發明專利說明書

200526689

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：93134705

※ 申請日期：93.11.12　　※IPC 分類：C07K 7/00, C12N 15/11, C12N 15/63

一、發明名稱：（中文/英文）

源自羊膜的胜肽及其用途

AMNIOTIC-DERIVED PEPTIDE AND USES THEREOF

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

拉傑生物科技股份有限公司/ LAJOR BIOTECH, INC.

代表人：（中文/英文）

海勒　喬登 D./HALLER, JORDAN D.

住居所或營業所地址：（中文/英文）

美國賓州麥墨雷·林特爾道 114 號

114 Lintel Drive, McMurray, PA 15317, U.S.A.

國　籍：（中文/英文）

美 國/U.S.A.

三、發明人：（共 7 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 巴克塔許維里　維拉堤米/BAKHUTASHVILI, VLADIMIR
2. 喬登　海勒　D./HALLER, JORDAN D.
3. 巴克塔許維里　伊維尼/BAKHUTASHVILI, IVANE
4. 巴克塔許維里　亞利斯安達/BAKHUTASHVILI, ALEXANDER
5. 尼可拉堤　佛瑞迪南多/NICOLETTI, FERDINANDO
6. 希瑞　米契爾/THIRY, MICHEL
7. 龐西　亞浪/PONCIN, ALAIN

國　籍：（中文/英文）

1.3.4.蘇聯喬治亞/Republic of Georgia

2.美 國/U.S.A.

5.義大利/Italy

6.7.比利時/Belgium

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2003,11,13；60/520,458
2. 美國；2003,11,13；60/520,430
3. 美國；2004,09,20；60/611,619

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本申請聲明有以下的權益：台灣專利申請號碼93134705，於2004年11月12日提申，美國專利申請號碼60/520458，於2003年11月13日提申，60/520430，於2003年11月13日提申，和60/611619，於2004年9月20日提申，以上的先前申請的專利內容在本申請中全部納入作為參考。

在本申請的整體內容中都附有不同的文獻作為參考資料，這些公開的文獻，都完整地併入這個的申請之內，使更完全地描述本發明所包含的技術狀態。

【先前技術】

發明背景

此處引用的參考資料並未被認為是本請求發明之先前技術。

本發明是關於一具生物活性之胜肽的合成方法和其在治療及化妝上的應用，其可用於改良皮膚的外觀，促進創傷癒合和治療及/或預防各種病況、創傷及疾病之漸進，包括但不限制於：病毒性B和C型肝炎，帶狀疱疹神經結神經炎，糖尿病周邊多發性神經病變，腎病變症候群，青年型類風濕關節炎，類風濕性關節炎，牛皮癬性關節炎，氣管性氣喘，呼吸器官的感染，乳癌，癲癇症，牛皮癬，動脈漿狀硬化症和其他形式的血管阻塞，心肌梗塞，愛滋病毒和非典型肺炎感染，由於局部缺血和外傷所產生之腦細胞失能，局部缺血－再充血之病理結果，器官移植之後的排

斥反應，包括但不限制於麻醉劑、酒精和嗎啡之化學和藥物中毒狀態，癌症，第一型糖尿病，多發性硬化症，敗血性休克，帕金森氏症，第二型糖尿病，阿茲海默症，肌萎縮性(脊髓)側索硬化，甲狀腺機能亢進，吉蘭-巴雷(Guillain- Barre) 症候群，系統性紅斑狼瘡，寄生蟲感染，特別是：萊什曼病，和其他的膠原蛋白疾病，以及發生細胞凋亡的疾病。

細胞凋亡或稱為程式化的細胞死亡，是生物體去掉不需要的細胞的主要機制。細胞凋亡失去控制，可能是過分細胞凋亡或不能進行細胞凋亡，與很多疾病都有關聯，譬如癌症、急性和慢性疾病，自身免疫、免疫和過敏症，缺血性疾病和一些神經衰退的疾病。

一個細胞凋亡的重要調節元件就是腫瘤壞死因子受體(見到Chan et al. A Role for Tumor Necrosis Factor Receptor 2(TNFR-2)and Receptor-interacting Protein(RIP)in Programmed Necrosis and Anti-Viral Responses. JBC Papers in Press，October 7，2004.)：

腫瘤壞死因子(TNF)是一個多功能的細胞因子，參與廣泛的生物反應，從發炎到細胞的死亡，TNF施展它的生物功能主要是通過結合它的兩個表面細胞受體，就是TNFR-1和TNFR-2。研究證明在某些條件下，TNFR－2可以增加TNFR－1的訊息，形成的初組合TNFR－1傳遞的訊息導致招募了含有死亡結構域(dead domain，DD)的TRADD適配器，跟著結合TRAF2或蛋白絲胺基酸/蘇胺基酸激酶-RIP對於

TNF誘發的Jnk激酶和NF－KB的活化分別是關鍵性的。此外，TRADD結合FADD和Caspase-8 或Caspase –10蛋白酶可以發動Caspase 蛋白酶之級聯反應，而最終引致藉由細胞凋亡而致的細胞死亡。

大概在1978年Vladimimir(Lado)Bulchufashuili 啟發研究以鑒定一個平價的干擾素(IFN)來源，於是他利用人類包括了羊膜和絨毛膜之胎盤組織。這些術語以前曾在材料中描述，包括了"胎盤干擾素(Placental interferon)"，"Plaferon"和"PL"。

這個有藥理活性的試劑顯示含有以下的IFN部分：α：85-90%，β：8-10%，γ：3-5%。Plaferon曾被以國際單位(IU)為標準而依據IFN的力價測定，也被格魯吉亞(Georgia)衛生部註冊為抗病毒和免疫調節藥物。

實驗證據顯示了Plaferon具有額外在干擾素中未知的性質。一個新的藥物和治療的藥物在當時從羊膜被製造。這藥品的商業化名稱為Plaferon-LB(PLB)。它不含干擾素但它仍具有一些已在Plaferon 所觀察到的性質，譬如抗過低氧、抗過敏、抗毒物、免疫調節和細胞凋亡調節性。Plaferon-LB亦不含HIV、B型和C型肝炎病毒和普里昂(prion)蛋白。

Plaferon的生產在1992年停止，生產的方法也從沒有公開，直至美國專利申請案第09/928178號和國際PCT申請號PCT/US01/41666。此外，Plaferon內很多的有效成分，亦從沒有公開過。

Plaferon-LB在1992年被格魯吉亞政府批准為藥物，具有抗過敏、抗病毒和免疫調節的作用(見格魯吉亞共和國(Republic of Georgia)衛生部註冊號A0001)，製造的方法也公開在美國專利申請號09/928178，提申的日期為2001年8月9號，和PCT申請號PCT/US01/41666，提申日期為2001年8月9號，附以國際公開號WO 02/12444。它的內容現全部納入本案作為所有目的的參考，在提申美國專利申請號09/928178和國際PCT申請號PCT/US01/41666的時候，不僅PLB的活性成分，而且分離組成PLB的生物活性部分的方法，即本專利申請的主題，都沒有被揭露。

在此被揭露的實驗提出許多的Plaferon和Plaferon-LB的生物活性都被一個小分子量之胜肽所賦有。

【發明內容】

發明概要

依據本發明這些和其他的目的，呈現了本發明之一簡短的摘要。在以下的摘要中有些被簡處化和省略處，其意圖是突出和介紹本發明的一些面貌，但不是限制它的範圍。在以後章節中將有較佳具體化之實施例的詳細描述，是足以允許那些在本技術界中具有通常知識者來製造和使用本發明的概念。

本發明描繪一個活性胜肽，原來發現在PLB而現在用以下所述的方法合成。這包括了採用重組DNA技術，化學合成，rDNA技術，化學工程和聚核苷酸編碼法。這活性胜肽原本在PLB發現，亦可從動物的羊膜中取得。這生物活

性胜肽在本專利中稱為"Lajor活性胜肽"或"LAP"。含有氨基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

另一方面，本發明提供方法使用含有LAP的化妝、藥物和治療組成去改良皮膚的外表和加促創傷的痊癒。

另一方面，本發明提供一個方法予病毒性肝炎病者以使用含有LAP的藥物和治療組成以使肝功能的生化參數和免疫指標正常化。

另一方面，本發明提供一個使用含有LAP的藥物和治療組成物的方法給一個乳癌患者以使其腫瘤血清標記CA15.3正常化、和增加了的腫瘤滲透的CD5'T-細胞的和CD11巨噬細胞。

在較進一步的方面中，本發明提供用以治療和預防多種生理情況、創傷和疾病進展的方法，這包括但不限於帶狀疱疹神經節神經炎，糖尿病的週邊性多發性神經炎，腎衰竭併發症，先天性腎病併發症，青年型類風濕性關節炎，類風濕性關節炎，牛皮癬性關節炎，支氣管性氣喘、呼吸道感染、乳癌、癲癇症、牛皮癬、動脈硬化、和其他形式的血管障礙、心肌梗塞、愛滋病毒和非典型肺炎感染、腦細胞功能的異常，由於局部缺血或多個器官的創傷而特別是心臟和腎臟，局部缺血後再充血的後患病，器官移植後的排斥反應，化學和麻醉物中毒包括但不限於麻醉、酒精和嗎啡，癌症，第一型糖尿病，多發性硬化症，敗血性休克(格蘭氏陰性敗血症)，帕金森氏併發症，第二型糖尿病，阿茲海默症，肌萎縮性(脊髓)側索硬化，甲狀腺機能亢進

症，吉蘭-巴雷氏併發症，寄生蟲感染特別是萊什曼寄生蟲病，系統性紅斑狼瘡和其他膠原蛋白疾病，和潰瘍性結腸炎。

在仍有的另一個方面中，本發明提供一個治療發生細胞凋亡之疾病的方法。

圖式簡單說明

為了闡明本發明，這裏選擇了用圖式來顯示。然而應該被瞭解的是這個發明不被限制於該等明確的安排和在圖式中描述的手段。

第1圖顯示Sephadex G25色層分析法純化Plaferon-LB的圖譜。

第1圖描繪了使用 Sephadex G25 分離Plaferon 化合物之後獲得的色層分析圖譜。含高分子量化合物(>5000Ds)部份和含低分子量化合物(<5000Ds)部份在集中後冷凍乾燥。

第2圖顯示Plaferon-LB的低和高分子量化合物在Superdex 30 HR 10/30上的SE-HPLC分析。

第2(A)和2(B)圖顯示含高分子量化合物之集中物中只含高分子量物質(在排斥容積中，保留時間=14.425分鐘)，而含低分子量化合物之集中物中皆含有一個高分子量物質(保留時間＝14.408分鐘)和一較小的胜肽(保留時間超過38分鐘)。

第3圖顯示RP-HPLC分析Plaferon-LB的低分子量化合物。

RP-HPLC 在Plaferon-LB的低分子量化合物中分析檢出數個胜肽。

第4圖顯示RP色層分析法分析Plaferon-LB低分子量化合物。

逆相色層分析法所獲得的圖譜確認了RP-HPLC所獲得的分析結果且共收集了八(8)個峰。不包含峰的部分被收集及集中("RP Non pic"分離部分)。

第5圖顯示第4分離部份之胜肽的質譜分析。

第4分離部份的胜肽使用質譜和NH2胺基酸序列法以決定胺基酸的序列。

第6圖顯示PLB預防對DA大鼠的PR-EAE的效果。

表6是在PLB處理的大鼠的EAE的累積發生率的一個比較。雖然在PLB處理的大鼠之中的EAE的累積發生率和控制組大鼠沒有明顯不同，但是相對後者之動物，那些以Plaferon-LB治療疾病的有較溫和的病程而承受較低的EAE累積得分和後來比較短的復發期減低了嚴重性。

第7圖顯示預防性的Plaferon-LB避免DA大鼠的OIA誘發的關節炎。

OIA-關節炎病程順利地被PLB預防法影響了。PLB處理的大鼠所展現明顯地溫和的病程則反映在顯著的較記錄中控制組大鼠為低的關節炎得分($p<0.0001$)。

第8圖顯示用PLB第4分離部份處理的油-誘發關節炎實驗的DA大鼠的4張相片。

第8A-8D圖為油誘發關節炎中的控制組大鼠，而第

8E-H圖顯示以第4分離部份處理的大鼠。控制組鼠有關節炎的發生率是100%而第4分離部份處理的大鼠則是50%。此外，那二隻已經發展為關節炎的第4分離部份處理之動物有非常溫和的疾病紀錄。

第9圖顯示二批不同Plaferon的RP-HPLC 色層分析法圖譜。

藍色 ："第1批" Plaferon-LB

紅色 ："第2批" Plaferon-LB

LAP(Lajor活性胜肽)以黑色的箭號指出。

第10圖顯示RP-HPLC Plaferon-LB 的色層分析法圖譜(最後的和製造中二個階段的產品)。

藍色 ：Plaferon-LB(最後的產品)；

紅色 ：Plaferon-LB(製造的第一階段)；

綠色 ：Plaferon-LB(製造的第二階段)；

LAP(Lajor活性胜肽)以黑色的箭號指出。

第11圖顯示Plaferon-LB的大小排斥色層分析法圖譜。

第12圖顯示Plaferon-LB(在SE色層分析法後的低和高MW部分)的RP- HPLC色層分析法圖譜。

藍色 ：Plaferon-LB(最後的產品)；

紅色 ：在SE色層分析法後的低MW部分；

綠色 ：在SE色層分析法後的高MW部分；

LAP(Lajor 活性胜肽)以黑色的箭號指出。

第13A-13B圖顯示Plaferon-LB的色層分析法圖譜。

雙箭號是指示從第一個大量提純中獲得的第4分離部

份中的LAP。

第14圖顯示LAP對LPS誘發的死亡的時間和劑量效果。

第15A-C圖表示LAP降低LPS誘發的迴環TNF-α水平的增加。

第16圖顯示LAP預防法減少Con A(伴刀豆球蛋白)-誘發之ALAT增加。

第17A圖顯示LAP在NOD小鼠延長治療(14-25個星期)對身體重量增加上缺乏效果。

第17B圖顯示LAP早期的預防法在治療NOD小鼠胰腺炎進展上的效果。

第18圖顯示使用PLB治療萊什曼原蟲病的實驗相片。

第18A-C圖顯示表現萊什曼原蟲病臨床症狀的狗的照片。

第18D-F圖顯示用PLB治療的狗症狀上明顯地減少的照片。

第19(A)-(C)圖顯示來自所有3組鼠科胎兒的腦切片(5-6μM)用TUNEL方法染色。黑點表現凋亡，(A)控制組(沒有治療)，(B)只有CP，(C)CP+Plaferon-LB，第19(D)圖顯示來自B組動物(只有CP)的胎兒呈現了典型的殘缺，例如缺趾畸形併發症(四肢的反常)，免唇，糾結尾和低體重。

第19(E)圖顯示用CP和Plaferon-LB治療後C組動物的胎兒沒有殘缺和有正常的重量和大小。

本發明將會以選擇的具體實施例來描述，然而，可理解的，這裏沒有意圖以被描述的具體實施例去限制本發

明。相反地，意圖是按附屬之聲明所定義之本發明的精神和範圍去包括所有可能的選擇，修飾和相等物。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

本發明提供一個純化的胜肽，包含胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH和它的功能同等物，在一具體化之情況，絲胺酸被修飾而改變它的活性情況、位置、代謝和與其他蛋白的相互作用，在另外一個具體化的情況中，絲胺酸是經磷酸化修飾，胜肽上有磷酸化的絲胺酸，其胺基酸序列是NH2-NVSpAVEIA-COOH。

如在此處所使用者，蛋白的修飾包括但並不限於改變物理和化學性質，折疊，三維結構的分佈，穩定性、活性和功能(修飾可能涉及改變蛋白的性質，如打斷蛋白或加上修飾基團到一或多個氨基酸)。此外，修飾本身可以增加功能基團，蛋白修飾的生物效果的例子包括磷酸化以作為資訊傳遞，泛蛋白化用以蛋白質溶解，附上脂質酸以錨在及附在細胞膜上，糖基化改變了蛋白的半衰期，定靶效應，細胞-細胞間和細胞-基質間的相互作用(103)。其他常見的蛋白修飾包括丙基化、甲基化、脂質酸化，葡萄糖磷脂酸化基甘醇(GPI)錨或細胞膜束縛的酶和受體，脯胺酸化、硫酸化、雙硫橋的形成、去醯胺化，焦谷氨酸化和泛素化。

已知糖基化對蛋白有的明顯影響是在折疊，三維結構分佈，穩定性和活性，醣以天冬醯胺酸聯結(N-聯結)或絲胺酸、酥胺酸(O－聯結)的寡醣是的細胞膜表面和分泌蛋白的

主要結構成份(103)，主在絲胺酸、酥胺酸、酪胺酸的殘基上的磷酸化是最重要的和深入研究的轉譯後修飾，磷酸基化扮演許多細胞的重要角色包括了細胞週期、生長、凋亡和訊息傳遞路徑(103)。

修飾後的蛋白功能可以用技術中被廣為人知的方法去決定，譬如：使用序列基礎的方法去鑒定和合併該等可以用來分配蛋白的未知功能或功能類別相關的特徵(102)。

如這裏所用的，功能相等物係可執行如上述胜肽之相等的功能的化合物。明顯地，蛋白有相同的胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH者，基因性變異者，種系同源者和病毒同源者，和功能衍生物者，包括仍保存生物特性的上述胺基酸序列的碎段，和它的實質同源的蛋白仍保存所有本發明的多肽的特性者。

胜肽是由二或多個胺基酸組成的分子，胜肽較胺基酸鏈稍長的蛋白為小，傳統上，分子小到可以從基本胺基酸合成的叫胜肽而非蛋白，分界線約在25－50個胺基酸。

胺基酸是蛋白或多肽的基本構造單元，他們都有一個鹼性胺基團(NH2)，一個酸性羥基團(COOH)和一個支鏈(R-，有很多不同的種類)連在α位置的碳原子上。這20個胺基酸的生物和藥理性質都被認定。這20個生物活躍的α胺基酸和它們3個字母或1個字母的縮寫是：

丙胺酸-ala–A；　精胺酸-arg–R；　天冬醯胺酸-asn–N；

天冬胺酸-asp–D；　半胱胺酸-cys–C；　麩醯胺酸-gln–Q；

麩胺酸-glu–E； 甘胺酸-gly–G； 組胺酸-his–H；

異白胺酸-ile–I； 白胺酸-leu–L； 離胺酸-lys–K；

甲硫胺酸-met–M； 苯丙胺酸-phe–F； 脯胺酸-pro–P；

絲胺酸-ser–S； 蘇胺酸-thr–T； 色胺酸-trp–W；

酪胺酸-tyr–Y；和 纈胺酸-val–V.

根據支鏈的特性，這20個胺基酸可分類為次群組：

・碳鏈的–丙胺酸，甘胺酸，異白胺酸，白胺酸，脯胺酸，纈胺酸

・芬香的–苯丙胺酸，色胺酸，酪胺酸

・酸性的–天冬胺酸，麩胺酸

・鹼性的–精胺酸，組胺酸，離胺酸

・氫氧基的–絲胺酸，蘇胺酸

・含硫的-半胱胺酸，甲硫胺酸

・醯胺的(含胺基)–天冬醯胺酸，麩醯胺酸

本發明提供一個經分離出含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH的多肽，在具體例中，胺酸被修飾而改變活性、位置、更新和其他蛋白的相互作用，在另一具體例中，絲胺酸被磷酸化修飾。

本申請案的目的也包括了發明的修飾以包括了這些胺基酸的修飾和取代這些胺基酸。

多肽是一個由一條以醯胺鍵連結之胺基酸鏈(有10－100個)所組成的化合物。

本發明提供一個經分離出的核苷酸，其編碼一包含著胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或NH2-NVSpAVEIA-COOH的多肽，在一獨立具體實施例中，本發明提供一個經分離出的核苷酸分子，其編碼了一含有序列NH2-NVSAVEIA-COOH或NH2-NVSpAVEIA-COOH的胜肽。

本發明提供一個經分離出且含有胺基酸序列NVS或NVSp和它的功能相等物的胜肽或多肽，在一具體實施例，S後的胺基酸不會抑制生物活性。在另一具體實施例中，胜肽或多肽含有胺基酸序列X-N(V或L)-封閉基團-Y，其中胺基酸在N前的不會抑制生物活性，而在V或L後的胺基酸可為非天然的胺基酸或其他封閉基團，譬如磷酸鹽或聚硫酸乙稀，在進一步的具體實施例中，絲胺酸是磷酸化的。

本發明提供一個經分離出的核苷酸分子，其編碼了一個含有胺基酸序列NVSp的多肽。在一分開的具體實施例，本發明提供一個分離的核苷酸，其編碼了一胜肽包含著胺基酸序列NVSp。

如在此曾使用的，核苷酸是定義為可編碼一經分離出之胜肽或它的功能相等物或一個含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之多肽的RNA或DNA，或是互補於編碼這胜肽或多肽的核苷酸。

本發明提供一個編碼出胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之核苷酸分子的載體(Vector)。

如在這曾使用的，一個載體是定義為任何可以作為運

送器或輸送器的試劑，如一個可以傳達一個遺傳工程過的DNA片段到一個寄主細胞之病毒或質體。

本發明提供一個含有核苷酸分子或有編碼出胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之核苷酸分子之載體的細胞。

本發明提供一個表達系統以表達以上所述的多肽或胜肽或它的相等功能物。換言之，本發明亦提供一個包括一個經分離出的核苷酸分子之表達系統或具有一個編碼了胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之經分離出的核苷酸分子的載體。

本發明提供用以製造一個經分離出之含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物的胜肽或用以製造一個經分離出之含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之多肽的方法。該經分離出之胜肽或它的相等功能物或該經分離出之多肽的製造是由導入一個編碼出胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之核苷酸分子至一個合適的細胞，和將該細胞安置在適當的條件以允許表達該胜肽或和它的功能相等的胜肽或多肽。

在一具體實施例中，以上的方法更包括回收上述的胜肽和它功能相等物或上述的多肽。

在一分開的具體實施例中，該核苷酸分子是操作上聯結到一個調節元件，這調節元件包括但不限於啟動子、增強子、以及基因表達所必須之模體。

在進一步之實施例中，該核苷酸分子是聯結著該載體的。

本發明提供一個基因轉殖動物或嵌合體，其包含了編碼出胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH的核苷酸分子或包含編碼出胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之核苷酸分子的載體。本發明也提供一個製造所述之基因轉殖動物或嵌合體的方法。

本發明提供了一種動物，其含有編碼出胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH的核苷酸分子或編寫出胺基酸NH2-NVSAVEIA-COOH之核苷酸載體。本發明也提供一個製造所述之動物的方法。

本發明提供一個組成物，其包括一個含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物之經分離出的胜肽或一個含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之經分離出的多肽在一個適合的載劑中。

