

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期：

案號：

，☐有 ☐無主張優先權

日本	1996 年 11 月 29 日	8-333037
日本	1997 年 1 月 21 日	9-020906
日本	1997 年 11 月 14 日	9-329715

☒有主張優先權☒有主張優先權☒有主張優先權

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明(1)

本發明的背景

1. 發明的範圍

本發明是關於新穎之生物活性的多肽類，尤其與人工創造的多肽類有關，這種多肽類通常能夠誘發免疫活性細胞製造干擾素- γ （以下縮寫為“IFN- γ ”）。

2. 從前相關研究的說明

本發明者成功地分離出某些多肽類，這些多肽類可誘發免疫活性細胞製造IFN- γ ，本發明者並且成功地將負責此多肽類（以下稱為“野生型多肽類”）編碼之

cDNA克隆化；相關發明揭示於“日本專利可凱號”

27,189/96及193,098/96，以及日本專利申請號67,434/96中。已知：野生型多肽類通常含有SEQ ID NOs: 1-3做為保守的部分胺基酸順序且它們除了具有誘發製造IFN- γ （一種有用的生物活性蛋白質）的性質外，通常還具有能誘發殺傷細胞形成及加強它們之細胞毒性的性質。由於具有這些性質，使用野生型多肽類來做為抗病毒，抗微生物，抗腫瘤，及/或抗免疫病變作用劑，等等是很令人期待的。

然而，如本申請者在日本專利申請號67,434/96中所描述的，目前存在的問題是：天然細胞通常不會製造出達到所需要量的野生型多肽類。本發明者積極研究其原因，結果發現野生型多肽類於天然細胞中通常以前身細胞的型式存在，不顯示出其生物活性。該前身細胞已經

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(2)

證實可經由轉換酶(如:介白素-1 β 轉換酶,此酶由本申請者描述於日本專利申請號207,691/96和213,267/96中)的作用,而轉換成一種活性型式。

該野生型多肽類可能會不穩定,這樣會成為另一個牽涉到上述問題的原因。近年來,在重組DNA技術上的進步,已使自生物活性蛋白質中移去和/或置換一或多個胺基酸來發展突變的多肽類變得很容易。然而,即使是進步的重組DNA技術也不能使每一種具有原有活性之蛋白質的穩定性獲得改良,除非對蛋白質進行個別的測試和誤差調整。

本發明的總論

從前文看來,本發明的第一個目標是提供一種其穩定性有顯著改善的多肽類,但其本質上仍保有野生型多肽類的生物活性。

本發明的第二個目標是提供一種製造多肽的方法。

本發明的第三個目標是提供該多肽類在藥品中的用途。

本發明者積極的進行研究以達成上述目標,因而發現了一種較野生型多肽穩定的多肽,其中該穩定之多肽類包含了一段胺基酸順序,此順序之來源為下列二者之一:①衍生自含有S E Q I D N O s:1-3之部分胺基酸順序的多肽,而以不同的胺基酸來代替其中之一或多個半

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(3)

胱胺酸，②衍生自半胱胺酸被取代之胺基酸順序中，這是藉著在順序中加入，移走及／或置換一或多個胺基酸來完成的，發生變化的位置是除了曾被置換掉半胱胺酸之位置外的其它部位；且某些穩定的多肽類（其中的半胱胺酸已被取代）顯示出它們誘發免疫活性細胞製造 I F N - γ 的活性遠高於野生型多肽類。這些多肽類經證實可利用重組 D N A 的技術來製造，其產量並可達到所需要的量，還有，這些多肽類也經證實其毒性較低。由於上述原因，本發明之多肽類可確定不僅能有效地做為一種 I F N - γ 的誘導物也可做為一種藥品。

本發明的第一個目標可藉著一種經分離出可誘發免疫活性細胞製造干擾素 - γ 的多肽來達成，該多肽所含有之胺基酸順序為下列二者之一：①其中之一或多個半胱胺酸被不同的胺基酸所取代，但是仍保存各個保守順序（如 S E Q I D N O s : 1 - 3 中所顯示的）的完整性，②在其中加入、移去和／或置換一或多個胺基酸，發生改變的位置有一或多個（包含那些在保守順序中的位置），但發生改變的位置不包含曾被置換掉半胱胺酸的位置。

本發明的第二個目標可藉著一種製造多肽類的方法來達成，此方法包含了二個步驟：①培養一種細胞，其中含有負責本多肽之編碼的 D N A ，②自產生的培養中收集所製造的多肽。

本發明的第三個目標可藉用於感受性疾病的作用劑來達成，此作用劑含有本多肽為其有效成分。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(6)

" I G I F / M U T 2 1 " ,

" I G I F / M U T 2 5 " ,

" I G I F / M U T 3 2 " ,

" I G I F / M U T 4 1 " ,

" I G I F / M U T 3 5 " ,

" I G I F / M U T 4 2 " ,

" m I G I F / M U T 1 1 " 及

" m I G I F / M U T 1 2 " 表示 c D N A s , 每一個 c D N A 都負責一種本發明之多肽的編碼。

本發明的詳細說明

下列為本發明之較佳的具體實施例。根據本發明之多肽類包含所有能誘發免疫活性細胞製造干擾素- γ 的多肽類,其中該多肽類含有的胺基酸順序為下列二者之一:(

1) 其中之一或多個半胱胺酸被不同的胺基酸所置換,但仍然保留各個(如 S E Q I D N O s : 1 - 3 中所顯示的)保守順序的完整性,(2) 其中有一或多個胺基酸被加入、移去和/或置換,其發生改變的位置有一或多個(包含那些在保守順序中的位置),但此改變不會發生在被置換過之半胱胺酸的位置上。當野生型多肽類含有

S E Q I D N O s : 1 - 3 為保守的部分胺基酸順序時用來置換半胱胺酸的不同的胺基酸並不侷限於任何型,只要所產生之多肽(含有以不同的胺基酸置換的胺基酸順序)能在有或沒有一種適當的輔助因子的存在下,顯示出

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

誘發免疫活性細胞製造 I F N - γ 的活性，且此多肽亦顯示具有明顯高於野生型多肽之穩定性。不同的胺基酸包含：絲胺酸、蘇胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、組胺酸、酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、蛋胺酸，在這些胺基酸中，較佳的為絲胺酸或丙胺酸。胺基酸順序的具體實施例為含有 S E Q I D N O : 4 或 5 的野生型多肽類，在此類胺基酸順序中含有 S E Q I D N O s : 1 - 3 做為保守的部分胺基酸順序，且其中之一或多個半胱胺酸被不同的胺基酸所代替。S E Q I D N O : 4 所含有的半胱胺酸之位置是在自 N - 端算起第 3 8 , 6 8 , 7 6 及 1 2 7 號的位置。S E Q I D N O : 5 所含有的半胱胺酸是在 7 , 7 5 , 及 1 2 5 號位置。

本多肽類包括：①含有 S E Q I D N O s : 6 - 1 2 之任一胺基酸順序的多肽類，它們係衍生自含有 S E Q I D N O : 4 的野生型多肽，②含有 S E Q I D N O : 1 3 或 1 4 的胺基酸順序的多肽類，它們係自衍生自含有 S E Q I D N O : 5 之胺基酸順序的野生型多肽，及③含有衍生自 S E Q I D N O s : 6 - 1 4 中任一項之胺基酸順序的多肽類，其衍生的方法是在原順序中加入、移去，及／或置換一或多個胺基酸；發生變化的部位是除了已置換過半胱胺酸之位置外的其它位置，而且衍生得到的多肽類仍保持著所需要的生物活性和穩定性。“一或多個胺基酸”一詞是指通常可用傳統的方法（如：位置導向的遺傳誘變）加入，移去或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8)

置換的胺基酸數目。含有 S E Q I D N O s : 6 - 1 4 其中之任一項的多肽類擁有明顯高於野生型多肽類的穩定性和生物活性。

本發明之多肽類可藉著下述的 D N A 重組技術來製備：以負責本多肽類之編碼的 D N A 來轉化適合的宿主細胞以得到含有該 D N A s 的細胞，培養含有該 D N A s 的細胞來製造多肽類，並自所產生的培養收集所製造出的多肽類。本發明另外還提供一種使用 D N A 重組的技術來製備本多肽類的方法，經由此法可以很容易地得到本多肽類所需要的量。

在本方法中所使用的 D N A s 包括負責本多肽類編碼的所有的 D N A s，這些 D N A s 可以自天然來源中以人為方式誘變 D N A s 而取得或以化學合成的方法來獲得。第一種方法的實施例如下：先在做為來源的天然細胞中，以負責 S E Q I D N O : 4 或 5 之胺基酸順序編碼的 S E Q I D N O : 2 5 或 2 8 核苷酸順序來製備 D N A，然後，將“重疊延展”的方法（一種由羅伯 M . 哈頓等人所提出的方法，載於“酵素學的方法”中，第 2 1 7 冊（紐院：學院出版公司，1 9 9 3 年），第 2 7 0 ~ 2 7 9 頁）應用至該 D N A，以便利用屬於不同的胺基酸之密碼子來置換掉在 S E Q I D N O : 4 或 S E Q I D N O s : 5 中的屬於半胱胺酸的一或多個密碼子，而製造出不同的胺基酸。本 D N A s 包括含有 S E Q I D N O s : 1 5 ~ 2 1 中任一種核苷酸順序

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(9)

的 D N A s，它們係衍生自 S E Q I D N O : 2 5，而 S E Q I D N O s : 2 2 及 2 3，係衍生自 S E Q I D N O : 2 8 (此為 S E Q I D N O s : 1 5 ~ 2 3 的互補核苷酸順序) 及其它以不同的核苷酸來置換其中之一或多個核苷酸而衍生出的 D N A s，而且這些 D N A 不會因此而改變它們所負責編碼的胺基酸順序。第二種方法的實施例為化學合成法，在此方法中，本 D N A s 是以 S E Q I D N O s : 9 - 1 5 之核苷酸順序為基礎，用普通的方法製成的。一旦用以上任何一種方法得到 D N A 後，本 D N A s 便可利用 P C R 的放大作用而得到所需要的量。

在本領域中，一般而言，當一個由 D N A 編碼的多肽可顯現在宿主細胞時，為了改良顯現效果或顯現之多肽的生物活性，可以將該 D N A 中的一或多個核苷酸以不同的核苷酸加以置換，並且可以將一個適當的促進因子或加強因子連接至該 D N A 上。本 D N A 也可依此方式加以改變。例如：在 S E Q I D N O : 1 6 中，利用適當之限制酶切出以做為識別點的核苷酸順序，起始密碼子，終止密碼子，及／或適當之訊號肽（包括干擾素 - γ 之次型 α 2 b 的訊號肽）均可任意地連結至

S E Q I D N O s : 9 - 1 5 之任一核苷酸順序的 5' - 及／或 3' - 端，除非所產生的多肽降低了所需要的活性和穩定性。

當本 D N A s 自微生物的，植物的或動物的來源中（

五、發明說明 (10)

以動物來源較佳) 引入適當的宿主細胞後，其顯現出之多肽類具有較佳之穩定性和生物活性。本 D N A s 可以重組之 D N A s 之型式被引入宿主細胞。通常，重組之

D N A s 含有一種本 D N A s 及一種可自行複製的媒介體，只要取得本 D N A s，則此重組之 D N A s 可以傳統之 D N A 重組技術獲得。可用來嵌入本 D N A s 之媒介體的具體實施例為質粒媒介體，包括：p C D，

p C D L - S R α ，p K Y 4，p C D M 8，p C E V 4 及 p M E 1 8 S，此質粒媒介體通常含有適合在宿主細胞中顯現本 D N A s 的核苷酸順序，如：促進因子，加強因子，複製來源，轉錄作用之終止因子，接合順序，及／或選擇標識。使用具有促進因子的媒介體（如：熱衝擊蛋白質促進因子，或由本申請者在日本專利可凱號

1 6 3，3 6 8 中所揭示的干擾素 - γ 促進因子）可藉著外在刺激來調節本 D N A s 在轉化株中的表現。

在本領域中之任何傳統方法都可以用來將本 D N A s 嵌入媒介體中。例如：先將含本 D N A s 之 D N A s 和如上述之媒介體以限制酶處理和／或以超音波震盪法處理，再將由本 D N A s 所產生之片段和媒介體之片段進行連結。以作用在特定核苷酸的限制酶來進行水解作用，可促進 D N A 片段與媒介體片段的連結，較佳之限制酶有：

A c c I，B a m H I，B g l I I，B s t X I，

E c o R I，H i n d III，N o t I，P s t I，

S a c I，S a l I，S m a I，S p e I，X b a I，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (11)

X h o I , 等等。在體內或玻管內進行 D N A 片段與媒介體片段的連結時，如果需要的話，可先將它們韌化然後再以一種 D N A 連接酶處理。由此獲得之重組的 D N A s 可以在宿主中無限制的複製。

重組的 D N A s 可以被引入適合的宿主細胞內以製造本多肽類。雖然在本領域中任何傳統上可用來做為宿主細胞的細胞均可用於本發明，但那些源自酵母或哺乳動物的宿主細胞較適合用於製造藥品。源自哺乳動物之宿主細胞的具體實施例為來自人類、猴子、老鼠、及大田鼠的上皮細胞、間質細胞、及造血細胞，這些包括了 3 T 3 細胞，C 1 2 7 細胞，C H O 細胞，C N - 1 細胞，C O S 細胞，H e L a 細胞（海拉細胞），M O P 細胞，及它們的變異體。任何傳統方法都可以用來將本 D N A s 引入宿主細胞中，如：D E A E - 葡聚糖方法，磷酸鈣轉染方法，電子鑽洞法，脂類轉染法，顯微注射方法及使用下列病毒以病毒感染的方法引入：逆轉錄病毒，腺病毒，疱疹病毒和痘苗病毒，等等。為了自轉化株中選擇“克隆”來製造本多肽類，可先培養轉化株，再檢查所產生之用來製造本多肽的培養。使用哺乳動物之宿主細胞來重組 D N A 的技術在下列發表中有詳細的陳述：由多喜歐·古羅奇，馬莎路塔尼古奇及米蘇－歐·歐喜慕拉等人所編輯之吉肯－伊卡古－貝塞特斯，“沙寶－可嘉古”手冊（細胞工程的手冊），（東京：約度夏公司，1992），及塔可西約可塔及肯尼奇阿雷伊所編輯之吉肯－伊嘉古－貝塞初，生物手

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (12)

冊系統 3，伊丹西－可隆－吉肯－何（基因可隆化的實驗方法），（東京，日本：約度夏公司，1993）。

由此所得的轉化株，其中之細胞含有本 D N A s，當把它們培養在培養液中時可以在細胞內及／或細胞外製造本多肽類。任何傳統上用來製備轉化株的培養液都可以使用。培養液一般含有：做為基礎的緩衝液，無機離子如：鈉離子，鉀離子，鈣離子，磷離子，及氯離子；微量營養素，碳來源，氮來源，胺基酸及維他命，它們可根據細胞之代謝速率來使用；及血清，荷爾蒙，細胞生長因子，和細胞黏附因子（在有需要時才會用）。培養液的實施例有：199 培養液，“漢斯 F 1 2 培養液”，I M D M 培養液，M C D B 1 0 4 培養液，M E M 培養液，R D 培養液，R I T C 8 0 - 7 培養液，R P M I - 1 6 3 0 培養液，R P M I - 1 6 4 0 培養液及 W A J C 4 0 4 培養液。在下列情況下培養本轉化株可以產生含有本多肽類的培養：將本轉化株接種於培養液中，使細胞濃度為 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 個細胞／毫升，較佳者為： $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個之細胞／毫升，並在 37°C 下，將細胞培養於懸浮液培養或單層細胞培養中 1 - 7 天，較佳者為 2 - 4 天，如果需要時，以新鮮培養液來置換舊的培養液。由此所得之培養通常含有的本多肽類濃度約為 $1 \sim 100 \mu\text{g} / \text{ml}$ ，這濃度可能會隨著轉化株的種類或使用之培養情況不同而有改變。

雖然由此所得之培養可以完整的做為一種 I F N - γ

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (13)

