$  之免疫勝任細胞。由結果證知，組合多肽及充作輔因子之間白素 2 或刀豆球蛋白 A 使用可加強 I F N -  $\gamma$  之產製。

## 實例 A - 7 - 4 ( d )

N K 細胞所加強之胞毒性

以經肝素化之主射器，自健康志願者中收集新鮮血液，並以 10 m M 含有 140 m M 氯化鈉之磷酸鹽緩衝溶液 ( p H 7 . 4 ) 稀釋 2 倍。血液平覆在 Percoll 上，且生成物離心，再接受 P E R C O L L 梯度離心以得高密度淋巴細胞。

淋巴細胞懸浮於含有 10 微克 / 毫升康黴素，5  $\times$

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

## 五、發明說明 ( 55 )

1 0<sup>-5</sup>M 2 - 巰基乙醇，及 1 0 v / v % 胚牛血清之 RPM ± 1 6 4 0 培養基 ( p H 7 . 2 ) 中，以生成 1 × 1 0<sup>6</sup>細胞 / 毫升之細胞密度，懸浮液分佈於 1 2 孔洞之微滴定盤中，0 . 5 毫升 / 孔洞。以實例 B - 1 - 2 方法所得之多肽以相同培養基之新鮮製劑適當地稀釋，且經稀釋之溶液以 1 . 5 毫升 / 孔洞之量分佈於微滴定盤上，再以相同培養基新鮮製劑加或不加有 5 0 單位 / 毫升重組人類間白素 2，0 . 5 毫升 / 孔洞之量分佈盤中，微滴定盤在 3 7 °C，5 v / v % C O<sub>2</sub> 條件之培育箱中培育 2 4 小時，以含有 1 4 0 m M 氯化鈉之 1 0 m M 磷酸鹽緩衝溶液 ( p H 7 . 4 ) 洗滌微滴定盤，可得含有 N K 細胞為效應細胞之培養的淋巴中細胞。充作 N K - 細胞一敏感性標的細胞之衍自人類慢性骨髓性白血病之 K - 5 6 2 細胞 ( A T C C C C L 2 4 3 )，以一般方式以 <sup>51</sup>Cr 標記之，並分佈在 9 6 孔洞盤中生成 1 × 1 0<sup>4</sup>細胞 / 孔洞，且效應細胞加至各孔洞中，其中 ( 效應細胞 ) : ( 標的細胞 ) 之比率為 2 . 5 = 1，5 = 1 或 1 0 = 1，並在 3 7 °C，5 v / v % C O<sub>2</sub> 條件下培育 4 小時。依據傳統方法，各孔洞中上清液之放射活性偵測出以計數死之標的細胞。在各系統中，估計死的標的細胞對標的細胞之百分率 ( % ) 以決定胞毒水平。結果示於表 4。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 56 )

表 4

多肽之 濃度 (pM*)	間白素 2 濃度 (單位 / 毫升)	胞 毒 性 (%)		
		效 應 細 胞 : 標 的 細 胞		
		2.5=1	5:1	10:1
0	0	22	35	65
0	10	30	48	73
0.5	0	23	36	66
0.5	10	32	50	75
5	0	25	39	68
5	10	35	52	78
50	0	29	47	73
50	10	41	59	85
500	0	37	50	83
500	10	52	70	93

註\*：於表中“pM”符號表示  $10^{-12}M$ 。

表 4 之結果顯示多肽具有加強 NK 細胞胞毒性之活性。如表 4 所示，間白素 2 之共存可更加強胞毒性。

實例 A - 7 - 4 ( e )

誘導 L A K 細胞之形成

依據傳統方式，衍自人類布氏 ( Burkite ) 淋巴瘤充作標的細胞對 NK 細胞非敏感性之經  $^{51}Cr$  - 標記之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 57 )

Raji細胞 ( A T C C C C L 8 6 ) ，置於 9 6 孔洞微量  
 滴定盤中，使細胞達到  $1 \times 10^4$  細胞 / 孔洞，並培養  
 7 2 小時。經培養的淋巴細胞，含有 L A K 細胞為效應細  
 胞且類似實例 A - 7 - 4 ( d ) 製備，及標的細胞加至微  
 滴定盤中，其比率為 5 : 1 ， 1 0 : 1 或 2 0 : 1 ，且微  
 滴定盤在  $37^\circ\text{C}$  ， 5 v / v %  $\text{CO}_2$  條件之培育箱中培育  
 4 小時。之後，偵測各孔洞中各上清液中之放射活性，且  
 類似實例 A - 7 - 4 ( d ) 般估計胞毒性 ( % ) 。結果示  
 於表 5 中。

表 5

多肽之 濃度 (pM*)	間白素 2 濃度 (單位 / 毫升)	胞毒性 (%)		
		效應細胞 : 標的細胞		
		5=1	10:1	20:1
0	0	11	21	34
0	10	15	28	38
0.5	0	13	22	35
0.5	10	17	31	43
5	0	15	23	39
5	10	19	34	48
50	0	20	25	44
50	10	23	42	54
500	0	27	34	57
500	10	31	34	67

註：\*表中符號 " p M " 表示  $10^{-12}\text{M}$  。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

## 五、發明說明 ( 58 )

表 5 之結果顯示多肽具有誘導 L A K 細胞形成之活性。如結果所示，間白素 2 之共存可更加強誘導作用。

實例 A - 7 - 4 ( f )急性中毒試驗

依據傳統方式，以實例 B - 1 - 2 方法所得之經純化多肽，以穿皮，口服或腹膜內方式投予至 8 週大老鼠中。結果，經純化的多肽其 L D<sub>50</sub> 為約 1 毫克 / 公斤以上，和投藥路徑無關。此證知多肽可安全地納入藥物中以供投予至人體。

如熟知的，I F N -  $\gamma$  和經由拮抗細菌之感染性保護作用之人類生體防衛性，對於惡性腫瘤之生長抑制活性，及免疫調控活性深切有關。如上述，I F N -  $\gamma$  發展成用於人類敏感疾病之作用物，並實質地研究主題疾病，劑量，投藥路徑，及安全性。如在 "Cytokines in Cancer Therapy" 由 Frances R. Balkwill, 編輯, Yoshihiko WATANABE (1991) 翻譯, Tokyo-Kagaku-Dojin, Tokyo, Japan 出版中所述，當利用如 N K 細胞及 L A K 細胞之殺手細胞作用在各樣人類疾病包括抗腫瘤免疫療法時，幾乎可得令人滿意的結果。近來，已注意到在治療作用及殺手細胞之誘導或利用細胞動素加強殺手細胞毒性之間已有相互關係。如，T. Fujioka 於 "British Journal of

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

紙

## 五、發明說明 ( 59 )

Urology", Vol. 73, No. 1 pp23-31(1994)中所報告的，在利用 L A K 細胞及間白素 2 之抗腫瘤免疫療法中，間白素 2 可強烈地誘導 L A K 細胞之形成，並在人類癌症上可展現顯著的癌症轉移—抑制作用，而不致誘生嚴重的副作用。

因此其顯示，I F N -  $\gamma$  s 及殺手細胞與各樣人類疾病之治療及／或預防深切有關，且大大地造成其完整的治療或緩解。在這些狀況中，以及由實例 A - 7 - 4 ( c ) 反 A - 7 - 4 ( f ) 之結果證知，多肽可誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$ ，且加強 N K 細胞之胞毒生或誘導 L A K 細胞之形成，而不致引起嚴重的副作用。這些事實顯示，本多肽可重覆地投予至人體而不致誘導嚴重的副作用，並可在治療及／或預防和 I F N -  $\gamma$  及殺手細胞緊密相關之疾病上展現令人滿意的作用。