如這裡曾使用的，適合的載劑這術語包括但並不限於任何在這技術界中眾所週知適合給予醫藥成份的任何適合的載劑。按給藥的模式，載劑的種類亦有不同。

對於非經腸骨道給藥的組成物(如皮下注射)，適合的載劑這術語包括但並不限於水，鹽水，酒精，一種脂質，一種臘質或一個緩衝液。

對於口腔給藥的組成物，適合的載劑這術語包括但並不限於任何以上的載劑或一個固體的載劑，例如甘露糖醇，乳糖，澱粉，硬脂酸鎂，糖精鈉，滑粉，纖維素，葡萄糖，蔗糖和碳酸鎂都可以採用。

生物可降解的微球體(例如，聚乳酸聚甘醇酸)也可能被

採用為本發明的藥物組成物的載劑。

本發明提供一個藥物的組成物，其包含一有效量之一個含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物之經分離出的胜肽或含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之經分離出的多肽在一個藥學可接受的載劑中。

如在此使用的，藥學可接受的載劑包括但是不被限制到任何一個標準的藥學載劑，例如一個磷酸鹽緩衝液，水，和乳狀液如油和水或水和油乳狀液，和各種不同類型的潤濕劑。該等組成物也能包括安定劑和防腐劑。關於載劑，安定劑和佐藥，見Martin REMINGTON'S PHARM. SCI.，15th Edmund.(Mack Publ. Co.，Easton(1975))。藥學上可接受的載劑可自以下群組選擇出：液體，噴霧劑，膠囊，片劑，藥丸，粉狀，凝膠體，藥膏，乳霜和顆粒。在另外的一個具體例中，藥學上可接受的載劑包含一個控制釋放處方。然而在另外的一個具體實施例，藥學可接受的載劑可從以下選擇：水，磷酸鹽緩衝液，Ringer's溶液，葡萄糖溶液，包含血清的溶液，Hank's溶液，其他的水性的生理平衡溶液，油，酯，乙二醇，生物相容的聚合體，聚合的基質，膠囊，微膠囊，微粒子，大丸藥製劑，滲透性泵，擴散裝置，脂質體，脂質球，細胞膜。

本發明提供一藥學的組成物，其包含一有效量的一個含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物之經分離出的胜肽或含有胺基酸序列

NH2-NVSAVEIA-COOH之一個經分離出的多肽在一個藥學可接受的載劑中和一個從以下群組中所選擇之藥劑，該群組包括：抗生素，創傷痊癒劑，抗氧化物，抗病毒的，抗真菌藥，抗局部缺血的，抗老化，免疫調節劑，抗低氧的，抗毒的，抗過敏的，抗皺的，抗發炎的，抗傳染性的，抗免疫性的，抗原生動物的，抗寄生蟲的和抗腫瘤的藥劑[1，2，4，7，8，10，13，15，16，18，19，20，27，28，39，50，52，60，66]。

本發明提供一藥學的組成物，其包含一有效量的一個含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物之經分離出的胜肽或一個含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之經分離出的多肽在一個藥學可接受且適合於體表的，舌下的，體內的，或腸胃給予的或氣霧的的載劑。

本發明提供一個方法，其用以藉著化學合成或遺傳基因工程學產生一個含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物之經分離出的胜肽或產生含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之經分離出的多肽。

本發明提供一個保護一個人的視網膜方法，其係投予一有效量的一個含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物之經分離的胜肽或含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之經分離的多肽至這病人[96]。

本發明提供一個改良一個人的皮膚外表的方法，該方法藉著將其外表和一有效量之含有胺基酸序列

NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物的胜肽或含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之經分離的多肽相接觸。

如在此使用過的，皮膚病況包括但是不被限制於：牛皮癬，異位性皮膚炎，疱疹，帶狀疱疹，濕疹，不同嚴重程度和起源的皮膚燒傷，皺紋，色素斑點。在一個具體例中，本發明的胜肽或多肽係混合或聯同於一個化妝品用的載劑。如在此使用過的，化妝用的載劑至少包括一種添加劑成分，像矽油，增稠劑，香水油，混濁引發劑，負離子表面活性劑，陽離子表面活性劑，非離子的表面活性劑，雙性離子表面活性劑，潤濕劑，顏料，光保護劑，抗氧化物，傳授光彩增添劑和防腐劑。

本發明提供一使用一有效量之含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物之經分離的胜肽或含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之經分離的多肽以治療肝炎患者的方法。在一個具體例中，上方描述的胜肽或它的功能相等物或多肽能使一急性病毒性B型或C型肝炎患者肝功能的生化指數和免疫指標正常化，加速其疾病的症狀恢復，或避免疾病復發[14，26，32，41，42，53，97]。

本發明提供一個以一有效量之如上述的胜肽或它的功能相等物或上述經分離之多肽以治療一個帶狀疱疹神經結神經炎患者的方法。在一個具體例中，上述的胜肽和/或它的功能相等物或上述經分離之多肽能使CD3+，CD4+，CD8+，和攜帶HLA抗原的T-細胞的細胞數目正常化，而且改善

帶狀疱疹神經結神經炎患者之神經學上的症狀[45]。

本發明提供一個使一個糖尿病週邊性多發性神經炎的患者CD3+和CD4+T-細胞的等級正常化的方法。

本發明提供一個治療一腎病變併發症患者的方法，該方法包含投予一有效量的含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物之經分離的胜肽或含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之經分離的多肽[29]至該患者。

本發明提供一個用以治療或防止一個兒童患者腎病變併發症狀的病程的方法，該方法包含投予一有效量之含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物之經分離的胜肽或含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之經分離的多肽至該患者[29]。

上述的胜肽或它的功能相等物或上述的多肽係能夠在一個先天性腎病變併發症(INS)的孩童患者促進早期的和延長的臨床檢驗之消除，而且改正CD3+和CDB+T-淋巴球的減少[29]。

本發明提供一個治療或防止一個關節炎病者的病程的方法，其包括給予一有效量之如上述的胜肽或它的功能相等物或上述經分離之多肽。在一個具體例中，上述的胜肽或它的功能相等物或上述經分離的多肽在青年型類風濕性關節炎，類風濕性關節炎或牛皮癬性關節炎患者能改善臨床的症狀和實驗室指標，刺激白血球干擾素的產生，並使體液和細胞免疫正常化[63]。

本發明提供一個治療或防止一個氣管性氣喘患者的病程方法，其包括給予一有效量的如上述的胜肽或它的功能相等物或上述分離的多肽。在一個具體例中，上述的胜肽或它的功能相等物或上述分離的多肽能減輕所必需的口服類固醇的平均每日劑量以舒緩痛苦，亦稍為改善肺活量參數；和增加對地塞米松(dexamethasone)的敏感性[11，36，38，64，65，66，67，68]。

本發明提供一個方法給治療或防止一位小兒科的病者呼吸器官傳染的病程包括給予一有效量的如上述的胜肽或它的功能相等物或上述分離的多肽。在一個具體例中，上述的胜肽或它的功能相等物或上述分離的多肽能改善免疫學的指標而且減少被傳染的頻率。

本發明提供一個方法給予一個癲癇病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH，以減少過敏的反應和藥物的毒性[6]。

本發明提供一個方法給治療或防止一個乳癌病者的病程包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH一有效量的如上述的胜肽或它的功能相等物或上述分離的多肽。在一個具體例中，上述的胜肽或它的功能相等物或上述分離的多肽提供免疫調節，使腫瘤血請標記，CA15.3的水平常態化，和藉

由增加腫瘤滲透的CD5'T-細胞和CD11-巨噬細胞[60]。

本發明提供一個方法包括給予一個結腸癌的病者在治療或外科手術之後一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH以改善康復[98]。

本發明提供一個方法包括給予一個惡性肉芽腫(Hodgkin's disease)病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH以引發疾病重發[100]。

本發明提供一個方法給治療或防止一個牛皮癬病者的病程包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。在一個具體例中，上述的胜肽或它的功能相等物或上述分離的多肽能改善臨床的症狀，根除紅疹，減輕痛苦，而且增加免疫調節淋巴球的活性，而且增加CD3+和CD8細胞的百分比。在另一個具體例中，上述分離的胜肽或分離的多肽與其他有效治療或防止牛皮癬的藥物組合給予病者以增加本發明分離的胜肽或分離的多肽的藥效。藥物或製劑可能有效地或協同地與LAP組合的包括但是不被限制於Anthralin，煤焦油，哥的松(Corticosteroids)，類維化命A(Tazarotene)，維他命D3(Calcipotriene)，pimecrolimus和tacrolimus[104]。

本發明提供一個方法給治療一個動脈漿樣性硬化症和

其他形式的脈管障礙的病者包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法以限制一個的心肌細胞死亡的病者包括給予一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH[7，37]。

本發明提供一個方法給改良心臟的肌肉的收縮力量被各種心臟的肌肉疾病包括給予一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH高血壓，病毒的和先天性者的減低。

本發明提供一個方法給限制一個在器官移植後的排後反應包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法給治療或防止愛滋病或非典型肺炎(嚴重急性呼吸道併發症)的病程包括給予病者一有效的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

一個非典型肺炎的爆發，記錄為嚴重急性呼吸道併發症(非典型肺炎)，首先在中國廣東省鑒定，後來擴散到數個

國家。在2003年二月至三月期間，相似的案例在香港，越南和加拿大病者身上被發現。為了這疾病世界衛生組織(WHO)發行了一個全球性的警告。在2003年三月中，遠東區域的非典型肺炎在護理工人和家庭成員曾照顧這嚴格呼吸器官的疾病病者的被辨認出患病。大部份這些病例被追蹤為經過多樣串鏈的傳播給一個來自廣東省的護理工人，在拜訪香港時被收容イ作肺炎入住醫院而且死那裏。在2003年四月下旬之前，來自全球的超過25個國家，有超過千計的非典型肺炎案例和數以百計非典型肺炎相關的死亡被報告到世界衛生組織。這些情形的大部分在暴露在家庭中的非典型肺炎病者或在護理環境下。這一個公告提供一個方法預防及[或]治療非典型肺炎。

本發明提供一個方法給治療或防止一個局部缺血和創傷的腦細胞失常的病者的病程包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH[17，24]。

本發明提供一個方法給治療一個局部缺血-再充血的病理結果的病者包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH(8)。

本發明提供一個方法給治療任何的化學或麻醉的中毒狀態包括但是不限制於酒精和嗎啡中毒狀態包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列

NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法給援助或促進創傷的痊癒包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法給治療一個病毒疾病病者包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法給保護心臟細胞的損傷藉著心臟細胞接觸一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法給保護一個病者的心臟細胞的損傷包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

在一個具體例中心臟細胞是受傷的。本發明提供一個方法給保護心臟細胞免受進一步的受傷，藉著心臟細胞接觸一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。當病者心臟細胞是受傷的，本發明提供一個方法給保護病者的心臟細胞，包

括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

在一個具體例中，本發明消除對心臟細胞的傷害。本發明提供一個方法保護心臟細胞免受進一步的受傷藉著心臟細胞接觸一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。本發明提供一個方法給保護病者的心臟細胞免受化學藥品或因為缺乏血或氧的進一步的傷害，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法給治療當凋亡發生的受傷和疾病的情況包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH[3]。

本發明提供一個組成能夠抑制或殺害癌細胞藉著癌細胞接觸一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

如在此使用過的，癌細胞包括但是不被限制於乳癌，腸癌，腦癌，Jurkat細胞(急性T-細胞的白血病細胞株)[3，15，52，60]。

本發明提供一個方法給病者抑制或殺害癌細胞，包括

給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供方法給細胞產生對H1-組織胺的受體有拮抗的效果藉著細胞接觸一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供方法給病者產生對H1-組織胺的受體有拮抗的效果，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH[3]。

本發明提供一個組成可以抑制A2-磷脂酶的活性，這組成含有一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH在一個適當的載劑中[39]。

本發明提供一個方法給細胞中產生抑制A2-磷脂酶的活性，藉著細胞接觸一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH連結在一個適當的載劑中。

本發明提供一個組成可以保護對抗腫瘤壞死因子(TNF)的效果藉著一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含

有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法可以保護一個細胞對抗腫瘤壞死因子(TNF)的效果藉著接觸一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法可以保護病者對抗腫瘤壞死因子(TNF)的效果，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防發炎性腸炎疾病的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防一個第一類糖尿病病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防一個多發性硬化症病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防一個毒血症中風症(格蘭氏陰性敗血病)病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的

功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH[62]。

本發明提供一個方法治療或預防一個帕金森氏症病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法修飾sigma-1和sigma-2個受體以避免一個心肌梗塞病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH，聯同一個合適的載劑。

本發明提供一個方法修飾sigma-1和sigma-2個受體以避免一個腦中風病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH和一個分離多肽的載劑者。

本發明提供一個方法治療或預防一個第二類糖尿病病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防一個老年失智症病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防一個肌萎縮性(脊髓)側索硬化症病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防一個內和外毒血症病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防一個Crohn's疾病(即慢性的腸炎)病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防一個潰瘍性結腸炎病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防一個甲狀腺功能亢進症病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH[49，54，55，56，57，58，59]。

本發明提供一個方法治療或預防一個吉蘭-巴雷併發

症病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防系統性紅斑狼瘡和其他的膠原蛋白疾病包括但是不限於硬皮症病者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療或預防一個活化了Caspases-3，-4，和–8蛋白酶

者的病程，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法以調節一氧化氮合成酶(NOS)，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療一佃萊什曼原蟲病病者，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。

本發明提供一個方法治療一個萊什曼原蟲病病者，包括給予病者一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽

含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH。上述的胜肽或多肽可能被肌內或皮下注射入病者。亦可採用其他注射途徑。

本發明提供一個組成含有一有效量的分離的胜肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物或分離的多肽含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH在一個藥學可接受適當的載劑以治療萊什曼原蟲病。

本發明提供一個組成含有一有效量的Plaferon-LB在一個藥學可接受適當的載劑以治療萊什曼原蟲病。

本發明提供一個方法治療一個萊什曼原蟲病(萊什曼原蟲病)病者，包括給予病者一有效量的一有效量的Plaferon-LB。

上述的病者包括但是不被限制於哺乳動物。在一個具體例中哺乳動物是狗或貓。

本發明更進一步提供一個程式以準備一個藥物處方包含了一個把本發明的胜肽結合著一個藥學可接受的輔劑或載劑。

本發明提供一個物質含有上述的胜肽(等)或多肽(等)。在一個具體例中，這胜肽是直接地或間接地與另一化合物結合。在進一步的具體例中，這胜肽是一個蛋白質。

分離和合成這生物活性的化合物的方法

在本發明的生物話性胜肽或多肽可用以下程式合成：

(1) 取得羊膜組織後，在37℃用1.0ml培養液培養0.01mg蛋白含量的羊膜組織

(2) 在37℃用Newcastle病病毒(NDV)誘發羊膜組織製造生物活性胜肽1小時，

(3) 在37℃培養羊膜組織10-12小時

(4) 離心分離羊膜組織和含生物活性胜肽的溶液

(5) 調整溶液的pH至2.0後培養溶液在+4C不少於3天來滅活NDV

(6) 提純生物活性胜肽

步驟(1)到(6)已經在美國專利申請號09/928，178和國際PCT申請號PCT/US01/41666被詳細地討論，他們的全部內容以參考形式被吸納在這申請之內。

(7) 胜肽被分離為高分子量(>5000Da)和低分子量(<5000Da)部份(見實施例)；

(8) 檢查分離部份的生物活性；

(9) 生物活性胜肽被解碼決定所含胺基酸的序列；

(10) 利用解碼的胺基酸序列來合成胜肽或多肽；及

(11) 檢查合成胜肽或多肽的生物活性。

本發明提供一個化合物或胜肽，用上面描述的程式生產。

本發明將會從下面的例子被加以瞭解。然而，一個在這技術中熟練者，將會不遲疑地懂得這只當做描述本發明的特定方法和被討論的結果，因為在其後的聲明有更完全的說明。

實驗的詳細報告

例1

生物活性胜肽在Plaferon-LB的低分子量分離部分

低分子量的Plaferon－LB成分(PM<5，000 Da)是用體積排斥色層分析法利用Sephadex G25 與高分子量(PM>5，000 Da)的成分分離(第1圖)。

含有高分子量(>5，000 Da)的化合物與含有低分子量(<5，000 Da)的化合物分別集中後，急凍乾燥保存，接著這兩個冷凍乾燥的集中成分用SE及RP-HPLC來分析(第2a及2b圖。而RP－HPLC分析確定了所得的結果，同時在低分子量分離成分中檢出了數個胜肽分子(第3圖)。

進一步用逆相色層分析法(RP-chromatography)在低分子量的PLB成分中分離了9個分離部分，在此定為第0－8分離部分(第4圖)。應用小鼠脂多醣(LPS)毒血症模式作活性實驗，結果發現在第2，3和4分離部分中檢出生物活性，而以第4部分最為活躍。

材料及方法

5至6週齡的雌性CD1小鼠(Charles River，Calco，Italy)在實驗前允許適應了環境一個星期後才用於試驗，它們在標準的動物室條件下，用ad libitum的食物和水飼養。小鼠用i.p.注射1mg LPS(Sigma Chimica，Milan，Italy)，LPS挑戰後每24小時便記錄死亡數目直至72小時為止。

結果及總結

如期望中的結果，用PBS處理的對照小鼠組在LPS注射後72小時觀察到的死亡率是100%；相反地，預防性處理的小鼠每售用0.5ml第2，3或4分離部分分別在LPS處理前-24

及-24小時顯著的減低了累積的死亡率(表1)。第四個分離部分提供最佳的保護作用。這實驗結果表明，低分子量PLB的第2第3分離部分也能夠對LPS誘發的死亡有保護作用。最大的效果見於每只小鼠在LPS處理的-24小時及-1小時前給予0.5ml的分離部分，在分離部分第0，5，6，8都顯示了一些活性。

表1.低分子量Plaferon-LB再分離部份的抵抗LPS-誘發死亡的效能

治療(0.5毫升)	處理的時候*	致死率24h	致死率48h	致死率72h
PBS(控制)	-24，-1	25%(5/20)	75%(15/20)	100%(20/20)
PLB分離部分0	-24，-1	25%(5/20)	75%(15/20)	75%(15/20)
PLB分離部分1	-24，-1	15%(3/20)	75%(15/20)	100%(20/20)
PLB分離部分2	-24，-1	15%(3/20)	35%(7/20)	35%(7/20)
PLB分離部分3	-24，-1	15%(3/20)	35%(7/20)	35%(7/20)
PLB分離部分4	-24，-1	25%(5/20)	25%(5/20)	25%(5/20)
PLB分離部分5	-24，-1	15%(3/20)	35%(7/20)	50%(10/20)
PLB分離部分6	-24，-1	0%(0/20)	65%(13/20)	65%(13/20)
PLB分離部分7	-24，-1	50%(10/20)	90%(18/20)	100%(20/20)
PLB分離部分8	-24，-1	0%(0/20)	65%(13/20)	75%(15/20)

*相對於LPS處理的小時計時間

雖然這實驗顯示了Plaferon-LB低分子量分離部分第2，3和4具有最大的保護LPB誘發的死亡率的作用，其他的分離部分(如第0，5和6)都顯示了一些生物活性，因此，可能低分子量分離部分第0，1，5，6，7和8和沒有檢測的高

分子量PLB-LB都含有一樣或近似的治療和藥學性質的在Plaferon-LB低分子量分離部分第2，3和4發現的生物活性胜肽(等)。

例2

在低分子量部分的第2，3和4部分的生物活性胜肽

在Plaferon-LB低分子量部分的第2，3和4分離部分用質譜分析法(MALDI-TOF)鑒定。

材料及方法

質譜分析法(MALDI-TOF)

準備量逆相色層分析法分離得的第2，3和4分離部分經用Voyager System 1178(Applied Biosystem)的MALDI-TOF質譜分析儀分析如下：

介質：3-羥基吡啶甲酸(3-hydroxypicolinic acid)

操作模式：線性

極性：陽性

取樣控制：手動

加速電壓：2，300伏特

網電壓：95%

提取延誤時間：400nsec

獲取質量範圍：500–20，000 Da

鐳射拍照次數：25/光譜

鐳射強度：1820

結果

結果總結在下面表2.