誘發劑，但它們通常可在使用前先進行純化步驟，以純化本多肽，接著再自細胞或細胞碎片中藉著過濾、離心等步驟分離出本多肽類，目，如果需要時，可再用超音波震盪法，細胞水解酶，及／或清潔劑來破壞細胞。爲了純化本多肽類，可隨意使用本領域中傳統用來純化生物活性多肽類的方法，如：鹽析法，透析法，過濾法，濃縮法，分段沈澱法，離子－交換色層分析法，凝膠過濾色層分析法，吸附色層分析法，等電點聚焦色層分析法，離水色層分析法，逆相色層分析法，親和層析法，凝膠電泳及／或等電點聚焦凝膠電泳法。由此純化而得的本多肽類可根據最後使用所需要的而進行濃縮及／或進行冷凍乾燥成液體或固體。由本申請者揭示於日本專利申請號

58,240/95的單株抗體在純化本多肽類上是非常有用的。使用抗體之免疫親和層析法可降低爲了得到純度很高之本多肽類所需的花費及人工。

通常可將本多肽類加入培養免疫活性細胞的培養液中以製造 I F N - γ ，或將它用於人體內以治療或預防

I F N - γ 感受性疾病。製備 I F N - γ 的方法如下：將淋巴球自哺乳動物周邊血液中分離出來或者是建立如下列群體之細胞系：H B L - 38細胞，M o 細胞 A T C C C R L 8066，求凱特 (Jurkat) 細胞 A T C C C R L 8163，H u T 78細胞 A T C C T I B 161，E L 4細胞 A T C C T U B 39，L 12 - R 4細胞，及其突變種，再將這些細胞懸浮於含

五、發明說明 (14)

有 $0.1 \text{ ng} - 1 \mu\text{g} / \text{ml}$ (以 $1 - 100 \text{ ng} / \text{ml}$ 為較佳者) 之本多肽類的培養液中。然後，如需要時，在 T-細胞刺激作用劑 (如：促細胞分裂劑、介白素 2，及抗-CD3 抗體) 的存在下，以傳統方法將細胞培養約 $1 - 100$ 小時，並且定期以新鮮培養液來置換培養液。為了收集所製出的 IFN- γ ，將所產生的培養液以選自下列群體中之適當的傳統技術來純化 IFN- γ ：鹽析法、透析法、過濾法、濃縮法、分段沈澱法、凝膠過濾層析法、離子交換層析法、離子層析法、吸附層析法、親和層析法、等電點聚焦層析法、凝膠電泳法及等電點聚焦凝膠電泳法，等等。

既然本多肽類可誘發 IFN- γ 的製造，用以治療感受性疾病之含有以本多肽類為有效成分的作用劑可以在給予至人體時誘發人體內 IFN- γ 的製造，並且可以治療和／或預防 IFN- γ 感受性疾病。除了具有誘發 IFN- γ 製造的活性外，如下文中之本發明實施例的說明中，本多肽類也具有加強細胞毒性和／或誘發殺傷細胞 (如：NK 細胞、LAK 細胞 (淋巴素-活化的殺傷細胞) 及細胞毒性的 T 細胞) 形成的活性，殺傷細胞也牽涉到治療及／或預防感受性疾病。因此，本發明中，“感受性疾病”一詞是指包括所有可以經由 IFN- γ 及／或殺傷細胞之直接或間接作用來治療及／或預防的疾病。感受性疾病為 ① 為病毒性疾病，包括：肝炎、疱疹、尖銳濕瘡、及 AIDS；② 感染，包括：念珠菌病、瘧疾、隱球菌病、耶爾

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (15)

森氏菌感染引起的疾病，和結核病；③固體惡性腫瘤，包括：腎臟癌、蕈狀肉芽腫、慢性肉芽腫疾病；④血液－細胞－衍生的惡性腫瘤，包括：成人T細胞白血病、慢性骨髓性白血病，及惡性淋巴瘤；⑤免疫病變疾病，包括：過敏，氣喘，及膠原病；⑥及骨質疏鬆症，等等。本作用劑額外。含有介白素3可完全治癒或緩解由用來治療除了白血病和骨髓瘤外之惡性瘤的放射治療或化學治療所引起之白血球減少及血小板減少症。

因此，用於感受性疾病之本作用劑可以下列形式廣泛地用於治療及／或預防前述之感受性疾病：抗腫瘤作用劑、抗病毒作用劑、抗菌劑、抗免疫病變作用劑、血小板增生作用劑、及白血球增生作用劑，等等。本作用劑通常可製成液體、膏狀、或固體等形式，所含有之本多肽的乾燥固體基質濃度為0.000001～100w/w%，以0.0001～0.1w/w%較為合適，而作用劑之形式和內含物可根據其用途及所要治療及／或預防之疾病的型態和症狀而有所不同。

本作用劑可以不只含有本多肽類還可以含有下列之其它種生理上可接受的作用劑以製成組成物，如：載媒劑、賦形劑、稀釋劑、生物反應改良劑及穩定劑，而且，如果需要時，還可加入一或多種生物活性物質。穩定劑可以為蛋白質類，如：血清白蛋白類，及明膠類，糖類（包括：葡萄糖、果糖、蔗糖、麥芽糖、乳糖、海藻糖、山梨糖醇、甘露糖醇、麥芽糖醇、及乳糖醇），及含有磷酸及／或

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (16)

琥珀酸的緩衝液。其它種生物活性物質的具體實施例有：干擾素 - α ，干擾素 - β ，干擾素 - γ ，介白素 2，介白素 3，介白素 1 2，T F N - α ，T F N - β ，粒細胞群落刺激因子，粒細胞巨噬細胞 - 群落刺激因子，卡波奎翁，環磷醯胺，阿克雷如畢辛噻替脈，白消胺，安畢泰並，阿糖胞苷，5 - 氟基尿嘧啶，5 - 氟基 - 1 - (四氫 - 2 - 呋喃基) 尿嘧啶，甲胺喋呤，放線菌素 D，色黴素 A 3，柔紅黴素，阿黴素，博來黴素，絲裂黴素 C，長春新鹼，長春花鹼，L - 天門冬醯胺酶，放射膠體金，克列斯汀® (Krestin®)，匹西巴尼爾，香菇多糖，及“馬魯雅馬疫苗” (Maruyama vaccine)。

在上述作用劑中，那些含有介白素 2 者特別有用，因為當本多肽類誘發免疫活性細胞製造 I F N - γ 時，介白素 2 的作用為一種共同因子。因此，額外含有一種天然或重組之介白素 2 的作用劑可以誘發那些甚至很少製造 I F N - γ 的免疫活性細胞來製造所需要量之 I F N - γ ，這種作用是來自本多肽類的單獨作用。

額外含有介白素 1 2 之本作用劑可以誘發特別高之 I F N - γ 的製造量，這種產量是單獨使用本多肽類或介白素 1 2 所無法達到的。另外，既然本多肽類可以加強介白素 1 2 對免疫球蛋白 E 抗體之製造的抑制作用，含介白素 1 2 之本作用劑在做為用來治療及／或預防異位性疾病（如：異位性氣喘、異位性皮膚炎、血管性水腫、及異位性消化不良）的抗免疫病理作用劑上很有用。由於在人體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (17)

中之介白素 1 2 偶爾會有很低的含量存在，所以本多肽類在人體中可以單獨達到所要的效果。

本作用劑包含那些以單位劑量形式存在之作用劑（意指：一種適合給予用之經生理上分開或成形的藥品）並且含有每日劑量中所需之本多肽類或為一種配藥形式，其中之劑量為每日劑量的 $1/40$ 至數倍（至多 4 倍）。此類藥品的具體實施例有：注射藥品、液體、粉末、顆粒、錠片、膠束、舌下含片、眼藥水、鼻藥水及栓劑。

本作用劑可以經由口服的途徑或腸胃道外的途徑給予病人，且在活化如下述之玻管內的抗腫瘤細胞方面，二種途徑之作用劑均可有效治療和／或預防感受性疾病。例如，本作用劑經常以口服方式給予病人或以腸胃道外給予方式給予病人，打入其皮內組織，皮下組織，肌肉或血管，這些是經由觀察病人的症狀來決定給予方式，並且給予的劑量範圍約 $0.1 - 50$ 毫克／針，以下列劑量較佳： 1 微克／針至 1 毫克／針之本多肽類，施打次數為 $1 - 4$ 次／天或 $1 - 5$ 次／週，打上一天或一週。

本作用劑在使用介白素 2 進行所謂的“抗腫瘤免疫治療”方面也很有用。“抗腫瘤免疫治療”一般是分成二種方法：（i）直接將介白素 2 給予至有惡性腫瘤之病人身體裏，及（ii）在體外利用介白素 2 活化抗腫瘤細胞，再將此細胞引入病人身體裏（繼承性免疫治療），當使用本多肽類時，以上之任一方法均可展現出顯著的改良效果。例如：在方法（i）中，本多肽類可以劑量約在 0.1 微

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (18)

克／針／成人至1毫克／針／成人，給予次數1至10次的範圍內與介白素2同時給予病人，或在介白素2之前給予病人。介白素2的劑量，可根據惡性腫瘤的型態，病人的症狀及本多肽類的劑量而有所不同，通常其劑量範圍約在10,000~1,000,000單位／針／成人之間。在方法(ii)中，在介白素2的存在下，可將本多肽類約以0.1 ng ~ 1 μ g / 1×10^6 細胞的量加入培養單核細胞或取自病人之淋巴球的培養液中。在將細胞培養一段前述的時間後，自所產生的培養中收集NK細胞或LAK細胞，再種回病人體內。可做為本抗腫瘤免疫治療之目標的疾病有：(i)固體惡性腫瘤，如：大腸癌、直腸癌、胃癌、甲狀腺癌、舌癌、膀胱癌、絨毛膜癌、肝癌、前列腺癌、子宮癌、喉癌、肺癌、乳癌、惡性黑素瘤、卡波西肉瘤、腦瘤、神經母細胞瘤，卵巢瘤、睪丸瘤、骨肉瘤、胰臟癌、腎臟癌、腎上腺樣瘤，及血管內皮瘤；及(ii)血液細胞惡性腫瘤；如：白血病及惡性淋巴瘤，等等。

負責本多肽類編碼的DNAs在所謂的“基因治療”中也很有用。根據在基因治療中的傳統技術，本DNAs可以先嵌入衍生自病毒（如：逆轉錄病毒，腺病毒及腺—相關病毒）的媒介體中，或是先併入陽離子的或膜的易熔性—脂質體中，再直接注入帶有IFN- γ 及／或殺傷細胞感受性疾病的病人體內。或者，先自病人體中收集淋巴球，再將DNAs引入其中，然後，將此用於自我—移植

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (19)

的淋巴球送回人體中，以此方式可將本 D N A s 引入病人體中。在以基因治療的繼承性免疫治療中，可利用類似的傳統技術將本 D N A s 引入受動器細胞中。此種作法可加強受動器細胞對腫瘤細胞的細胞毒性，而使繼承性免疫治療更為改進。以基因治療來做腫瘤疫苗治療的方面，可將本 D N A s 以類似上述方法引入來自病人的腫瘤細胞中，將此腫瘤細胞在體外增生至所需要的細胞數後，再自我移植回人體中。移植的腫瘤細胞在人體中的作用有如疫苗，可激發有所改善之特定的抗腫瘤免疫力來對抗抗原。因此，本 D N A s 對於用來治療病毒性疾病、微生物性疾病、惡性腫瘤，及免疫病變方面疾病的基因治療上有顯著的效果。基因治療的一般步驟詳述於下列文章中：泰卡西西馬達，伊蘇米塞多及凱雅歐札瓦等人著，生物方法上系列（基因治療之基本技術），（東京，日本：優杜夏公司，1996年）。

下列實施例說明本發明：實施例 A - 1 至 A - 9 描述本多肽類之較佳具體實施例及根據本發明之製備它們的方法，而 B - 1 至 B - 5 描述根據本發明之作用劑的具體實施例，這些作用劑是用來治療感受性疾病。在實施例 A - 1 至 A - 9 中的技術為本領域中傳統所使用的技術，它們在下列出版書刊中有詳細記載：如：多西歐庫洛奇，馬沙路坦尼古奇及米蘇歐歐西慕洛等人著，“吉肯－伊嘉古－貝塞蘇，沙寶－高嘉古手冊”（細胞工程的手冊），（東京，日本：約杜夏公司，1993）。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(21)

養，循環溫度為 94℃，60℃，及 72℃，時間各為 1 分鐘，以完成一次 PCR，反應結果可得一般 DNA 片段 (DNA 片段 1)，此片段中含有 SEQ ID NO: 24 的核苷酸順序，在此 SEQ ID NO: 24 的 5' - 端連接著一個由限制酶 XhoI 所識位的部位，而 SEQ ID NO: 24 的 3' - 端則是連接著 SEQ ID NO: 25 中由第 1 至第 11 個核苷酸的一段順序。

重組之 DNA "pHIGIF" 中含有負責野生型多肽編碼的 SEQ ID NO: 25 的核苷酸順序 (其中帶有負責 SEQ ID NO: 4 的胺基酸順序的編碼)，此重組之 DNA 是根據由本申請者所提出之日本專利可凱號 193,098 / 96 中所描述的方法合成的。該野生型多肽 (具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸順序) 包含了 SEQ ID NOs: 1 - 3 的部分胺基酸順序，其所在區域分別為第 16 ~ 24 個，第 30 ~ 35 個，及第 51 ~ 55 個胺基酸。以 5' - CTGCTCTGTGGGCTACTTTGGCAAGCTTGAAATC - 3' 為感覺引物 (感覺引物 2) 及以 5' - ACACGCCGCCCTAGTCTTCTTGAAACAG - 3' 為抗感覺引物 (抗感覺引物 2) 的寡核苷酸是利用傳統方法，以 SEQ ID NOs: 25 及 26 為根據經由化學方法合成的。在一根 0.5 ml 的反應管中，加入下列各項物質加以混合：1 ng 之重組 DNA "

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(22)

p H I G I F " , 1 0 μ l 之 1 0 $\times$ P C R 緩衝液 , 1 μ l 之 2 5 m M d N T P 混合物和適量的感覺引物 2 、和抗感覺引物 2 。將無菌蒸餾水加入其中 , 使體積成為 9 9 μ l 。還有 , 於此混合物中 , 再進一步加入 1 μ l 之 2 . 5 單位 / 微升 P f u D N A 聚合酶。將此混合物進行 3 0 個循環的培養 , 循環溫度分別為 9 4 $^{\circ}$ C , 6 0 $^{\circ}$ C , 和 7 2 $^{\circ}$ C , 各溫度分別培養一分鐘 , 以完成一次 P C R , 所產生的一段 D N A (D N A 片段 2) 含有 S E Q I D N O : 2 5 的核苷酸順序。連接在 S E Q I D N O : 2 5 的 5 ' - 端者為 " 終止密碼 5 ' - T A G - 3 " , 及一個被限制酶 N o t I 所識別的部位 , 而 S E Q I D N O : 2 4 中 , 由第 5 7 至第 6 9 個核苷酸所組成的一段順序則是連接至 S E Q I D N O : 2 5 的 3 ' - 端。

在 0 . 5 毫升之反應管中 , 加入下列幾項物質加以混合 : 1 n g 之 1 和 2 二種 D N A 片段 , 1 0 μ l 之 1 0 $\times$ P C R 緩衝液 , 1 μ l 之 2 5 m M d N T P 混合物。將無菌蒸餾水加入混合物中 , 使全部體積為 9 9 μ l 。在 9 4 $^{\circ}$ C 下將混合物培養 3 分鐘並慢慢冷卻至 3 7 $^{\circ}$ C , 再於該溫度下培養 1 5 分鐘。將 1 μ l 之 2 . 5 單位 / μ l P f u D N A 聚合酶加入其中 , 並慢慢加熱至 7 2 $^{\circ}$ C , 再於 7 2 $^{\circ}$ C 下培養 2 分鐘。在加入適量的感覺引物 1 和抗感覺引物 2 後 , 使此混合物在下列溫度和培養時間下進行 3 0 個循環 , 以完成一次 P C R : 9 0 $^{\circ}$ C 培養 1 分鐘 $\rightarrow$