實例 B - 1融合瘤 H - 1 之製備實例 B - 1 - 1轉形細胞 K G F H H 2 之製備

在 0 . 5 毫升反應試管中加入 8 微升的 2 5 m M 氯化鎂，1 0 微升 1 0  $\times$  P C R 緩衝溶液，1 微升 2 5 m M d N T P 混合液，1 微升 2 . 5 單位／微升 Amplitaq DNA 聚合酶，1 毫微克重組體 D N A，其中含有製備自噬

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(60)

菌體 DNA 純系之 SEQ ID No. 8 鹼基序列，且含有編碼 SEQ ID No. 1 多肽之 DNA，及適量的由 5' - A T A G A A T T C A A A T G T A C T T T G G C A A G C T T G A A T C - 3' (此依據 SEQ ID No. 1 近 N 及 C 末端之胺基酸序列為基礎而化學合成)，及 5' - A T A A A G C T T C T A G T C T T C G T T T T G A A C - 3' 代表之意識引子及抗意識引子，且混合物溶液以蒸餾水加至總體積達 100 微升。混合物溶液以一般方式相繼培育，94 °C 下 1 分鐘，43 °C 下 1 分鐘，及 72 °C 下 1 分鐘，且此依序培育重覆 3 次。生成的混合物進一步相繼培育，在 94 °C 下 1 分鐘，60 °C 下 1 分鐘，及 72 °C 下 1 分鐘，且此相繼培育重覆 40 次以達成 PCR 反應。

生成的 PCR 反應混合物及 "pCR-Script SK(+)"，一種購自 Stratagene Cloning systems, California, USA, 之質體載體，以 DNA 連接酶連接以得重組體 DNA，其再以勝任細胞引入 "Escherichia coli XL-1 BlueMRF' Kan" 中，一種購自 Stratagene Cloning Systems, California, USA 之微生物，以轉形微生物。如此得到的轉形細胞接種至含有 50 微克 / 毫升氨苄青霉素之 L 肉汁中 (pH 7.2)，再於 37 °C 震盪條件下培育 18 小時，再將生成的培育物離心以收集經增殖之轉形細胞，再以傳統的鹼 - SDS 方法分離重組體 DNA。提供部份重組體 DNA，二去氧方法分析，結果顯示其含有一段

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

## 五、發明說明 ( 61 )

D N A , 其在 S E Q I D N o . 8 之 5 ' 及 3 ' - 末  
端處有 E c o R I 及 H i n d III 解離位置 , 一個啓動多  
肽合成之甲硫胺酸密碼子及在相當於 S E Q I D N o  
. 8 N 及 C - 末端前及後位置之所在 , 以及可終止多肽合  
成之 T A G 密碼子。

## SEQ ID NO:8:

TAC	TTT	GGC	AAG	CTT	GAA	TCT	AAA	TTA	TCA	GTC	ATA	AGA	AAT	TTG	AAT	48
Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	
1				5				10						15		
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	ATT	GAC	CAA	GGA	AAT	CGG	CCT	CTA	TTT	GAA	GAT	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
			20					25						30		
ATG	ACT	GAT	TCT	GAC	TGT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
			35					40						45		
ATA	AGT	ATG	TAT	AAA	GAT	AGC	CAG	CCT	AGA	GGT	ATG	GCT	GTA	ACT	ATC	192
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
			50			55				60						
TCT	GTG	AAG	TGT	GAG	AAA	ATT	TCA	AYT	CTC	TCC	TGT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Xaa	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile	
65						70				75					80	
ATT	TCC	TTT	AAG	GAA	ATG	AAT	CCT	CCT	GAT	AAC	ATC	AAG	GAT	ACA	AAA	288
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
						85				90					95	
AGT	GAC	ATC	ATA	TTC	TTT	CAG	AGA	AGT	GTC	CCA	GGA	CAT	GAT	AAT	AAG	336
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
										105					110	
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TGT	GAA	384
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	
			115					120							125	
AAA	GAG	AGA	GAC	CTT	TTT	AAA	CTC	ATT	TTG	AAA	AAA	GAG	GAT	GAA	TTG	432
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
			130				135								140	
GGG	GAT	AGA	TCT	ATA	ATG	TTC	ACT	GTT	CAA	AAC	GAA	GAC				471
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				
145						150										
																155

留下的重組體 D N A s , 以限制酶 E c o R I 及  
H i n d III 解離 , 且 0 . 1 微克以 "DNA LIGATION KIT  
Version 2" ( 一種購自 Takara Shuzo Co., Ltd.,  
Tokyo, Japan 之 D N A 連接套組 ) 所得之生成的  
E c o R i - H i n d III D N A 片段 , 及 1 0 毫微克 "

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 62 )

p K K 2 3 3 - 3 " ( 一種購自 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala Sweden 之質體載體 ) , 其先前已用上述限制酶解離 , 將其在 16 °C 下培育 30 分鐘以連接而得可複製之重組體 DNA " p K G F H H 2 " 。利用勝任細胞法 , 大腸桿菌 Y 1 0 9 0 株 ( A T C C 3 7 1 9 7 ) 以可複製的重組體 DNA p K G F H H 2 轉形 , 所形成的轉形細胞 " K G F H H 2 " 接種至含有 50 微克 / 毫升氨苄青黴素之 L 肉汁中 ( p H 7 . 2 ) , 並在 37 °C 及震盪條件下培育 18 小時。生成的培養物離心以收集經增殖之轉形細胞 , 且取其一部份以傳統的 SDS - 鹼方法處理以萃取重組體 DNA p K G F H H 2 。如 3 所示 , 以二去氧方法分析顯示 , 在重組體 DNA p K G F H H 2 中 , 含有 SEQ I D N o . 8 中鹼基序列之 " K G F H H 2 c D N A 連接至 T a c 啟動子之下游。

實例 B - 1 - 2自轉形細胞 K G F H H 2 中產製多肽

含有 50 微克 / 毫升氨苄青黴素之 L 肉汁 ( p H 7 . 2 ) 以真空壓熱法滅菌 , 冷卻至 37 °C , 以實例 B - 1 - 1 之轉形細胞 K G F H H 2 接種 , 並在相同溫度下培育 18 小時 , 於震盪條件下得種子培養物。18 升的相同培養基新鮮製劑置於 20 升醱酵槽中 , 如上述般滅菌 , 冷卻至 37 °C , 以 1 v / v % 種子培養物接種 , 再於相同溫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 63 )

度下培養 8 小時，在需氣及攪動條件下進行。生成的培養物離心以收集細胞，其再懸浮於由 150 mM 氯化鈉，16 mM 磷酸氫二鈉，及 4 mM 磷酸二氫鈉組成之混合溶液中 ( pH 7.3 )，以超音波瓦解，再離心移去細胞殘屑得上清液。