表2.分離部分第2，3和4檢出的胜肽的質量的總結

分離部分第2	分離部分第3	分離部分第4
664，9	664，7	673
825，6	826，5	
986，6	986	
1148	1147	
1307，9		
1468，3		

第2分離部分含有一個主要的胜肽分子，質量為664.9 Da 和重復(5)附加的約160 Da.第3分離部分含有相同的胜肽及3個附加的160 Da，而第4分離部分含有相同的胜肽而沒有附加的。所附加的160 Da與磷酸化作用(2X80 Da)一致。

第4分離部分含有的生物活性胜肽的序列用質譜學一檢定(第5圖)。下面表3總結了第4分離部分的質譜學結果。

表3.第四分離部份的多肽的質量總結

質量(Da)	胺基酸序列
785.5	NVAAVEIA
801.5	NVSAVEIA
837.4	NVS(+phosphate)AVEIA(-C02)
881.4	NVS(+phosphate)AVEIA
917.5	NVCKVEIA(+2 Na)
	NVFKVEIA
1243.8	NVS(+2xGalNAc or GlcNAc, +phosphate)AVEIA(-CO2)
1287.8	NVS(+2xGalNAc or GlcNAc, +phosphate)AVEIA
1331.9	NVS(+2xGalNAc or GlcNAc, +phosphate)AVEIA(+2Na)
1375.9 1419.9 1463.9 1508.0 1552.0 1596.0	

1640.0	
1127.7 1171.7 1215.7 1259.8 1303.8 1347.8 1391.9 1435.9 1480.0 1523.9 1568.0	

例3

化學合成的Lajor活性胜肽(LAP)的生物活性

合成胜肽或Lajor活性胜肽(LAP)是跟據以上在PLB低分子量部份的第2，3和4分離部分檢出的胜肽的序列化學合成的。這LAP的生物活性的效能評估採用了發現在PLB低分子量部份的第2，3和4分離部分活性的相同實驗情況(見例1)。

在實驗中PLB第4分離部分處理的小鼠被用作陽性對照。

材料與方法

實驗採用6週齡的雌性CD1小鼠(Charles River，Calco，Italy)，經過一星期去適應環境後才開始試驗，小鼠是在標準條件下ad libitm餵養及飲水，試驗中小鼠被i.p.注射1 mg的脂多醣(LPS)，然後在72小時內每24小時記錄一次死亡率。

結果

正如期望的，對比的小鼠在注射PBS 72小時後100%死亡(表4)。相反地，在LPS處理前-24及-1小時給予每隻0.5ml第4分離部份作預防性處理的小鼠明顯地減低累積計的死亡率(表4)，此外動物死亡率的動態及累積率都未受不同劑量的LAP所影響，這樣處理過的小鼠都表現出與對比組近似的LPS誘導死亡出現的動態與累積計情況。

用10 ucg LAP預防性處理的小鼠的累積的死亡率亦同時顯著地減低，這實驗的資料顯示LAP與第4分離部分相若，在小鼠的LPS誘導死亡率模式中，具有強烈的免疫調節及保護作用。

這試驗確定了這個胜肽的活性和它可能的使用於免疫性發炎或自身性免疫疾病，例如第一類糖尿病、 多發性硬化症、 吉蘭-巴雷併發症(Guillain Barre syndrome)、慢性肝炎等。

研究臨床前的免疫發炎病或自身免疫病的動物模式是足以作為"活體"的概念證明。在疾病如多發性硬化症，第一類糖尿病、類風濕性關節炎、發炎性肝炎等的臨床前模式使用天然(未經分離)的PLB所觀察到的有益效果，LAP在這些情況下亦預期有相似的好處。

表4.LAP抵禦DL100劑量(1 mg/鼠)的LPS誘發死亡效果的效能試測

處理(0.5 ml)	注射的時間*	死亡率24 h	死亡率48 h	死亡率72 h

載劑	-24，-1	15 %(3/20)	80 %(16/20)	100 % (20/20)a
PLB 第4分離部份	-24，-1	5 %(1/20)	20 %(4/20)	40 %(8/20)b
胜肽 2.5 mcg	-24，-1	10 %(2/20)	35 %(7/20)	80%(16/20)
胜肽 10 mcg	-24，-1	10 %(2/20)	35 %(7/20)	50%(10/20)c

*相對LPS注射的時間；b對a，p>0.0001；d對a，p=0.001；c對b=Chi-方沒意義

在目前(及下面)的數據顯示Plaferon-LB(PLB)在五種不同的切齒類免疫性發炎病和自身性免疫病動物模式中都顯示明確的好處，這包括了：

用化學方法生產或用重組DNA技術來製造的合成的包含了胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH的活性胜肽或稱Lajor活性胜肽(LAP)，相信都具有和從Plaferon-LB分離出來含有胺基酸序列(NH2-NVSAVEIA-COOH)的生物活性胜肽(第4分離部分)(見例5)相同或相似的治療和藥理學性質。所以，在切齒動物中不同的人類疾病和傷害的模式中研究LAP的效果的結果，都會表現出近似在Plaferon-LB發現到的好處。

實驗已証明瞭PLB在第一類糖尿病(NOD小鼠)，多發性硬化症(DA大鼠 PR-EAE)，免疫發炎性肝炎(Con A-誘發的小鼠肝炎)，類風濕性關節炎(油誘發的DA大鼠關節炎)和毒血症(鼠科內毒素毒血症)的效果。而這些數據為PLB在這些自身免疫疾病的效能提供了有價值的概念的証明。因為這些疾病都有特徵性的調升第一類發炎前細胞因子(TFN-α，IL-2，IFN-γ)的合成和功能，PLB的一個可能作用方式亦可

能依賴對這些細胞因子的特異拮抗。此外，因為這些細胞生長素都在病理遺傳學上涉及其他免疫發炎症或自身免疫病，譬如Hashimoto's甲狀腺炎、Crohn's病和吉蘭-巴雷併發症疾病，因此PLB都可能被考慮作為這些病患的治療藥物(亦可見於National Institutes of Health Autoimmune Diseases Coordinating Committee Autoimmune Diseases Research Plan，<http：www.niaid.nih.gov/dait/pdf/ADCC_Report.pdf>，其中的內容已被以參考形式完全收錄在本專利中)。

例4

PLB預防法在DA大鼠PR-EAE病程的效果

實驗的過敏性腦脊髓炎病(EAE)是一個像多發性硬化症的病況，可以在容易感染的哺乳類動物中注射有適當佐劑的CNS抗體去誘導發病(69)，可惜大多數的EAE模式的最大缺點就是這些大鼠都發生單相的病情而罕有或缺少了脫髓鞘的病變，例如Lewis 大鼠的EAE就提供了這個人類對等病的臨床和組織學上的重要的不同。然而，最近報導有一個嚴重拖延復發性而有脫髓鞘形式的EAE(PR-EAE)模式，可以注射乳化在不完全(FIA)或完全的Freund's佐劑(FCA)的同種或天竺鼠的脊椎抗體去誘導DA大鼠的EAE模式中(70)。這模式因此提供一個獨特的活體工具去研究免疫系統參與而產生的慢性病況和脫髓鞘病變，從而作出研究新穎的人類多發性硬化症免疫治療方向的思考。

物料與方法

動物

試驗採用重230－270克的雄性DA大鼠(Harlan Nossan，Italy)。

免疫注射

50毫克的天竺鼠脊髓(Sigma，St. Louis，MO)，經徹底切碎與100ml的FIA(Sigma)和2ug結核分枝桿菌(Mycobacterium tuberculosis)H 37 RA種(Difco，Detroit，MI)乳化後，皮下(s.c.)注射在大鼠尾的底部。

治療

Plaferon-LB溶於10ml的消毒鹽水後，在一星期內連續5天用每隻大鼠0.5ml的劑量i.p.注射。治療組在免疫注射前一日開始處理直到免疫注射後第40日止，一個藥瓶的PLB溶解在10ml的PBS，每隻大鼠每天接受0.5ml這藥物(i.p.)，一星期6次。

病理記分方法

如他處所述(71)，大鼠每天的體重及病理像徵的記分。都由一個不知道處理情況的觀察者記錄，病理的記分如下：0＝無病徵，1＝尾軟弱，2＝中度二肢癱瘓，3＝嚴重癱瘓，4＝四肢癱瘓，5＝死亡。

結果

長期的PLB治療沒有毒性

從大鼠的行為及病理表現觀察，PLB的治療是滿意地被接納的也沒有觀察到毒性引致的病態。

預防性及PLB處理減低DA大鼠的PR－EAE病情

正如預測，在50日詳細的觀察期間中，傳統的PR－EAE

病徵都在PBS處理的大鼠組中(15/15)看到(第6圖)。如從前報告過的(71)，在第一次發病後出現不同的拖延性疾病，在一些大鼠中表現病徵的免除和復發病2或多次(第6圖)。為了評估PLB對PR-EAE病程的影響，DA大鼠的用藥在提早預防療程中免疫注射的前一天直至注射後的第+40天。雖然累積計的EAE病變出現率在PLB處理大鼠組(16/18，88.9%)是與控制組大鼠沒有明顯的差異，相對於後者動物，PLB處理過的大鼠表現較輕微的病程引致較低的EAE的累積記分和其後較短的復發時期及減低的病程。

這些結果肯定了兩組獨立的試驗。因為所得結果的重複性高，它們被合併和在這作單一試驗闡明(第6圖)。

例5(亦見例3)

Plaferon-LB對鼠類LPS誘發死亡的效果：一個人類毒血症的模式

這試驗用LPS作為人類毒血症的模式以說明PLB在內毒素毒血症的效果。

在內毒素休克情況的病理機製，第一類的細胞因子(例如白血素(IL)-1，IL-12，腫瘤壞死因子(TFN-α)和干擾素(IFN-γ)和第2類細胞因子(例如IL-6和IL-10(72))扮演著一個主要的角色，那就是通過了他們的發炎前及血管的活化性質而產生(71)。但是，第一類細胞因子的製造及作用可以被第二類細胞因子的抗發炎作用所拮抗，而這兩種細胞因子子群的平衡可能是影響寄主的內毒素毒血症的反應。因此，脂多醣(LPS)誘發的小鼠死亡的防止可通過阻塞內源性

的IL-1，IL-12，TNF或IFN附加特異性拮抗劑或注射第2類細胞因子(例如IL-4，IL-10或IL-13)(74-78)。因此，能夠抑制第一類細胞因子的製造和作用同時提升第二類細胞因子的製造的藥理學物質應該是適用於防止和治療內毒素血毒病的。

這些觀察促使了我們在這評估Plaferon-LB在實驗性的小鼠的致死的情況，這可以一次注射高劑量LPS而誘發，與人內毒素血毒病有相似的免疫和病理路徑，也是現今常廣泛選用的活體模式以瞭解病理機制和評估嶄新的免疫治療方法去治療這個併發症。

結果顯示PLB成功地抵抗LBS誘導的小鼠致死率，這與它是否在內毒素挑戰小鼠一小時前或一小時後給予是無關的。

物料與方法

試劑

PLB的製造如從前所述(見美國申請專利號碼09/928，178提申於2001年8月9日及Patent Cooperation Treaty(PCT)申請號碼 PCT/US01/41666提申於2001年8月9日和International Publication Number WO 02/12444)。PLB溶於10ml PBS後，以0.5ml或1ml i.p.注射入小鼠。LPS購自Sigma Chemicals(St. Louis，MO，USA)而消毒的注射用水從坊間藥房購得。

小鼠

4－6週齡的雌性CD1小鼠是購自Charles River(Calco，

Italy)。

實驗設計

所有動物的操作都跟隨Catania大學的指引，以符合國家對照料和使用實驗室動物的法律。在誘發致死性內毒素毒血症時，小鼠以i.p.注射3ml稀釋在0.3ml水中的LPS。這劑量是根據以前實驗的結果，可以引致75% 至100%的小鼠在3日內死亡。PLB對於LPS誘發死亡的過程以預防和"及早治療"方案來評估。對於預防，小鼠接受i.p.注射0.5或1毫升PLB是在LPS挑戰前24小時及1小時(表5)。控制組小鼠除只用PBS外，其他處理情況相同，"治療"的能力是用LPS處理過30分鐘後的小鼠i.p注射1ml PLB一次來測試(表5)。加之，陽性控制組的小鼠包括了給予多細胞株小鼠TFN-α抗體(Peprotech，UK)，這抗體(Ab)從我等的研究與發表的文獻的結果，知道能抵抗LPS的預防性致死作用，但不是治療情況，致死率是每天查核一次，連續進行三天。

統計

LPS注射後累積的72小時致死率的比較是用chi-方的P值相等或低於0.05作為顯著的考慮。

結果

PLB預防性處理對LPS誘發致死率的影響

如預見的控制組小鼠(15/5)在LBS注射3天內死去(表5)，但給予0.5ml PLB的預防處理組小鼠在LPS後-24及-1小時的生存有明顯的改善，只有10/15(66.7%)在觀察期中死去(表5)。PLB不單延遲LPS的致死作用，因為沒有一隻小鼠在

控制組剩下的或PLB處理組的在其後一週內死去。小鼠用抗TFN-α多細胞株抗體處理亦足夠產生一個與PLB組相似的保護作用，9/15(60%)如這樣處理的小鼠，在LPS注射72小時內完全死亡，死亡的動態與觀察到的PLB處理組相似(表5)。

PLB"早期治療"對LPS誘發死亡的效果

為了評估PLB有治療效果，PLB在LPS藥物注射後30分鐘後才進行試驗，如表5所示"治療性注射"PLB減少LPS誘發的死亡，累積的死亡事件是PBS處理控制組100%(15/15)及在PLB處理的小鼠 62.5%(6/15)。再次地，沒有小鼠在一星期的跟蹤期內去世。相反地，注射LPS後30分鐘注射抗TFN-α抗體的小鼠未能抗衡內毒素引致死亡的結果，而觀察到累積的死亡率在這組中是100%(15/15)，這與控制組小鼠受LPS挑戰而用PBS處理者相同。

表5. 給予PLB時間對LPS誘發小鼠死亡的結果

處理(n)	劑量/小鼠	相對於 LPS的注射時間	死亡數目			
			24h	48h	72h	年總數
PBS(15)	0.5 ml	-24，-1 h	6	9	0	15
PLB(15)	0.5 ml	-24，-1 h	4	5	1	10*
抗TFN-α Ab(15)	0.5 mg	-24，-1 h	4	3	2	9**
PBS(15)	1 ml	+30 分	5	9	1	15
PLB(15)	1 ml	+30 分	4	4	2	10*
抗TFN-αAb(15)	0.5 mg	+30 分	5	7	3	15

** p< 0.05 用chi-方　　* p= 0.05 對. PBS-處理控制組 用 chi-方

例6

PLB保護及改善Con A-誘發的T細胞依賴的肝損傷

最近，有一個新的肝炎模式被形容為可用一次i.v.注射Con A而在小鼠誘發病變(79-81)。在8-24小時內，肝的病理及組織學證實肝炎的發生，而有血漿轉胺酶活性的提高和肝損傷性大量的粒細胞聚集和肝壞死(79-81)。Con A誘發的肝炎是依賴T細胞和的，不可能在缺乏免疫功能性的T細胞的的光身去胸腺小鼠中誘發，用樣亦可用抗T細胞免疫抑制劑如環孔素A(CSA)和FK506或用矽石粒子對巨噬細胞功能的障礙去防止(79-81)。

準確的T細胞和巨噬細胞施展他們的肝源性能力的機制還未知悉。因為在Con A的反應中發生大量的釋放巨噬細胞和T細胞来源的細胞因子(IL-1，IL-2，IL-6，IL-10，TFN-α，IFN-γ和GM-CSF)而有不同的動態情況，這些細胞因子被認為負上肝臟損傷發展的責任。雖然如此，細胞因子在免疫性發炎情況的病理機制中的角色仍需定義，譬如，利用特異性的TFN-α，IL-4，IFN-γ，IL-12抗體抑制劑(單株抗體，可溶性受體)和利用外源性注射的IL-6和IL-10是可以同等地阻止這疾病的，病情的後果可能是根據一個Con A-激發的細胞釋放的致發炎和抗發炎的細胞因子的微妙的平衡(79-81)。

PLB對Con A誘發的肝損傷影響曾做過試驗，結果清晰地顯示該藥無論是預防的(在Con A前給予)或是治療的(在Con A後給予)使用都有效地防止肝炎的組織學和血清學的病徵。

物料和方法

試劑

PLB的製造如從前在他處所述(見美國申請專利號碼09/928，178提申於2001年8月9日及Patent Cooperation Treaty(PCT)申請號碼 PCT/ US01/ 41666提申於2001年8月9日和International Publication Number WO 02/12444)。PLB溶於10ml PBS後，以0.5ml i.p. 注射入小鼠。購自坊間的藥的CSA(Novartis，Basle，Switzerland)按所需濃度用消毒的橄欖油稀釋以每公斤體重100 毫克的劑量i.p.注射. Con A購自Sigma Chemicals(St. Louis，MO，USA)而消毒的注射用水從坊間藥房購得。

6-8週歲的Naval Medical Research Institute(NMRI)雄性小鼠購自Charles River，Calco，Italy.

小鼠在實驗前16小時不進食，分為3個實驗組，每一組挑戰以20mg/kg的Con A，Con A溶於無菌的PBS，然後注射在小鼠的尾靜脈，按照表中所示的實驗設計這三組分別 i.p.給予PBS、PLB或陽性反應的CSA，最後組是陽性對比因為從前的結果證明CSA有防止Con A-誘發肝炎的能力(79)，只挑戰PBS的小鼠組是額外的比較組(見表6)。

因為曾報導在Con A注射後8小時小鼠有顯著的轉胺酶活性上升，伴以嚴重的組織學的病徵和肝藏的損傷(79-81)，這些動物在8小時後犧牲，血和肝都被收集觀察。

表6 PLB對Con A-誘發小鼠肝炎的實驗設計和效果

組別	N°	肝炎的誘發	處理	ALT(U/ml)	P

		(Con A)	-24h	- 1h	+ 1h		
A	15	-	-	-	-	40.7 ± 16.7	< 0.0001
B	12	+	PBS	PBS	PBS	3645 ± 2068	control
C	15	+	PLB*	PLB*	-	348 ± 269.9	< 0.0001
D	15	+			PLB*	294.6 ± 116.6	< 0.0001
E	15	+	-	CSA**	-	319.3 ± 161	< 0.0001
F	14	+	-	-	CSA**	3795 ± 2497	n.s.

動物在Con A-注射8小時後犧牲，每隻的血樣本被收集作ALT量度。

統計分析以B組作比較。

*PLB注射 0.5 ml/鼠和**CSA為 100 mg/kg/鼠。都是i.p. 給藥。

血漿轉胺酶的活性檢定

血漿內的轉胺酶活性用標準的測量試驗檢定方法，採用雙光束分析儀量度。

資料計算

結果是用平均值±SD來表達，分析結果是用ANOVA來進行。

結果

PLB誘發的Con A-肝損傷血清及組織病徵的保護

15只小鼠中有3只(20%)的Con A或PBS處理的控制小鼠死去，而有Con A挑戰及CSA治療的小鼠有1/15(6.7%)在犧牲前死去，這些小鼠沒有作血請學的分折。

在Con A挑戰後8小時內的PBS處理的小鼠組中結果如預料中的也與前人研究相符地都發現了急性的肝損傷的徵狀而反映於血漿中急劇的ALT活性上升(79-81，91-94)。相對地，CSA與PLB都非常顯著地減低了Con A注射所引致的

ALT活性上升，也相當程度地減低了在Con A-挑戰前的"預防"注射療程所誘發的ALT上升值。但是，只有PLB而非CSA，抑制了在"預防"療程中的Con A注射後的肝炎的病程(見表6)。

雖然在這初步的實驗中沒有作組織學檢查，但在這種模式中ALT值是已知與肝的發炎性細胞滲透和肝細胞的壞死的程度是相關的(79-81)。因此血液中觀察到PLB(和CSA)–處理的ALT的減少應該與減低的肝臟發炎性的滲透和抑制壞死和凋亡路徑有關係。

例7

PLB預防法減低油誘發的關節炎

油誘發的關節炎(OIA)是一種發炎性與自我抑制限制性多種關節炎，可以在DA大鼠中表皮注射礦物油譬如不完全的Freund's不完全佐劑(82－84)。開始時的關節主要有多形核粒細胞的滲透和士聲一古單核細胞的在場。這個病是T-細胞依賴性的，可以藉單株抗T-細胞受體抗體(82)，也可以傳輸屬於CD4+-T細胞的次種Th1細胞(83)，以制約T細胞的功能，從而得到防止和復康。如在人類的RA，TNF-A亦可能在DA大鼠OIA中扮演重要的病理機制的角色。OIA因此提供治療人類RA的一個合適的活體工具，作為研究免疫病理機制和嶄新的免疫藥理學的方法。

材料和方法

動物

實驗採用10－12週齡的雌性DA大鼠從義大利購自

Harlan Nossan(Udine，Italy)，大鼠飼養在義大利Catania大學生物醫學科學系的動物房，在標準的實驗室條件下(無非特殊致病原體)的動物室，可以自由地取食和喝水，在環境適應最少一週後便可以開始作試驗。

OIA的誘發與PLB的防治

FIA(Difco，Detroit，MI，USA)與pH 7.7的磷酸鹽(PBS)溶液1：V/V乳化後，用200μl表皮注射入輕微乙醚麻醉的大鼠的尾部。

PLB的製造如從前在他處所述(見美國申請專利號碼09/928，178提申於2001年8月9日及Patent Cooperation Treaty(PCT)申請號碼 PCT/ US01/ 41666提申於2001年8月9日和International Publication Number WO 02/12444)。PLB溶於10ml鹽水中後i.p.注射大鼠(n＝20)每只0.5ml。治療是FIA挑戰前一天開始，連續6次一週直至FIA注射後30天，停止用藥後10天便評估關節炎的爆發。控制動物(N＝20)是由同樣實驗狀況的大鼠注射PBS處理所組成。

關節炎的評估

關節炎的在整個試驗期間和直至FIA挑戰後40天期間，每隔一天便由不知處理過程的觀察者用0至16的記分標度來評估，每一個四隻腳爪腫脹記分為0－4，其中0分為無關節炎，腳跟腫脹記1分，腫脹在附骨內及或蹠骨關節者記1分，腫脹1或多個趾骨內關節者記1分，4＝腫脹發生在所有關節，亦即整個腳爪。

結果

Plaferon-LB預防法阻止OIA誘發的DA大鼠關節炎

100% PBS處理的控制組DA大鼠注射一次20μl劑量的FIA都發展為OIA。最初期的病徵在FIA注射後11－14天觀察到(第7圖)，最通常在後腳爪的(metatarsophalangeal)蹠骨、附骨關節或腳跟關節有對稱性的腫脹，其後包括了整個後腳爪，而前關節亦在病程的後期發病。病情的不斷變壞直至完全康復是在FIA挑戰後約30天後開始(第7圖)。OIA關節炎的病程是受PLB預防性治療的良性影響，受治療的大鼠表現出顯著溫和的病程反映在明顯的較控制組大鼠為低($p<0.0001$)的關節炎記分紀錄(第7圖)，從它們的行為和外表判斷大鼠顯然能忍受PLB的藥性，PLB與PBS處理的大鼠在試驗完結時的體重都沒有差異。

例8

PLB預防法阻止NOD大鼠的自發性自身免疫型糖尿病

NOD小鼠是作為最具特性及最廣採用的自身性糖尿病的實驗模式(85-89)。與人類相似NOD小鼠在自身免疫性糖尿病中的模式中的病理發展是短暫地帶有選擇性的T細胞和巨噬細胞在胰B-細胞的發炎性滲透(85－89)，在NOD小鼠的糖尿病的T細胞和巨噬細胞依賴性的性質，已證明可以用單株抗體鈀掉這些細胞的功能，也可用矽石粒子(對巨噬細胞有毒)或抗T細胞的藥物譬如CSA而完全防止這糖尿病的發展(85-89)。通常在7-8個月齡內，就見到累積的發病情況，然而來自不同的小鼠群落間也有60%-80%的差異，而雌性較雄性的發病機會較大(85-89)，這與人類的第一類糖

尿病情況相若，NOD小鼠發展的胰腺炎通常在4-5週齡開始慢慢地發展而遠早於明顯的糖尿病的發生(85-89)。

在這個試驗中，我們評估長期PLB預防法治療對自發性胰腺炎的發展和雌性NOD小鼠的自身免疫糖尿病的效果。

物料與方法

劑試

PLB的製造如從前在他處所述(見美國申請專利號碼09/928，178提申於2001年8月9日及Patent Cooperation Treaty(PCT)申請號碼 PCT/ US01/ 41666提申於2001年8月9日和International Publication Number WO 02/12444)。PLB溶於10ml PBS後，以0.5ml i.p. 注射入小鼠。購自坊間的藥的CSA(Novartis，Basle，Switzerland)按所需濃度用消毒的橄欖油稀釋以每公斤體重25毫克的劑量管飼。PBS購自Sigma Chemicals(St. Louis，MO，USA)。