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(23)

60℃，1分鐘→72℃，30秒鐘，結果可產生一段DNA片段(DNA片段3)，此DNA片段包含SEQ ID NO: 26的核苷酸順序。

帶有核苷酸順序為5'-CTCTGTGAAGTCTGAGAAATTTCAACTC-3'的寡核苷酸可做為一種導致基因突變的感覺引物，而使SEQ ID NO: 26中第283個核苷酸之鳥嘌呤被胞嘧啶所取代，此種寡核苷酸可用一般化學方法來合成。以類似合成DNA片段1的方法進行PCR，但是以DNA片段3做為模板並以導致基因突變的感覺引物取代感覺引物1。此PCR的結果可產生一段DNA片段(DNA片段4)，其中含有之DNA順序與SEQ ID NO: 26中第276至第570個核苷酸順序一致，但其中之第287個核苷酸被胞嘧啶取代。

帶有核苷酸順序為5'-GAGTTGAATAATTTCTCAGACTTCAAGAG-3'的寡核苷酸可做為一種導致基因突變的抗感覺引物，使SEQ ID NO: 26中第287個核苷酸的鳥嘌呤被胞嘧啶所取代，此寡核苷酸可以一般化學方法合成。以類似製備DNA片段2的方法進行PCR，自以DNA片段3做為模板且以導致基因突變的抗感覺引物取代抗感覺引物1。此PCR的結果可產生一段DNA片段(DNA片段5)，其中含有之核苷酸順序與SEQ ID NO: 26中第1至第304個核苷酸一致，除了其中之第287個核

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(24)

苷酸被胞嘧啶取代。

以類似製備DNA片段3的方法進行PCR，但以DNA片段4和5做為模板以得到一段DNA片段（DNA片段6），其中含有負責SEQ ID NO：6之胺基酸順序編碼的核苷酸順序。此DNA片段6含有SEQ ID NO：15的核苷酸順序，連接在SEQ ID NO：15 5'端的是SEQ ID NO：24的核苷酸順序及一個被限制酶XhoI所識位的部位，連接在SEQ ID NO：15 3'端的為5'-TAG-3'核苷酸之終止密碼及一個被限制酶NotI所識位的部位。

當DNA片段6被限制酶XhoI及NotI裂解而產生一段含有555bps的DNA片段後，將所產生之DNA片段25ng與10ng之質體媒介者“pCDM8”（由“因微特歐金公司，聖地牙哥，美國所生產，此質體媒介者事先以XhoI及NotI進行裂解）混合，然後，將此混合物在16℃下，培養30分鐘（這是利用一種接合套件叫“接合套件轉譯2”來進行，它是由日本東京之塔卡洛蘇若公司生產）。經由“克隆繁殖”後，可得一種由4494bps所組成之自動複製的重組DNA“pCSHIGIF/MUT12”。如第1圖中所顯示的，於重組DNA之DNA“pCSHIGIF/MUT12”中，帶有SEQ ID NO：15之核苷酸順序的cDNA“IGIF/MUT12”連接至核

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (25)

苜蓿酸順序 " I F N s s " 的下流 (此 I F N s s 是負責干擾素 - α 之次型 $\alpha 2 b$ 訊號肽的編碼)。如在所附的胺基酸順序中所顯示的, S E Q I D N O : 1 5 之核苷酸順序負責 S E Q I D N O : 6 之胺基酸順序的編碼, 此段順序是衍生自帶有 S E Q I D N O : 4 的野生型多肽, 但是將第 6 8 個位置上的半胱胺酸予以置換掉。

在控制組中, 以類似上述方法的步驟製備一種自動複製的重組 D N A " p C S H I G I F / W T " , 但以 D N A 片段 3 取代 D N A 片段 6。如第 2 圖中所顯示的, 在重組之 D N A " p C S H I G I F / W T " 中, 帶有 S E Q I D N O : 2 5 之核苷酸順序的 c D N A " I G I F / W T " (負責野生型多肽的編碼) 是連接至核苷酸順序 " I F N s s " 的下流 (此順序是負責人類干擾素 - α 之次型 $\alpha 2 b$ 訊號肽的編碼)。

實施例 A - 1 (b)

以轉化株來製備多肽

將由實施例 A - 1 (a) 得來的重組 D N A " p C S H I G I F / M U T 1 2 " 以傳統的活性細胞方法引入大腸菌種 " M C 1 0 6 1 / P 3 " (由 " 因微特歐金公司 ", 美國聖地牙哥所生產) 中以得到一種轉化株。將此轉化株, 在 1 8 ° C 下, 培養在 L 培養液 (p H 7 . 2 , 內含 2 0 μ g / m l 胺苳青黴素及 1 0 μ g / m l 四環素) 中 1 8 小時, 並且持續震動。將所產生的培養加以離心

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (26)

以分離出細胞，所分離出之細胞再進行傳統的鹼 - S D S 方法以萃取該重組的 D N A。

在 2 . 5 m l 之 D M E 培養液 (p H 7 . 4) 中加入 1 0 v / v % 之小牛血清，然後，將此培養液加入含 6 個凹槽之微量培養盤的每一個凹槽中，並在每一凹槽中加入 $1 . 8 \times 10^5$ 個 C O S - 1 , A T C C C R L 1 6 5 0 細胞 (一種建立好的細胞株，它是衍生自非洲綠猴子的腎臟)。將微量培養盤在 5 v / v % C O ₂ 培養箱中，於 3 7 °C 下，培養 2 4 小時。培養完畢後，移去培養液並以含 5 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 (p H 7 . 4) 的 D M E 培養液清洗凹槽。在每一凹槽中加入下列各項物質：D M E 培養液 1 . 8 毫升，其中含 2 . 8 μ g / m l 自上述步驟而來之重組 D N A，② 5 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 (p H 7 . 4)，③ 0 . 4 m g / m l D E A E - 葡聚糖，及④ 0 . 1 m M 氯喹，將此微量培養盤再置於 5 v / v % C O ₂ 培養箱中，在 3 7 °C 下，繼續培養 4 小時。培養完畢後，再移去培養液，然後在每一凹槽中加入含 1 0 v / v % 二甲基亞碲和 1 4 0 m M N a C l 的 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 4) 2 . 5 毫升，並使培養盤在周圍溫度下靜置 2 分鐘。靜置完畢後，將緩衝液移走，並以含 5 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 (p H 7 . 4) 的 D M E 培養液清洗凹槽。接著，在每一凹槽中，加入 2 . 5 毫升的 " C O S 培養液 " (由日本東京柯斯莫拜爾有限公司所販售)，再將培養盤置於 3 7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (27)

℃ 之 5 v / v % C O₂ 培養箱中 3 天，以培養該細胞。以西方點墨法分析所產生的培養，而所使用的單株抗體於日本專利可凱號 2 3 1，5 9 8 / 9 6 中有所描述。本分析證明本多肽可誘發免疫活性細胞製造 I F N - γ ，並且含有衍生自 S E Q I D N O : 4 的胺基酸順序，此順序中之第 6 8 個位置上的半胱胺酸被絲胺酸所取代，本多肽在此培養中的產量約為 2 0 n g / m l。

在控制組的實施例中，自實驗 A - 1 (a) 中所得之重組 D N A " p C S H I G I F / W T " 以類似處理重組之 D N A " p C S H I G I F / M U T 1 2 " 的方法處理之。結果，在培養中，能誘發 I F N - γ 之製造的野生型多肽，其產量約為 1 n g / m l，此產量不超過使用重組之 D N A " p C D H I G I F / M U T 1 2 " 製造所得之產量的 5 %。這結果表示根據本發明的多肽較為穩定且較野生型多肽顯現出較高的生物活性。

實施例 A - 1 (c)

多肽的純化

自實驗 A - 1 (b) 中所得之含本多肽的培養經離心後收集上清液。將上清液送入一分析柱中（此分析柱以凝膠填充，並使用單株抗體來做免疫親和層析法，其製備法是根據本申請者在日本專利可凱號 2 3 1，5 9 8 / 9 6 中所揭示的方法來進行，分析柱事先須先以磷酸緩衝生理食鹽水（以下簡寫為 " P B S " ）沖洗過），以新鮮

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (28)

P B S 通過分析柱加以清洗，然後，以含 1 M N a C l 的 0 . 1 M 甘胺酸 - H C l 緩衝液通過分析柱以洗堤之。自洗堤液中收集含有能誘發免疫活性細胞製造 I F N - γ 之多肽的分餾液。將收集到的分餾液於 4 °C 下，對 P B S 進行透析 1 8 小時，然後，以膜過濾法加以濃縮，接著再以冷凍乾燥法得到一種固體多肽，其純度約為 9 5 % 或更高，且其回收率為起始物質之培養量的 5 0 % 。做為比較用的為：藉著使用重組 D N A “ p C S H I G I F / W T ” 所得到之含野生型多肽的培養，以類似上述的方法進行純化來做為控制組，所分析的純化性質描述於下。

實施例 A - 1 (d)

分子重量

在實施例 A - 1 (c) 中之多肽可利用由 “ U . K . 來姆利 ” 所著，載於 “ 自然 ” ，第 2 2 7 冊，p p . 6 8 0 ~ 6 8 5 (1 9 7 0) ” 中的方法進行測定。在做為還原劑之 2 w / v % 二硫代蘇糖醇的存在下，將 A - 1 (c) 之多肽進行 S D S - 聚丙烯醯胺的凝膠電泳，此多肽類在相對於分子量約為 1 8 , 0 0 0 ~ 1 9 , 5 0 0 道耳吞的位置上，顯現出一段能誘發 I F N - γ 之製造的蛋白質主帶。所使用之分子重量標記為牛血清白蛋白 (6 7 , 0 0 0 道耳吞) ，卵白蛋白 (4 5 , 0 0 0 道耳吞) ，碳酸酐酶 (3 0 , 0 0 0 道耳吞) ，黃豆胰蛋白酶抑制劑 (2 0 , 1 0 0 道耳吞) ，及 α - 乳白蛋白 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (29)

1 4 , 0 0 0 道耳吞)。

實施例 A - 1 (e)

N - 端胺基酸順序

使用一種蛋白質順序機“模型 4 7 3 A”來進行傳統分析(由位於美國、諾渥克市之“帕爾金-艾摩”公司所販售的),其結果透露出實施例 A - 1 (c) 中的多肽在 N - 端區域帶有 S E Q I D N O : 2 7 之胺基酸順序。

實施例 A - 1 (f)

穩定性

將在實施例 A - 1 (c) 中之本多肽或野生型多肽溶於培養液“C O S 培養液”中(由日本東京柯斯莫拜爾有限公司所販售)形成之濃度約為 1 0 u g / m l 。然後,將溶液於 4 0 °C 下培養 2 4 小時。自開始培養的時間算起,經過 0 , 0 . 5 , 1 , 2 , 4 , 6 , 8 , 1 2 或 2 4 小時後,自各溶液中採集一部分樣品。將這些樣品個別分析其誘發 I F N - γ 製造的活性,使用方法描述於下(於實施例 A - 1 (g) 中)以研究在培養中整個時間過程的活性。在每個點中之剩餘活性的百分比(%)是以起始活性做基礎來計算。結果顯示於第 3 圖。

如第 3 圖中所顯示的,此實施例中之多肽較野生型多肽穩定並保存較久的活性。此結果證實,於此實施例中所

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (30)

使用之替代胺基酸可以有效地改良野生型多肽之穩定性且不降低其生物活性。

實施例 A - 1 (g)

經由免疫活性細胞來製備 I F N - γ

將一種自人類急性骨髓性白血病衍生出之建立好的細胞株 " K G - 1 細胞 , A T C C C C L 2 4 6 " 種入不含血清之 R P M I - 1 6 4 0 培養液中 (p H 7 . 4) , 以產生一個濃度為 3×10^5 細胞 / 毫升的細胞液 , 並在 37°C 下 , 在 5 v / v % 的 CO_2 培養箱中培養 4 天。將培養的細胞收集起來並懸浮之以製成一個在 R P M I - 1 6 4 0 培養液 (p H 7 . 4) 中 , 濃度為 3×10^6 細胞 / m l 的細胞液 , 並加入 10 v / v % 的小牛血清。在 96 凹槽的培養盤中 , 加入 0 . 1 毫升細胞液於每個凹槽中 , 並加入含本多肽或野生型多肽 (來自實施例 A - 1 (c) 中) 的溶液 0 . 1 毫升 (經適當稀釋過的多肽溶液) 。然後 , 將細胞在 37°C 下 , 於 10 v / v % CO_2 培養箱中培養 24 小時。自培養凹槽中 , 各取出 0 . 1 毫升之培養上清液 , 並以傳統之酶 - 免疫分析來測定 I F N - γ 的製造。在空白組中 , 以上述方法進行實驗但其中則不含多肽。表 1 顯示出結果。於表 1 中 , I F N - γ 的製造量以國際單位 (I U) 來表示 , 計算的根據是來自美國的國際健康組織之 I F N - γ 標準 G g 23 - 901 - 530 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(31)

表 1

多肽濃度， n g / m l	製造之 I F N - γ ， I U / m l *
0	0 (0)
0 . 1	0 . 7 (0 . 6)
0 . 2	3 . 0 (2 . 4)
0 . 4	8 . 1 (7 . 4)
0 . 8	20 . 0 (18 . 9)
1 . 0	30 . 0 (25 . 9)

*) 括弧中之數值代表當使用野生型多肽時 I F N - γ 的產量。

表 1 表示本多肽作用在 K G - 1 (一種免疫活性細胞) 上，以誘發 I F N - γ 的製造。本多肽之 I F N - γ 的製造量等於或高於野生型多肽所誘發的 I F N - γ 產量。

實施例 A - 1 (h)

N K 細胞之細胞毒性的加強

自一健康供血者收集新鮮血液，所使用的工具為含肝素之針筒，然後再以等積體之 P B S 稀釋血液。將稀釋好的血液佈於 FICOLL 上並離心之，以得到高密度的淋巴球。將淋巴球懸浮後得到一個濃度為 1×10^6 之細胞 / 培養液的細胞液，使用的培養液為含下列各項物質之 P R M I - 1640 培養液 (p H 7 . 2) : $10 \mu g / m l$ 卡那黴素， $5 \times 10^{-5} M$ 2 - 巰醇及 10 v / v % 小牛血清。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (32)

在 12 - 凹槽培養盤的每個凹槽中置入 0.5 毫升之細胞液，再將自實施例 A - 1 (c) 得來的本多肽或野生型多肽以新鮮製備的培養液加以稀釋後，取 1.5 毫升加入各凹槽中，然後再進一步加入 0.5 毫升之新鮮製備的培養液（其中含有或不含有 50 單位／毫升之重組的人類介白素 2）。然後，將細胞於 $-5\text{ v} / \text{v} \% \text{CO}_2$ 培養箱中，在 37°C 下培養 24 小時。以 PBS 清洗培養的細胞以得到培養好之含 NK 細胞的淋巴球，來做為作用器細胞。

將一種衍生自人類慢性骨髓性白血病之已建立好的細胞株 K - 562 細胞，ATCC CCL 243，傳統方法以 ^{51}Cr 標示之，它可做為對 NK 細胞敏感的靶細胞。將 1×10^4 個已標示好的細胞加入一帶有 96 - 凹槽的培養盤的每一個凹槽中並加入由上述所得之培養的淋巴球，各種加入的細胞比例為：作用器細胞：靶細胞 = 2.5 : 1, 5 : 1 及 10 : 1，然後，將培養盤於 $-5\text{ v} / \text{v} \% \text{CO}_2$ 培養箱中，在 37°C 下培養 4 小時。然後，以傳統方法檢查培養之上清液的放射活性，以估計殺傷細胞的數目。在每一個系統中所測試之殺傷細胞對靶細胞的比率（%）經計算後可評估其細胞毒性。此結果顯示於表 2 中。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (33)