加硫酸銨至上清液，使濃度可高達 40 w / v % 並溶解至勻質狀，溶液再離心得上清液。上清液先混合以含有 1.5 M 硫酸銨之 150 mM 磷酸鹽緩衝溶液 ( pH 6.6 )，再填加至充填有 "PHENYL SEPHAROSE" 之管柱中，此為 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 之產品，其先用含有 1.5 M 硫酸銨之 10 mM 磷酸鹽緩衝溶液平衡，再以相同緩衝溶液之新鮮製劑洗管柱，管柱中再填加由 1.5 M 至 0 M 於 10 mM 磷酸鹽緩衝溶液之硫酸銨緩衝溶液梯度 ( pH 6.6 )。

匯集在約 1.0 M 硫酸銨處溶離之流份，以膜過濾，對 10 mM 磷酸鹽緩衝溶液 ( pH 6.5 ) 在 4 °C 下透析 18 小時，並填加至充填有 "DEAE 5PW" 之管柱中，此為 Tosoh Corporation, Tokyo, Japan 之產品，其先前已用 10 mM 磷酸鹽緩衝溶液 ( pH 6.5 ) 平衡，再以相同緩衝溶液之新鮮製劑洗滌管柱，並以 0 M 至 0.2 M 氯化銨於 10 mM 磷酸鹽緩衝溶液 ( pH 6.5 ) 之緩衝溶液直線梯度填加，同時收集在 0.05 氯化鈉處溶離之流份。

之後，流份以膜濃縮，再填加至充填有 "SUPER

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( 64 )

D E X 7 5 " 之管柱中，此為 Pharmacia LKB Biot-  
echnology AB, Uppsala, Sweden之產品，其以磷酸鹽緩  
衝之食鹽水（下文以 " P B S " 縮寫之）平衡，再以  
P B S 之新鮮製劑填加至管柱以收集相當於約  
1 8 , 5 0 0 道耳吞之流份。因此，可得含有約 5 . 2 毫  
克絡純化蛋白質之水溶液。整個純化中之總產率為約 1 0  
% 。

分析經純化的蛋白質，且發現其具有以下物化特性：  
當在還原條件下於 S D S - 聚丙烯醯胺凝膠上電泳，經純  
化的蛋白質呈主蛋白質帶型式，具有 I F N -  $\gamma$  誘導力及  
位於相當於 1 8 , 5 0 0  $\pm$  3 , 0 0 0 道耳吞之位置，同  
時 p I 值為 4 . 9  $\pm$  1 . 0 （在色譜聚焦上）。含有經純  
化蛋白質 N - 末端之胺基酸序列，具有 S E Q I D  
N o . 9 中之胺基酸序列，相當於在 S E Q I D  
N o . 1 中，且其中甲硫胺酸偶合至其 N - 末端。

#### SEQ ID NO:9:

Met Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser  
1 5 10

### 實例 B - 1 - 3

#### 融合瘤 H - 1 之製備

1 0 週大的 B A L B / c 老鼠，腹膜內注入 2 0 微克  
/ 老鼠的經純化多肽，此得自實例 B - 1 - 2，並加上完  
全的 Freund's 佐劑。老鼠進一步以相同劑量在 2 週間隔  
下注射，並於最後一次注射後一週靜脈內注入相同劑量，

（請先閱讀背面之注意事項再為本頁）

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( 65 )

萃取其脾臟再懸浮以得細胞懸液。

脾細胞及來自老鼠骨髓瘤之 S P 2 / 0 - A g 1 4 細胞 ( A T C C C R L 1 5 8 1 ) 懸浮於 R P M I 1 6 4 0 培養基 ( p H 7 . 2 ) ，其分別在  $3 \times 10^4$  細胞 / 毫升及  $1 \times 10^4$  細胞 / 毫升細胞密度下預加熱至  $37^\circ\text{C}$  ，並離心以收集沈積物。再以 1 分鐘在沈積物上逐滴加入含有 5 0 w / v 聚乙二醇 ( 平均分子量 1 , 5 0 0 道耳吞 ) 之 1 毫升無血清 R P M I 1 6 4 0 培養基 ( p H 7 . 2 ) ，且混合物在  $37^\circ\text{C}$  下培育 1 分鐘，再將無血清之 R P M I 1 6 4 0 培養基逐滴加入混合物中 ( p H 7 . 2 ) 使達 5 0 毫升總體積，離心混合物，再收集所形成之沈積物。如此得到的沈積物懸浮於 H A T 培養基中，分佈至 9 6 孔洞微滴定盤中每孔洞 2 0 0 微升，並在  $37^\circ\text{C}$  下培育 1 週，再選擇融合瘤。

在各孔洞中之上清液中分泌出之抗體含量，在酵素免疫分析法上進行分析，其以抗體及實例 B - 1 - 2 方法所得之經純化多肽之免疫反應為基礎，再選出可與經純化多肽強烈反應之融合瘤。可產製本單株抗體之經選殖的融合瘤 H - 1 細胞，以一般方式獲得，係以有限的稀釋重覆處理這些融合瘤而成。

#### 實例 B - 2

製備單株抗體 H - 1 m A b ，並在西方墨點技術上分析

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(66)

實例 B - 2 - 1製備單株抗體 H - 1 m A b

以實例 B - 1 - 3 方法所得之融合瘤 H - 1 細胞，懸浮於添加有 5 v / v 牛血清之 RPMI 1640 培養基中 (pH 7.2)，使細胞密度達到約  $1 \times 10^6$  細胞 / 毫升，再於 37°C，5 v / v CO<sub>2</sub> 條件之培養箱中培育，同時擴大培養物。當培養物之細胞密度達到預定水平，增殖之融合瘤 H - 1 細胞以  $1 \times 10^7$  細胞 / 老鼠腹膜內注入 8 週大的 B A C B / C 老鼠中，其則在先前已經腹膜內注射入 0.5 毫升，再以一般方法餵養老鼠一週。

自老鼠中收集腹水，以 P B S 稀釋劑 3 倍，與硫酸銨混合使達 50 w / v % 飽和度，令其在 4°C 下靜置 24 小時，並離心收集沈積物。沈積物以 20 m M 磷酸二氫鉀 (pH 6.7) 在 4°C 下透析一夜。填加至經磷灰石管柱內，其則已先用相同水溶液之新解製劑平衡，再將由 20 m M 至 300 m M 磷酸二氫鉀緩衝溶液 (pH 6.7) 之線性梯度填加至管柱，以得含有本單株抗體 H - 1 m A b 之水溶液。產率為每隻老鼠約 5 毫克。傳統的分析顯示，抗體屬於 I g G 1 類型。

實例 B - 2 - 2在西方墨點上分析

以實例 B - 1 - 2 方法所得之 1 微克的經純化多肽，

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(67)

加至由100毫克二硫異赤弱藻醇，0.5毫升10w/v% SDS水溶液，及1毫升甘油組成之混合溶液中，且混合物在37℃下培育1小時，並在SDS-聚丙烯醯胺凝膠上電泳。生成之凝膠以一般方式轉移至硝化纖維膜上，其再浸於融合瘤H-1細胞之培養物上清液中1小時，並以含有0.05v/v% tween 20之50mM Tris-HCl緩衝溶液(pH 7.5)洗滌，以移去過量的抗體。膜進一步在含有抗-老鼠Ig抗體(製備自兔子)之PBS中浸一小時以達成免疫反應，以含有0.05v/v% tween 20之50mM Tris-HCl緩衝溶液(pH 7.5)洗滌，並浸於含有0.005v/v%過氧化氫及0.3毫克/毫升3,3'-二胺基聯苯胺之50mM Tris-HCl緩衝溶液(pH 7.5)以達成著色反應。