動物

5-6週齡的雌性NOD小鼠購自Charles River(Calco，Italy)。

實驗設計

真糖尿的雌性NOD小鼠隨機地分為3組，見圖中實驗設計而定分別接受PLB、PBS或CSA。PBS處理的小鼠組用作PLB對照組的控制組，而CSA處理組為"陽性"控制組，如以前所證明過的用在試驗的治療過程中(表7)CSA成功地阻止NOD小鼠胰腺炎和糖尿病的病發。

處理是在小鼠第5與第6週齡之間開始，這時期的NOD小鼠基本上沒有發生胰腺炎的(85-89)，這方法讓我們瞭解

PLB-處理對早期NOD小鼠糖尿病病變過程的影響。

處理是直至20週齡。在這期間，小鼠都檢查糖尿病的發展，一週兩次跟蹤尿糖，如遇陽性反應便量度血糖，小鼠如在空腹血糖高於11.8 mmole/L連續2天，診斷為糖尿病，試驗期完結時在不同組別中所有高血糖的小鼠都犧牲，收集胰臟樣本以觀察胰腺炎的嚴重程度。

組織性的檢查胰島腺。

這是由不知處理或小鼠情況的觀察者用盲目的態度工作如他處詳細的說明。每一脾臟最少檢查10個胰島腺，單核細胞的內滲透情況以下列各項記分：0＝未被滲透，1＝管外及週圍滲透，2＝腺體週圍滲透，3＝腺體內部滲透，4＝腺體間的滲透伴有B-細胞破壞，每個脾臟的平均記分是總記分除以觀察過的胰島腺數目。

結果

早期預防性的處理阻止了胰腺炎發展及減低NOD小鼠糖尿病發病的累積機會

在PBS處理的控制組中NOD小鼠在20週齡前有急性的糖尿病而帶有糖尿和高血醣者占多數(9/20，40%)，相反地累積的糖尿病小鼠明顯地被CSA處理減低(2/20，10%)，更甚的，PLB處理它全壓抑病情的發展(0/20)(見表7)。

和以上的臨床結果相符，胰臟β-細胞的組織學分析這些組中的小鼠，顯示了CSA及PLB小鼠明顯有較PBS為溫和的胰腺炎的病變，故當後述的小鼠表現著持續活躍的胰腺炎由胰腺週圍的細胞滲透到胰腺內部的滲透在伴有β-細

胞的破壞。而CSA和PLB處理的小鼠大部分表現的胰腺炎過程特點是外管滲透或外胰腺滲透，結果，他們的胰腺炎記分是明顯的低於PBS處理的控制組小鼠(表7)，PLB處理和CSA處理的NOD小鼠間的胰腺炎記分是沒有明顯的差異(表7)。

表7. PLB預防法防止NOD小鼠自身免疫性糖尿病

組別(n)	處理	糖尿病數目	胰腺炎記分
A(20)	PBS	9/20(45%)[a]	2.3 ± 1.2[d]
B(20)	CSA	2/20(10%)[b]	1.1 ± 0.8[e]
C(20)	PLB	0/20[c]	1 ± 0.9[f]

5-6週齡的真血糖雌性NOD小鼠被處理以PBS(0.5ml)，或PLB(0.5ml)或CSA(25mg/kg體重，用管飼)直至20週齡，PBS和PLB是一週6次i.p.注射，而CSA是隔一天通過管飼給藥。糖尿病的診斷見材料和方法部分的說明。糖尿病發的小鼠在開始病發時便犧牲。每組中其餘真血糖的小鼠在試驗結束才犧牲，它們的胰臟樣本收集作為組織分析。胰島腺炎的評分是用平均值±SD來表示。

作統計分析的各組是與PBS處理的控制組比較的。B對A，P＝0.034及C對A，P＝0.002，用Chi-方 比較，E對A，P＝0.001，F對D，P＝0.002，應用單方向ANOVA

例9

PLB對大鼠乳突肌肉收縮力的影響

背境

在1999年，Johnson等證明PLB在44隻只雜種狗中有心臟保護的效果，Shakarishvili等調查PLB在局部缺血性中風症利用電子順磁共振(EPR)去量化粒腺體膜的電子傳遞鏈的自由基製造。Nicolletti通過Western blot吸水分析證明PLB在狗模式中有降低細胞因子TFN-α，Interferon-γ，IL-1，IL-12 and IL-18的效果。

結果

大鼠乳突肌肉的收縮力在250ml的充氧緩衝液中沐浴著量度，收縮力經逐步的組織延長(0.05mm/5分鐘)，而得到最佳的收縮力。使用一安瓿的PLB在最佳收縮力情況下所引出的收縮力作紀錄。

Mutrie等人證明38%的乳突肌肉引出力(心臟收縮力-舒張力)在PLB處理後增加了(P=0.023，N＝61)6束乳突肌肉從小鼠取得後在離體(ex-vivo)下在組織沐浴盆中進行試驗。

材料和用法

肌肉束末端鑲嵌在一個力量換能器(Harvard Bioscience 529503)上和一個堅硬的鉤使達到等比例的情況，放在35-38℃沐浴腔內。剛開始時均衡在低鈣的控制溶液中約20分鐘，其後沐浴腔浸在充氧氣95%CO_2-5%CO_2的高鈣的控制液中(高鈣控制液一升水；1.73g 碳酸氫鈉，0.277g氯化鈣，0.2ml 胰島素)。待調較好肌肉的長度應產生最大

的等比例力量後，肌肉兩邊用超最大的電伏去刺激，產生的拉力被紀錄並分析最大的顫動力。PLB的收縮力參數被如此評估並和最初均衡期間PLB處理前者比較。抑制劑處理的肌肉亦同時與控制肌肉比較。統計學意義是由一系列的配對t-試驗，當P值少於0.05便考慮為有統計學意義。

參考資料

9-1. Tbilisi State Medical University. Annals of Biomedical Research and Education. January 2002(2)：39.

9-2. Shakarishvili R，Sanikidze T，Mitagvaria N，Beridze M，Mikeladze D，Bakhutashvili V. The Role of Oxygen and Nitrogen Reactive Species in the Pathogensesis of Ischemic Stroke. Georgian State Medical Academy，Georgian Academy of Sciences(unpublished).

9-3. Rukhadze R，Sanikidze T，Bakhutashvili V，Chikovani T，Pantsulaia L，Jgenti M. Proceedings of the Georgian Academy of Sciences. 1998(24)：339-343.

9-4. Sharma R，Bolger AP，Li W，Davlouros PA，Volk HD，Poole-Wilson PA，Coats AJ，Gatzoulis MA，Anker S. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines and bacterial endotoxin in adults with congenital heart disease. American Journal of Cardiology. 92(2)：188-93，2003 Jul 15.

9-5. Heba G. Krzeminski T. Porc M. Grzyb J. Dembinska-Kiec A. Relation between expression of TNF-α，iNOS，VEGF mRNA and development of heart failure after

experimental myocardial infarction in rats. Journal of Physiology & Pharmacology. 52(1)：39-52，2001 Mar.

9-6. Mariell J，Brozena S. Heart Failure. New England Journal of Medicine. 348(20)：2007-2018 May 2003.

例10

人類基因編碼了有生物活性的Plaferon-LB胜肽的'原'多肽

跟隨著這裏公開的胜肽序列，可以編碼這胜肽序列的核苷酸可以被推算出。而啓動子也可以被設計以"釣出"編碼了這胜肽或先前物的基因，這就是所謂的"退化啓動子方法"。利用一個退化啓動子的混合物在人類基因庫去提取和鑒定能夠與啓動子雜交而含有該胜肽序列的編碼的核苷酸。見參考如：Molecular Cloning：A Laboratory Manual by Joseph Sambrook and David W. Russell。

核苷酸編碼了這胜肽序列的是可以從這裏揭露的胜肽的序列推算出來。用於基因克隆的轉載子在這行業中是廣為人知的，這些轉載子可以是質粒體，亦可見於：Schumacher 等，美國專利號。6，190，906，標題為Expression Vector for the Regulatable Expression of Foreign Genes in Prokaryotes，2001年2月20日發佈。加之，細胞含有編碼這胜肽的核苷酸分子的轉載子是可以從這裏揭露的胜肽序列來推算出來。

例11

比較兩批Plaferon-LB胜肽的組成

2毫克的Plaferon-LB(PLB)(兩個不同生產批)溶解於純

水後用RP－HPLC來分析：

液相色層分析系統：HP附有二極體陣列的檢查器(Agilent)

液相色層分析柱：Alltech RP18，5μM

緩衝液A：水+ TFA 0.1%

緩衝液B：氰代甲烷 + TFA 0.1%

梯度：0 – 100%在25分鐘期間

注射樣本體積：100μl

所得的色層分離的圖譜結果見第9圖，如圖中所示，第2批的LAP的濃度較少，但各該峰的位置與第一批的都相同。胜肽的濃度已知反映在2批有稍微不同的鹽分含量。

但LAP在這兩次生產中都有相同的保留時間，且UV光譜證明LAP在這2批Plaferon-LB中都有同樣的胺基酸序列。

例12

不同生產工序中的Plaferon-LB胜肽成分

2毫克的Plaferon-LB(PLB)(最終產品)和生產中兩個工序(第一及第二階段工序)的中間產品溶解於純水後用RP－HPLC來分析如例11所述。所得到的色層分離圖譜，見第10圖。在第10圖中，LAP存在於每一工序中，但最終產品中只有少量的LAP。可能是因為在Plaferon-LB生產過程中採用的苛刻條件把部分Plaferon-LB打斷了。

例13 大量的LAP提純

從一批新的PLB製造來分離大量的LAP。

大小排斥色層分析法

35小藥瓶的Plaferon-LB溶解於3.5ml的0.9%NaCl液中，待溶解後，便在大小排斥色層分析柱SephadexG25(500 ml在XK50/30分析柱，緩衝液：10 mM 碳酸銨 pH 7.8，流速：20ml/min)

所得到的色層分析圖譜見第11圖，其中2個峰(低分子量及高分子量)的取樣作RP－HPLC分析(見第12圖)，如預期的結果，LAP在低分子量分離峰中被發現。含有低分子量的峰(藍＋黑箭頭所示)被收集作進一步的RP－HPLC色層分析。

逆相色層分析法

含有低分子量的分離物進一步用CG161逆相色層分析法分離。

基質：CG161M(TosaHass)20 ml 在HR16/20色層柱中

樣品：低分子量的P laferon-LB分離部份

緩衝液A：水＋0.1%TFA

緩衝液B：acetonitrile+0.1%TFA

梯度：0－100%B在87%分鐘間

流速：9ml/min

分離峰用人工收集後，冷凍乾燥儲存，第13圖顯示所得到的分析圖譜。

例14

LAP對LPS(脂多糖)-誘發的毒血症中風的效果

背景

內腹膜(i.p.)或靜脈(i.v.)注射一次高劑量(0.75-1.5mg)

從格蘭氏陰性細菌壁分離的脂多糖(LPS)會引致50%－100%小鼠毒血症中風，在3天內死亡，(見14-1至14-4)。這個結果被證明與第一類細胞因子急劇釋放到血流中有莫大關係，這情況是可以第二類細胞因子來拮抗。(見14－1至14－4)。藥物如有減低LPS誘導致死的能力，常與抑制第一類細胞因子的生成、或作用和提升第二類細胞因子有關(見14-1至14-5)，鼠科的LPS誘導致死因此成為一個活體的工具去篩選能夠下調第一類細胞因子的作用或提升第二類細胞因子的免疫抑制藥物，亦同時用以鑒定藥物作為防止及治療人類內毒素毒血症(見14-1至14-2)。

初步的試驗中顯示LAP的免疫調節作用對鼠類的LPS－誘發的死亡情況有良好的效果(見上面例3)，這裏的試驗補充和加強所觀察及評估的LAP對LPS-誘發的迴圈細胞因子增加的影響。小鼠在LPS注射前1小時或後1小時，注射10 mcg LAP顯示，處理小鼠死亡率明顯較控制組小鼠的死亡率為低。

此外，經處理過的小鼠血內TFN-α在LPS挑戰後2和8小時都明顯的降低，LPS-誘發的血內IFN－α和IL-10 水平不被LAP影響，當LAP只是在治療性給藥時，也就是只在LPS挑戰後，所減少的死亡率特別顯著。

材料和方法

動物

採用6週齡的雌性CD1小鼠(Charles River，Calco，Italy)，小鼠是在標準條件下自由進養及飲水。

血毒病中風的誘發和實驗性的治療

為了誘發致死性的內素毒血毒病，小鼠被i.p. 注射1 mg脂多醣(LPS，Cod.L600，lot 112K4063，Sigma Chimica，Milan，Italy)。設立了6組小鼠按表中所示的實驗計處理。由Lajor Biotech(Pittsburgh，PA，USA)提供的LAP溶解在0.1% v/v三氟化醋酸的水和磷酸氫鈉中，然後用i.p. 注射100 mcl。

LAP處理對LPS-誘發的血中TFN-α，INF-γ，和IL-10的效果

為了評估LAP-處理對LPS所引致的迴圈細胞因子提升的影響，而進行了實驗，把小鼠處理以10mcg LAP或載劑如前所述，然後在剛注射了不致死量的LPS(0.5mg/鼠)後便犧牲(T0，即此組小鼠只有一次LAP處理)和LPS處理後2和8小時(n＝10隻小鼠每一個時間點)每隻小鼠在犧牲的時候取血漿樣本。TNF-α，IFN-γ和IL-10都用小鼠特異性的固相ELISA根據製造商(Celbio Eurclone，Milan，Italy)的使用法去量度，量度的內在和之間的變異參數低於10%，而量度的敏感度為7pg/ml。對統計分析，樣品如不能檢出，則其細胞因子作7pg的理論值。

統計分析

統計分析中致死率是用chi一方執行，而細胞因子的量度是用單向ANOVA，當P值<0.05時作有意義。

結果：

LAP預防法明顯地減低LPS誘發的死亡

如預料的，載劑處理的控制組小鼠在注射LPS後72小時

內死亡，1 mcg或20 mcg LAP處理的小鼠表現動態性的和累積率性的死亡與控制組非常近似而與報行的療程無關。相反地，注射10mcg LAP的小鼠表現強烈的減低死亡，這劑量的LAP也同等地有效，無論對LPS注射在-24，-1h前或1h後(見表7和第14圖)。LAP如在LPS注射後1小時報行便不能表現可見的效果(見表8和第14圖)。

表8 實驗設計：LAP處理的時間及劑量對LPS誘發死亡的影響

處理	執行時間	劑量	72h 死亡率	P
載劑(n=16)	-24，-1h	0.1 ml	12/16(75%)	控制組
LAP(n=14)	-24，-1h	1 mcg	11/14(79%)	N.S.
LAP(n=14)	-24，-1h	10 mcg	2/14(14%)	P=0.003
LAP(n=14)	-1，+1h	10 mcg	2/14(14%)	P= 0.003
LAP(n=14)	-1，+1h	20 mcg	14/14(100%)	N.S.
LAP(n=14)	+1h	10 mcg	10/14(71%)	N.S.

在統計分析上每組都與載劑處理的控制組比較，統計分析是用chi一方執行。

LAP抑制LPS誘發的循環系統的TNF－α水平的增加

LPS注射是與血中第一類細胞因子(IFN-γ，TNF-α，IL-1)和第二類細胞因子(IL-10)的顯著上升有關，在毒素注

射後這些細胞因子出現不同的動態情況。為了評估LAP治療LPS誘發的小鼠循環的細胞因子上升所進行的實驗是用10mcg LAP或它的載劑而小鼠犧牲在臨注射不致死劑量的LPS前，在LAP或PBS處理1小時後(T0)，然後LPS處理2小時(T2)和8小時(T8)後。

在臨注射LPS前犧牲的控制組小鼠有可檢出的IFN-γ，TFN-α 和IL-10在血流中(見第15A-C圖)，雖然沒有IFN-γ或TNF-α在LAP處理的小鼠的血液中檢出，我們觀察到10只中的3只小鼠在接受了LAP在犧牲前1小時的血中可檢出IL-10(見第15A-C圖)。

在LPS注射後2-8小時可，在控制組小鼠中觀察到小鼠迴圈量的這些細胞因子有特別的改變，特別是TNF-α和IL-10的提前提升(T2)，跟著有較後(T8)的IFN-γ上升(見第15A-C圖)。相對於這些控制組小鼠，LAP處理的小鼠表現明顯的降低血中的TNF-α水平，同時，在LPS後2小時(37.3%降低相對控制組，P＝0.01)，亦在8小時(76.5%降低相對控制組，P＝0.005)。相反地，LAP處理並不改變血中的IFN-γ或 IL-10水平(見第15A-C圖)。

結論

目前的結果顯示在小鼠用LAP作為預防性使用(即在毒素注射前)，如劑量是10mcg，已可強力抵抗高劑量LPS的死亡效果，我們亦觀察到LAP處理過的小鼠明顯地比載劑處理的控制組有較低量的TNF-α量。相反地，LPS-誘發的IL-10或IFN－γ的血水平在LAP處理或載劑處理的小鼠中

都沒有明顯差異，但我們發現在10 mcg LAP處理1小時後，10隻中的3隻小鼠的血有可檢出的IL-10水平，而控制組的10隻中只有一隻可檢出。

因為內源性的TNF-α曾多次被證明在鼠類LPS誘發死亡中有主要的病理作用(見14-5)，LAP減低了LPS誘發的TNF-α合成。在這動物模式中，可能是無意地導致這有利的效果。

抑制TNF－α的合成可能是LAP最重要的免疫藥理作用，事實上，TNF-α曾確定的證明在數種人類的免疫發炎性和自身免疫疾病，包括了風濕性關節炎，Crohn's 病，牛皮癬和發炎性皮膚病。因此，LAP對TNF-α合成的拮抗作用可能是這胜肽的主要應用，以治療以上的或甚至其他TNF－α誘發的免疫病理情況。

我們相信這實驗的主要結果是LAP預防法成功作用在一個侵犯性的急性免疫發炎模式，例如LPS誘發的死亡中徹底的證明病理性(減低死亡率)和免疫病理性(減低了LPS誘發的血中TNF-α增加水平)。這給予強力的概念證明使用LAP在其他TNF-α和可能其他第一類的細胞因子作為主要致病作用的免疫發炎性或自身免疫性的疾病。

參考資料

14-1. Nicoletti F.，et al. Prevention and treatment of lethal murine endotoxemia by the novel immunomodulatory agent MFP-14. Antimicrob. Agents Chemother，45：1591，2001

14-2. Genovese F. , et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy , 40 : 1733 , 1996

14-3. Nicoletti F. , et al.Prevention of endotoxin-induced lethality in neonatal mice by interleukin-13. Eur. J. Immunol. , 27 : 1580 , 1997

14-4. Nicoletti F. , et al. Endotoxin-induced lethality in neonatal mice is counteracted by interleukin-10(IL-10)and exacerbated by anti-IL-10. Clin.Diagn.Lab. Immunol. , 4 : 607 , 1997

14-5. Scallon BJ , et al. Functional comparisons of different tumour necrosis factor receptor/IgG fusion proteins. Cytokine , 7 : 759 , 1995

14-6. Nahar IK , Shojaunia K , Marra CA , Alamgir AH and Anis AH. Infliximab treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease.Infliximab treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease.Ann.Pharmacother.37 : 1256 , 2003

14-7. Victor FC and Gottlieb AB. TNF-α and apoptosis : implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis : J. Drugs Dermatol. , 1 : 264 , 2002

14-8. Drosou A. , et al. Use of infliximab , an anti-tumor necrosis factor alpha antibody , for inflammatory dermatoses. J. Cutan. Med. Surg. , 7 : 382-386 , 2003

14-9. Li MC and He SH. IL-10 and its related cytokines

for treatment of inflammatory disease. World J. Gastroenterol. ，10：620，2004

例15

LAP在鼠類的ConA-誘發T細胞依賴的免疫發炎性肝炎的影響

背景

Con A-誘發的肝炎是細胞仲介的免疫性發炎情況和人類自身免疫性肝炎相似，用小鼠靜脈(i.v.)注射一次的Con A可以誘發這病(見15-1至15-9)，這病的特點是在Con A挑戰後血漿中在短時間內(8-24小吋)有明顯的升高轉氨酶，同時，肝臟有中性粒細胞，巨噬細胞和T細胞，跟著是肝細胞的凋亡和壞死(見15-1至15-9)。有人提出Con A注射刺激脾臟T細胞的遷移到肝臟而通過釋放穿孔素(perforin)和顆粒酶(granzymes)和活化巨噬細胞而損壞肝細胞(見15-1 至 15-9)。T細胞在這模式中的貢獻是被強調的，因為裸體去胸腺小鼠能抵抗Con A誘發的肝炎和使用針對T細胞的藥物如環孢子菌素A，FK506和梭鏈孢酸鈉有預防的效果(見15-1，15-2，15-5)。使用外源性注射的細胞因子和特異的細胞因子拮抗劑，聯同選用遺傳工程過的小鼠都清晰地證明各該細胞因子IL-4，IFN-γ，和 TFN-α都是發病過程中的基礎，而IL-6和IL-10下調節免疫發炎性的攻擊肝細胞(見15-1至15-3，15-6至15-9)。

Lajor活性胜肽(LAP，Lajor Biotech，Pittsburgh，USA)是一種負有免疫調節性質的胜肽分子，如我們已證明的能夠抵抗脂多醣(LPS)誘發的小鼠死亡，因為後者模式中是已

知依賴TNF-α和用LAP處理明顯減低血LPS誘發的血中TNF-α和用LAP處理明顯減低血LPS-誘發的血中TNF-α的增加，這些觀察促使我們試驗LAP對齧齒類Con A誘發肝炎發展的預防性效果。

結果顯示Con A挑戰後8小時在PBS處理的控制小鼠明顯的增加轉氨酶的活性，而使用短暫的LAP預防性處理便有效地降低。

材料和方法

動物

8週齡遠親交配的CD1雄性小鼠(Charles River，Calco，Italy)在標準實驗室條件下飼養(無非特殊致病原體)在24℃及自由取食物和水，實驗前16小時禁食。

肝炎的誘發

Con A(Sigma Chemical，St. Louis，MO)溶解於滅菌的磷酸鹽緩衝液(PBS)中，注射入尾靜脈，在Con A處理前1小時或後1小時，一組鼠用LAP(溶解體積/體積在TFA 0.1%在水和Na_2HPO_4，然後以水稀釋作注射用)處理，或是它的載劑。還有一組是控制組，接受Con A注射但沒有處理。最後一組鼠亦包括在內作比較，一組i.v.注射PBS用，另外一組沒有處理(表8)。LAP，它的載劑，PBS及Con A全部注射後容積都是100 mcl。動物在Con A注射後8小時犧牲以收集血樣本，這時肝損壞的生化和病徵(轉氨酶增高)都很明顯(15-1至15-9)犧牲前已經死亡的小鼠不計在內(表8)。