表 2

多肽的濃度 ，pM*	介白素 2 的濃 度，單位/毫升	細胞毒性，%**		
		[作用器細胞]:[靶細胞]		
		2.5:1	5:1	10:1
0	0	22 (22)	35 (35)	65 (65)
0	10	30 (30)	48 (48)	73 (73)
0.5	0	25 (23)	41 (36)	65 (66)
0.5	10	31 (32)	54 (50)	69 (75)
5	0	28 (25)	49 (39)	66 (68)
5	10	36 (35)	58 (52)	79 (78)
50	0	30 (29)	53 (47)	77 (73)
50	10	42 (41)	62 (59)	82 (85)
500	0	33 (37)	56 (50)	84 (83)
500	10	57 (52)	78 (70)	96 (93)

注意) *：“pM”意指一個 10^{-12} M 的克分子濃度。

**：括弧中的數目代表當使用野生型多肽時所顯現的細胞毒性。

如表 2 中所顯示的，本多肽會加強 N K 細胞的細胞毒性，且此加強能力等於或較野生型多肽為高。有介白素 2 的共同存在可加強此加強能力。

實施例 A - 1 (i)

L A K 細胞形成的誘導

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(34)

以類似於實施例 A - 1 (g) 中的步驟培養含 L A K 細胞之培養的淋巴球來做為作用器細胞，但其培養時間改成 72 小時。根據傳統方法以 ^{51}Cr 來標示 Raji (羅吉) 細胞，ATCC CCL 86，此為一種衍生自人類 Burkitt (伯奇特) 氏淋巴瘤的已建立好的細胞株，它可做為對 NK 細胞不反應的靶細胞。在含 96 個凹槽的培養液中，置入 1×10^4 個細胞於每一個凹槽中，並將培養好的淋巴球也置入凹槽中，使作用器細胞和靶細胞的比例分別為 5 : 1，10 : 1，和 20 : 1，然後，在 37℃ 的 5 v / v % CO_2 培養箱中培養 4 小時。接著，以類似於實施例 A - 1 (g) 的步驟測試培養上清液的放射活性以評估其細胞毒性。結果顯示於表 3。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(35)

表 3

多肽的濃度 ,pM*	介白素2的濃 度,單位/毫升	細胞毒性,%**		
		[作用器細胞]:[靶細胞]		
		5:1	10:1	20:1
0	0	11 (11)	21 (21)	34 (34)
0	10	15 (15)	28 (28)	38 (38)
0.5	0	14 (13)	24 (22)	34 (35)
0.5	10	18 (17)	32 (31)	42 (43)
5	0	16 (15)	26 (23)	37 (39)
5	10	21 (19)	36 (34)	50 (48)
50	0	22 (20)	41 (25)	49 (44)
50	10	26 (20)	52 (42)	56 (54)
500	0	27 (27)	44 (34)	61 (57)
500	10	33 (31)	59 (54)	72 (67)

注意) *：“pM”意指一個 10^{-12} M 的克分子濃度。

**：括弧內的數值代表當使用野生型多肽時所顯示細胞毒性。

如表 3 中所顯示的，本多肽可誘發 L A K 細胞的形成，且其誘導性等於或高於野生型多肽。有介白素 2 的共同存在可加強其誘導性。

實施例 A - 1 (j)

急性毒素試驗

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (36)

在實施例 A - 1 (c) 中的本多肽用一般方法經由表皮的、口服的或腹膜腔內的給予途徑給予 8 週大的老鼠。所得結果證實：不論給予途徑為何，本多肽的 LD_{50} 為每公斤體重約為 1 mg 或更高。由此證明本多肽可以併入人類所使用的藥品中而不必有任何疑慮。

實施例 A - 2

多肽的製造

以類似於實施例 A - 1 (a) 的步驟來製備一種自動複製之含 SEQ ID NO : 16 核苷酸順序的重組

DNA " p C S H I G I F / M U T 2 1 "，但是以實施例 A - 1 (a) 中所得之 DNA 片段 6 來做為模板，以核苷酸順序為 5' - C T G A T T C T G A C T C T A G A T A A T G C - 3' 的寡核苷酸做為導致基因突變的感覺引物，以核苷酸順序為 5' - G C A T T A T C T C T A G A G T C A G A A T C A G - 3' 的寡核苷酸做為導致基因突變的抗感覺引動，以利用絲胺酸取代 SEQ ID

NO : 4 中第 38 個位置的半胱胺酸。如第 4 圖中所顯示的，在重組之 DNA " p C S H I G I F / M U T 2 1 " 中，負責 SEQ ID NO : 7 之胺基酸順序編碼的 cDNA " I G I F / M U T 2 1 " 連接至核苷酸順序 " I F N s s " 下流（此段順序是負責人類干擾素 α 之次型 $\alpha 2 b$ 訊號肽的編碼）。

以類似於實施例 A - 1 (b) 的步驟將重組之 DNA

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (37)

引入 C O S - 1 細胞中以得到一轉化株。培養該轉化株以製造具有 S E Q I D N O : 7 之胺基酸順序的多肽，其產量約為 5 0 n g / m l 培養。以類似實施例 A - 1 的步驟先純化此培養再進行物化性質的分析。結果證實：本實施例之多肽的性質（即：分子量，N - 端的胺基酸順序，及較低的毒性）類似於實施例 A - 1 之多肽。如第 3 圖中所顯示的，根據實施例 A - 1 (f) 中的方法所進行之穩定性分析的結果證明此實施例中之本多肽野生型多肽更為穩定。這些結果證實：在此實施例中所使用的胺基酸置換可以有效地改良野生型多肽的穩定性而不會降低其生物活性。

實施例 A - 3

多肽的製造

以類似於實施例 A - 1 (a) 中的步驟來製造一種自動複製之含 S E Q I D N O : 1 7 的核苷酸順序的重組 D N A 片段 " p C S H I G I F / M U T 2 5 "，但是以實施例 A - 1 (a) 中所得之 D N A 片段 6 來做為模板，以核苷酸順序為 5 ' - C T T T C T A G C T T C T G A A A A A G A G A G A G - 3 ' 的寡核苷酸和核苷酸順序為 5 ' - C T C T C T C T T T T T C A G A A G C T A G A A A G - 3 ' 的寡核苷酸分別做為導致基因突變的感覺引物和抗感覺引物，以利用絲胺酸取代 S E Q I D N O : 4 中第 1 2 7 個位置的半胱胺酸。如第 5 圖中所

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (38)

顯示的，在重組之 DNA " p C S H I G I F / M U T 2 5 " 中，負責 S E Q I D N O : 8 之胺基酸順序編碼的 c D N A " I G I F / M U T 2 5 " 是連接至核苷酸順序 " I F N s s " 的下流（此段順序是負責人類干擾素 - α 之次型 $\alpha 2 b$ 訊號肽的編碼）。

以類似於實施例 A - 1 (b) 的步驟將重組之 DNA 引入 C O S - 1 細胞中以得到一轉化株。培養該轉化株以製造具有 S E Q I D N O : 4 之胺基酸順序的多肽，其產量約為 3 0 n g / m l 培養。以類似實施例 A - 1 的步驟先純化此培養再進行物化性質的分析。結果證實：本實施例之多肽的性質（即：分子量，N - 端的胺基酸順序，及較低的毒性）類似於實施例 A - 1 之多肽。如第 3 圖中所顯示的，根據實施例 A - 1 (f) 中的方法所進行之穩定性分析的結果證明此實施例中之本多肽野生型多肽更為穩定。這些結果證實：在此實施例中所使用的胺基酸置換可以有效地改良野生型多肽的穩定性而不會降低其生物活性。

實施例 A - 4

以類似於實施例 A - 1 (a) 的步驟來製備一種自動複製之含有 S E Q I D N O : 1 8 核苷酸順序的重組 DNA " p C S H I G I F / M U T 3 2 "，但是以自實施例 A - 2 中得到之重組 DNA " p C S H I G I F / M U T 2 1 " 中之 c D N A " I G I F / M U T 2 1 " 來

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(39)

做為模板，此段 c D N A 是負責 S E Q I D N O : 7 之胺基酸順序的編碼，並且以核苷酸順序為 5' - C T T T C T A G C T T C T G A A A A G A G A G A G - 3' 的寡核苷酸和核苷酸順序為 5' - C T C T C T C T T T T C A G A A G C T A G A A A G - 3' 的寡核苷酸分別做為導致基因突變的感覺引物和抗感覺引物，以利用絲胺酸取代在 S E Q I D N O : 4 中第 1 2 7 個位置的半胱胺酸。如第 6 圖所顯示的，在重組之 D N A " p C S H I G I F / M U T 3 2 " 中，負責 S E Q I D N O : 9 之胺基酸順序編碼的 c D N A " I G I F / M U T 3 2 " 是連接至核苷酸順序 " I F N s s " 的下流（此段順序是負責干擾素 α 之次型 $\alpha 2 b$ 訊號肽的編碼）。

以類似於實施例 A - 1 (b) 的步驟將重組之 D N A 引入 C O S - 1 細胞中以得到一轉化株。培養該轉化株以製造具有 S E Q I D N O : 9 之胺基酸順序的多肽，其產量約為 8 0 n g / m l 培養。以類似實施例 A - 1 的步驟先純化此培養再進行物化性質的分析。結果證實：本實施例之多肽的性質（即：分子量，N - 端的胺基酸順序，及較低的毒性）類似於實施例 A - 1 之多肽。如第 3 圖中所顯示的，根據實施例 A - 1 (f) 中的方法所進行之穩定性分析的結果證明此實施例中之本多肽野生型多肽更為穩定。這些結果證實：在此實施例中所使用的胺基酸置換可以有效地改良野生型多肽的穩定性而不會降低其生物

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(40)

活性。

實施例 A - 5

以類似於實施例 A - 1 (a) 的步驟來製備一種自動複製之含有 SEQ ID NO : 19 核苷酸順序的重組 DNA " p C S H I G I F / M U T 4 1 " , 但是以自 c D N A " I G I F / M U T 3 2 " 來做為模板, 此段 c D N A 是與 SEQ ID NO : 18 之胺基酸順序一同存在於自實施例 A - 4 中製得之重組 DNA "

p C S H I G I F / M U T 3 2 " 中, 並且以核苷酸順序為 5 ' - C A A C T C T C T C C T C T G A G A A C A A - 3 ' 的寡核苷酸和核苷酸順序為 5 ' - T T G T T C T C A G A G G A G A G A G T T G - 3 ' 的寡核苷酸分別做為導致基因突變的感覺引物和抗感覺引物, 以利用絲胺酸取代在 SEQ ID NO : 4 中第 76 個位置的半胱胺酸。如第 7 圖所顯示的, 在重組之 DNA "

p C S H I G I F / M U T 4 1 " 中, 負責 SEQ ID NO : 10 之胺基酸順序編碼的 c D N A " I G I F / M U T 4 1 " 是連接至核苷酸順序 " I F N s s " 的下流 (此段順序是負責人類干擾素 α 之次型 $\alpha 2 b$ 訊號肽的編碼)。

以類似於實施例 A - 1 (b) 的步驟將重組之 DNA 引入 COS - 1 細胞中以得到一轉化株。培養該轉化株以製造具有 SEQ ID NO : 10 之胺基酸順序的多肽

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(41)

，其產量約為 6 n g / m l 培養。以類似實施例 A - 1 的步驟先純化此培養再進行物化性質的分析。結果證實：本實施例之多肽的性質（即：分子量，N - 端的胺基酸順序，及較低的毒性）類似於實施例 A - 1 之多肽。如第 3 圖中所顯示的，根據實施例 A - 1 (f) 中的方法所進行之穩定性分析的結果證明此實施例中之本多肽較野生型多肽更為穩定。這些結果證實：在此實施例中所使用的胺基酸置換可以有效地改良野生型多肽的穩定性而不會降低其生物活性。

實施例 A - 6

以類似於實施例 A - 1 (a) 的步驟來製備一種自動複製之含有 S E Q I D N O : 20 核苷酸順序的重組 D N A " p C S H I G I F / M U T 35 "，但是以自實施例 A - 2 中得到之重組 D N A " p C S H I G I F " 中 c D N A " I G I F / M U T 21 " 來做為模板，此段 c D N A 是負責 S E Q I D N O : 7 之胺基酸順序的編碼，並且以核苷酸順序為 5 ' - C T C T C C G C T G A G A A C A A A A T T A T T T C C - 3 ' 的寡核苷酸和核苷酸順序為 5 ' - T T T G T T C T C A G C G G A G A G A G T T G - 3 ' 的寡核苷酸分別做為導致基因突變的感覺引物和抗感覺引物，以利用丙胺酸取代在 S E Q I D N O : 4 中第 76 個位置的半胱胺酸。如第 8 圖所顯示的，在重組之 D N A " p C S H I G I F /

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(42)

M U T 4 1 " 中，負責 S E Q I D N O : 1 1 之胺基酸順序編碼的 c D N A " I G I F / M U T 3 5 " 連接至核苷酸順序 " I F N s s " 的下流（此段順序是負責人類干擾素 α 之次型 $\alpha 2 b$ 訊號肽的編碼）。

以類似於實施例 A - 1 (b) 的步驟將重組之 D N A 引入 C O S - 1 細胞中以得到一轉化株。培養該轉化株以製造具有 S E Q I D N O : 1 1 之胺基酸順序的多肽，其產量約為 6 0 n g / m l 培養。以類似實施例 A - 1 的步驟先純化此培養再進行物化性質的分析。結果證實：本實施例之多肽的性質（即：分子量，N - 端的胺基酸順序，及較低的毒性）類似於實施例 A - 1 之多肽。如第 3 圖中所顯示的，根據實施例 A - 1 (f) 中的方法所進行之穩定性分析的結果證明此實施例中之本多肽較野生型多肽更為穩定。這些結果證實：在此實施例中所使用的胺基酸置換可以有效地改良野生型多肽的穩定性而不會降低其生物活性。

實施例 A - 7

以類似於實施例 A - 1 (a) 的步驟來製備一種自動複製之含有 S E Q I D N O : 2 1 核苷酸順序的重組 D N A " p C S H I G I F / M U T 4 2 "，但是以自實施例 A - 4 中得到之重組 D N A " p C S H I G I F / M U T 3 2 " 中之 c D N A " I G I F / M U T 3 2 " 來做為模板，此段 c D N A 是負責 S E Q I D N O :

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (43)

18 之胺基酸順序的編碼，並且以核苷酸順序為 5' - C T C T C C G C T G A G A A C A A A A T T A T T T C C - 3' 的寡核苷酸和核苷酸順序為 5' - T T T G T T C T C A G C G G A G A G A G T T G - 3' 的寡核苷酸分別做為導致基因突變的感覺引物和抗感覺引物，以利用丙胺酸取代在 SEQ ID NO: 4 中第 76 個位置的半胱胺酸。如第 9 圖所顯示的，在重組之 DNA " p C S H I G I F / M U T 4 2 " 中，負責 SEQ ID NO: 12 之胺基酸順序編碼的 cDNA " I G I F / M U T 4 2 " 是連接至核苷酸順序 " I F N s s " 的下流（此段順序是負責干擾素 α 之次型 $\alpha 2 b$ 訊號肽的編碼）。

以類似於實施例 A - 1 (b) 的步驟將重組之 DNA 引入 COS - 1 細胞中以得到一轉化株。培養該轉化株以製造具有 SEQ ID NO: 12 之胺基酸順序的多肽，其產量約為 30 ng / ml 培養。以類似實施例 A - 1 的步驟先純化此培養再進行物化性質的分析。結果證實：本實施例之多肽的性質（即：分子量，N - 端的胺基酸順序，及較低的毒性）類似於實施例 A - 1 之多肽。如第 3 圖中所顯示的，根據實施例 A - 1 (f) 中的方法所進行之穩定性分析的結果證明此實施例中之本多肽野生型多肽更為穩定。這些結果證實：在此實施例中所使用的胺基酸置換可以有效地改良野生型多肽的穩定性而不會降低其生物活性。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (44)

實施例 A - 8

多肽的製造

以類似於實施例 A - 1 (a) 中製備 D N A 片段 1 的方法進行 P C R , 但使用經由化學合成之核苷酸順序為

5' - C G G C C A A A G T T G C C C A C A G A G C
A G C T T G - 3' 的寡核苷酸來做為抗感覺引物 1。