至於對照組，提出利用重組人類間白素12取代純化多肽之系統，並如上類似地處理。以牛血清白蛋白1MW = 67,000道耳吞)，卵白蛋白1MW = 45,000道耳吞)，碳酸酐酶(MW = 30,000道耳吞)，胰蛋白酶抑制劑(MW = 20,100道耳吞)，及L-乳清蛋白(1MW = 14,400道耳吞)為標幟蛋白質。這些結果於第4圖中。

由圖4中證知，單株抗體H-1mAb可與以實例B-1-2方法所得之經純化的多肽(1列)特異地反應，但不與人類間白素12(2列)反應。此可證知本單株抗

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 ( 68 )

體可與具有特殊胺基酸序列之多肽特異地反應。

實例 B - 3製備融合瘤 H - 2 及單株抗體 H - 2 m A b

以實例 B - 2 - 1 之方法可類以地製備單株抗體 - 融合瘤 H - 2，除了使用 P 3 - X 6 3 - A g 8 細胞 ( A T C C T I B 9 ) 替代 S P / O - 1 4 A g 細胞之外。

實例 B - 3 - 2製備單株抗體 H - 2 m A b

融合瘤 H - 2 實例 B - 3 - 1 中得到後，類似實例 B - 2 - 1 般培養，且純化培養物以得每 B A L B / c 老鼠約 5 . 6 毫克的單株抗體 H - 2 m A b。經傳統分析顯示，單株抗體屬於 I g M 型式，且當類似實例 B - 2 - 2 般在西方墨點上分析時，以實例 B - 1 - 2 方法所得之經純化之多肽可與其特異地反應。

實例 B - 4

在免疫親和力層析上純化多肽

實例 B - 4 - 1

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 (69)

### 製備用於免疫親和力層析之凝膠

以實例 B - 2 - 1 方法所得之 80 毫克單株抗體 H - 1 m A b，稱重再以含有 0.5 M 氯化鈉之 0.1 M 硼酸鹽緩衝溶液 (pH 8.5) 在 4 °C 下透析一夜。令 4 克、經 C N B r - 活化之 Sepharose 4B<sup>®</sup>，一種購自 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 之水不溶性載劑，以 1 m M 氯酸水溶液泡脹，再以相同緩衝溶液之新鮮製劑及 0.1 M 硼酸鹽緩衝溶液 (pH 8.5) (其中含有 0.5 M 氯化鈉) 相繼洗滌，摻合以約 10 毫升以上述方法所得之單株抗體水溶液，並相繼培育在環境溫度及 4 °C 下一夜，在緩和攪拌條件下進行。之後，生成的凝膠以 1 M 乙醇胺溶液 (pH 8.0)，0.1 M 硼酸鹽緩衝溶液 (pH 8.5) (其中含有 0.5 M 氯化鈉)，及 0.1 M 醋酸鹽緩衝溶液 (pH 4.0) 相繼洗滌，這些洗滌步驟並重覆 5 次。最後，凝膠以 P B S 洗滌以得可用於免疫親和力層析之凝膠。傳統的分析顯示，約 6 毫克單株抗體 H - 1 m A b 可連接至 1 毫升凝膠上。

### 實例 B - 4 - 2

#### 在免疫親和力層析上純化多肽

實例 B - 4 - 1 中用於免疫親和力層析之 10 毫升凝膠，填加至塑膠圓筒型管柱中，以 P B S 洗滌，再充填以 10 毫升含有約 0.1 毫克 / 毫升以實例 B - 1 - 2 方法

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(70)

所得之多肽之苯基 Sepharose 溶離流份。管柱以 P B S 之新鮮製劑洗滌，再充填以含有 1 M 氯化鈉之 0.1 M 甘氨酸 - H C l 緩衝溶液，以收集有 I F N -  $\gamma$  誘導活性之流份。流份匯集，以 P B S 在 4 °C 下透析一夜，濃縮，並分析 I F N -  $\gamma$  誘導活性及蛋白質含量，且結果顯示此純化步驟可生成純度為 95 w / w % 以上的純化多肽，產率為約 100 %。

## 實例 B - 5

在酵素免疫分析上偵測多肽

兔子以一般方式以實例 B - 1 - 2 方法所得之純化多肽免疫接種，並收集其血液。自血中分離免疫球蛋白 G 抗體，並溶於 P B S 中使濃度達 20 微克 / 毫升，且溶液分佈至 96 孔洞微滴定盤中，含量為每孔洞 100 微升。微滴定盤在環境溫度下培育 3 小時，再移去含有 I g G 之溶液，加入含有 w / v % 牛血清白蛋白之 P B S，含量為每孔洞 200 微升，並令其靜置 4 °C 下一夜。

移出微量滴定盤上經磷酸鹽緩衝之食鹽水，其再以含有 0.05 v / v % t w e e n 20 之 P B S 洗滌，並注入每孔洞 100 微升實例 B - 1 - 2 方法所得之純化多肽，其則以含有 0.5 w / v % 牛血清白蛋白之 P B S 適當稀釋製成溶液，再於環境溫度及震盪條件下反應混合物溶液歷 2 小時。微滴定盤以含有 0.05 v / v %

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(71)

t w e e n 2 0 之 P B S 洗滌，並注入每孔洞 1 0 0 微升含有單株抗體 H - 1 m A b 並經生物素標記之溶液，反應溶液在環境溫度下反應 2 小時（震盪條件下），以含有 0 . 0 5 v / v % t w e e n 2 0 之 P B S 洗滌微滴定盤，注入每孔洞 1 0 0 微升含有辣根過氧化物酶及鏈抗生物素蛋白複合物之溶液，生成的混合物在環境溫度及震盪條件下進一步反應 2 小時。之後，以含有 0 . 0 5 v / v % t w e e n 2 0 之 P B S 洗滌微滴定盤，並在 4 9 2 毫微米波長下偵測辣根過氧化物酶連接至經純化多肽之活性，此中利用鄰近一苯二胺為受質。結果示於表 6 中。

表 6

多肽濃度 (微微克/毫升)	492毫微米* 下之吸光度	相對誤差 (%)
1,000	1.51 ± 0.05	3.3
500	0.93 ± 0.05	5.4
250	0.55 ± 0.03	5.5
100	0.25 ± 0.02	8.0
50	0.137 ± 0.007	5.1
25	0.080 ± 0.007	8.8
0	0.024 ± 0.007	-

註：\* 表示三次之統計值

由表 6 結果證知，依據本發明之偵測方法，可正確地

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( 72 )

分析約 50 - 1,000 微微克 / 毫升範圍之多肽。

#### 實例 B - 6

##### 於放射免疫分析上偵測多肽

兔子以一般方式以實例 B - 1 - 2 方法所得之經純化多肽免疫，共收集其血液，再分離 I g G 抗體。抗體以一般方式吸附在聚苯乙烯珠粒上以行放射免疫分析，並令其靜置在含有 2 w / v % 牛血清白蛋白之 P B S 中，於 4 °C 下一夜以得經回化之抗體。