轉氨酶活性測定

血漿內的丙胺酸轉胺酶(ALAT)活性用標準的測量試驗檢定方法，採用雙光束分析儀量度。結果是用u/L表示。

統計分析

結果是用平均值±SD表示。統計分析是採用單向ANOVA，當血中的ALAT量對比控制組產生的P值最少低於0.05，LAP的效果是考慮為有意義的。

結果

LAP預防法強勁的減低ConA誘發的ALAT增加

如預料的，PBS i.v.注射後8小時，血中的ALAT活性值與沒有挑戰的正常小鼠非常接近(見表9和第15圖)。相反地，載劑處理的控制組在Con A處理8小時後，血中ALAT活性有明顯的增加(見表9和第15圖)，這增加被LAP短暫預防性療程顯著地減低，如此處理的小鼠在Con A 8小時後表現的ALAT活性較控制組還顯著的低(84.7%減低)(見表9和第15圖)。

表9　　LAP減低Con A誘發的ALAT活性

處理	Con A	PBS	ALAT 值	致死率
Nil(n=15)	+	-	4534±831a	2/15
載劑(n=15)	+	-	4227± 693	3/15
LAP(n=15)	+	-	686±197b	1/15
Nil(n=15)	-	+	34± 12	0/15
Nil(n= 10)	-	-	28± 10	0/15

討論

我們在這介紹一個短預防性LAP處理引致血中的ALAT比載劑處理的控制組的為明顯的減低。因為轉氨酶的

上升在這模式中是緊密地關係到組織病徵的肝受到滲透的T細胞，巨噬細胞和中性粒細胞的損壞(見15-1至15-5)，這結果強力地建議LAP預防法有強勁的預防性效果去控制Con A誘發的肝炎病程中的血清和組織學病徵。

這裏報告的發現加深了在LPS誘發的小鼠死亡所觀察到的LAP在急性細胞介入的免疫性發炎的模式的有利的抗發炎效果。加之，在後者的模式中LAP清晰的抑制TNF-α合成的能力，連同這細胞因子在Con A誘發肝炎的主要病原功能(見15-3)，說明拮抗TNF-α的產生應該也參與LAP的抗肝炎效果。這裏證明的LAP預防性功能應在臨床使用上有重要的啟示。例如，自身免疫性的肝炎病者在自然和藥物誘發的緩解期間可以給予LAP使用以防止病情再惡化，也可用於預防在B型肝炎病毒感染後肝臟的免疫性發炎事件和這些事件所引起 的疾病慢性化和肝硬化的病變。

參考資料

15-1. Tiegs G.J. et al. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. J. Clin. Invest.，90：196，1992

15-2. Mizuhara H.，et al.，T-cell activation-associated hepatic injury ：mediation by tumor necrosis factor and protection by interleukin-6. J. Exp. Med.，179：1529，1994

15-3. Gantner F. ， et al. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice：the role of tumor necrosis factor. Hepatology，21：190：1995

15-4. Watanabe Y. et al. Concanavalin A induces perforin-mediated but not Fas-mediated hepatic injury. Hepatology 24 : 702 , 1996

15-5. Nicoletti F. , Beltrami B. , Raschi E. , Di Marco R. , Magro G. , Grasso S. , Bendtzen K. , Fiorelli G. , Meroni PL. Protection from concanavalin A(ConA)-induced T cell-dependent hepatic lesions and modulation of cytokine release in mice by sodium fusidate.Clin.Exp. Immunol. , 110 : 479-484 , 1997

15-6. Xiang M. , Zaccone P. , Di Marco R. , Magro S. , Di Mauro M. , Beltrami B. , Meroni PL. , and Nicoletti F. Prevention by rolipram of concanavalin A-induced T-cell dependent hepatitis in mice. Eur. J. Pharmacol. , 367 : 399-404 , 1999

15-7. Di Marco R. , Xiang M. , Zaccone P. , Leonardi C. , Franco S. , Meroni PL. , and Nicoletti F. Concanavalin A-induced hepatitis in mice is prevented by Interleukin(IL)-10 and exacerbated by endogenous IL-10 deficiency. Autoimmunity , 31 : 75-83 , 1999

15-8. Nicoletti F. , et al. , Essential pathogenetic role for intereferon(IFN)-γin Concanavalin A-induced T cell dependent hepatitis : Exacerbation by exogenous IFN-γ and prevention by IFN-γreceptor Immunoglobulin fusion protein. Cytokine , 12 : 315-323 , 2000

15-9. Nicoletti F.，Di Marco R.，Zaccone P.，Salvaggio A.，Magro G.，Bendtzen K.，and Meroni PL. Murine concanavalin A-induced hepatitis is prevented by interleukin(IL)-12 antibody and exacerbated by exogenous IL-12 through an interferon-γ-dependent mechanism. Hepatology，32：728-733，2000

例16

Lajor活性胜肽(LAP)在不肥胖糖尿病(NOD)小鼠自身免疫性糖尿病的發展

物料和方法

雌性NOD小鼠(Charles River，Calco，Italy)在標準實驗室條件下飼養(無非持殊致病原)在24℃及自由取食物和水。小鼠在糖尿病病發期間，每週2次檢查糖尿，如遇上陽性反應，即量度血糖，小鼠如有連續二天檢得空腹血糖超過12mmol/L，即診斷為患糖尿病。

實驗處理

雌性真高血糖的NOD小鼠隨機地分為不同的4個組別從第4週齡開始直至第12週齡分別接受LAP或載劑。因為胰腺炎在第4週齡的NOD小鼠是基本上不存在的，而是在12週齡仍活躍地不斷發展著。這方法讓我們研究LAP處理對NOD糖尿病的早期和晚期的糖尿病病發過程。早期預防性的處理的結果是用以評估LAP在胰腺炎病程的早期發展，而晚期的預防性處理是要評估LAP對臨床明顯的糖尿病的影響。

早期預防法

作早期預防性處理的4週齡NOD小鼠用10mcg LAP(溶解及稀釋為[100 mcl，最後容積]如例14和15所述)或100 mcl載劑每天處理，每週6次直至14週齡，到這時間，真血糖的小鼠被犧牲而收集胰臟樣本作胰腺炎的組織學檢查。

晚期預防法

作晚期預防性處理的12週齡NOD小鼠是隨機地分為2個實驗組別，一組用LAP處理，另一組用載劑處理，實驗方法如早期預防法所述，處理將會繼續。

組織學檢查胰臟胰島腺

組織學檢查胰島腺是由二位病理學家在不知小鼠情況和處理的盲目態度下進行，正如前所述(見16-3至16-5)。單核細胞的內滲透情況以下列各項記分：0＝未被滲透，1＝管外及週圍滲透，2＝腺體週圍滲透，3＝腺體內部滲透，4＝腺體間的滲透伴有Β-細胞破壞。每隻小鼠最少檢查12個胰島腺。每個脾臟的平均記分是總記分除以觀察過的胰島腺數目。

結果

LAP沒有毒性

從長期由4週齡或12週齡至25週齡注射LAP的NOD小鼠所表現的病理和行為未判斷，NOD小鼠顯示對本藥物有良好的容忍情況。此外，在整個試驗期間LAP處理的動物的體重與控制組的都差不多。在被犧牲作組織學分析的第14週齡完成試驗的小鼠中，血內氮含量和轉氨酶活性值都

沒有觀察到任何差異(結果未出示)。第17A圖顯示長期使用(14-15週)LAP對NOD小鼠的體重增加沒有影響。

早期的LAP預防處理減低NOD小鼠的胰腺炎嚴重性

使用載劑的8隻NOD小鼠中2隻(25%)在試驗完結前的14週齡患有糖尿病，這2隻小鼠因此被犧牲而未包括作組織分析。LAP處理過的NOD小鼠在處理期間都未患上糖尿病，與LAP的早期預防處理的明顯治療有利效果也一致的觀察到LAP處理小鼠的胰腺炎記分是明顯地低於載劑處理的控制組(0.9±0.6對2±0.9，p=0.018)(見第17B圖)。

結論

我們在這顯示早期預防性治療對4週齡的NOD小鼠連續處理10天的治療，明顯的減低了胰腺炎過程的嚴重性，這個組織學上的效果可能說明治療效能的結論是本於沒有一隻14週齡的小鼠接受LAP治療而患糖尿病，而控制組8隻中便有2隻。

參考資料

16-1. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogensis of insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Metab. Rev.，14：129，1998

16-2. Bach JF. Immunotherapy of type 1 diabetes：lessons for other auto-immune diseases. Arthritis Rheum.，4 Suppl 3：S3-15，2002

16-3. Nicoletti F et al. Fusidic acid and insulin-dependent diabetes mellitus.Autoimmunity 24：187，1996

16-4. Nicoletti F et al The effects of a nonimmunogenic form of murine soluble interferon-g receptor on the development of auto-immune diabetes in the NOD mouse.Endocrinology，137：5567-5575，1996

16-5. Nicoletti F et al. Early prophylaxis with recombinant human Interleukin-11 prevents spontaneous diabetes in NOD mice. Diabetes，48：2333-2339，1999

例17

PLB治療萊什曼原蟲病的使用

PLB被發現可能對萊什曼原蟲病的患者有陴益的效果。在這具體化實施例中的患者是一隻動物。

材料和方法

按表10指示的劑量和時間皮下注射PLB到一群有10隻狗表現著萊什曼原蟲病的臨床症狀(有外周淋巴結病和一個高程度的皮膚病變，主要地表現有瘡和出血性潰瘍且損失物質，食欲減退和減重)而導致症狀大部份的減少。

結果和結論

在治療期間沒有觀察到不利的效果。這些結果証明PLB在完全安全的情況下治癒萊什曼原蟲病的臨床症狀。

處方以溶液或混懸劑的形式而選擇用10毫升的消毒水溶劑用非胃腸特別是皮下或肌內的途徑給予蒙受萊什曼原蟲病的患者，直到症狀消失或大部份的減少。

表10.對狗的萊什曼原蟲病的臨床症狀的PLB藥量和藥量使用

病者的重量 <10 公斤	1 小玻璃瓶/皮下用 6 天 第7日：休息 1 小玻璃瓶/皮下用 另6天
病者的重量 >10 公斤	如上方，但是加倍劑量：2個小玻璃瓶/每日

例18

PLB的化妝應用

為了確定PLB的抗皺性能，全部共200名婦女都給予PLB羊脂基本的美容軟膏14天，右邊臉使用而左邊臉作為對照，參與的美容師都報告有顯著的改善，所有這200名婦女其後都使用PLB-羊脂膏，塗在右邊臉使臉部有平均的結果，另外，最少有50人在美國、歐洲及亞洲測試。

一個濕潤的精華霜和一個較濃的"血清"含有PLB或有本發明所述的合成的胜肽或蛋白加上美容用的載劑或一個如下所述的添加劑(A)或(B)。

這群人都有多種的膚色、皺紋、蟲咬(敏感性反應類似蜂叮和常春藤毒素)牛皮癬，第一度及第二度皮膚燒傷、外傷(創傷)太陽和UV暴曬，帶狀疱疹(帶狀疱疹病毒)和紅斑狼瘡病，糖尿性潰瘍，皮膚移殖有關的紅疹。這霜與血清都改善了幾乎每一個受到破壞的皮膚的外觀和情況。

加之，還有報導灰和白色頭髮，在有血清處理後重現原有發色。

添加劑(A)：純水，甘油化硬脂酸鹽(和)Laureth 23，甘油，乙醯化單甘油，椰子油，蘆薈葉汁，紅花油，硬脂的酸，油的酸，精蠟醇酒精，礦物油，羊毛脂，Laureth 16，生育酚醋酸鹽(維他命 E)，丙烯乙二醇(和)，對羥基苯甲酸甲酯(和)對羥基苯丙酸甲酯(和)Diazolidinyl 尿素，荷荷芭油，Carbomer，PLB，棕櫚酸視黃酯(維他命A)，三乙醇胺，芬芳劑，2，6一二叔丁基對甲酚。

添加劑(B)：純水，PLB，聚丙烯醯胺 C13 -C14(和)異鏈烷烴(和)Laureth 7，丙烯乙二醇，異丙基酒精，甘油，二甲聚矽氧烷，鉀氫氧化物，Diazolidinyl 尿素，碘丙基丁烷基氨基甲酸酯，芬芳劑。

例19

作用的機制

可能的機制包括特異的抑制組織蛋白酶-S，而降低第2類MHC分子粘合抗原胜肽分子的能力，從而減低了抗原胜肽通過第2類MHC分子呈遞資訊，且抑制免疫反應，調節TFN-α量的增或減，從而調節凋亡，籍著修復在粒腺體的呼吸鏈和通過磷酸脂酶-A2的抑制施行。

例20

PLB抗產生畸形胎兒的試驗

由環磷醯胺所引致的畸形胎兒的機制包括激發性凋亡。

PLB對凋亡強度的影響是用TUNEL的方法去研究小鼠胎兒的腦袋，實驗共有3組動物：

A組：不處理，控制對照(12只動物)

B組：只有CP處理(18只動物)

C組：CP處理及(18只動物)

B和C組的懷孕小鼠在妊娠期12日i.p.注射CP(15 mg/Kg)Plaferon-LB(0.8 mg/Kg)用相同途徑給予C組3次：在CP注射前1小時，之後3小時和6小時，在妊娠期18日動物便犧牲，而胎兒被收集和研究。

這實驗發現PLB處理比只處理CP組降低了小鼠胎兒腦袋種的凋亡，因此給予了抗畸胎的效果。

從3組胎兒的腦袋的5-6μm的切片，用TUNEL方法染色，其中黑點代表凋亡，見第19圖(A)-(C).(A)控制組(設有處理)(B)只有CP處理(C)CP＋PLB處理。A組的胎兒沒有畸形，B組的有64.8%畸形，而C組只有11.2% 畸形，B組動物(只有CP)代表典型的畸形，譬如：缺趾畸形併發症(肢體的不正常)，兔唇，曲尾，體重輕(見第19D圖)。

C組動物用CP和PLB處理未出現畸形和看來有正常的體重和體積(見第19E圖)。

參考資料

1. Bakhutashvili A，Chikovani T，Bakhutashvili V，Imedidze E. Immunopharmacology of preparation Plaferon-LB. Intern J Immunorehab 1994；1(S)：44.

2. BakhutasBhvili A，Cheishvili N，Chikovani T，Bakhutashvili V. Plaferon LB - a new immunodilatory drug. Abstracts XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology，Madrid，Spain，25-30 June 1995. Europ J Allergy

Clin Immunol 1995；50(26)：9. Abstract # OC-009.

3. Bakhutashvili A，Jaguzhinsky L，Bakhutashvili I，Kadagidze Z，et al. Amnion apoptosis modulator. Int J Immunorehab 2001，3(2)：17-22.

4. Bakhutashvili V，Bakhutashvili A，Chikovani T，Cheishvili N. Immunomodilatory activity of Plaferon-LB. Georg Symp Project Development and Conversion；Collection of Reports 1995；189-191.

5. Bakhutasvili V，Chikovani T，Rukhadze R. The perspectives of a new immunomodulator Plaferon LB in endocrynologic practice. Proceedings of Tbilisi State Medical University 1996；32：21-23.

6. Bakhutashvili V，Malashkhia V，Mikeladze D，Chikhladze M，Malashkhia Y，Bakhutashvili A. Impact of Plaferon-LB upon drug-resistant forms of epilepsy. Int J Immunorehab 1996；3：28-37.

7. Bakhutashvili V，Javakhishvili N，Tsagareli Z，Kipshidze N. Cardioprotective effects of Plaferon LB in a canine model. The J Heart Failure 1997 May；4(1)：38. Abstract #151.

8. Bakhutashvili V，Gagua M，Garishvili T，Gelashvili L，Kharebava G，Kvaratskhelia E，Menteshashvili A. Human placenta antioxidant compounds of peptide nature. 11th International Symposium on Atherosclerosis，Paris 1997 October 5-9，Int J Res Invest on Atherosclerosis and Related Diseases

October 1997； 134(1-2)：199.Poster # 3.P.4.

9. Bakhutashvili V，Chikovani T，Bakhutashvili I，Cheishvili N，Kukuladze N，Bakhutashvili A. Some pharmacological characteristics of Immunomodulator Plaferon-LB. 10th International Congress of Immunology in New Delhi，1998 Nov 1-6； The Immunologist 1998 Suppl 1：586.

10. Bakhutashvili V，Shakarishvili R，Geladze T，Tatishvili N，Bakhutashvili A，Cheishvili N，Chikovani T，Sobera LA. Drugs of the Future 1999； 24(9)：974-977.

11. Bakhutashvili V，Telia D，Katsarava V. Use of Plaferon-LB and cromoglycate in patients with symptomatic asthma. Int J Immunorehab 1999； 11：214-215.

12. Bakhutashvili V，Pagava K，Telia A，Jorjoladze N，Kokaia L，Alavidze M，Kvachadze L. Bronchotropic effect of Plaferon-LB. Int J Immunorehabilitation 1999； 5：51-53.

13. Bakhutashvili V，Chikovani T，Bakhutashvili A，Dolidze T，Nanava N，Kvitaishvili G. Dynamics of some immunological indices in case of Plaferon-LB therapy. Europ. J. Allergy and Clin Immun 1999； 54(52 S)：77. Abstract # P37.

14. Bakhutashvili V，Chikovani T，Bochorishvili T，Metreveli D，Pavliashvili D. Results of treatment of acute B hepatitis by Plaferon LB. Bulletin of Georgian Academy of Science，Biology Series 1999 25(1-3)：21-23.

15. Bakhutashvili V，Bakradze I，Aladashvili A. Impact of

perioperational immunotherapy upon nonspecific resistance and specific immune status in patients with bowel cancer and upon frequency and spectrum of complications in nearest postoperative period.Int J Immunorehab2000；2(2)：4. Abst# 3.

16. Beridze M.Effect of Plaferon-LB on several clinical and neuroimmunological indices.Georgian MedNews1998；6(39)：27-30

17. Beridze M，Malashkhia V，Bakhutashvili V. Neuroprotective action of immunomodulator Plaferon-LB. Int J of Immunorehab 1999； 14：114. Abstract # 15.

18. Chavchanidze D，Hvadagiani G，Kalmahelidze V，Sulhanishvili V，Stepina J，Bakhutashvili V，Managadze L.Protective effect of Plaferon LB preparation on acute ischemic renal injury in experiments.Arch Urologium Belgrade1989；30：45-51.

19. Chavchanidze D，Sanikidze T，Sulkhanishvili V，Bakhutashvili V，Managadze L. Changes of blood paramagnetic centers under the influence of shock waves on kidneys and membrane-protector effect of Plaferon-LB in experiment. Bull Georgian Academy of Sciences 1998；158(2)：332-35.

20. Chavchanidze D，Sanikidze T，Bakhutashvili V，Managadze L. Determination of traumatic influence of shock waves and membrane-protecting effects of Plaferon-LB on the renal parenchyma during extracorporeal lithotripsy in experiment.

Proc Georgian Acad Sci ; Biol Ser 1998 ; 24(1-6) : 53-59.

21. Cheishvili N , Kukuladze N , Bakhutashvili A , Bakhutashvili V. Effect of Plaferon-LB on proliferative activity of human periferal blood mononuclear cells and murine splenocytes. Reports of Georgian Acad Science 1994 ; 150(1) : 142-143.Ch

22. Chichua G , Sanikidze T , Bakhutashvili V. Correction of the induction of nitric oxide synthesis and free radical reactions in experimental model of vitro-retinopathy by Plaferon-LB. Aller & Immunol 2(1) : 155-161.

23. Chikovani T , Cheishvili N , Bakhutashvili A , Bakhutashvili V. The influence of Plaferon LB on synthesis of interleukins. Int J Immunorehab 1996 ; 3 : 96

24. Chikovani T , Cheishvili N , Pirtskalava T , Pantsulaia I , Bakhutashvili V. Plaferon LB as a blocker of neurotoxic effect of glutamate. Int. J Immunorehab 1997 ; 5 : 46.

25. Chikovani T , Cheishvili N , Pantsulaia I , Bakhutashvili V. Immunopotential activity of Plaferon LB fractions. Int J Immunorehab 1998 ; (9) : 5.

26. Chikovani T , Pavliashvili D , Bakhutashvili V. Different ways of therapy by Plaferon LB in patients with acute B viral hepatitis. Abstracts of International Falk Workshop , New Aspects in Hepatology and Gastroenterology ; May 29-30 , 1998 ; Tbilisi , Georgia. Abstract # 52.

27. Chikovani T，Cheishvili N，Pantsulaia I，Bakhutashvili V，Bakhutashvili A. Immunologic study of human amniotic factor. Eur J Allergy Clin Immun； 1999； 54(52 S)：89. Abstract # P81.

28. Chikovani T，Rukhadze R，Bakhutashvili V，Sanikidze T，Pantsulaia I. Antioxidant action of immunomodulatory drug Plaferon LB in experimental thyroid pathology. Int J Immunorehab 1999； 12(S)：14-18.

29. Dolidze C，Gelovani M，Bakhutashvili V，Chikovani T. Antirelapse effect in case of idiopatic nephropathy syndrome in children. Bull Acad Sci Geo 1992； 145(1)：209-11.

30. Gagua M，Russia L，Kupatadze R，Simonidze M，Bakhutashvili V. Investigation of polipeptide contents of Plaferon LB. Bulletin of Acad of Sci of Georgia 1996； 3(153)：450-452.

31. Gagua M，Dzidziguri D，Bakhutashvili V. Influence of Plaferon LB on the transcriptional activity of regenerating liver and kidney cells. International-European A.I.R.R. Conference； Tbilisi，1999 Oct 4-9；Collection of reports：11.

32. Gagua M，Dzidziguri D，Mikadze E，Rukhadze M，Bakhutashvili I，Bakhutashvili V. Effect of Plaferon LB on morpho-functional activity of hepatocytes under conditions of hormonal disbalance in white rats. Bulletin of Georgian Acad of Sci 1999； 160(3)：56-68.

33. Germanashvili T，Pavliashvili N，Sanikidze T，Bakhutashvili V. Thymic paramagnetic centers changes during

crush syndrome of limbs and its correction with Plaferon-LB. Exper & Clin Medicine 2000；1：30-33.

34. Gongadze M，Chicovani T，Sanikidze T，Bakhutashvili V. Effect of Plaferon-LB on LPS-induced synthesis of nitric oxide. Int J Immunorehab 2001；3(3)：158-159.

35. Gongadze M，Chicovani T，Sanikidze T，Bakhutashvili V. Correction of LPS-induced synthesis of nitric oxide. Bulletin of Georgian Acad of Sci 2002；166(2)：311-313.

36. Gurgenidze G，Chogovadze M，Bakhutashvili V. Plaferon-induced in vitro inhibition of mitogen-activated T-lymphocyte proliferation in steroid-resistant asthmatic patients. Trans-Caucasian J Immunology 1999；1(2)：12-19.