P C R 的結果可得一含有 S E Q I D N O : 2 4 之核苷酸順序的 D N A 片段 (D N A 片段 7) , 連接在 S E Q

I D N O : 2 4 5' - 端的是一個被限制酶 X h o I 所識別的部位 , 而連接在 S E Q I D N O : 2 4 3' 端的是 S E Q I D N O : 2 8 之核苷酸順序中第 1 至第 1 1 個核苷酸的一段順序。

該重組之 D N A " p M G T G - 1 " 含有 S E Q I D N O : 2 8 的核苷酸順序 , 它是負責帶有 S E Q I D N O : 5 之胺基酸順序的野生型多肽編碼 , 其製備方法可依由本申請者在日本專利可凱號 2 7 , 1 8 9 / 9 6 中所說明的方法來進行。帶有胺基酸順序 S E Q I D N O : 5 之野生型多肽 , 其中所含之部分胺基酸順序 S E Q I D N O s : 1 , 2 和 3 , 其位置分別是第 1 6 至 2 1 個 , 第 2 9 至 3 4 個 , 第 5 0 至 5 4 個區域。以化學合成的方法可製備核苷酸順序為 5' - C T G C T C T G T G G G C A A C T T T G G C C G A C T T C A C T G - 3' 的寡核苷酸 , 此段順序

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (45)

可做為抗感覺引物（抗感覺引物 3），且，也可利用化學方法合成核苷酸順序為 5' - A C A C G C G G C C G C C T A A C T T T G A T G T A A G T T A G - 3' 的寡核苷酸，此段順序可做為抗感覺引物（抗感覺引物 3）。然後，以類似於 A - 1 (a) 中製備 D N A 片段 2 的方法進行 P C R，但使用 "p M G T G - 1" 代替 D N A "p H I G I F"，並使用感覺引物 3 和抗感覺引物 3 來分別代替感覺引物 2 和抗感覺引物 2。P C R 的結果可得一含有 S E Q I D N O : 2 8 核苷酸順序的 D N A 片段（D N A 片段 8），5' - T A G - 3' 的終止密碼和一個被限制酶 N o t I 所識別的部位是連接至 S E Q I D N O : 2 8 的 3' 端，而在 S E Q I D N O : 2 4 之核苷酸順序中由第 5 7 至 6 9 個位置的一段核苷酸順序則連接至 S E Q I D N O : 2 8 的 5' 端。

以類似實施例 A - 1 (a) 中製備 D N A 片段 3 的步驟來進行 P C R，但使用 D N A 片段 7 和 8 及自上述所得之抗感覺引物 3 來分別取代片段 1 和 2 及抗感覺引物 2。此 P C R 的結果可得到一段含 S E Q I D N O : 2 9 之核苷酸順序的 D N A 片段（D N A 片段 9）。

以類似實施例 A - 1 (a) 中製備 D N A 片段 4 的步驟來進行 P C R，但使用 D N A 片段 9 代替 D N A 片段 3，以抗感覺引物 3 代替抗感覺引物 2，且以核苷酸順序為 5' - G G C C G A C T T C A C G C T A C A A C C - 3' 的寡核苷酸做為導致突變的感覺引物，以使鳥嘌呤和

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(46)

胞嘧啶分別取代在 S E Q I D N O : 2 9 中之第 1 0 3 個和 1 0 4 個核苷酸的胸腺嘧啶和鳥嘌呤。此 P C R 產生了一段含有與 S E Q I D N O : 2 9 中由第 9 1 至 5 7 0 個核苷酸順序一致的核苷酸順序，除了它的第 1 0 3 個和第 1 0 4 個位置分別被鳥嘌呤和胞嘧啶所取代。

以類似實施例 A - 1 (a) 中製備 D N A 片段 5 的步驟進行 P C R，但使用 D N A 片段 9 代替 D N A 片段 3，且以帶有核苷酸順序為 5' - G G T T G T A G C G T G A A G T C G G C C - 3' 的寡核苷酸取代導致基因突變的抗感覺引物，以使鳥嘌呤和胞嘧啶分別取代在 S E Q I D N O : 2 9 中第 1 0 3 個和 1 0 4 個核苷酸的胸腺嘧啶和鳥嘌呤。此 P C R 產生了一段含有與 S E Q I D N O : 2 9 中第 1 個至第 1 1 1 個的核苷酸順序一致的核苷酸順序，除了第 1 0 3 個和第 1 0 4 個位置分別為鳥嘌呤和胞嘧啶所取代。

以類似於實施例 A - 1 (a) 中製備 D N A 片段 3 的步驟進行 P C R，但使用 D N A 片段 1 0 和 1 1 及自上述方法得到之抗感覺引物 3 分別取代 D N A 片段 1 和 2 及抗感覺引物。此 P C R 產生一 D N A 片段 (D N A 片段 1 2)，其中含有：S E Q I D N O : 2 2 之核苷酸順序，連接至 S E Q I D N O : 2 2 5' - 端的為 S E Q I D N O : 2 4 之核苷酸順序及一個被限制酶 X h o I 識別的部位，而連接至 S E Q I D N O :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(47)

2 2 3 ' - 端的是 5 ' - T A G - 3 ' 的終止密碼和一個被限制酶 N o t I 所識別的部位。

根據實施例 A - 1 (a) 中製備重組之 D N A " p C S H I G I F / M U T 1 2 " 的步驟，以類似處理 D N A 片段 6 的方法來處理 D N A 片段 1 2，以得到一種自動複製的重組 D N A " p C S M I G I F / M U T 1 1 "。如第 10 圖中所顯示的，在重組之 D N A " p C S M I G I F / M U T 1 1 " 中，帶有 S E Q I D N O : 2 2 之核苷酸順序的 c D N A " m I G I F / M U T 1 1 " 連接至核苷酸順序 " I F N s s " 的下流（此段順序是負責人類干擾素 - α 之次型 $\alpha 2 b$ 訊號肽的編碼）。如附上之胺基酸順序中所顯示的，S E Q I D N O : 2 2 負責一段衍生自帶有 S E Q I D N O : 5 之野生型多肽的胺基酸順序的編碼，而這是藉著以丙胺酸取代第 7 個位置的半胱胺酸來進行的。

在對照組方面，以類似於製備重組之 D N A " p C S H I G I F / M U T 1 2 " 的步驟來製備一種自動複製的重組 D N A " p C S H I G I F / W T "，但以處理 D N A 片段 9 來取代 D N A 片段 6。如第 11 圖中所顯示的，在重組之 D N A " p C S M I G I F / W T " 中，帶有 S E Q I D N O : 2 8 核苷酸順序並負責野生型多肽編碼的 c D N A " m I G I F / W T " 是連接至核苷酸順序 " I F N s s " 的下流（此段順序是負責人類干擾素 - α 之次型 $\alpha 2 b$ 訊號肽的編碼）。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(48)

實施例 A - 8 (b)

以轉化株製備多肽

根據實施例 A - 1 (b) 中製備多肽的步驟來進行，但以重組之 DNA " p C S M I G I F / M U T 1 2 " 取代 " p C S H I G I F / M U T 1 1 "，將此重組之 DNA 加以萃取並引入 C O S - 1 細胞中，再培養帶有此 DNA 的 C O S - 1 細胞。將此培養利用單株抗體（本申請者在日本專利可凱號 2 1 7，7 9 8 / 9 6 中有所描述）以西方點墨法加以分析。此分析證明本多肽可以誘發免疫活性細胞製造 I F N - γ ，它帶有的胺基酸順序係衍生自 S E Q I D N O : 5，但以丙胺酸取代第 7 個位置上的半胱胺酸，且在本培養中之產量為約 2 0 n g / m l。

在對照組方面，以類似上述方法處理重組之 DNA " p C S H I G I F / W T " 來製備能誘發免疫活性細胞製造 I F N - γ 的野生型多肽。此野生型多肽的產量明顯地較使用上述之 " p C S M I G I F / M U T 1 1 " 來製備的產量要低。這證明了在此實施例中之本多肽較野生型多肽更為穩定並展現較野生型多肽為高的生物活性。

實施例 A - 8 (c)

多肽的純化

將實施例 A - 8 (b) 中之含本多肽的培養加以離心

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(49)

以收集上清液。將上清液送入一個填充著凝膠的分析柱中，使用單株抗體（可利用本申請者描述於日本專利可凱號“217,798”中的方法製備得到）進行免疫親和層析法，此分析柱需預先以PBS沖洗。先以新鮮PBS沖洗分析柱，再以35mM乙胺（pH10.8）進行洗滌。自洗滌出之分餾液中，收集含有可誘發免疫活性細胞製造IFN- γ 之多肽的部分。在4℃下，將此收集到的分餾液對PBS進行透析18小時，然後以膜過濾法濃縮之，接著再進行冷凍乾燥以得到一種純度約為95%的固體多肽。同時，將藉著使用重組DNA所得之含野生型多肽的培養，以類似上述方法加以純化來做為對照組，依照下述方法進行物化性質的分析。

實施例A-8(d)

分子量

將實施例A-8(c)中之本多肽，以類似於實施例A-1(d)的方法進行SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳分析，結果顯示出一條能誘發IFN- γ 之製造的多肽主要暗帶，其位置是對應於分子量約為18,500~19,500之間。

實施例A-8(e)

N-端之胺基酸順序

以類似於實施例A-1(e)中的方法分析，證實在

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (50)

實施例 A - 8 (c) 中之本多肽的 N - 端含有
S E Q I D N O : 3 0 的胺基酸順序。

實施例 A - 8 (f)

穩定性

將實施例 A - 8 (c) 中之本多肽或野生型多肽溶於含 0 . 2 g / m l 麥芽糖的 P B S 中，並將此溶液在 4 0 °C 下，培養 2 4 小時。在開始培養之 0 , 3 , 9 或 2 4 小時後分別採取部分的樣本。將這些樣本根據下述實施例 A - 8 (g) 中的方法分別分析其誘發 I F N - γ 之活性，以研究在培養中，活性的時間過程。根據起始點的活性來計算每一個時間點之剩餘活性的百分比 (%)，結果顯示於第 1 2 圖。

如第 1 2 圖中所顯示的，在此實施例中之本多肽較野生型多肽來得穩定且保持活性的時間較長。這證明了本實施例中所採用的胺基酸置換可以有效地改良野生型多肽之穩定性而不會降低其生物活性。

實施例 A - 8 (g)

由免疫活性細胞製造 I F N - γ

自 C 3 H / H e J 老鼠中收集脾細胞來做為免疫活性細胞。將此脾細胞懸浮於含有 1 0 v / v % 胎牛血清之 R P M I - 1 6 4 0 培養液中。在有或沒有刀豆球蛋白 A 或介白素 2 的存在下，將本多肽或野生型多肽加入懸浮液

五、發明說明 (51)

中。然後，培養此脾細胞再利用傳統之酵素－免疫分析來檢查 I F N - γ 的製造，以評估誘發 I F N - γ 之製造的活性。結果證實：本多肽可作用在脾細胞（免疫活性細胞）上以誘發 I F N - γ 的製造。本多肽誘發 I F N - γ 之製造的活性等於或高於野生型多肽的活性。

實施例 A - 8 (h)

急性毒性試驗

以實施例 A - 1 (j) 的方法測試實施例 A - 8 (a) 中之本多肽的急性毒性。結果證實，不論給予的途徑為何，本多肽之 L D ₅₀ 約為每公斤體重 1 m g 或更高。這證實了本多肽可以一起併入供哺乳動物使用之藥品中而不必有任何疑慮。

實施例 A - 9

多肽的製造

以類似實施例 A - 8 (a) 中的步驟製備一種自動複製之含有 S E Q I D N O : 23 核苷酸順序的重組 D N A “ p C S M I G I F / M U T 1 2 ”，但是以實施例 A - 8 (a) 中所製得的 D N A 片段 9 做為模板，以帶有核苷酸順序為 5' - G G A C A C T T T C T T G C T A G C C A A A A G G - 3' 的寡核苷酸和帶有核苷酸順序為 5' - C C T T T T G G C T A G C A A G A A A G T G T C C - 3' 的寡核苷酸分別做為導致基因突變的感

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (52)

覺引物和抗感覺引物，以利用絲胺酸來取代在

SEQ ID NO: 5 中第 1 2 5 個位置上的半胱胺酸

。如第 3 圖中所顯示的，在重組之 DNA

p C S M I G I F / M U T 1 2 " 中，負責 SEQ ID

NO: 1 4 之胺基酸順序編碼的 cDNA " m I G I F / M U T 1 2 " 係連接至核苷酸順序 " I F N s s " 的下流（此段順序是負責人類干擾素 - α 之次型 $\alpha 2 b$ 訊號肽的編碼）。

以類似實施例 A - 1 (b) 的步驟將重組之 DNA 引入 COS - 1 細胞中以得到一個轉化株。培養該轉化株以製造帶有 SEQ ID NO: 1 4 之胺基酸順序的多肽，其產量約為 50 ng / ml 培養。以類似於實施例 A - 8 的步驟先純化此培養，再進行物化性質的分析。結果證實，在此實施例中之多肽的性質類似於實施例 A - 8 中之多肽，即：分子量，N - 端之胺基酸順序，及較低之毒性。如第 1 2 圖中所顯示的，根據實施例 A - 8 (f) 中的方法進行穩定性分析的結果證實在此實施例中之本多肽野生型多肽來得穩定。這些結果證實在此實施例中之胺基酸置換可以有效地改良野生型多肽的穩定性而不會降低其生物活性。

實施例 B - 1

溶液

將在實施例 A - 1 至 A - 9 中之任一純化好的本多肽

五、發明說明 (53)

類溶於含 1 v / v % 人類血清白蛋白 (做為穩定劑) 之生理食鹽水中，使其濃度為 1 m g / m l，並將此溶液以一般方法經過濾膜過濾成為無菌溶液。

這些具有令人滿意之穩定性的溶液可以做為注射液、眼藥水、及洗鼻藥來治療和 / 或預防包括人類在內之哺乳動物的感受性疾病 (如：惡性腫瘤、病毒性疾病、感染及免疫病變)。

實施例 B - 2

乾式注射劑

將在實施例 A - 1 至 A - 9 中之任一種經純化的本多肽類 1 0 0 m g 溶於含有 1 w / v % 明膠 (做為穩定劑) 的生理食鹽水 1 0 0 毫升中，並將此溶液以一般方法經過濾膜過濾成無菌溶液。在各小瓶中各裝 1 毫升此無菌水溶液，並將之進行冷凍乾燥後再以蓋子將小瓶封住。

此產品具有令人滿意的穩定性，可以做為一種乾式注射劑來治療和 / 或預防包括人類在內之哺乳動物的感受性疾病，如：惡性腫瘤、病毒性疾病、感染、及免疫病變。

實施例 B - 3

油膏

將一種羧乙烯基聚合物，"H I - B I S - W A K O 1 0 4" (由日本東京之和光純化學所生產販售) 及一種粉狀結晶型海藻糖 "TREHALOSE" (由日本，歐卡雅馬市

五、發明說明 (54)

之海牙西巴拉有限公司生產販售) 溶於無菌蒸餾水中，使其濃度分別為 1 . 4 w / w % 及 2 . 0 w / w % 。將在實施例 A - 1 至 A - 9 中之任一種經純化的本多肽與溶液混合均勻。將每一種均勻液之 pH 值調整成 7 . 2 ，以得到其中含濃度為 1 m g / g 之任一種本多肽的糊狀物。

此糊狀物具有令人滿意的可塗開性和穩定性，可以做為用於治療及 / 或預防包括人類在內之哺乳動物的感受性疾病（如：惡性腫瘤、病毒性疾病、感染和免疫病變）的油膏。

實施例 B - 4

錠劑

將在實施例 A - 1 至 A - 9 中之任一種經純化的多肽類及 "LUMIN"，〔雙 - 4 - (1 - 乙基喹啉)〕〔 γ - 4 - (1 - 乙基喹啉)〕五申硫胺酸花青（為一種細胞活化劑）與 "FINETOSE"（一種無水結晶型 α - 麥芽糖，由日本歐卡雅馬市海牙西巴拉有限公司生產販售）混合均勻。以傳統錠劑機器將每一種均勻物製成錠劑，每一錠劑重為 200 m g 並含有約 1 m g 之任一種多肽和 LUMIN。