試管中置入一個珠粒，浸於 0.2 毫升由實例 B - 1 - 2 方法所得之經純化多肽以含有 0.5 w / v % 牛血清白蛋白之 P B S 稀釋製備之溶液，並令其在 4 °C 下靜置 4 小時。之後，珠粒以含有 0.05 v / v % t w e e n 20 及 0.5 w / v % 牛血清白蛋白之 P B S 洗滌，浸於 0.2 毫升 (  $1 \times 10^5$  c p m ) 含有實例 B - 3 - 2 方法所得之單株抗體 H - 2 m A b 並標以  $^{125}$  I 之溶液，再令其於 4 °C 下靜置一夜。移去過量經  $^{125}$  I 一標記之抗體後，珠粒以含有 0.05 v / v % t w e e n 20 及 0.5 w / v % 牛血清白蛋白之 P B S 洗滌，再於  $\gamma$  - 計數器上計數珠粒之放射活性。結果示於表 7 中。

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(73)

表 7

多肽濃度 (微微克/毫升)	計數* (CPM)	相對誤差 (%)
1,000.0	6,900 ± 200	2.9
500.0	4,100 ± 20	0.5
250.0	2,390 ± 50	2.1
125.0	1,590 ± 70	4.4
62.5	880 ± 10	1.1
0	700 ± 20	-

註：\* 符號表示三次之統計數值。

由表 7 之結果證知，本偵測法可正確地分析約 100 - 1,000 微微克/毫升範圍中之多肽。

實例 C - 1溶液劑

以實例 B - 1 - 2 方法所得之多肽，溶於含有 1 w / v % 人類血清白蛋白為穩定劑之生理食鹽水中，以得 1 毫克/毫升多肽溶液，其以膜過濾滅菌以得溶液劑。

多肽具有令人滿意的穩定性，可充作注射劑，眼用溶液劑，及灌鼻藥，以治療及/或預防敏感疾病如惡性腫瘤，病毒疾病，細菌傳染性疾病，及免疫疾病。

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(74)

### 實例 C - 2

#### 乾式注射劑

以實例 B - 1 - 2 方法所得之多肽，溶於 100 毫升含有 1 w / v % 經純化明膠為穩定劑之生理食鹽水中，且溶液以一般方式以膜過濾滅菌。一份 1 毫升的經滅菌溶液分裝於小瓶中，冷凍乾燥再加蓋熔封。

產物具令人滿意的穩定性，可充作乾式注射劑以治療及 / 或預防敏感疾病，如惡性腫瘤，病毒疾病，細菌性疾病，及免疫疫病。

### 實例 C - 3

#### 油膏

"HI-BIS-WAKO 104"，一種購自 Wako Pure Chemicals, Tokyo, Japan 之羧乙烯基聚合物，及經純化的海藻糖溶於蒸餾水使濃度分別為 1.4 w / w % 及 2.0 w / w %，且以實例 B - 1 - 2 方法所得之多肽溶於溶液中使達均質，再將生成的溶液調至 pH 7.2，以得含有約 1 毫克 / 克多肽之糊劑。

產物有令人滿意的散而性及穩定性，可充作油膏以治療及 / 或預防敏感性疾病，如惡性腫瘤，病毒疾病，細菌傳染性疾病，及免疫疾病。

(請先閱讀背面之注意事項再打為本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(75)

實例 C - 4錠劑

以實例 B - 1 - 2 方法所得之多肽，及 L U M I N 即 [ 雙 - 4 - ( 1 - 乙基喹啉 ) [  $\gamma$  - 4 ' - ( 1 - 乙基喹啉 ) 五甲硫胺酸喹啉藍，充作細胞活化劑，與 " F I N E T O S - E <sup>®</sup> "，一種購自 Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japan 之無水晶狀  $\gamma$  - 麥芽糖，混合至均質，且混合物以一般方式利用製錠機製錠，以得各約 200 毫克之錠劑，其中含有各約 1 毫克之多肽及 L U M I N。

產物具有令人滿意的容服力，穩定性及細胞活化活性，且可充作治療及 / 或預防敏感性疾病之錠劑，如惡性腫瘤病毒性疾病，細菌傳染性疾病，及免疫疾病。

實例 C - 5過繼性免疫治療劑

自有惡性淋巴癌之病人周邊血液中分離單核細胞，懸浮於添加有 10 v / v % 人類 A B 血清之 R P M I 1640 培養基 ( p H 7 . 2 )，並預熱至 37 °C 使細胞密度達約  $1 \times 10^6$  細胞 / 毫升，再與約 1 . 0 微克 / 毫升多肽 ( 以實例 B - 1 - 2 方法獲得 ) 及約 100 單位 / 毫升重組人類間白素 2 混合，再將生成物培育於 5 v / v % C O <sub>2</sub> 及 37 °C 之培育箱中一週，並離心生成培養物以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

## 五、發明說明 ( 76 )

收集 L A K 細胞。

如此得到的 L A K 細胞當引入供者病患體內時，可在淋巴瘤細胞上呈現強的胞毒性，且較利用問白素 2 單獨於過繼性免疫療法所得的可呈現更高之胞毒性。將入病人腫瘤組織之淋巴細胞類似地處理而得之胞毒 T 細胞，替代上述的淋巴細胞注入供者病人體內，可造成與由 L A K 細胞所得之相似作用。過繼性免疫治療劑可任意使用以治療固體惡性腫瘤，如腎癌，惡性黑色素瘤，結腸癌，直腸癌，及肺癌。

本發明是以新穎多肽之發現為基礎，其可誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$ 。多肽是一種物質，有部份或完全顯示之胺基酸序列，且穩定的誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  之活性。

多肽具有強的 I F N -  $\gamma$  誘導性，如此僅以少量即可誘生欲求含量之 I F N -  $\gamma$  產生。多肽不會造成嚴重的副作用，即使當以相當高劑量投予時，因為其具極低毒性。因此，本多肽具有可立即誘導欲求量 I F N -  $\gamma$  產生之優點，而勿需嚴格控制劑量。

本單株抗體可與多肽特異地反應，且可廣泛用於純化及多肽之偵測。抗體利用融合瘤製備可達欲求含量。

用於敏感疾病之本作用物在治療及 / 或預防敏感疾病上展現令人滿意的作用，如惡性腫瘤，病毒疾病，細菌傳染性疾病，及免疫疾病。再者，作用物具有加強殺手細胞胞毒性之活性，或誘導殺手細胞形成之活性，並在治療嚴

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明(77)

重疾病如惡性腫瘤上展現令人滿意的作用。

因此，本發明是一個重要的發明，其有顯著的作用並對此領域有重大貢獻。

雖然此中已描述何者本發明較佳之具體實例，但仍要了解此中仍可有各樣的變化，且全部涵蓋在所附之申請專利範圍中，只要其落在本發明真實精神及範圍之內。

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

86. 7. -8 修正  
年 月 日  
7. -8 補充

464656

A5  
B5

四、中文發明摘要(發明之名稱: )

誘使干擾素 -  $\gamma$  製造之多肽，單株抗體及用於對干擾素 -  $\gamma$  敏感疾病的藥劑

本發明是有關一種新穎的多肽，其在 SDS - PAGE 上具  $18,500 \pm 3,000$  道耳吞之分子量，及在色聚焦法中有  $4.9 \pm 1.0$  之 pI 值。多肽僅用少量即可強烈誘導免疫勝任細胞產製 IFN -  $\gamma$  且即使以相當高劑量投多至人體也不會造成嚴重的副作用。利用得自融合瘤之單株抗體其可容易地製備，且可納入應用於 IFN -  $\gamma$  敏感疾病之作用物中以治療及 / 或預防惡性腫瘤，病毒性疾病，細菌感染性疾病，及免疫疾病。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要(發明之名稱: Interferon-gamma production inducing polypeptide, monoclonal antibody, and agent for interferon-gamma susceptible disease)

訂

A novel polypeptide which has a molecular weight of  $18,500 \pm 3,000$  daltons on SDS-PAGE and a pI of  $4.9 \pm 1.0$  on chromatofocusing. The polypeptide strongly induces the IFN- $\gamma$  production by immunocompetent cells with only a small amount, and dose not cause serious side effects even when administered to human in a relatively-high dose. It is readily prepared by using a monoclonal antibody obtained from hybridomas, and incorporated into agents for IFN- $\gamma$  susceptible diseases to treat and/or prevent malignant tumors, viral diseases, bacterial infectious diseases, and immune diseases.