37. Johnson DW，Kipshidze N，Javahishvili N，Zagareli Z，Bakhutashvili V. Cardioprotective effects of Plaferon-LB in canine model. First International Congress on Heart Disease-New Trends in Research，Diagnosis and Treatment；Washington DC，USA；1999 May16-19；Abstract # 30.

38. Macharadze D，Bakhutashvili V，Fedotova E. Plaferon-LB in immuno-rehabilitation of chidren with bronchial asthma. Int J Immunorehab 1998；8：67. Abstract # 249.

39. Maisuradze E，Garishvili T，Bakhutashvili V. Inhibition of Bee Venom Phospolipase A2 activity by Plaferon LB. Bulletin of the Georgian Academy of Sciences 1998；157，(2)：317-319.

40. Malashhia Y，Beridze M，Bakhutashvili V.

Immunomodulator Plaferon Lb in the treatment of acute stroke. Int J Immunorehab 1999；12：161-165.

41. Metreveli D，Bakhutashvili V，Bochorishvili T，Jamutashvili M，Gingolava M. Influence of Plaferon-LB on clinical course of Hepatitis and Laboratory Data in Children.International Falk Workshop-New Aspects in Hepatology and Gastroenterology；May 29-30，1998；Tbilisi，Georgia.Abst# 195.

42. Metreveli D，Bakhutashvili A，Chikovani T，Pavliashvili D，Bakhutashvili V. Long term results of treatment of B hepatitis with Plaferon LB. Int J Immunorehab 1999；12：43. Abstract # 169.

43. Mikeladze D，Djanashia N，Djanashvili C，Bakhutashvili V. Influence of Plaferon upon main excitatory and inhibitary neurotransmitters of brain. Tbilisi 1995；332-337.

44. Mitagvaria N，Bakhutashvili V，Sanikidze T，Nebieridze M，Pipia N. Plaferon-LB prevents development of cerebral infarction after photochemically induced thrombosis in rats. Georgian J Neurosci 2001；1：13-25.

45. Nadareishvili Z，Malashkhia Y，Bakhutashvili V. Plaferon in the treatment of herpes zoster ganglioneuritis in intravenous drug users. Int Conf AIDS，Berlin 1993，June 6-11；9(1)：344. Abstract # PO-B08-1254.

46. Nakashidze I，Rukhadze R，Chikovani T，Bakhutashvili

V. Influence of Plaferon-LB on structural changes in kidney during experimental traumatic shock. 2001 ; Proceedings of the Black Sea Countries III International Conference "Advances of Clinical and Theoretical Medicine and Biology" : 174-175.

47. Nakashidze I , Rukhadze R , Chikovani T , Bakhutashvili V. Influence of Plaferon-LB on structural changes in myocardium during experimental traumatic shock. 2000 ; Tbilisi State Medical University , Collection of Scientfic Works Volume XXXIV : 329-332.

48. Nakashidze I , Chikovani T , Gamkrelashvili D , Bakhutashvili V. Oxidation process correction in blood of patients with traumatic shock. Georgian Medical News 2002 ; 86(5) : 94-98.

49. Pantsulaia I , Chikovani T , Ruhadze R , Sanikidze T , Bakhutashvili V. The impact of Plaferon-LB on changes in immune organs caused by acute experimental hyperthyroidism. Proceedings of the 4th Republic Scientific Practical Conference , Kutaisi , 1998 May 31 ; Collection of reports : 24.

50. Pantsulaia I , Chikovani T , Cheishvili N , Garishvili T , Kharebava G , Bakhutashvili V , Zhgenti M. Alteration of lymphocytes' proliferative activity in vitro under the influence of plaferon LB fractions. Proc Georgian Acad Sci , Biology Series 1999 ; 25(1-6) : 75-79.

51. Pantsulaia I , Cheishvili N , Kukuladze N , Jgenti M ,

Chikovani T. Influence of PlaferonLB on proliferative activity of splenocytes in iexperimental hyper- and hypothyroidism. Int J Immunorehab 2000；2(2)：49.Abst # 157.

52. Pantsulaia I，Pkhakadze E，Cheishvili N，Chikovani T，Jgenti M. Influence of Plaferon LB on the course of moderate periodontitis. Int J Immunorehabilitation 2000；2(2)：89. Abstract # 294.

53. Pavliashvili D，Chikovani T，Metreveli D，Sanikidze T，Bakhutashvili V. Influence of sublingual administration of Plaferon-LB on metabolic disorders in viral B hepatitis. Georgian Med News 1999；9(54)：65-67.

54. Ruhadze R，Sanikidze T，Bakhutashvili V，Chikovani T，Pantsulaia I，Jgenti M. Influence of plaferon LB on metabolic disorders in liver during experimental hyper-thyroidism.Proc Georg Acad Sci，Biol Ser1998；24(1-6)：333-7.

55. Ruhadze R，Sanikidze T，Bakhutashvili V，Chikovani T，Nikoleishvili L，Pantsulaia I，Jgenti M. An interim report on the effect of Plaferon LB on metabolic changes in myocardium during experimental hyperthyroidism. Proc Georgian Acad Sci，Biol Ser 1998；24(1-6)：339-343.

56. Ruhadze R，Sanikidze T，Ciqovani T，Bakhutashvili V. Influence of Plaferon LB on some indices of liver mitochondria during experimental hyperthyroidism. Georgian Medical News 1999；2：7-9.

57. Ruhadze R，Chikovani T，Bakhutashvili V，Sanikidze T，Metreveli D，Pantsulaia I，Balarjishvili M. The impact of Plaferon LB on the metabolism of nitric oxide(NO)in thyrotoxicosis.Bull Georg Acad Sci 1999； 160(3)：580-582.

58. Ruhadze R，Chikovani T，Pantsulaia I，Bakhutashvili V. The influence of Plaferon LB on several splenic morphometric indices during experimental hyper- and hypothyroidism. Int J Immunorehab 1999； 14：117. Abstract # 76.

59. Ruhadze R，Chikovani T，Bakhutashvili V，Sanikidze T，Metreveli D，Pantsulaia I，Balarjishvili M. Influence of Plaferon LB on the metabolism of nitric oxide in hypo-thyroidism. Bull Georg Acad Sci； 2000，161(1)：156-158.

60. Ryazantzeva S，Visotskaja I，Ermilova V，Bakhutashvili V. Immunomorphological changes in breast cancer as a result of preoperative administration of immunomodulator Plaferon. Herald of Oncology National Center，Russian Academy of Science； Clinical Investigations 1999； 4：37.

61. Shakarishvili R，Sanikidze T，Mitagvaria N，Beridze M，Mikeladze D，Bakhutashvili V. The role of oxygen and nitrogen reactive species in pathogenesis of ischemic stroke. Report on Scientific Session of NATO，Tbilisi，Georgia，October 2001.

62. Sulkhanishvili V，Bakuradze V，Amiridze G，Chigogidze T，Bakhutashvili V. The Effect of Plaferon-LB on local kidney blood flow in acute hemorrhage and septicemia in experiment.

Georgian Medical News 2002 ; 86(5) : 22-24.

63. Tatishvili N , Bakhutashvili V , Simonia G. Local use of Plaferon-LB in rheumatology. Int JImmunorehab1999 ; 12 : 81. Abst#303.

64. Telia À , Bakhutashvili V , Jorjoladze N , Kvachadze L. Use of Plaferon LB in children with bronchial asthma. Int J Immunorehab 1997 ; 7 : 139.

65. Telia À , Bakhutashvili V , Kokaia L , Jorjoladze N , Kvachadze L , Alavidze M. Preventive effect of Plaferon LB on hystamine-caused bronchial obstruction in guinea pig. Int J Immunorehab 1998 ; 9 : 28

66. Telia À , Bakhutashvili V , Kokaia L , Alavidze M , Pagava K , Jorjoladze N , Kvachadze L. Plaferon LB as an alternative preparation for treatment of bronchial asthma in children. Int J Immunorehab 1998 ; 10 : 165-167.

67. Telia À , Katsarava V , Bakhutashvili V. Impact of Plaferon LB on bronchial and alveolar cell count and ventilatory function in patients with asthma.Int.JImmunorehab1999 ; 12(S) : 24

68. Telia À , Bakhutashvili V , Kokaia L , Alavidze M , Kvachadze L.Comparison of effect of Plaferon LB and chromglycate in adults with bronchial asthma.Int JImmunorehab1999 ; 12 : 164-5.

69. Olsson T. Critical influences of the cytokine

orchestration on the outcome of myelin-antigen specific T cell autoimmunity in experimental auto-immune encephalomyelitis and multiple sclerosis. Immunol. Rev. , 1995 , 144 ; 245-268.

70. Lorentzen JC. , Issazadeh S. , Storch M. , Mustafa MI. , Lassman H. , Linington C. , Klareskog L. , and Olsson T. Protracted , relapsing and demyelinating experimental auto-immune encephalomyelitis in DA rats immunized with syngeneic spinal cord and incomplete Freund's adjuvant. J. Neuroimmunol. , 1995 , 63 : 193-205.

71. Issazadeh S. , Lorentzen JC. , Mustafa MI. , Hojeberg B. , Mussener A. , and Olsson T. Cytokines in relapsing experimental auto-immune encephalomyelitis in DA rats : persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transfroming growth factor-b. J. Neuroimmunol. , 1996 , 69 : 103-115

72. Bendtzen K. Interleukin-1 , interleukin-6 and tumour necrosis factor in infection , inflammation and immunity. Immunol. Lett. , 1988 , 19 : 183-192

73. Rabinovitch A.An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. Diab.Metab.Rev. 1998 , 14 : 129-51

74. Ohlsson K. , Bjork P. , Bergenfeldt M. , Hageman R. , and Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from septic shock. Nature(Lond) , 1990 , 348 : 550-

75. Alexander HR. , Doherty GM. , Buresh CM. , Venzon DJ. , and Norton JA. A recombinant human receptor antagonist to interleukin-1 improves survival after lethal endotoxaemia in mice. J. Exp. Med. , 173 : 1029

76. Mattner F. , Ozmen L. , Podlaski FJ. , Wilkinson VL. , Presky DH. , Gately MK. , and Alber G. Treatment with homodimeric interleukin-12(IL-12)p40 protects mice from IL-12-dependent shock but not from tumour necrosis factor alpha-dependent shock. Infection and Immunity , 1997 , 65 : 4734-4737

77. Ashkenazi A. , Marsters SA. , Capon DJ. , Chamow SM. , Figari IS. , Pennica D. , Goeddel DV. , Palladino MA. , and Smith DH. Protection against endotoxin shock by tumor necrosis factor receptor immunoadhesion.Proc.Natl.Acad.Sci.1991 , 88 : 1035-39

78. Heinzel FP. The role of IFNgamma in the pathology of experimental endotoxemia. J. Immunol. , 1990 , 145 : 2920-2924

79. Tiegs G. , Hentschel J. and Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. J. Clin. Invest. , 1992 , 90 : 196-203

80. Gantner F. , Leist M. , Lose AW. , German PG. , and Tiegs G. ConcanavalinA-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice : The role of tumor necrosis factor. Hepatology , 1995 , 21 : 190-198

81. Mizuhara H. , O'Neill E. , Seki N. , Ogawa T. , Kusunoki

C. , Otsuka K. , Satoh S. , Niwa M. , Senoh H. , and Fujiwara H. T cell activation-associated hepatic injury : mediation by tumor necrosis factor and protection by interleukin 6. J. Exp. Med. , 1994 , 179 : 1529-1537

82. Holmdahl R. et al. , Immunology , 1992 , 76 : 197-202

83. Svelander L. et al. , Immunology , 1997 , 91 : 260-265

84. Mussener A. Scand. J. Immunol. , 1995 , 42 : 128-134

85. Bach JF. Endocr. Rev. , 1994 , 15 : 516-542

86. Rabinovitch A. Diab. Metab. Rev. , 1988 , 14 : 129-151

87. Rossini AA. et al.Clin.Immunol.Immunopathol.1995 , 74 : 2-9

88. Parish NM. , et al. Immunol. Rev. , 1995 , 144 : 269-300

89. Nicoletti F. et al. , Autoimmunity , 1996 , 24 : 187-197

90. Mori Y. et al , Diabetologia , 1986 , 29 : 244-247

91. Toyabe S , Seki S , Iaii T , Takeda K , Shirai K , Watanabe H , Hiraide H , et al.Requirements of IL-4 and NK1+T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice.J.Immunol. 1997 , 159 : 1537-1542

92. Nicoletti F. , Zaccone P. , Xiang M. , Magro G. , Di Mauro M. , Di Marco R. , Garotta G. et al. Essential pathogenetic role for interferon(IFN)-gamma in Concanavalin A-induced T cell-dependent hepatitis : exacerbation by exogenous IFN-g and prevention by IFN-g receptor-immunoglobulin fusion protein. Cytokine 2000 , 12 : 315-323

93. Di Marco R.，Xiang M.，Zaccone P.，Leonardi C.，Franco S.，Meroni P.，Nicoletti F. Concanavalin A-induced hepatitis in mice is prevented by interleukin(IL)-10 and exacerbated by endogenous IL-10 deficiency. Autoimmunity，1999，31：75-83

94. Nicoletti F，Di Marco R，Zaccone P，Salvaggio A，Magro G，Bendtzen K and Meroni PL. Murine Concanavalin A-induced hepatitis is prevented by interleukin-12(IL-12)antibody and exacerbated by exogenous IL-12 through an interferon-gamma-dependent mechanism. Hepatology，2000，32：728-33

95. Dzotsenidze，L.，Mkervalishvili，J.，Gogiashvili，R.，Bakhutashvili，V. The Antitoxic Effect of Plaferon LB on Pesticides in Tissue Culture Model. Annals of Biomedical Research and Education，2003，Vol. 3，Issue 3，p. 180-182.

96. Chichua，G.，Sanikidze，T.，Bakhutashvili，V. Biochemical Changes in Retinal Tissue During Vitreoretinal Pathology. Annals of Biomedical Research and Education，2002(2)3，189-95

97. Kvezereli，M.，Chikovani，T.，Sanikidze，T.，Rukhadze，R.，Cheishvili，N.，Sharashenidze，T.，Papava，M.，Bakhutashvili，V. Effects of Plaferon LB(PLB)on Concanavalin A-induced hepatitis in Mice. Annals of Biomedical Research and Education，2002，(2)2，133-8.

98. Bakradze，I.，Bakhutashvili，V.，Aladashvili，A.，Shavdia，M.，Aroshidze，T. The Perioperative Immunocorrection by

Plaferon for Colorectal Cancer Patients. Annals of Biomedical Research and Education , 2002 , (2) , 1 , 38-41.

99. Maisuradze , M. Abdushelishvili , N. , Dumbadze , M. Some Aspects of Protective Effect of Plaferon LB During Bronchial Asthma. Annals of Biomedical Research and Education , 2003 , Vol. 3 , Issue 3 , p. 189-191.

100. Lobzhanidze , N. , Koupradze , S. Positive Effect of Plaferon-LB on Treatment of Hodgkin's Disease – Result of Immunocorrection or Apoptosis ? Annals of Biomedical Research and Education , 2001 , Vol. 1 , Issue 3 , p. 170-173.

101. Mann , M. and Jensen , O.N. Proteomic Analysis of Post-Translational Modifications. Nature Biotechnology , 2003 , Vol. 21 , p. 255-261.

102. Jensen , L.J. , Gupta , R. , Blom , N. Devos , D. , Tamames , J. , Kesmir , C. , Nielsen , H. , Staerfeldt , H.H. , Rapacki , K. , Workman , C. , Andersen C.A.F. , Knudsen , S. , Krogh , A. , Valencia , A. and Brunak S. Prediction of Human Protein Funcation from Post-Translational Modifications and Localization Features. J. Mol. Biol. , 2002 , 319 : 1257-1265.

103. Proteomics : Post Translational Modification , Pierce Biotechnology , Inc. web site , accessed November 11 , 2004 , <http : //www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=7CE3FCF5-0DA0-4378-A513-2E35E5E3B49B>.

104. Topical Preparations , PsoriasisNet , American Academy

of Dermatology，accessed November 11，2004，< http：//www.skincarephysicians.com/psoriasisnet/TopicalPreparations.html>.

【圖式簡單說明】

第1圖顯示Sephadex G25色層分析法分離Plaferon-LB的圖譜。

第1圖描繪了使用 Sephadex G25 分離Plaferon化合物之後獲得的色層分析圖譜。高分子量分離物(>5000Ds)和低分子量分離物(<5000Ds)在集中後冷凍乾燥。

第2圖顯示Plaferon-LB的 SE- HPLC分析在Superdex 30 HR 10/30上的低和高分子量化合物。

第2(A)和2(B)圖顯示高分子量集中物只含高分子量物質(在排斥容積中，保留時間=14.425分鐘)，而低分子量物中含有一個高分子量物質(保留時間＝14.408分鐘)和較小的胜肽(保留時間超過38分鐘)。

第3圖顯示RP-HPLC分析Plaferon-LB 的低分子量化合物。

RP-HPLC的分析檢出Plaferon-LB 的數個低分子量化合物。

第4圖顯示RP色層分析法分析Plaferon-LB低分子量化合物。

逆相色層分析法所獲得的圖譜確認了RP色層分析法獲得的分析結果，共收集了八(8)個峰。不包含峰的部分被收集及集中("RP Non pic"分離部分)。

第5圖顯示第4分離部份質譜分析。

第4分離部份的胜肽使用質譜和NH2胺基酸序列法以決定胺基酸的序列。

第6圖顯示PLB預防對 DA大鼠的PR- EAE的效果。

表6是在PLB處理的大鼠的EAE的累積影響的一個比較。雖然在PLB處理的大鼠之中的EAE的累積影響和控制大鼠沒有明顯不同，但是相對較後的動物，那些以Plaferon-LB治療疾病的有較溫和的病程而承受較低的EAE累積得分和後來比較短的復發期減低了嚴重性。

第7圖顯示預防性的Plaferon-LB避免DA大鼠的OIA誘發的關節炎。

OIA-關節炎病程順利地被PLB預防法影響了。PLB處理的大鼠展現明顯地溫和的病程反映在顯著的較記錄中控制鼠為低的關節炎得分($p<0.0001$)。

第8圖顯示用PLB第4分離部份處理的油-誘發關節炎實驗的DA大鼠的4張相片。

第8A-8D圖為油誘發關節炎中的控制大鼠，而第8E-H圖顯示第4分離部份處理的大鼠。控制鼠有關節炎的影響是100%而第4分離部份處理大鼠者是50%。此外，那二隻已經發展為關節炎的第4分離部份處理動物有非常溫和的疾病紀錄。

第9圖顯示二批不同Plaferon的RP- HPLC色層分析法圖譜。

藍色 ：“第1批“ Plaferon-LB

紅色 ：“第2批“ Plaferon-LB

LAP(Lajor 活性胜肽)以黑色的箭指出。

第10圖顯示RP- HPLC Plaferon-LB 的色層分析法圖譜(最後的和製造中二個階段的產品)。

藍色 ：Plaferon-LB(最後的產品)；

紅色 ：Plaferon-LB(製造的第一階段)；

綠色 ：Plaferon-LB(製造的第二階段)；

LAP(Lajor 活性胜肽)以黑色的箭指出。

第11圖顯示Plaferon-LB的大小排斥色層分析法圖譜。

第12圖顯示Plaferon-LB(在SE色層分析法後的低和高MW部分)的RP- HPLC色層分析法圖譜。

藍色 ：Plaferon-LB(最後的產品)；

紅色 ：在SE色層分析法後的低MW部分；

綠色 ：在SE色層分析法後的高MW部分；

LAP(Lajor 活性胜肽)以黑色的箭指出。

第13A-13B圖顯示Plaferon-LB的色層分析法圖譜。

兩倍的箭是指示從第一個大量提純中獲得的第4分離部份中的LAP。

第14圖顯示LAP對LPS誘發的死亡的時間和劑量效果。

第15A-C圖表示LAP降低LPS誘發的迴圈TNF-α水平的增加。

第16圖顯示LAP預防法減少Con A(伴刀豆球蛋白)-誘發ALAT的增加。

第17A圖顯示LAP在NOD小鼠延長的治療(14-25個星

期)的身體重量增加上缺乏效果。

第17B圖顯示LAP早期的預防法治療在NOD小鼠胰腺炎的發展效果。

第18圖顯示使用PLB治療萊什曼原蟲病的實驗相片。

第18A-C圖顯示萊什曼原蟲病的狗表現臨床症狀的照片。

第18D-F圖顯示用PLB治療的狗症狀上明顯地減少的照片。

第19(A)-(C)圖顯示來自所有3組鼠科胎兒的腦切片(5-6μM)用 TUNEL 方法染色。黑點表現凋亡，(A)控制(沒有治療)，(B)只有CP，(C)CP + Plaferon-LB，第19(D)圖顯示來自B組動物(只有CP)的胎兒呈現了典型的殘缺，例如缺趾畸形併發症(四肢的反常)，免唇，糾結尾和低體重。

第19(E)圖顯示來自C組動物的胎兒用CP和Plaferon-LB處理沒有殘缺和正常的重量和大小。

【主要元件符號說明】

(無)

五、中文發明摘要：

本發明是關於一具生物活性之胜肽的合成方法和其在治療及化妝上的應用，其可用於改良皮膚的外觀，促進創傷癒合和治療及/或預防各種病況、創傷及疾病之漸進，包括但不限制於：病毒性B和C型肝炎，帶狀疱疹神經結神經炎，糖尿病周邊多發性神經病變，腎病變症候群，青年型類風濕關節炎，類風濕性關節炎，牛皮癬性關節炎，氣管性氣喘，呼吸器官的感染，乳癌，癲癇症，牛皮癬，動脈漿狀硬化症和其他形式的血管阻塞，心肌梗塞，愛滋病毒和非典型肺炎感染，由於局部缺血和外傷所產生之腦細胞失能，局部缺血－再充血之病理結果，器官移植之後的排斥反應，包括但不限制於麻醉劑、酒精和嗎啡之化學和藥物中毒狀態，癌症，第一型糖尿病，多發性硬化症，敗血性休克，帕金森氏症，第二型糖尿病，阿茲海默症，肌萎縮性(脊髓)側索硬化，甲狀腺機能亢進，吉蘭-巴雷(Guillain- Barre) 症候群，系統性紅斑狼瘡，寄生蟲感染，特別是：萊什曼病，和其他的膠原蛋白疾病，以及發生細胞凋亡的疾病。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to the method(s) of synthesis of and the therapeutic and cosmetic applications of biologically active peptides for improving the appearance of skin, for hastening wound healing and for treating and/or preventing the progression of various conditions, injuries and diseases, including but not limited to viral hepatitis B and C, herpes zoster ganglioneuritis, diabetic peripheral polyneuropathy, nephrotic syndrome, juvenile rheumatoid arthritis, rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, bronchial asthma, respiratory infection, breast cancer, epilepsy, psoriasis, atherosclerosis and other forms of vascular obstructions, myocardial infarction, HIV and SARS infection, brain cell malfunction due to ischemia and trauma, pathologic consequences of ischemia-reperfusion, rejection reaction following organ transplantation, chemical and drug intoxication including but not limited to anesthetic, alcohol and morphine, cancer, type 1 diabetes mellitus, multiple sclerosis, septic shock (Gram negative sepsis), Parkinson's disease, type 2 diabetes mellitus, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, hyperthyroidism, Guillain-Barre syndrome, systematic lupus erythematosus, parasitic infections, especially leishmaniasis, and other collagen diseases, and diseases in which apoptosis occurs.