此種錠劑具有令人滿意的可吞嚥性和穩定性及活化細胞的活性，可以做為一種錠劑，用來治療和 / 或預防包括人類在內之哺乳動物的感受性疾病，如：惡性腫瘤、病毒性疾病、感染及免疫病變。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (55)

實施例 B - 5

繼承性免疫治療作用劑

將單核細胞自惡性淋巴瘤之病人的周邊血液中分離出來。將此細胞懸浮於事先預熱之含有 10 v / v % 人類 A B 血清的 R P M I - 1 6 4 0 培養液中，製成密度為 1×10^6 細胞 / 毫升的細胞液。將在實施例 A - 1 至 A - 7 中之任一種本多肽及一種重組之人類介白素 2 加入此細胞懸浮液中以做為繼承性免疫治療作用劑，其濃度分別為 10 ng / ml 和 100 單位 / ml。將此細胞在 37 °C 之 5 v / v % C O₂ 培養箱中培養一星期後再離心收集 L A K 細胞。

這些 L A K 細胞在送回人體時對淋巴瘤有很強的細胞毒性，使用此作用劑來進行繼承性免疫治療時可展現出明顯高於單獨使用介白素 2 的治療效果。以類似上述方法製備細胞毒性 T 細胞，但以腫瘤 - 侵襲性淋巴球取代單核細胞，當此細胞送回人體時，也可顯現出相當於 L A K 細胞的治療效果。因此，在此實施例中之繼承性免疫治療作用劑可以有效地用於治療除了淋巴瘤外的固體惡性腫瘤如：腎臟、惡性黑色瘤、大腸癌、直腸癌及肺癌。

I F N - γ 與下列作用的關聯是為人所熟知的：①對病毒和細菌，等等感染的保護作用，②對惡性腫瘤增生的抑制作用；③調節引起保護作用之免疫系統，及④抑制免疫球蛋白 E 抗體之製造。I F N - γ 目前可用於對抗人類感受性疾病之作用劑中，而對於它在標的疾病之治療方向

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(56)

的陳述，用途，劑量 and 安全性均已建立。

如法蘭西斯 R . 巴克威爾在論文“用於癌症治療之細胞毒”(由“優西希古”翻譯，日本東京之東京卡嘉古東吉有限公司，1991年出版)中所敘述的：使用如NK細胞及LAK細胞之類的殺傷細胞來進行的治療(包括抗腫瘤之免疫治療)應用至人類疾病時可產生令人滿意的效果。最近，對於由細胞素來加強其細胞毒性之殺傷細胞或由細胞素所誘發形成的殺傷細胞所牽涉到的治療效果已引起相當的重視。例如：由T . 富吉歐卡等人著，載於英國泌尿學期刊第73冊，第1輯，23-31頁(1994)中描述了在抗腫瘤之免疫治療中同時使用LAK細胞和介白素2，介白素2可誘發LAK細胞的形成，因此在對抗人類癌症轉移中有顯著的效果，且不會有嚴重的毒性和副作用。

因此，已知IFN- γ 或殺傷細胞與治療和/或預防許多人類疾病有關，並且可治癒或緩解這些疾病。如實施例A-1至A-9中所顯示的，本多肽可誘發免疫活性細胞製造IFN- γ ，加強NK細胞之細胞毒性，及誘發LAK細胞的形成，這表示本用於感受性疾病的作用劑可連續給予病人一段相當長的時間，並能有效地治療及/或預防IFN- γ 及/或殺傷細胞所牽涉的疾病且不會引起嚴重的副作用。

本發明的效果

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (57)

如上述所描述，本發明是基於建立一種能誘發免疫活性細胞製造 I F N - γ 的穩定多肽。根據本發明之多肽類是依它們的胺基酸順序來解釋，由於它們較野生型多肽有較高的穩定性，因此，它們的特性是能保有其生物活性一段相當長的時間。因此，本多肽可提供許多不同的用途，如：①做為一種 I F N - γ 誘發劑，以便能在細胞培養中誘發 I F N - γ 的製造，及②做為一種作用劑來治療及／或預防對 I F N - γ 敏感的一般疾病，包括：病毒性疾病、感染、惡性腫瘤、及免疫病變。另外：以本多肽作為有效成分的作用劑還具有加強細胞毒性及／或誘發殺傷細胞形成的物質，因此可以令人滿意地用於治療嚴重疾病，如：惡性腫瘤。

還有，一般而言，由於本多肽具有很強之誘發 I F N - γ 之製造的活性，僅需用一點量之本多肽即可誘發出所需要量之 I F N - γ 。由於其毒性很小，當給予相當高劑量之本多肽類時也不會引起嚴重的副作用，這給予了本多肽一種優點，即是：它們可以很容易地誘發出所需要量之 I F N - γ ，而不必嚴格控制實際使用的劑量。帶有這些用途的多肽類可以利用重組 D N A 之技術，以本製備方法製造出所需要量的多肽。

本發明是一個重要的發明，它具有一顯著的效果並且在此領域中有很大的貢獻。

雖然被認為是本發明目前之較佳的具體實施例前述已有說明，但是其中仍有許多不同的改良，而且，在本發明之直

五、發明說明 (58)

正精神和範圍中所涵蓋的所有此類改良也將涵蓋在附屬的專利申請中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(59)

順序列表

(1) 一般資料：

(i) 申請者：

名字：凱夏哈雅西巴洛塞布蘇卡嘉古肯奇求

(ii) 發明的標題

(iii) 順序的數目：30

(2) SEQ ID NO：1的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：6個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：SEQ ID NO：1：

Asn	Asp	Gln	Val	Leu	Phe
1				5	

(3) SEQ ID NO：2的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：6個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：SEQ ID NO：2：

Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp
1				5	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(60)

(4) SEQ ID NO: 3 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：5 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：SEQ ID NO: 3：

Met	Tyr	Lys	Asp	Ser
1				5

(5) SEQ ID NO: 4 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：157 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：SEQ ID NO: 4：

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	Thr	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					

五、發明說明(61)

(6) S E Q I D N O : 5 的 資 料

(i) 順 序 特 徵 :

(A) 長 度 : 1 5 7 個 胺 基 酸

(B) 型 態 : 胺 基 酸

(D) 拓 撲 學 : 線 型

(ii) 分 子 型 態 : 肽

(xi) 順 序 說 明 : S E Q I D N O : 5 :

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (62)

(7) S E Q I D N O : 6 的 資 料

(i) 順 序 特 徵 :

(A) 長 度 : 1 5 7 個 胺 基 酸

(B) 型 態 : 胺 基 酸

(D) 拓 撲 學 : 線 型

(ii) 分 子 型 態 : 肽

(xi) 順 序 說 明 : S E Q I D N O : 6 :

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	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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					

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(63)

(8) SEQ ID NO: 7 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：157 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：SEQ ID NO: 7：

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	Ser	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	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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								

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(64)

(9) SEQ ID NO: 8 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：157 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：SEQ ID NO: 8：

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	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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	Ser	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								

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (65)

(1 0) S E Q I D N O : 9 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：1 5 7 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 9 :

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	Ser	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	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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	Ser	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					

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (66)

(11) S E Q I D N O : 10 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：157 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 10 :

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	Ser	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	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ser	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	Ser	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						

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(67)

(1 2) S E Q I D N O : 1 1 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：1 5 7 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 1 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	Ser	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	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	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						

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(68)

(1 3) S E Q I D N O : 1 2 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：1 5 7 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 1 2 :

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	Ser	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	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	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	Ser	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					

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (69)

(1 4) S E Q I D N O : 1 3 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：1 5 7 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 1 3 :

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(70)

(1 5) S E Q I D N O : 1 4 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：1 5 7 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 1 4 :

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(71)

(1 6) S E Q I D N O : 1 5 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：4 7 1 個鹼基對

(B) 型態：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：c D N A

(ix) 特徵：

(A) 名字／鍵：m a t 肽

(B) 座落位置：1 . . 4 7 1

(C) 鑑定方法：S

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 1 5 :

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	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(72)

ATA	AGT	35	ATG	TAT	AAA	GAT	AGC	40	CAG	CCT	AGA	GGT	ATG	45	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	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	TGT	GAG	AAC	AAA	ATT	240			
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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				
			100							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								

(17) S E Q I D N O : 16 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：471 個鹼基對

(B) 型態：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：c D N A

(ix) 特徵：

(A) 名字／鍵：m a t 肽

(B) 座落位置：1 . . 471

(C) 鑑定方法：S

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 16 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(73)

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	TCT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	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	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	TGT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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	
			100						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						

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

(18) SEQ ID NO: 17 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：471 個鹼基對

(B) 型態：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：cDNA

(ix) 特徵：

(A) 名字／鍵：mat 肽

五、發明說明 (74)

(B) 座落位置 : 1 . . 4 7 1

(C) 鑑定方法 : S

(xi) 順序說明 : S E Q I D N O : 1 7 :

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	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	TGT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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	
		100						105					110			
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TCT	GAA	384
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ser	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						

(1 9) S E Q I D N O : 1 8 的資料

(i) 順序特徵 :

(A) 長度 : 4 7 1 個鹼基對

(B) 型態 : 核酸

(C) 股型 : 雙股

(D) 拓撲學 : 線型

(ii) 分子型態 : c D N A

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (75)

(ix) 特徵：

(A) 名字／鍵：m a t 肽

(B) 座落位置：1 . . 4 7 1

(C) 鑑定方法：S

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 1 8 :

1	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	TCT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	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	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	TGT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
	Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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	
			100						105				110				
	ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TCT	GAA	384
	Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ser	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							/

(20) S E Q I D N O : 1 9 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：4 7 1 個鹼基對

(B) 型態：核酸

(C) 股型：雙股

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(76)

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：c D N A

(ix) 特徵：

(A) 名字／鍵：m a t 肽

(B) 座落位置：1 . . 4 7 1

(C) 鑑定方法：S

(xi) 順序說明：S E Q I D · N O : 1 9 :

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	TCT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	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	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	TCT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ser	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	
		100						105				110				
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TCT	GAA	384
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ser	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						

(2 1) S E Q I D N O : 2 0 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：4 7 1 個鹼基對

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(77)

(B) 型態：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：c D N A

(ix) 特徵：

(A) 名字／鍵：m a t 肽

(B) 座落位置：1 . . 4 7 1

(C) 鑑定方法：S

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 2 0 :

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	TCT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	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	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	GCT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	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	
					100					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	
							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	
							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					

五、發明說明(78)

(2 2) S E Q I D N O : 2 1 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：4 7 1 個鹼基對

(B) 型態：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：c D N A

(ix) 特徵：

(A) 名字／鍵：m a t 肽

(B) 座落位置：1 . . 4 7 1

(C) 鑑定方法：S

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 2 1 :

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	TCT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	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	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	GCT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	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	
		100					105					110				
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TCT	GAA	384
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ser	Glu	
		115					120					125				

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(79)

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						

(2 3) S E Q I D N O : 2 2 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：4 7 1 個鹼基對

(B) 型態：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：c D N A

(ix) 特徵：

(A) 名字／鍵：m a t 肽

(B) 座落位置：1 . . 4 7 1

(C) 鑑定方法：S

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 2 2 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(80)

1	AAC	TTT	GGC	CGA	CTT	CAC	GCT	ACA	ACC	GCA	GTA	ATA	CGG	AAT	ATA	AAT	48
Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Ala	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	ATG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT		240
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile		
65				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	CTC	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		
	130					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					
145					150					155							

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

(2 4) S E Q I D N O : 2 3 的 資 料

(i) 順 序 特 徵 :

(A) 長 度 : 4 7 1 個 鹼 基 對

(B) 型 態 : 核 酸

(C) 股 型 : 雙 股

(D) 拓 撲 學 : 線 型

(ii) 分 子 型 態 : c D N A

(ix) 特 徵 :

(A) 名 字 / 鍵 : m a t 肽

(B) 座 落 位 置 : 1 . . 4 7 1

五、發明說明 (81)

(C) 鑑定方法 : S

(xi) 順序說明 : S E Q I D N O : 2 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	ATG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT	240
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	
65				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	AGC	CAA	AAG	GAA	384
Phe	Glu	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Glu		
		115				120						125				
GAT	GAT	GCT	TTC	AAA	CTC	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	
	130				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				
145				150					155							

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

(2 5) S E Q I D N O : 2 4 的資料

(i) 順序特徵 :

(A) 長度 : 6 9 個鹼基對

(B) 型態 : 核酸

(C) 股型 : 雙股

(D) 拓撲學 : 線型

(ii) 分子型態 : 其它種核苷酸

(ix) 特徵 :

五、發明說明(82)

(A) 名字／鍵：s i g 肽

(B) 座落位置：1 . . 6 9

(C) 鑑定方法：S

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 2 4 :

ATGGCCTTGA CCTTTGCTTT ACTGGTGGCC CTCCTGGTGC TCAGCTGCA⁶⁰ GTCAAGCTGC
TCTGTGGGC⁶⁹

(26) S E Q I D N O : 2 5 : 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：4 7 1 個鹼基對

(B) 型態：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：c D N A

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：人類

(F) 組織型態：肝臟

(ix) 特徵：

(A) 名字／鍵：m a t 肽

(B) 座落位置：1 . . 4 7 1

(C) 鑑定方法：S

(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 2 5 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(83)

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	ACT	CTC	TCC	TGT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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	
		100						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						

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

(2 7) S E Q I D N O : 2 6 的資料

(i) 順序特徵 :

(A) 長度 : 5 7 0 個鹼基對

(B) 型態 : 核酸

(C) 股型 : 雙股

(D) 拓撲學 : 線型

(ii) 分子型態 : c D N A

(ix) 特徵 :

(A) 名字 / 鍵 : 5 ' U T R

(B) 座落位置 : 1 . . 1 5

五、發明說明 (84)

(C) 鑑定方法 : S

(A) 名字 / 鍵 : s i g 肽

(B) 座落位置 : 1 6 . . 8 4

(C) 鑑定方法 : S

(A) 名字 / 鍵 : m a t 肽

(B) 座落位置 : 8 5 . . 5 5 5

(C) 鑑定方法 : S

(A) 名字 / 鍵 : 3 ' U T R

(B) 座落位置 : 5 5 6 . . 5 7 0

(C) 鑑定方法 : S

(xi) 順序說明 : S E Q I D N O : 2 6 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (85)

ACACCTCGAG CCACC ATG GCC TTG ACC TTT GCT TTA CTG GTG GCC CTC CTG	51
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu	
-20	-15
GTG CTC AGC TGC AAG TCA AGC TGC TCT GTG GGC TAC TTT GGC AAG CTT	99
Val Leu Ser Cys Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Tyr Phe Gly Lys Leu	
-10	-5
GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC	147
Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe	
10	15
ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC	195
Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp	
25	30
TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT ATA AGT ATG TAT AAA	243
Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys	
40	45
GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC TCT GTG AAG TGT GAG	291
Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu	
55	60
AAA ATT TCA ACT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT ATT TCC TTT AAG GAA	339
Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu	
70	75
ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC	387
Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe	
90	95
TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT	435
Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser	
105	110
TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT	483
Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu	
120	125
TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA	531
Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile	
135	140
ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA GAC TAGGCGGCCG CGTGT	570
Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp	
150	155

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

(2 8) S E Q I D N O : 2 7 的 資 料

(i) 順 序 特 徵 :

(A) 長 度 : 1 0 個 胺 基 酸

(B) 型 態 : 胺 基 酸

(D) 拓 撲 學 : 線 型

(ii) 分 子 型 態 : 肽

(v) 片 段 型 態 : N - 端 片 段

(xi) 順 序 說 明 : S E Q I D N O : 2 7 :

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

(xi) 順序說明 : S E Q I D N O : 2 8 :

訂

五、發明說明(87)

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	ATG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT	240
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	
65				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	CTC	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	
			130			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				
145					150					155						

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

(30) SEQ ID NO: 29 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：570 個鹼基對

(B) 型態：核酸

(C) 股型：雙股

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：cDNA

(ix) 特徵：

(A) 名字／鍵：5' UTR

(B) 座落位置：1...15

五、發明說明(88)