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

附件 1 - 1

90. 7. 18 修正  
年 月 日 補充

第 84110504 號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國 90 年 7 月 修正

1. 一種誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  之多肽，其具有 S E Q I D N o. 1 所示之胺基酸序列（其中符號 " X a a " 表示 " 異白胺酸 " 或 " 蘇胺酸 " ），且在硫酸十二酯鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳（ S D S - P A G E ）上具有 1 8 , 5 0 0  $\pm$  3 , 0 0 0 道耳吞之分子量，在色譜聚焦上具有 4 . 9  $\pm$  1 . 0 之等電點，

SEQ ID NO:1:

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1				5					10					15	
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
			20					25					30		
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
			35				40					45			
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
			50			55					60				
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Xaa	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
					85				90					95	
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys
					100			105					110		
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu
							120					125			
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
						135						140			
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp.			
145					150							155			

2. 一種編碼申請專利範圍第 1 項之多肽的 D N A ，及其簡併序列，其中該簡併序列係編碼 S E Q I D N O : 1 所示的胺基酸序列。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂 線

## 六、申請專利範圍

3. 如申請專利範圍第2項之DNA，其具有SEQ

ID NO: 2所示之核苷酸序列，

TACTTTGGCA	AGCTTGAATC	TAAATTATCA	GTCATAAGAA	ATTTGAATGA	CCAAGTTCTC	60
TTCATTGACC	AAGGAAATCG	GCCTCTATTT	GAAGATATGA	CTGATTCTGA	CTGTAGAGAT	120
AATGCACCCC	GGACCATATT	TATTATAAGT	ATGTATAAAG	ATAGCCAGCC	TAGAGGTATG	180
GCTGTAACTA	TCTCTGTGAA	GTGTGAGAAA	ATTTCAAYTC	TCTCCTGTGA	GAACAAAATT	240
ATTTCCCTTA	AGGAAATGAA	TCCTCCTGAT	AACATCAAGG	ATACAAAAG	TGACATCATA	300
TTCTTTTCAGA	GAAGTGTCCC	AGGACATGAT	AATAAGATGC	AATTTGAATC	TTCATCATA	360
GAAGGATACT	TTCTAGCTTG	TGAAAAAGAG	AGAGACCTTT	TAAACTCAT	TTTGAAAAAA	420
GAGGATGAAT	TGGGGGATAG	ATCTATAATG	TTCACTGTTC	AAAACGAAGA	C	471

4. 如申請專利範圍第2項之DNA，其具有SEQ

ID No. 6所示之核苷酸序列（其中符號“Xaa

”表示“異白胺酸”或“蘇胺酸”）：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

表

訂

線

六、申請專利範圍

SEQ ID NO:6:

```

GCCTGGACAG TCAGCAAGGA ATTGTCTCCC AGTGCATTTT GCCCTCCTGG CTGCCAACTC 60
TGGCTGCTAA AGCGGCTGCC ACCTGCTGCA GTCTACACAG CTTCGGGAAG AGGAAAGGAA 120
CCTCAGACCT TCCAGATCGC TTCCTCTCGC AACAACTAT TTGTCGCAGG AATAAAG 177
ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA ATG 225
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met
1 5 10 15
AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA GCT GAA GAT GAT GAA AAC 273
Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn
20 25 30
CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA 321
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile
35 40 45
AGA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT 369
Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro
50 55 60
CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG 417
Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg
65 70 75
ACC ATA TTT ATT ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG 465
Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met
85 90 95
GCT GTA ACT ATC TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA AYT CTC TCC TGT 513
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys
100 105 110
GAG AAC AAA ATT ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC 561
Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile
115 120 125
AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA 609
Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly
130 135 140
CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT 657
His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe
145 150 155
CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA 705
Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
165 170 175
GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA 753
Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu
180 185 190
GAC TAGCTA TAAAATTTC ATGCCGGGCG CAGTGGCTCA CGCCTGTAAT CCCAGCCCTT 812
Asp
TGGGAGGCTG AGCGGGGCGAG ATCACCAGAG GTCAGGTGTT CAAGACCAGC CTGACCAACA 872
TGGTCAAACC TCATCTCTAC TAAAAATACT AAAAAATTAGC TGAGTGTAGT GACGCATGCC 932
CTCAATCCCA GCTACTCAAG AGGCTGAGGC AGGAGAATCA CTTGCACTCC GGAGGTAGAG 992
GTTGTGGTGA GCCGAGATTG CACCATGCG CTCTAGCCTG GGCAACAACA GCAAACTCC 1052
ATCTCAAAA AAAAAATAAA TAAATAACA AATAAAAAAT TCATAATGTG AAAAAAAAAA 1112
AAAAAAA 1120

```

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 六、申請專利範圍

5. 如申請專利範圍第 2 項之 DNA，其係衍自人類。
6. 一種用於抗腫瘤免疫療法之藥學組成物，其包括有效劑量之作為活性組份的申請專利範圍第 1 項之多肽，及／或其藥學上可接受之載劑。
7. 如申請專利範圍第 6 項之藥學組成物，其中該多肽可加強殺手細胞之胞毒性及／或誘導殺手細胞之形成。
8. 如申請專利範圍第 6 項之藥學組成物，其中該殺手細胞為選自下列之成員包括 NK 細胞，LAK 細胞（淋巴激素活化之殺手細胞）及胞毒性 T - 細胞。
9. 如申請專利範圍第 6 項之藥學組成物，其額外地含有一個以上選自下列之成員，包括間白素 2，間白素 1 2 及力豆球蛋白 A。
10. 如申請專利範圍第 6 項之藥學組成物，其含有作為穩定劑的選自下列一種以上之成員，包括血清白蛋白，明膠，麥芽糖及海藻糖。
11. 如申請專利範圍第 6 項之藥學組成物，其含有按乾固計為 0.000001 - 100 w / w % 的多肽。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