十、申請專利範圍：

1. 一種經分離出的胜肽，其包含NH2- NVSAVEIA-COOH、NH2- NVSpAVEIA-COOH或其功能相等物之序列。
2. 一種經分離出的多肽，其包含NH2-NVSAVEIA-COOH或NH2- NVSpAVEIA-COOH之序列。
3. 一種經分離出的核苷酸分子，其編碼出NH2-NVSAVEIA-COOH或NH2-NVSpAVEIA-COOH之氨基酸序列。
4. 一種載體，其包含如申請專利範圍第3項之核苷酸分子。
5. 一種細胞，其包含如申請專利範圍第3項之核苷酸或如申請專利範圍第4項之載體。
6. 一種用以表達含有NH2-NVSAVEIA-COOH或NH2-NVSpAVEIA-COOH序列之多肽或胜肽的表達系統，該表達系統包含如申請專利範圍第3項之經分離出的核苷酸分子或如申請專利範圍第4項之載體。
7. 一種用以產生如申請專利範圍第1項之經分離出之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽的方法，該方法包含導入一編碼出NH2-NVSAVEIA-COOH或NH2-NVSpAVEIA-COOH氨基酸序列之核苷酸分子到一適當之細胞中，使該細胞置於一合適的條件下而允許NH2-NVSAVEIA-COOH或NH2-NVSpAVEIA-COOH之氨基酸序列的表達，藉此產生如申請專利範圍第1項之胜肽及如申請專利範圍第2項之多肽。

8. 如申請專利範圍第7項之方法，其中該核苷酸分子係操作性地聯結至一調節元件。

9. 如申請專利範圍第7項之方法，其中該核苷酸分子係與一載體聯結。

10. 一種基因轉殖動物，其包含如申請專利範圍第3項之核苷酸或如申請專利範圍第4項之載體。

11. 一種組成物，其包含如申請專利範圍第1項之經分離出的胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽以及一個合適的載劑。

12. 一種藥學組成物，其包含一有效量之如申請專利範圍第1項之經分離出的胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽以及一個藥學上可接受之載劑。

13. 如申請專利範圍第12項之組成物，其更包含一選擇自以下群組之藥劑，該群組係由抗生素、外傷癒合劑、抗氧化劑、抗病毒劑、抗真菌劑、抗局部缺血劑、抗損傷劑以及抗衰老劑、免疫調節劑、抗低氧劑、抗毒素、抗過敏劑、抗細紋劑、抗發炎劑、抗感染劑、抗免疫劑或抗腫瘤劑。

14. 如申請專利範圍第12項之組成物，其中該載劑係適用於局部、舌下、非經消化道或胃腸道使用或霧化劑。

15. 如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽，其係用化學合成或使用遺傳工程所製造。

16. 一種用以改善一患者之皮膚情況的方法，其包含使這患者之皮膚與一有效量之如申請專利範圍第1項之胜

肽或如申請專利範圍第2項之多肽接觸。

17. 一種用以使一急性病毒性B型肝炎或C型肝炎患者之肝功能生化指數和免疫指標正常化，加速由該疾病之病徵復原，或防止該疾病復發之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

18. 一個用以使CD3+，CD4+，CD8+及帶有HLA-DR抗原之T-細胞的細胞數目正常化，並改善一帶狀疱疹神經結神經炎患者之神經性病徵之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

19. 一種用以使一糖尿病周邊多發性神經病徵患者之CD3+及CD4+T-細胞表型程度正常化之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

20. 一種用以治療一具有腎病變症候群之患者的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

21. 如申請專利範圍第20項之方法，其中該病者係一孩童，且該胜肽或多肽可促進一具原發性腎病變症候群(INS)孩童之早期及延長之臨床檢驗緩解，或可矯正CD3+和CD8+T-淋巴細胞的降低。

22. 一種用於一青年型類風濕關節炎、類風濕性關節炎或牛皮癬性關節炎患者以改善臨床病徵及檢驗指標，刺

激白血球細胞干擾素產生，或使體液或細胞免疫正常化之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

23. 一種用於一支氣管氣喘患者以減低用以緩解之口服類固醇的平均每日劑量，適度地改善肺活量測定指數，或增加對地塞米松(dexamethasone)之敏感度的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

24. 一種用於一具有呼吸道感染之兒科患者以改善免疫指標或減低感染頻率的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

25. 一種用於一使用抗痙攣藥物的癲癇患者以減低過敏反應或藥物毒性之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

26. 一種用於乳癌患者以免疫調節，使該腫瘤血清標記CA15.3等級正常化，或增加CD5'T-細胞或CD11-巨噬細胞之腫瘤浸潤性的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

27. 一種用於一牛皮癬患者以改善臨床病徵，根除紅疹，減輕疼痛，增加免疫調節淋巴球的活性或增加CD3＋或

CD8細胞百分比的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

28. 一種用於治療一人類患者之粥狀動脈硬化，動脈硬化或其他形式之血管阻塞的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

29. 一種用於一患者以限制心肌細胞死亡或改善心臟肌肉收縮力的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

30. 一種用於限制一患者之排斥反應以允許器官移殖之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

31. 一個用於治療一患者之HIV感染之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

32. 一個用於治療一患者之腦部局部缺血或創傷之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

33. 一種用以治療一患者之局部缺血－再充血之病理結果的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

34. 一種用以治療化學性或麻醉性中毒之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

35. 一個用以治療一患者之創傷癒合的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

36. 一種用以治療一患者之病毒性疾病的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

37. 一種用以保護心肌細胞免於損傷之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

38. 一種用以保護一患者之心肌細胞的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

39. 如申請專利範圍第37或38項的方法，其中該心肌細胞係受到損傷的。

40. 如申請專利範圍第39項的方法，其中該損傷是化學性的或是由於缺血和缺氧的。

41. 一種能夠抑制或殺死癌細胞之組成物，該組成物包括有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽及一適當之載劑。

42. 一種用以抑制或殺死癌細胞之方法，該方法包括使該等癌細胞和一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽

或如申請專利範圍第2項之多肽接觸。

43. 一種用以抑制或殺死癌細胞之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

44. 一種組成物，其包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽，該胜肽或多肽係拮抗於H1－組織胺受體。

45. 一種用於在一細胞產生拮抗於H1－組織胺受體之效果的方法，該方法包括使該細胞和一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽接觸。

46. 一種用於在一患者產生拮抗於H1－組織胺受體之效果的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽至該患者。

47. 一種對於A2－磷脂酶活性具抑制性之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽和一適當之載劑。

48. 一種用於在一細胞產生抑制A2－磷脂酶活性效果之方法，該方法包括使該等細胞和一有效量之如申請專利範圍第47項的組成物接觸。

49. 一種用於在一患者產生抑制A2－磷脂酶活性效果之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第47項的組成物至該患者。

50. 一個用於保護以防腫瘤壞死因子(TNF)之效果的組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

51. 一種用於在一細胞保護以防腫瘤壞死因子(TNF)之效果的方法，該方法包括使該等細胞和一有效量之如申請專利範圍第50項的組成物接觸。

52. 一種用於在一患者保護以防腫瘤壞死因子(TNF)之效果的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第50項的組成物至該患者。

53. 一種用以治療發炎性腸道疾病之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

54. 一種用於治療一患者之發炎性腸道疾病的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第53項之組成物至該患者。

55. 一種用以治療第一型糖尿病之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

56. 一種用於治療一第一型糖尿病患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第55項之組成物至該患者。

57. 一種用以治療多發性硬化症之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

58. 一種用於治療一多發性硬化症患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第57項之組成物至該患者。

59. 一種用以治療敗血性休克或格蘭氏陰性菌敗血症之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

60. 一種用以治療一敗血性休克或格蘭氏陰性菌敗血症患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第59項之組成物至該患者。

61. 一種用以治療帕金森氏症之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

62. 一種用以治療一帕金森氏症患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第61項之組成物至該患者。

63. 一種用以預防心肌梗塞或改善心臟肌肉收縮力之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

64. 一種藉由變更一細胞中之sigma-1和sigma-2受體以預防心肌梗塞之方法，該方法包括使該細胞和一有效量之如申請專利範圍第63項的組成物接觸。

65. 一種用以預防一患者心肌梗塞之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

66. 一種用以治療第二型糖尿病之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

67. 一種用於治療一第二型糖尿病患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第66項之組成物至該患者。

68. 一種用以治療或預防阿茲海默症之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

69. 一種用於治療或預防阿茲海默症患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第68項之組成物至該患者。

70. 一種用以治療肌萎縮性側索硬化症之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

71. 一種用於治療一肌萎縮性側索硬化症患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第70項之組成物至該患者。

72. 一種用以治療內毒素血症、外毒素血症或相關病況之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

73. 一種用於治療內毒素血症、外毒素血症或相關病況患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第72項之組成物至該患者。

74. 一種用以治療Crohn's疾病(局部性迴腸炎)或慢性腸炎之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

75. 一種用於治療一Crohn's疾病(局部性迴腸炎)患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第74項之組成物至該患者。

76. 一種用以治療甲狀腺炎之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

77. 一種用於治療一甲狀腺炎患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第76項之組成物至該患者。

78. 一種用以治療吉蘭-巴雷症候群(Guillain Barre Syndrome)之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

79. 一種用於治療吉蘭-巴雷症候群(Guillain Barre Syndrome)患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第78項之組成物至該患者。

80. 一種用以治療系統性紅斑狼瘡之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

81. 一種用於治療一系統性紅斑狼瘡患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第80項之組成物

至該患者。

82. 一種用以治療和預防Caspases-3，-4和-8蛋白酶活化之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

83. 一種用於治療和預防一Caspases-3，-4和-8蛋白酶活化患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第82項之組成物至該患者。

84. 一種用以治療潰瘍性結腸炎之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽。

85. 一種用於治療一潰瘍性結腸炎患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第84項之組成物至該患者。

86. 一種用於一患者以調節氧化氮合成酶(NOS)之方法，該方法包括投予一有效量之含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH、NH2-NVSpAVEIA-COOH或其功能相等物之經分離出的胜肽或一含有胺基酸序列NH2-NVSAVEIA-COOH之經分離出的多肽至該患者。

87. 一種經選殖之動物，其包含如申請專利範圍第3項之核苷酸或如申請專利範圍第4項之載體。

88. 一種嵌合體，其包含如申請專利範圍第3項之核苷酸或如申請專利範圍第4項之載體。

89. 一種用以治療一SARS感染患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請

專利範圍第2項之多肽。

90. 一種經分離出之胜肽，其包含序列X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp，NVS或該等功能相等物。

91. 一種經分離出之多肽，其包含序列X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp，NVS或該等功能相等物。

92. 一種經分離出之核苷酸分子，其編碼出X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp，NVS或該等功能相等物之胺基酸序列。

93. 一種包含如申請專利範圍第92項之核苷酸分子的載體。

94. 一種細胞，其包含如申請專利範圍第92項之核苷酸分子或如申請專利範圍第93項之載體。

95. 一種用於表達一含有序列X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp，NVS或它的功能相等物之多肽或胜肽的表達系統，該系統包括如申請專利範圍第92項之經分離出的核苷酸分子或如申請專利範圍第93項之載體。

96. 一種用以產生如申請專利範圍第90項之經分離出之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽的方法，該方法包含導入一編碼出X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp，NVS或它的功能相等物之核苷酸分子到一適當之細胞中，使該細胞置於一合適的條件下而允許X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp，NVS或它的功能相等物之氨基酸序列的表達，藉此產生如申請專利範圍第90項之胜肽及如申請專利範圍第91項之多肽。

97. 如申請專利範圍第96項之方法，其中該核苷酸分子係操作性地聯結至一調節元件。

98. 如申請專利範圍第96項之方法，其中該核苷酸分子係聯結在一載體中。

99. 一種基因轉殖動物，其包含如申請專利範圍第92項之核苷酸或如申請專利範圍第93項之載體。

100. 一種組成物，其包含如申請專利範圍第90項之經分離出的胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽以及一個合適的載劑。

101. 一種藥學組成物，其包含一有效量之如申請專利範圍第90項之經分離出的胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽以及一個藥學上可接受之載劑。

102. 如申請專利範圍第101項之組成物，其更包含一選擇自以下群組之藥劑，該群組係由抗生素、外傷癒合劑、抗氧化劑、抗病毒劑、抗真菌劑、抗局部缺血劑、抗損傷劑以及抗衰老劑、免疫調節劑、抗低氧劑、抗毒素、抗過敏劑、抗細紋劑、抗發炎劑、抗感染劑、抗免疫劑、抗原蟲劑、抗寄生蟲劑或抗腫瘤劑。

103. 如申請專利範圍第101項之組成物，其中該載劑係適用於局部、舌下、非經消化道或胃腸道使用或霧化劑。

104. 如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽，其係用化學合成或使用遺傳工程所製造。

105. 一種用以改善一患者之皮膚情況的方法，其包含使這患者之皮膚表面與一有效量之如申請專利範圍第90項

之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽接觸。

106. 一種用以使一急性病毒性B型肝炎或C型肝炎患者之肝功能生化指數和免疫指標正常化，加速由該疾病之病徵復原，或防止患者該疾病復發之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

107. 一個用以使CD3+，CD4+，CD8+及帶有HLA-DR抗原之T-細胞的細胞數目正常化，並改善一帶狀疱疹神經結神經炎患者之神經性病徵之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

108. 一種用以使一糖尿病周邊多發性神經病徵患者之CD3+及CD4+T-細胞表型程度正常化之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

109. 一種用以治療一具有腎病變症候群之患者的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

110. 如申請專利範圍第109項之方法，其中該病患係一孩童，且該胜肽或多肽可促進一具原發性腎病變症候群(INS)孩童之早期及延長之臨床檢驗緩解，或可矯正CD3+和CD8+T-淋巴細胞的降低。

111. 一種用於一青年型類風濕關節炎、類風濕性關節炎或牛皮癬性關節炎患者以改善臨床病徵及檢驗指標，刺

激白血球細胞干擾素產生，或使體液或細胞免疫正常化之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

112.一種用於一支氣管氣喘患者以減低用以緩解之口服類固醇的平均每日劑量，適度地改善肺活量測定指數，或增加對地塞米松(dexamethasone)之敏感度的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

113.一種用於一具有呼吸道感染之兒科患者以改善免疫指標或減低感染頻率的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

114.一種用於一使用抗痙攣藥物的癲癇患者以減低過敏反應或藥物毒性之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

115.一種用於乳癌患者以免疫調節，使該腫瘤血清標記CA15.3等級正常化，或增加CD5'T-細胞或CD11-巨噬細胞之腫瘤浸潤性的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

116.一種用於一牛皮癬患者以改善臨床病徵，根除紅疹，減輕疼痛，增加免疫調節淋巴球的活性或增加CD3＋或

CD8細胞百分比的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

117.一種用於治療一人類患者之粥狀動脈硬化，動脈硬化或其他形式之血管阻塞的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

118.一種用於一患者以限制心肌細胞死亡或改善心臟肌肉收縮力的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

119.一種用於限制一患者之排斥反應以允許器官移殖之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

120.一個用於治療一患者之HIV感染之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

121.一個用於治療一患者之腦部局部缺血或創傷之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

122.一種用以治療一患者之局部缺血－再充血之病理結果的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

123.一種用以治療化學性或麻醉性中毒之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

124.一個用以治療一患者之創傷癒合的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

125.一種用以治療一患者之病毒性疾病的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

126.一種用以保護心肌細胞免於損傷之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第91項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

127.一種用以保護一患者之心肌細胞的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

128.如申請專利範圍第126或127項的方法，其中該心肌細胞係受到損傷的。

129.如申請專利範圍第128項的方法，其中該損傷是化學性的或是由於缺血和缺氧的。

130.一種能夠抑制或殺死癌細胞之組成物，該組成物包括有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽及一適當之載劑。

131.一種用以抑制或殺死癌細胞之方法，該方法包括使該等癌細胞和一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽

或如申請專利範圍第91項之多肽接觸。

132.一種用以抑制或殺死癌細胞之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

133.一種組成物，其包括一有效量之如申請專利範圍第1項之胜肽或如申請專利範圍第2項之多肽，該胜肽或多肽係拮抗於H1－組織胺受體。

134.一種用於在一細胞產生拮抗於H1－組織胺受體之效果的方法，該方法包括使該細胞和一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽接觸。

135.一種用於在一患者產生拮抗於H1－組織胺受體之效果的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽至該患者。

136.一種對於A2－磷脂酶活性具抑制性之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽和一適當之載劑。

137.一種用於在一細胞產生抑制A2－磷脂酶活性效果之方法，該方法包括使該等細胞和一有效量之如申請專利範圍第136項的組成物接觸。

138.一種用於在一患者產生抑制A2－磷脂酶活性效果之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第136項的組成物至該患者。

139.一個用於保護以防腫瘤壞死因子(TNF)之效果的組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

140.一種用於在一細胞保護以防腫瘤壞死因子(TNF)之效果的方法，該方法包括使該等細胞和一有效量之如申請專利範圍第139項的組成物接觸。

141.一種用於在一患者保護以防腫瘤壞死因子(TNF)之效果的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第139項的組成物至該患者。

142.一種用以治療發炎性腸道疾病之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

143.一種用於治療一患者之發炎性腸道疾病的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第142項之組成物至該患者。

144.一種用以治療第一型糖尿病之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

145.一種用於治療一第一型糖尿病患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第144項之組成物至該患者。

146.一種用以治療多發性硬化症之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

147.一種用於治療一多發性硬化症患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第146項之組成物至該患者。

148.一種用以治療敗血性休克或格蘭氏陰性菌敗血症之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

149.一種用以治療一敗血性休克或格蘭氏陰性菌敗血症患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第148項之組成物至該患者。

150.一種用以治療帕金森氏症之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

151.一種用以治療一帕金森氏症患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第150項之組成物至該患者。

152.一種用以預防心肌梗塞或改善心臟肌肉收縮力之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

153.一種藉由變更一細胞中之sigma-1和sigma-2受體以預防心肌梗塞之方法，該方法包括使該細胞和一有效量之如申請專利範圍第152項的組成物接觸。

154.一種用以預防一患者心肌梗塞之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第152項之組成物至該患者。

155.一種用以治療第二型糖尿病之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

156.一種用於治療一第二型糖尿病患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第155項之組成物至該患者。

157.一種用以治療或預防阿茲海默症之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

158.一種用於治療或預防阿茲海默症患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第157項之組成物至該患者。

159.一種用以治療肌萎縮性側索硬化症之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

160.一種用於治療一肌萎縮性側索硬化症患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第159項之組成物至該患者。

161.一種用以治療內毒素血症、外毒素血症或相關病況之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

162.一種用於治療內毒素血症、外毒素血症或相關病況患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第161項之組成物至該患者。

163.一種用以治療Crohn's疾病(局部性迴腸炎)或慢性腸炎之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

164.一種用於治療一Crohn's疾病(局部性迴腸炎)患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第163項之組成物至該患者。

165.一種用以治療甲狀腺炎之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

166.一種用於治療一甲狀腺炎患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第165項之組成物至該患者。

167.一種用以治療吉蘭-巴雷症候群(Guillain Barre Syndrome)之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

168.一種用於治療吉蘭-巴雷症候群(Guillain Barre Syndrome)患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第167項之組成物至該患者。

169.一種用以治療系統性紅斑狼瘡之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

170.一種用於治療一系統性紅斑狼瘡患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第169項之組成

物至該患者。

171.一種用以治療和預防Caspases-3，-4和-8蛋白酶活化之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

172.一種用於治療和預防一Caspases-3，-4和-8蛋白酶活化患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第171項之組成物至該患者。

173.一種用以治療潰瘍性結腸炎之組成物，該組成物包括一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

174.一種用於治療一潰瘍性結腸炎患者之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第173項之組成物至該患者。

175.一種用於一患者以調節氧化氮合成酶(NOS)之方法，該方法包括投予一有效量之含有胺基酸序列X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp，NVS或它的功能相等物之經分離出的胜肽或一含有胺基酸序列X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp，NVS或它的功能相等物之經分離出的多肽至該患者。

176.一種經選殖之動物，其包含如申請專利範圍第92項之核苷酸或如申請專利範圍第93項之載體。

177.一種嵌合體，其包含如申請專利範圍第92項之核苷酸或如申請專利範圍第93項之載體。

178.一種用以治療一SARS感染患者之方法，該方法包括投

予一有效量之如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽。

179.如申請專利範圍第90項之胜肽或如申請專利範圍第91項之多肽，其中該序列係NVS。

180.如申請專利範圍第170項之胜肽或多肽，其中該絲胺酸係經磷酸化的。

181.一種用以治療一萊什曼病患者之方法，該方法包括投予一有效量之包含序列NH2-NVSAVEIA-COOH、NH2-NVSpAVEIA-COOH或它的功能相等物之胜肽。

182.一種用以治療一萊什曼病患者之方法，該方法包括投予一有效量之包含序列NH2-NVSAVEIA-COOH或NH2-NVSpAVEIA-COOH之多肽。

183.如申請專利範圍第181項之方法，其中該胜肽序列為X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp，NVS或它的功能相等物。

184.如申請專利範圍第182項之方法，其中該多肽序列為X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp，NVS或它的功能相等物。

185.如申請專利範圍第181至184項任一項之方法，其中該胜肽或它的功能相等物是以皮下或肌肉內每日投予一有效量之該胜肽或它的功能相等物。

186.如申請專利範圍第181至184項任一項之方法，其中該多肽或它的功能相等物是以皮下或肌肉內每日投予一有效量之該多肽或它的功能相等物。

187.如申請專利範圍第185項之方法，其中投予的方式是使用皮下或肌肉內注射。

188.如申請專利範圍第186項之方法，其中投予的方式是使用皮下或肌肉內注射。

189.一種用以治療萊什曼病之藥學組成物，其包括一有效量之包含序列NH2-NVSAVEIA-COOH或它的功能相等物的胜肽，或包含序列NH2-NVSAVEIA-COOH或NH2-NVSpAVEIA-COOH的多肽。