(C) 鑑定方法 : S

(A) 名字 / 鍵 : s i g 肽

(B) 座落位置 : 1 6 . . 8 4

(C) 鑑定方法 : S

(A) 名字 / 鍵 : m a t 肽

(B) 座落位置 : 8 5 . . 5 5 5

(C) 鑑定方法 : S

(A) 名字 / 鍵 : 3 ' U T R

(B) 座落位置 : 5 5 6 . . 5 7 0

(C) 鑑定方法 : S

(xi) 順序說明 : S E Q I D N O : 2 9 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(89)

ACACCTCGAG CCACC															ATG	GCC	TTG	ACC	TTT	GCT	TTA	CTG	GTG	GCC	CTC	CTG	51
															Met	Ala	Leu	Thr	Phe	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	
															-20												
																		-15									
GTG	CTC	AGC	TGC	AAG	TCA	AGC	TGC	TCT	GTG	GGC	AAC	TTT	GGC	CGA	CTT	99											
Val	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Cys	Ser	Val	Gly	Asn	Phe	Gly	Arg	Leu												
															-10			-5			1			5			
CAC	TGT	ACA	ACC	GCA	GTA	ATA	CGG	AAT	ATA	AAT	GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	147											
His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn	Asp	Gln	Val	Leu	Phe												
															10			15			20						
GTT	GAC	AAA	AGA	CAG	CCT	GTG	TTC	GAG	GAT	ATG	ACT	GAT	ATT	GAT	CAA	195											
Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ile	Asp	Gln												
															25			30			35						
AGT	GCC	AGT	GAA	CCC	CAG	ACC	AGA	CTG	ATA	ATA	TAC	ATG	TAC	AAA	GAC	243											
Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile	Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp												
															40			45			50						
AGT	GAA	GTA	AGA	GGA	CTG	GCT	GTG	ACC	CTC	TCT	GTG	AAG	GAT	AGT	AAA	291											
Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Asp	Ser	Lys												
															55			60			65						
ATG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT	TCC	TTT	GAG	GAA	ATG	339											
Met	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	Ser	Phe	Glu	Glu	Met												
															70			75			80			85			
GAT	CCA	CCT	GAA	AAT	ATT	GAT	GAT	ATA	CAA	AGT	GAT	CTC	ATA	TTC	TTT	387											
Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	Asp	Leu	Ile	Phe	Phe												
															90			95			100						
CAG	AAA	CGT	GTT	CCA	GGA	CAC	AAC	AAG	ATG	GAG	TTT	GAA	TCT	TCA	CTG	435											
Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu	Phe	Glu	Ser	Ser	Leu												
															105			110			115						
TAT	GAA	GGA	CAC	TTT	CTT	GCT	TGC	CAA	AAG	GAA	GAT	GAT	GCT	TTC	AAA	483											
Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu	Asp	Asp	Ala	Phe	Lys												
															120			125			130						
CTC	ATT	CTG	AAA	AAA	AAG	GAT	GAA	AAT	GGG	GAT	AAA	TCT	GTA	ATG	TTC	531											
Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp	Lys	Ser	Val	Met	Phe												
															135			140			145						
ACT	CTC	ACT	AAC	TTA	CAT	CAA	AGT	TAGGCGGCCG			CGTGT					570											
Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser																				
															150			155									

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

(3 1) S E Q I D N O : 3 0 的資料

(i) 順序特徵：

(A) 長度：6 個胺基酸

(B) 型態：胺基酸

(D) 拓撲學：線型

(ii) 分子型態：肽

(v) 片段型態：N - 端片段

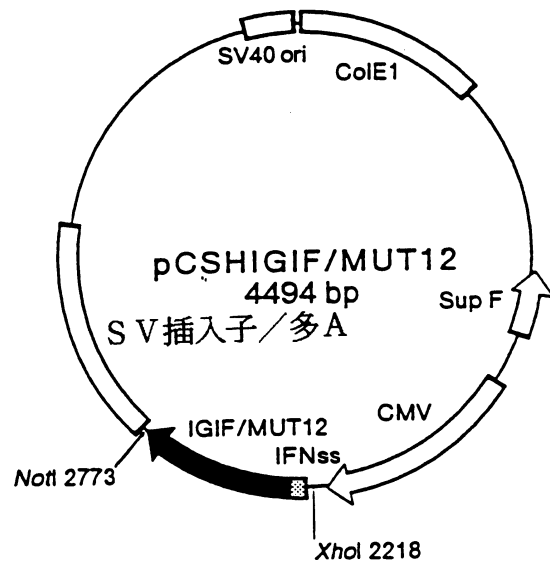
(xi) 順序說明：S E Q I D N O : 3 0 :

五、發明說明(90)

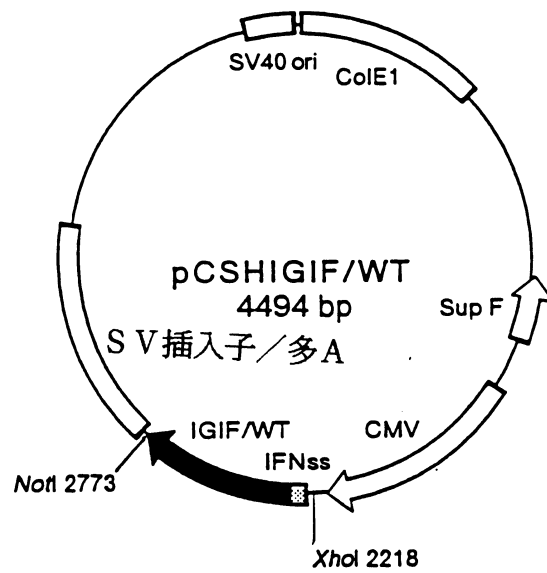
Asn Phe Gly Arg Leu His
1 5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

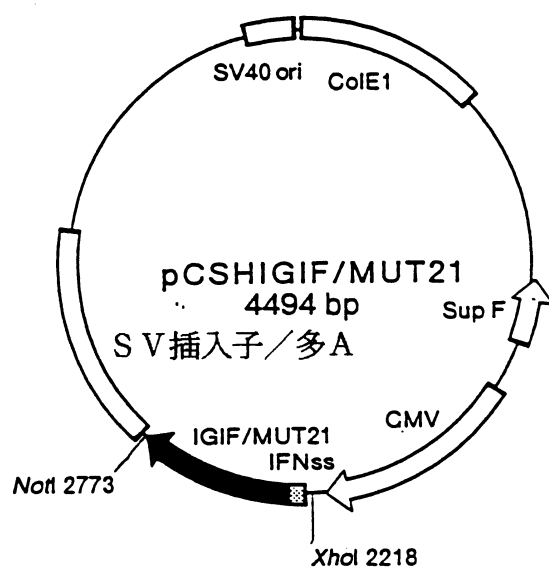
訂



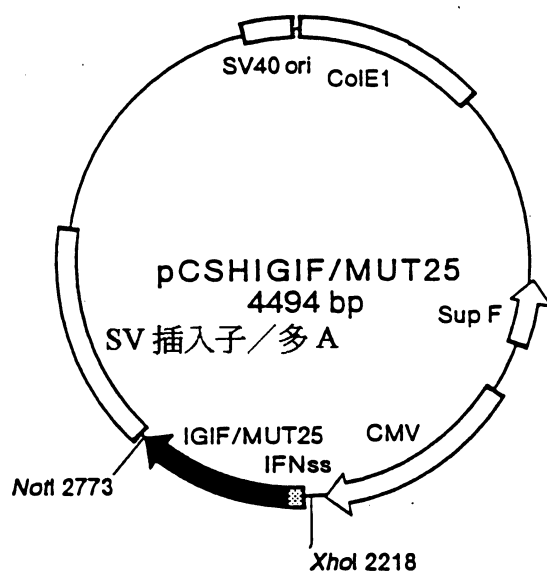
第 1 圖



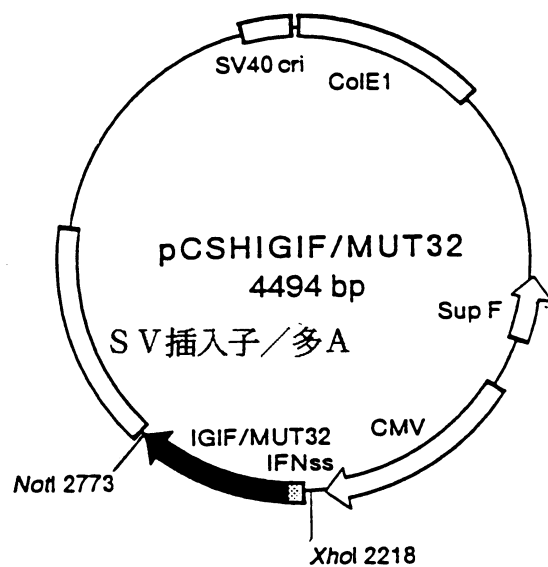
第 2 圖



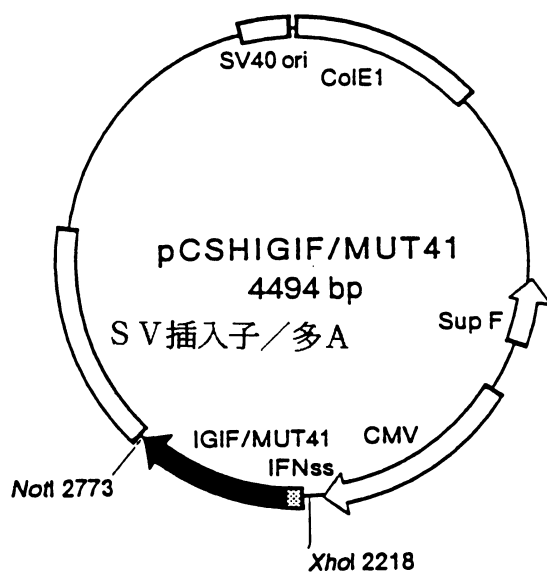
第 4 圖



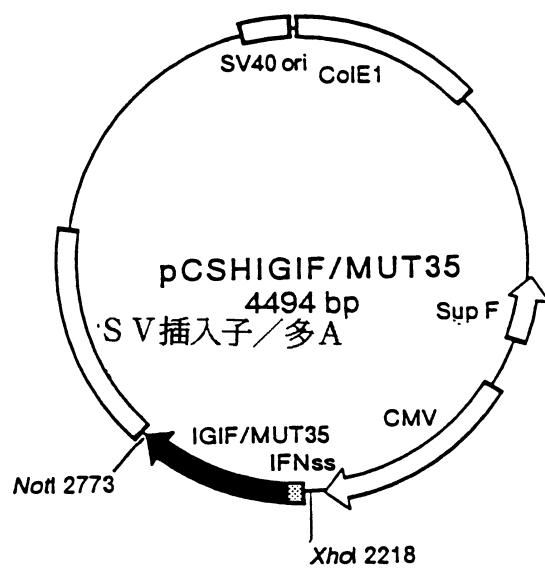
第 5 圖



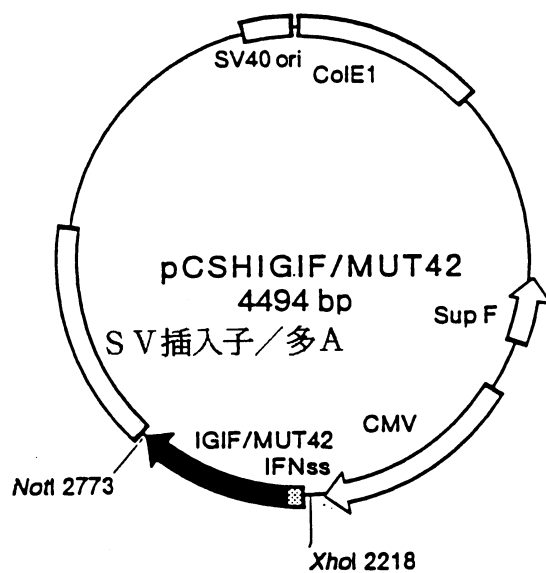
第 6 圖



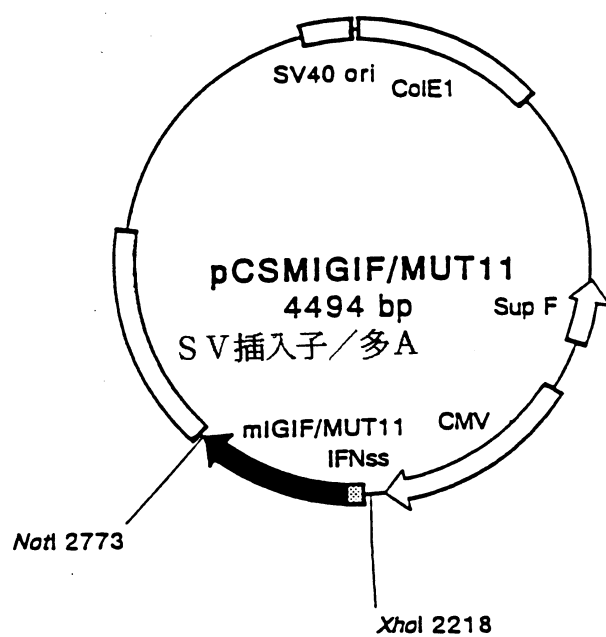
第 7 圖



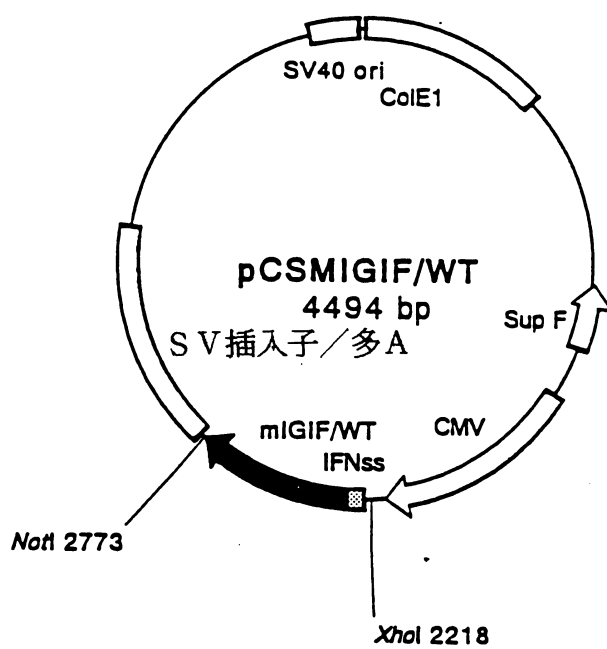
第 8 圖



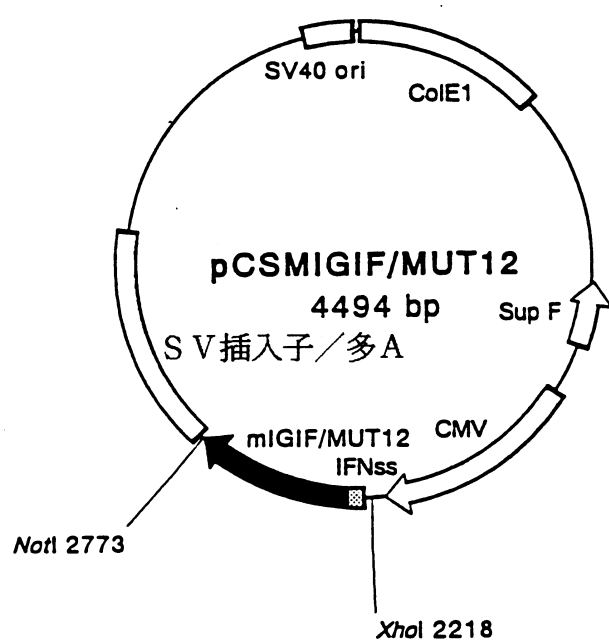
第 9 圖



第10圖



第11圖



第13圖

申請日期	86 年 11 月 27 日
案 號	86117857
類 別	C07K14/52, C12N15/19, A61K39/19

(以上各欄由本局填註)