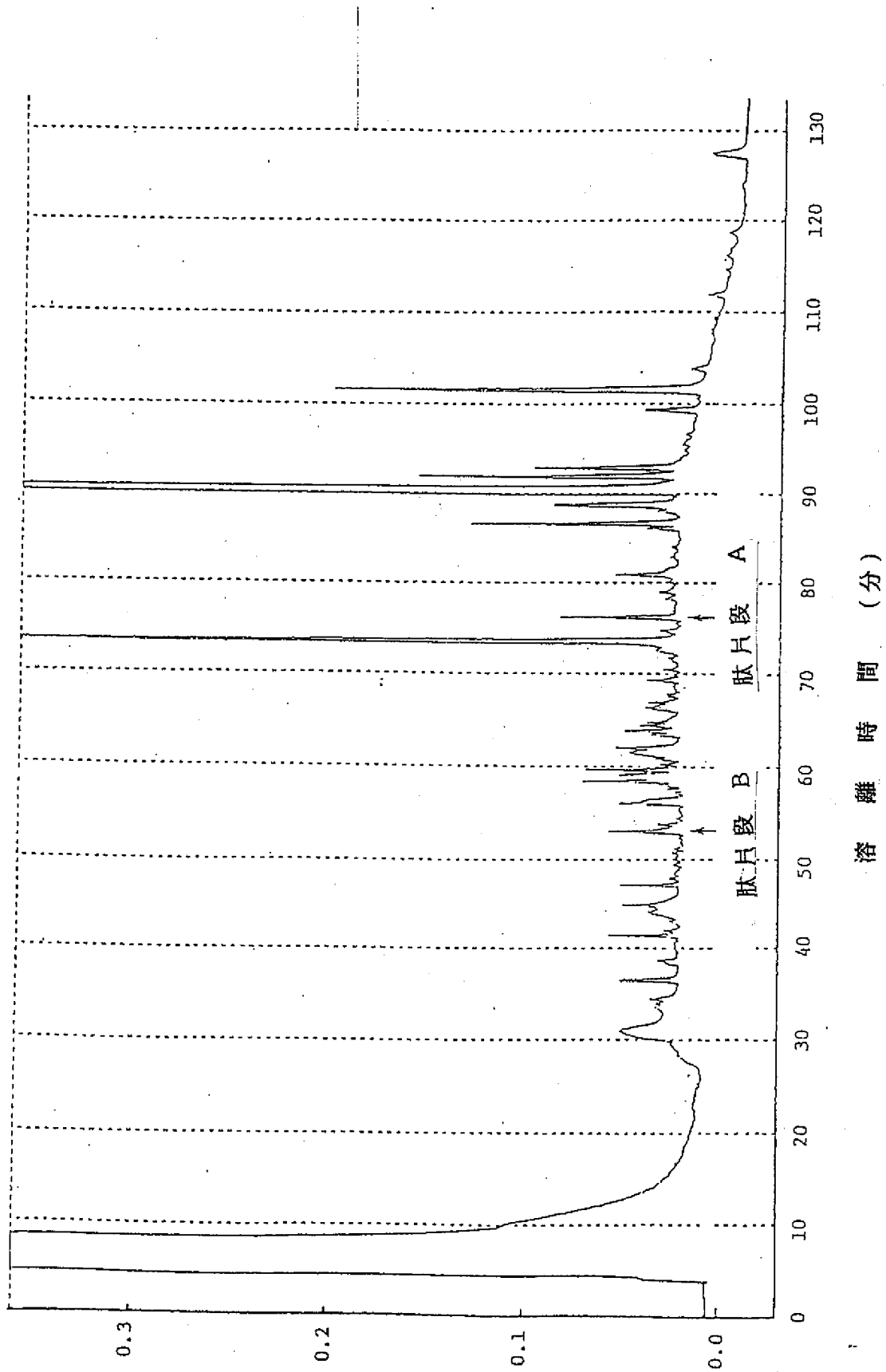
裝

訂

線

464656

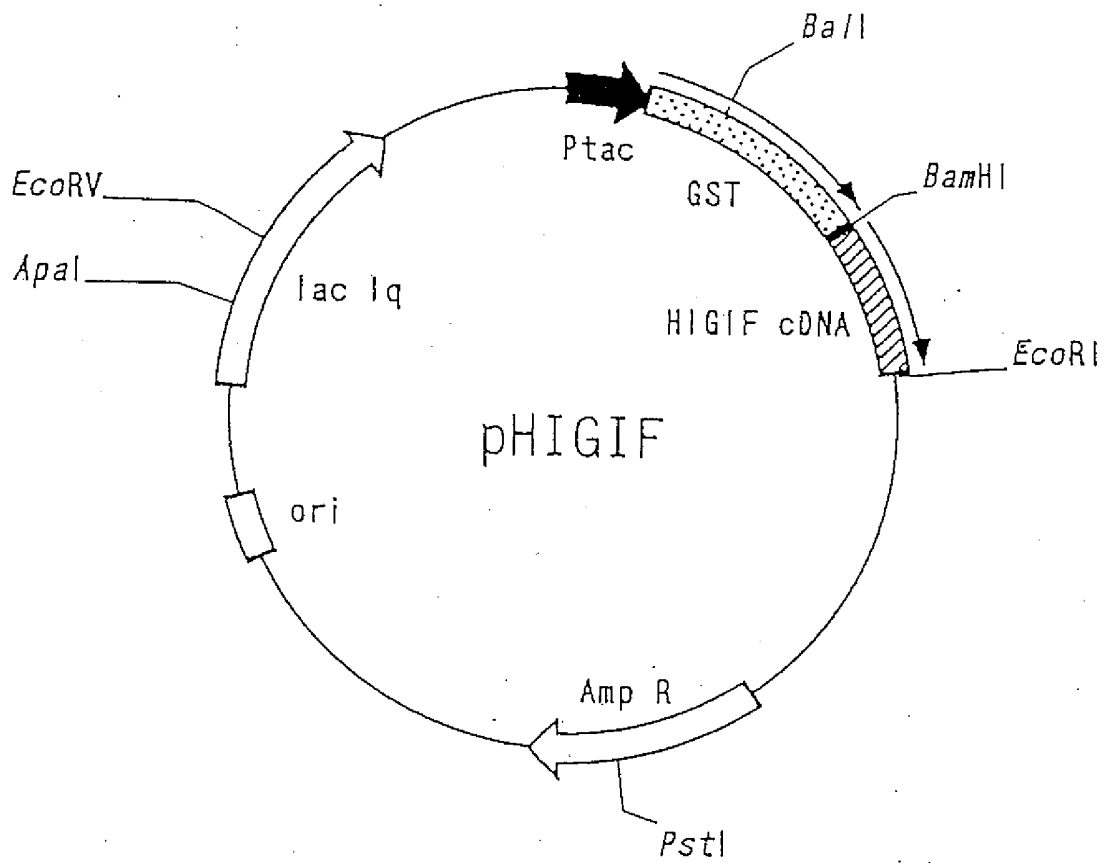
84110504



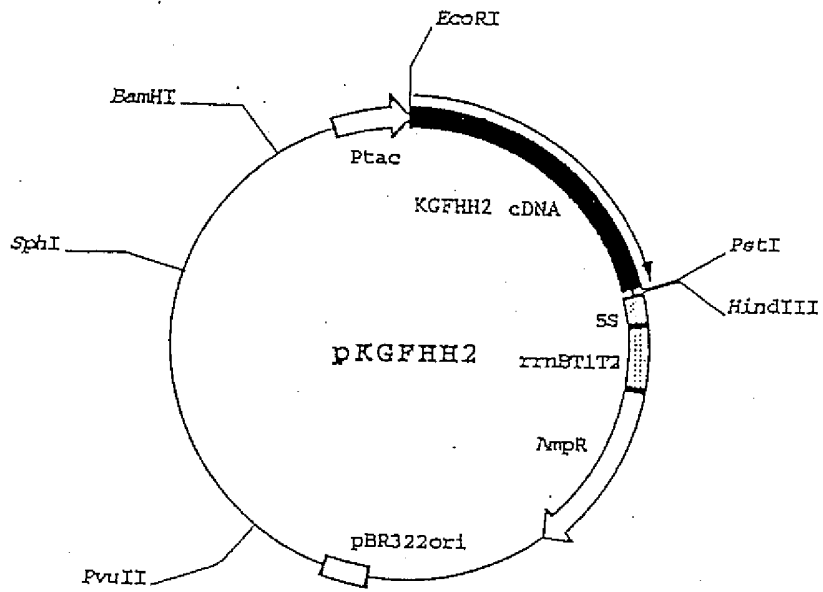
214 毫米波長下之吸光度

第1圖

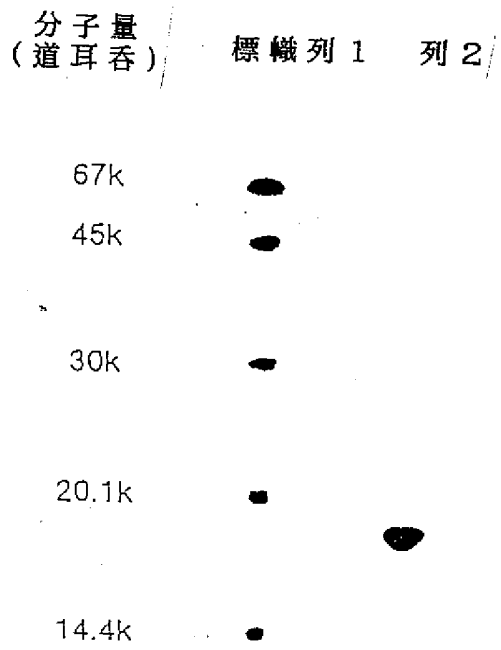
溶離時間 (分)



第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖

464656

修正  
補充  
年 月 日  
86. 7. - 8

申請日期	84 年 10 月 4 日
案 號	84110504
類 別	

A4  
C4

(以上各欄由本局填註)

# 發 明 專 利 說 明 書

~~新 型~~

一、 <del>發明 名稱</del>	中 文	
	英 文	
二、 <del>發明人 創作</del>	姓 名	(7) 河野惠三 (8) 福田惠溫 (9) 栗本雅司
	國 籍	(7) 日本                      (8) 日本                      (9) 日本  (7) 日本國岡山縣赤磐郡瀬戶町沖一五五番地の六
	住、居所	(8) 日本國岡山縣岡山市阿津二一八九番地  (9) 日本國岡山縣岡山市学南町二丁目七番二五號
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

修正  
年 月 日  
86. 7. -8 補充

464656

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
IPC分類：

A6  
B6

本案已向：

國(地區)	申請專利, 申請日期:	案號:	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1995 年 9 月 18 日	262,062/1995	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1995 年 9 月 29 日	274,988/1995	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1994 年 11 月 15 日	304,203/1994	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1995 年 2 月 23 日	58,240/1995	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1995 年 3 月 10 日	78,357/1995	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權

有關微生物已寄存於： 寄存日期： 寄存號碼：

(請先閱讀封面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明(1)

### 發明背景

本發明是有關新穎的多肽，其可誘導免疫勝任細胞產製 $\gamma$ -干擾素(下文縮寫成IFN- $\gamma$ )，一種與多肽具特異性之單株抗體，及用於敏感疾病之作用物，其中含多肽為有效組份。

### 先前技藝

IFN- $\gamma$ 是一種蛋白質，其具抗病毒，抗致癌及免疫調控活性，且由經抗原或突變原刺激之免疫勝任細胞所產製。由於這些生物活性，預期IFN- $\gamma$ 在發現之初可充作抗腫瘤劑，並在臨床試驗上致力研究充作惡性腫瘤之治療劑，一般而言包括腦部腫瘤。目前已商品化之IFN- $\gamma$ 可粗略地分類成2大類，即由免疫勝任細胞所產生之天然IFN- $\gamma$ s，及由可編碼天然IFN- $\gamma$ s之大腸桿菌DNAs引入微生物而製備之轉形細胞所產製之重組體IFN- $\gamma$ s。於上一臨床嘗試中，此種IFN- $\gamma$ s任一者均可充作“外源IFN- $\gamma$ ”而投予至患者。

在這些IFN- $\gamma$ s中，天然IFN- $\gamma$ s之產製通常是在添加有可誘導IFN- $\gamma$ s產製之IFN- $\gamma$ 之營養培養基中培養已發展之免疫勝任細胞，並純化所產生之IFN- $\gamma$ s。已知，IFN- $\gamma$ 誘導劑之型式大大地影響IFN- $\gamma$ 之產率，IFN- $\gamma$ 純化之簡易化，及最終產物之安全性。一般而言，可使用之突變原如刀豆素(CoNA)，*Lens culinaris*, *phytolacca americana*-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

86. 7. -8 修正  
年 月 日  
CS. 7. -8 補充

464656

A5  
B5

四、中文發明摘要(發明之名稱: )

誘使干擾素 -  $\gamma$  製造之多肽，單株  
抗體及用於對干擾素 -  $\gamma$  敏感疾病  
的藥劑

本發明是有關一種新穎的多肽，其在 SDS -  
PAGE 上具  $18,500 \pm 3,000$  道耳吞之分子量  