修正
92.9.10 補充

A4
C4
公告本

發明專利說明書 565569

一、發明 名稱	中 文	誘導干擾素- γ 之產製的新穎多肽類
	英 文	Novel polypeptides for inducing the production of interferon-gamma
二、發明 創作人	姓 名	(1) 山本康三 (2) 岡本岩夫 (3) 栗本雅司
	國 籍	(1) 日本國岡山縣岡山市平井三丁目八八〇番三號
	住、居所	(2) 日本國岡山縣岡山市桑野五二五番地之三 (3) 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)	(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

五、發明說明 (4)

附屬圖形的簡單說明

第 1 圖為一種重組 DNA "pCSHIGIF/MUT12" 的限制圖型，此 DNA 負責本發明之多肽的編碼。

第 2 圖為一種重組 DNA "pCSHIGIF/WT" 的限制圖型，此 DNA 負責源自人類之野生型多肽的編碼。

第 3 圖顯示本發明之多肽及源自人類的野生型多肽在培養過程中其活性的時間過程，其中符號 "○ - ○" 顯示野生型多肽之活性在時間過程中的變化，而符號 "▼ - ▼"，"▲ - ▲"，"▽ - ▽"，"◇ - ◇"，"● - ●"，"■ - ■"，"△ - △" 顯示分別具有 SEQ ID NO：6 至 12 之胺基酸序列之本發明之多肽的活性在時間過程中的變化。

第 4 圖為一種重組 DNA "pCSHIGIF/MUT12" 的限制圖型，此 DNA 負責本發明另一種多肽的編碼。

第 5 圖為一種重組 DNA "pCSHIGIF/MUT25" 的限制圖型，此 DNA 負責本發明另一種多肽的編碼。

第 6 圖為一種重組 DNA "pCSHIGIF/MUT32" 的限制圖型，此 DNA 負責本發明還有的另一種多肽的編碼。

第 7 圖為一種重組 DNA "pCSHIGIF/MUT" 的限制圖型，此 DNA 負責本發明還有的另一種多肽的編碼。

第 8 圖為一種重組之 DNA "pCSHIGIF/MUT35" 的限制圖型，此 DNA 負責本發明還有之另一種多肽的編碼。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (5)

第 9 圖為一種重組之 DNA "pCSHIGIF/MUT42" 的限制圖型，此 DNA 負責本發明還有之另一種多肽的編碼。

第 10 圖為一種重組之 DNA "pCSMIGIF/MUT11" 的限制圖型，此 DNA 負責本發明還有之另一種多肽的編碼。

第 11 圖為一種重組之 DNA "pCSMIGIF/MT" 的限制圖型，此 DNA 負責源自老鼠的野生型多肽的編碼。

第 12 圖顯示根據本發明之多肽及源自老鼠之野生型多肽在培養過程中，其活性的時間過程，其中符號 "■-■" 顯示一種野生肽之活性在時間過程中的變化，而符號 "□-□" 和 "◆-◆" 顯示分別具有 SEQ ID NO: 13 和 14 之胺基酸序列之本發明之多肽的活性在時間過程中的變化。

第 13 圖為一種重組的 DNA "pCSMIGIF/MUT12" 的限制圖型，此 DNA 負責本發明還有之另一種多肽的編碼。

(符號的解釋)

符號 "CMV" 表示一種巨細胞病毒的促催化劑。

符號 "IFNs" 表示一種核苷酸順序，此順序負責人類干擾素- γ 之次型 $\alpha 2b$ 信號肽的編碼。

符號 "IGIF/WT" 和 "mIGIF/WT" 表示 cDNAs，此 cDNAs 負責任何一種野生型多肽的編碼。

符號 "IGIF/MUT12"，

五、發明說明 (20)

實施例 A - 1

多肽的製造

實施例 A - 1 (a)

重組 DNA 的建構

修正
補充

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

以傳統方法自 BAL - 1 細胞，

RCB 0256 (此為一種衍生自人類，已建立好之急性淋巴性白血病的細胞株) 中收集基因組的 DNA，而以化學方法根據核苷酸順序來合成寡核苷酸，此種寡核苷酸是以核苷酸順序為 5' - A C A C C T C G A G C C A C C

A T G G C C T T G A C C T T T G C T T T A A C -

3' 者做為感覺引物 (感覺引物 1)，以核苷酸順序為

5' - T T G C C A A A G T A G C C C A C A G A G C

A G C T T G - 3' 者做為抗感覺引動 (抗感覺引物 1)

，再利用此寡核苷酸製造顯示於 SEQ ID NO :

24 中之干擾素 - α 的次型 $\alpha 2b$ 的訊號肽 (此描述於

K. 漢可等人所著，分子生物學期刊，第 185 冊，

227 - 260 頁 (1985) 中)。在一個 0.5 ml

的反應管中，將下列幾項加以混合：1 μ g 之基因組的

DNA，10 μ l 之 10 $\times$ PCR 緩衝液，1 μ l 之 25

mM dNTP 混合物，及適量之感覺引物 1 和抗感覺引

物 1。將無菌蒸餾水加入此混合物中，使體積成為 99

μ l，再進一步將 1 μ l 之 2.5 單位 / μ l Pfu

DNA 聚合酶加入其中。將此混合物進行 30 個循環的培

修正
92.9.10 補充

A5
B5

四、中文發明摘要(發明之名稱：誘導干擾素- γ 之產製的新穎多肽類)

所揭示的內容是關於新造之穩定多肽類，此種多肽類可誘發免疫活性細胞製造干擾素- γ 。本多肽類含有特殊的胺基酸順序，此特定順序通常是衍生自野生型多肽類，利用不同的胺基酸來置換原順序中之半胱胺酸而產生製造干擾素- γ 的能力。本多肽類具有誘發免疫活性細胞製造 I F N - γ 的穩定性和活性，且此二種性質均明顯高於野生型多肽類所具有的性質。除了上述活性外，本多肽類還可展現出誘發殺傷細胞形成的活性和加強它們的細胞毒性的活性。本多肽類可以根據本發明的製備方法，很容易地利用重組 D N A 的技術製得。因此，本多肽類對於用來治療和／或預防感受性疾病（如：病毒感染，感染，惡性腫瘤，及免疫病理）的作用劑很有用。

(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：Novel polypeptides for inducing the production of interferon-gamma)

Disclosed are created stable polypeptides which are capable of inducing the production of interferon-gamma by immunocompetent cells. The present polypeptides contain specific amino acid sequences usually derived from the wild-type polypeptides, being capable of the production of interferon-gamma, by replacing the cysteine(s) with different amino acid(s). The present polypeptides possess a stability and an activity of inducing the production of IFN- γ by immunocompetent cells, both of which are significantly higher than those of the wild-type polypeptides. In addition to the activity, the present polypeptides can exhibit remarkable activities of inducing the formation of killer cells and enhancing thier cytotoxicities. The present polypeptides are easily obtainable by the process according to the present invention using recombinant DNA techniques. Thus the present polypeptides are useful for agents to treat and/or prevent susceptible diseases such as viral diseases, infections, malignant tumors, and immunopathies.

訂

線

六、申請專利範圍

附件三(A)： 第86117857號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國92年9月10日修正

1. 一種經分離之多肽，其係能夠誘導免疫活性細胞產製干擾素- γ ，該多肽具有藉由不同之胺基酸以置換1或多個殘基而改變的SEQ ID NO：4或5之胺基酸序列，該1或多個殘基係選自SEQ ID NO：4自其N端第38，68，76及127位置之半胱胺酸或SEQ ID NO：5自其N端第7，75及125位置之半胱胺酸，該不同的胺基酸係選自絲胺酸、蘇胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、組織胺酸、酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、或蛋胺酸。

SEQ ID NO: 4:

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	Thr	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				

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

SEQ ID NO: 5:

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

2. 如申請專利範圍第1項之多肽，其含有一胺基酸序列，該胺基酸序列係選自源自於SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的SEQ ID NO: 6至12之胺基酸序列，或源自於SEQ ID NO: 5之胺基酸序列的SEQ ID NO: 13和14之胺基酸序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

SEQ ID NO: 6:

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	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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					

SEQ ID NO: 7:

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	Ser	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	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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					

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

SEQ ID NO: 8:

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	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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	Ser	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					

SEQ ID NO: 9:

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	Ser	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	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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	Ser	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					

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

SEQ ID NO: 10:

```

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 Ser 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 Ser Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Ser 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 Ser 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

```

SEQ ID NO: 11:

```

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 Ser 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 Ser Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Ala 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

```

SEQ ID NO: 12:

```

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
1      5      10      15

```

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
 20 25 30
 Met Thr Asp Ser Asp Ser 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 Ser Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Ala 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 Ser 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

SEQ ID NO: 13:

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

SEQ ID NO: 14:

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
 20 25 30
 Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
 35 40 45
 Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
 65 70 75 80
 Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
 85 90 95
 Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

		100						105					110				
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Glu		
		115					120					125					
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp		
	130					135					140						
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser.					
145					150					155							

3. 如申請專利範圍第1項之多肽，其另外具有一或多種選自下述之性質：加強殺手細胞之細胞毒性及誘導殺手細胞之生成。

4. 一種編碼申請專利範圍第1項之多肽的DNA，其係由選自SEQ ID NO: 15至23之核苷酸序列或其互補核苷酸序列之核苷酸序列所構成。

SEQ ID NO: 15:

TAC	TTT	GCC	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	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	TGT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	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	
		100					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				

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

145	150	155
SEQ ID NO: 16:		
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 TCT AGA GAT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT		144
Met Thr Asp Ser Asp Ser 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 TCT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT		240
Ser Val Lys Ser Glu Lys Ile Ser Thr 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		
100 105 110		
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		
SEQ ID NO: 17:		
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 TCT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT		240
Ser Val Lys Ser Glu Lys Ile Ser Thr 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		
100 105 110		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TCT GAA	384
Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Ser 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	

SEQ ID NO: 18:

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 TCT AGA GAT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT	144
Met Thr Asp Ser Asp Ser 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 TCT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT	240
Ser Val Lys Ser Glu Lys Ile Ser Thr 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	
100 105 110	
ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TCT GAA	384
Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Ser 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	

SEQ ID NO: 19:

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 TCT AGA GAT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT	144
Met Thr Asp Ser Asp Ser 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 TCT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC TCT GAG AAC AAA ATT	240

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

Ser Val Lys Ser Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Ser 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	
100 105 110	
ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TCT GAA	384
Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Ser 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	

SEQ ID NO: 20:

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 TCT AGA GAT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT	144
Met Thr Asp Ser Asp Ser 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 TCT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC GCT GAG AAC AAA ATT	240
Ser Val Lys Ser Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Ala 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	
100 105 110	
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	

SEQ ID NO: 21:

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	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

ATG	ACT	GAT	TCT	GAC	TCT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	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	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	GCT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	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	
			100					105				110				
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TCT	GAA	384
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ser	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						
SEQ ID NO: 22:																
AAC	TTT	GGC	CGA	CTT	CAC	GCT	ACA	ACC	GCA	GTA	ATA	CGG	AAT	ATA	AAT	48
Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Ala	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn	
				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	ATG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT	240
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	
		65				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	CTC	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	
		130				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				

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

145

150

155

SEQ ID NO: 23:

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	ATG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT	240
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	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	AGC	CAA	AAG	GAA	384
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Glu	
			115				120					125				
GAT	GAT	GCT	TTC	AAA	CTC	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	
			130			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				
145					150					155						

5. 如申請專利範圍第4項之DNA，其進一步於5'端連接SEQ ID NO: 24之核苷酸序列。

SEQ ID NO: 24:

ATGGCCTTGA CCTTTGCTTT ACTGGTGGCC CTCCTGGTGC TCAGCTGCAA GTCAAGCTGC 60
TCTGTGGGC 69

6. 一種用於治療及／或預防可被申請專利範圍第1項之多肽加以治療及／或預防的哺乳動物（包括人類）之惡性腫瘤、病毒性疾病、感染及免疫病症之藥學組成物，其包含該多肽以充作活性成份。

7. 如申請專利範圍第6項之藥學組成物，其另外含有間白素2、血清白蛋白、明膠、糖、或緩衝液。

8. 如申請專利範圍第6或7項之藥學組成物，其係調製成適用於哺乳動物（包括人類）之惡性腫瘤、病毒性

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

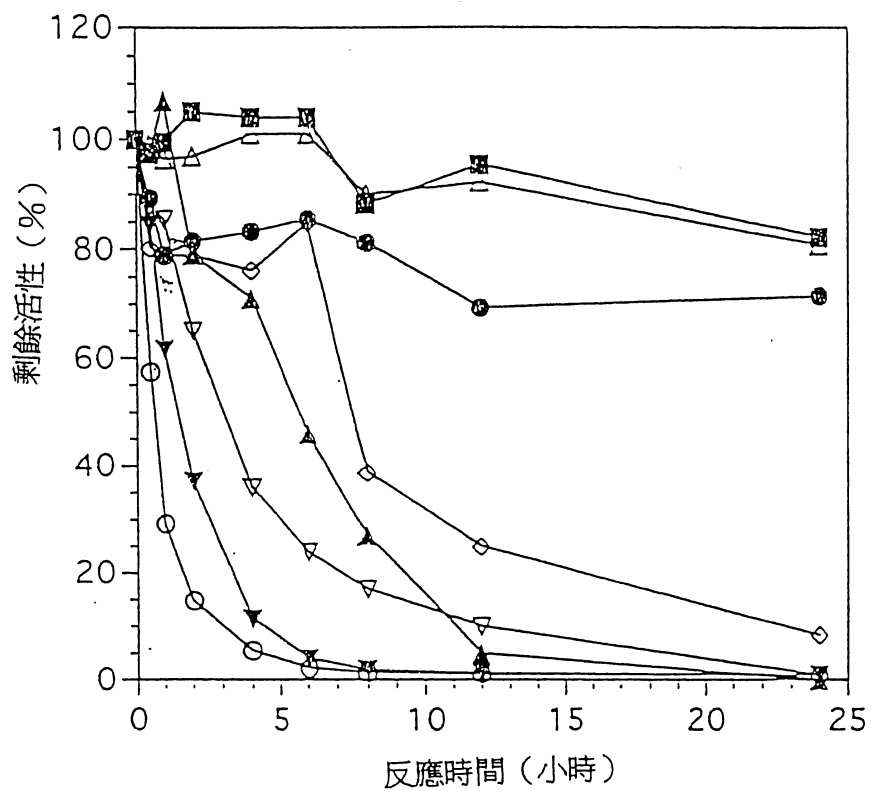
訂

六、申請專利範圍

疾病、感染及免疫病症的藥劑。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

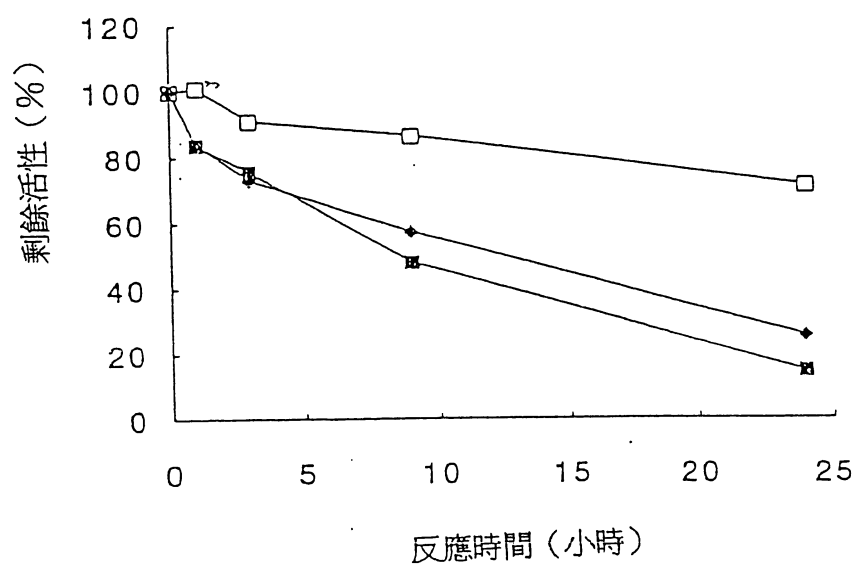
訂



第 3 圖

565569

92.9.10 修正
年月日 補充



第12圖