，及在色聚焦法中有  $4.9 \pm 1.0$  之 pI 值。多肽僅用  
少量即可強烈誘導免疫勝任細胞產製 IFN -  $\gamma$  且即使以  
相當高劑量投多至人體也不會造成嚴重的副作用。利用得  
自融合瘤之單株抗體其可容易地製備，且可納入應用於  
IFN -  $\gamma$  敏感疾病之作用物中以治療及 / 或預防惡性腫  
瘤，病毒性疾病，細菌感染性疾病，及免疫疾病。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要(發明之名稱: Interferon-gamma production inducing polypeptide,  
monoclonal antibody, and agent for interferon-gamma susceptible  
disease

訂

A novel polypeptide which has a molecular weight of  
 $18,500 \pm 3,000$  daltons on SDS-PAGE and a pI of  $4.9 \pm 1.0$  on  
chromatofocusing. The polypeptide strongly induces the IFN- $\gamma$   
production by immunocompetent cells with only a small amount, and  
dose not cause serious side effects even when administered to  
human in a relatively-high dose. It is readily prepared by using  
a monoclonal antibody obtained from hybridomas, and incorporated  
into agents for IFN- $\gamma$  susceptible diseases to treat and/or prevent  
malignant tumors, viral diseases, bacterial infectious diseases,  
and immune diseases.

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

附件 1 - 1

90. 7. 18 修正  
年 月 日 補充

第 84110504 號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國 90 年 7 月 修正

1. 一種誘導免疫勝任細胞產製 I F N -  $\gamma$  之多肽，其具有 S E Q I D N o . 1 所示之胺基酸序列（其中符號 " X a a " 表示 " 異白胺酸 " 或 " 蘇胺酸 " ），且在硫酸十二酯鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳（ S D S - P A G E ）上具有 1 8 , 5 0 0  $\pm$  3 , 0 0 0 道耳吞之分子量，在色譜聚焦上具有 4 . 9  $\pm$  1 . 0 之等電點，

SEQ ID NO:1:

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1				5					10					15	
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
			20					25					30		
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
			35				40					45			
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
			50			55					60				
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Xaa	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
					85				90					95	
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys
								105					110		
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu
							120					125			
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
						135						140			
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp.			
145					150							155			

2. 一種編碼申請專利範圍第 1 項之多肽的 D N A ，及其簡併序列，其中該簡併序列係編碼 S E Q I D N O : 1 所示的胺基酸序列。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製