190.如申請專利範圍第189項之組成物，其中該胜肽序列為X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp或NVS。

191.如申請專利範圍第189項之組成物，其中該多肽序列為X-N-(V或L)-封閉基團-Y，NVSp或NVS。

192.如申請專利範圍第189至191項任一項之組成物和一適當之載劑。

193.如申請專利範圍第192項之組成物，其中該載劑是適用於皮下或肌肉內給藥的。

194.一種用以治療萊什曼病之藥學組成物，其包括一有效量之Plaferon-LB。

195.如申請專利範圍第194項之組成物和一適當之載劑。

196.如申請專利範圍第195項之組成物，其中該載劑是適用於皮下或肌肉內給藥的。

197.一種物質，其含有如申請專利範圍第1、2、15、90、91或104項任一項之經分離出的胜肽或多肽。

198.如申請專利範圍第197項之物質，其中該胜肽係直接地

或間接地與另一化合物綴合。

199. 如申請專利範圍第198項之物質，其中該胜肽係一個蛋白質。

200. 一種用以製造如申請專利範圍第1、2、15、90、91或或104項任一項之胜肽或多肽的方法，該方法包括以下步驟：

a) 取得適量之羊膜組織；

b) 將該羊膜組織和適量之培養基一起在37℃培育，以製成一組織懸浮液；

c) 藉由在該組織懸浮液加入新城疾病病毒(NDV)而誘發該胜肽或多肽的製造；

d) 在37℃培養該組織懸浮液10-12小時以製造該胜肽或多肽；

e) 從該組織懸浮液分離出該羊膜組織；

f) 藉由調整該組織懸浮液的pH值至2.0以使該NDV去活化；

g) 純化該胜肽或多肽；

h) 將該胜肽或多肽分離為高分子量(>5000 Da)和低分子量(<5000 Da)部份；

i) 檢測該部份之生物活性；

j) 將有生物活性的胜肽或多肽解碼以決定該胺基酸序列；

k) 按經解碼的胺基酸序列合成該胜肽或多肽；

l) 檢測該合成之胜肽或多肽的生物活性。

201.如申請專利範圍第200項之方法，其中該步驟(b)的培養基包含Media 199、3 U/ml之肝素、3 %之人類血漿、0.0015 U/ml之胰島素、0.16 mg/ml之慶大黴素(Gentamicin)、和30ml/L之Plaferon-LB(PLB)。

202.如申請專利範圍第200項之方法，其中該分離步驟(e)是用離心方法進行。

203.如申請專利範圍第200項之方法，其中該純化步驟(g)是用凝膠過濾，親和色層分析柱或RP-HPLC進行。

204.如申請專利範圍第200項之方法，其中該分離步驟(h)是利用Sephadex G25以大小排阻層析法進行。

205.如申請專利範圍第200項之方法，其中在該步驟(i)和(l)中的生物活性是使用人類疾病的動物模式而決定，例如，LPS誘發的敗血性休克，豆球蛋白A(Concanavalin A)誘發NOD小鼠T-細胞依賴的免疫發炎性肝炎或自體免疫的糖尿病。

206.如申請專利範圍第200項之方法，其中該胜肽或多肽的胺基酸序列是用自動化的埃德曼降解法(Edman degradation)而決定。

207.如申請專利範圍第200項之方法，其中該胜肽或多肽的合成是用化學和酶的方法，固相合成的方法，液相合成的方法或其組合，以及氣合成法。

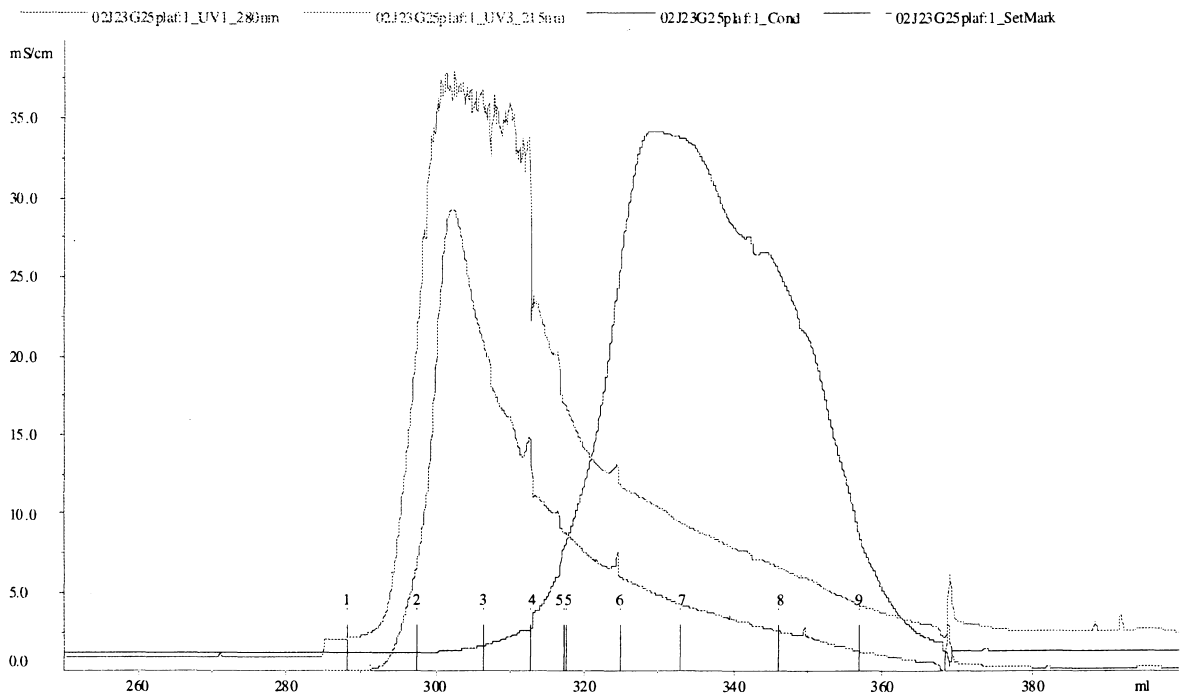
208.一種用以改善一患者在大腸直腸癌治療或手術後的復元之方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1、2、15、90、91或104項任一項之經分離出之胜

肽或多肽。

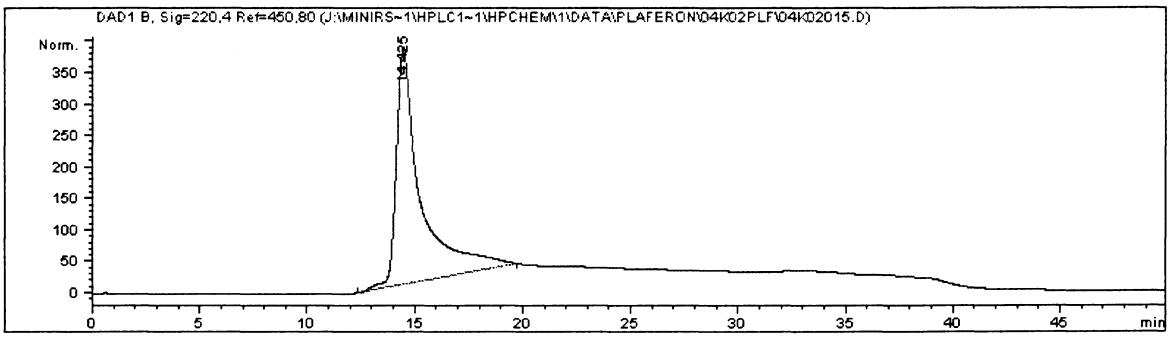
209.一種用以誘發一何傑金氏病患者之緩解的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1、2、15、90、91或104項任一項之經分離出之胜肽或多肽。

210.一種用以保護一患者之視網膜組織的方法，該方法包括投予一有效量之如申請專利範圍第1、2、15、90、91或104項任一項之經分離出之胜肽或多肽。

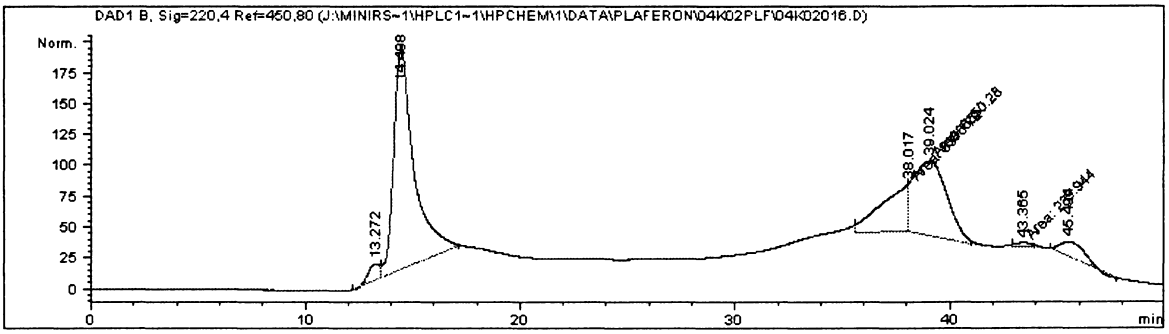
第 1 圖


02J23G25plaf:1_UV1_280nm
02J23G25plaf:1_UV3_215nm
02J23G25plaf:1_Cond
02J23G25plaf:1_SetMark
mS/cm
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
1
2
3
4
55
6
7
8
9
260
280
300
320
340
360
380
ml

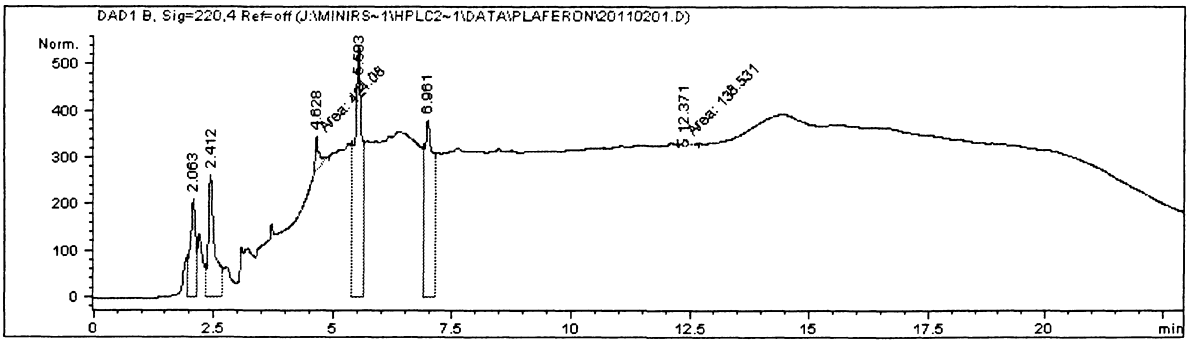
第 2A 圖


DAD1 B, Sig=220,4 Ref=450,80 (J:\MINIRS~1\HPLC1~1\HPCHEM\1\DATA\PLAFERON\04K02PLF\04K02015.D)
Norm.
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
min

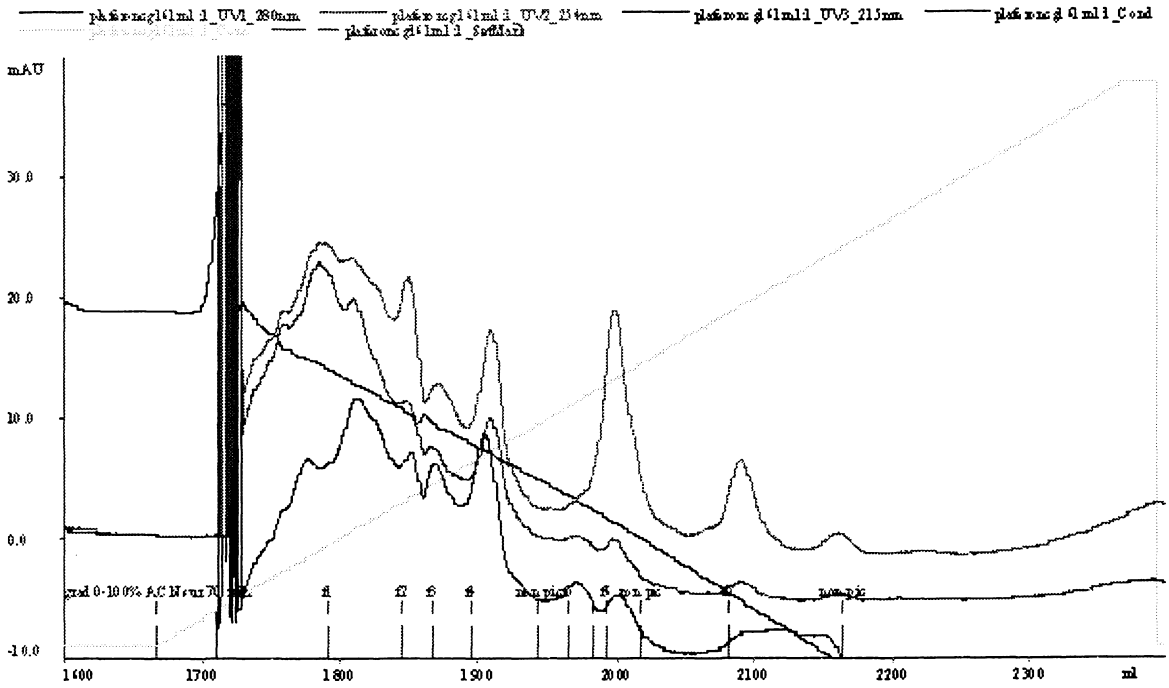
第 2B 圖


DAD1 B, Sig=220,4 Ref=450,80 (J:\MINIRS~1\HPLC1~1\HPCHEM\1\DATA\PLAFERON\04K02PLF\04K02016.D)
Norm.
175
150
125
100
75
50
25
0
13.272
38.017
39.024
43.365
0
10
20
30
40
min

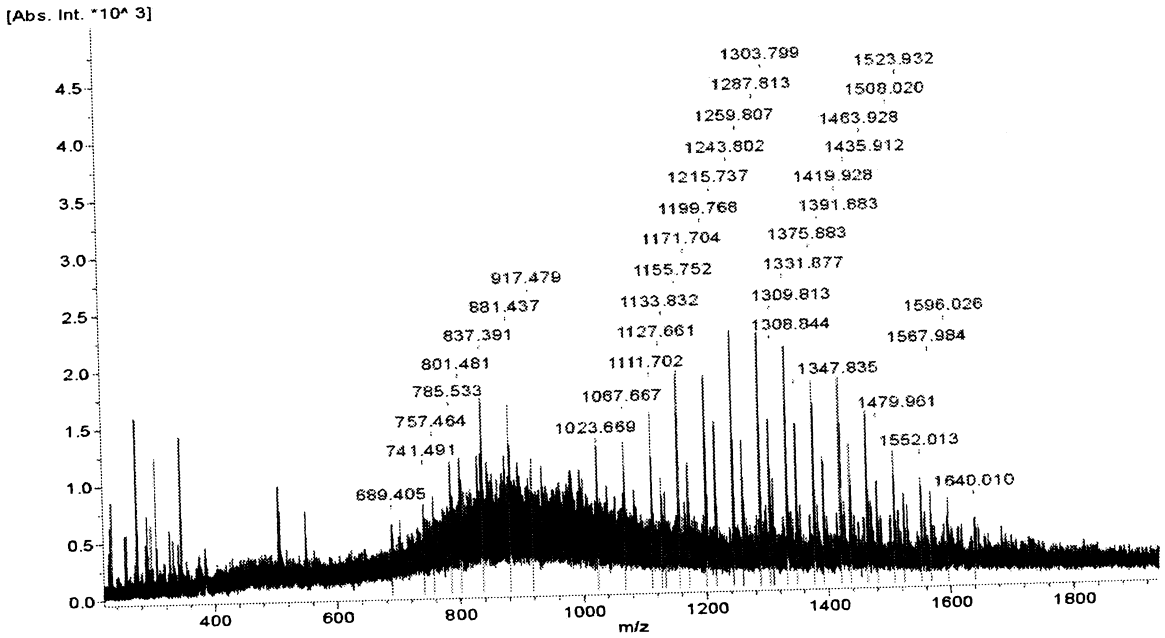
第 3 圖


DAD1 B, Sig=220,4 Ref=off (J:\MINIRS~1\HPLC2~1\DATA\PLAFERON\20110201.D)
Norm.
500
400
300
200
100
0
2.063
2.412
6.628
6.961
12.371
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
20
min

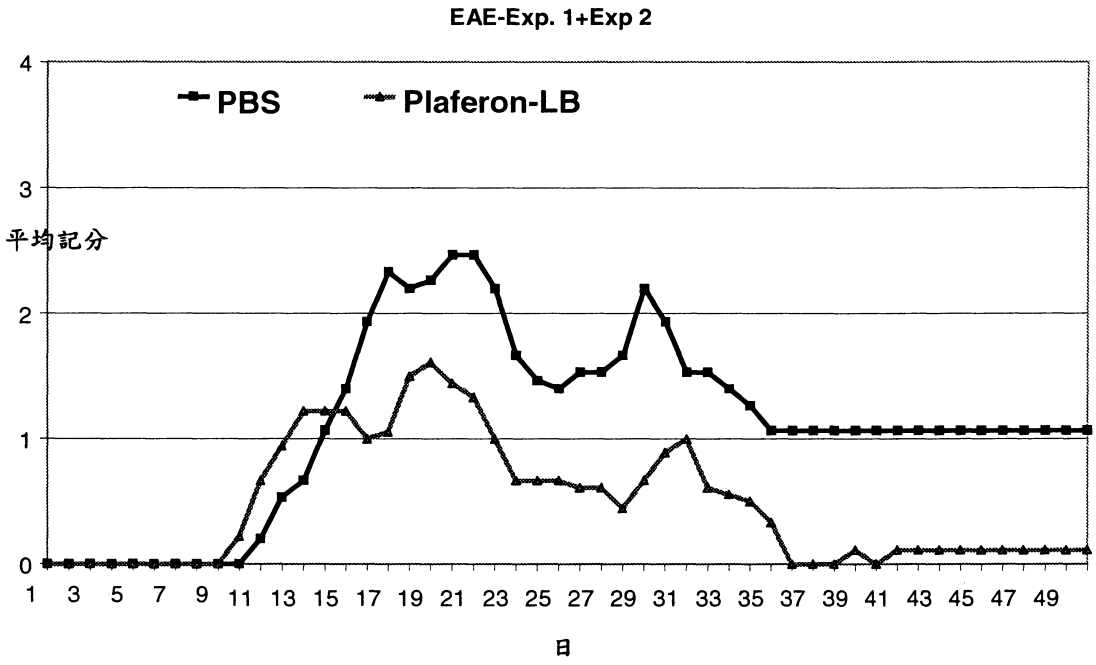
第 4 圖


mAU
30.0
20.0
10.0
0.0
-10.0
1600
1700
1800
1900
2000
2100
2200
2300
ml

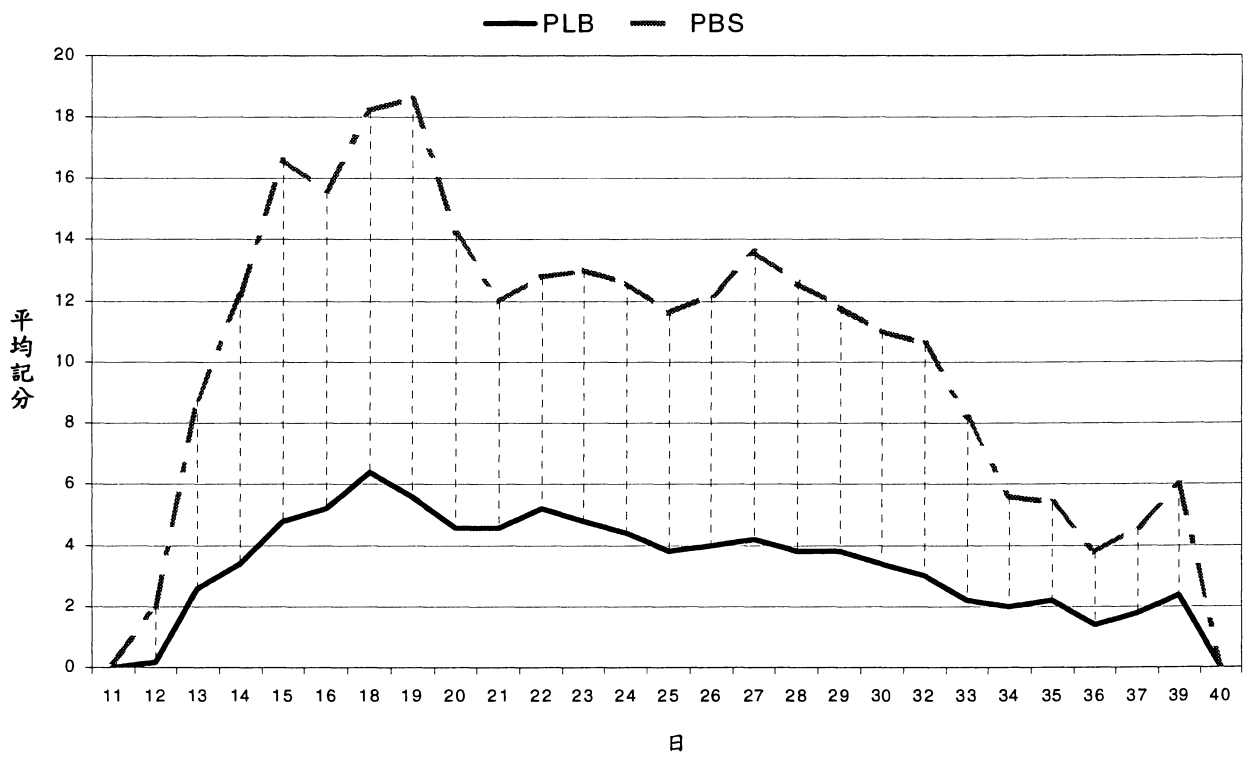
第 5 圖


[Abs. Int. *10^ 3]
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
m/z
1303.799
1523.932
1287.813
1508.020
1259.807
1463.928
1243.802
1435.912
1215.737
1419.928
1199.768
1391.683
1171.704
1375.883
1155.752
1331.877
917.479
1133.832
1309.813
881.437
1127.661
1308.844
1596.026
837.391
1111.702
1567.984
801.481
1087.667
1347.835
785.533
1023.669
1479.961
757.464
1552.013
741.491
1640.010
689.405

第 6 圖


EAE-Exp. 1+Exp 2
PBS
Plaferon-LB
平均記分
4
3
2
1
0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49
日

第 7 圖


PLB
PBS
平均記分
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
11 12 13 14 15 16 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 32 33 34 35 36 37 39 40
日

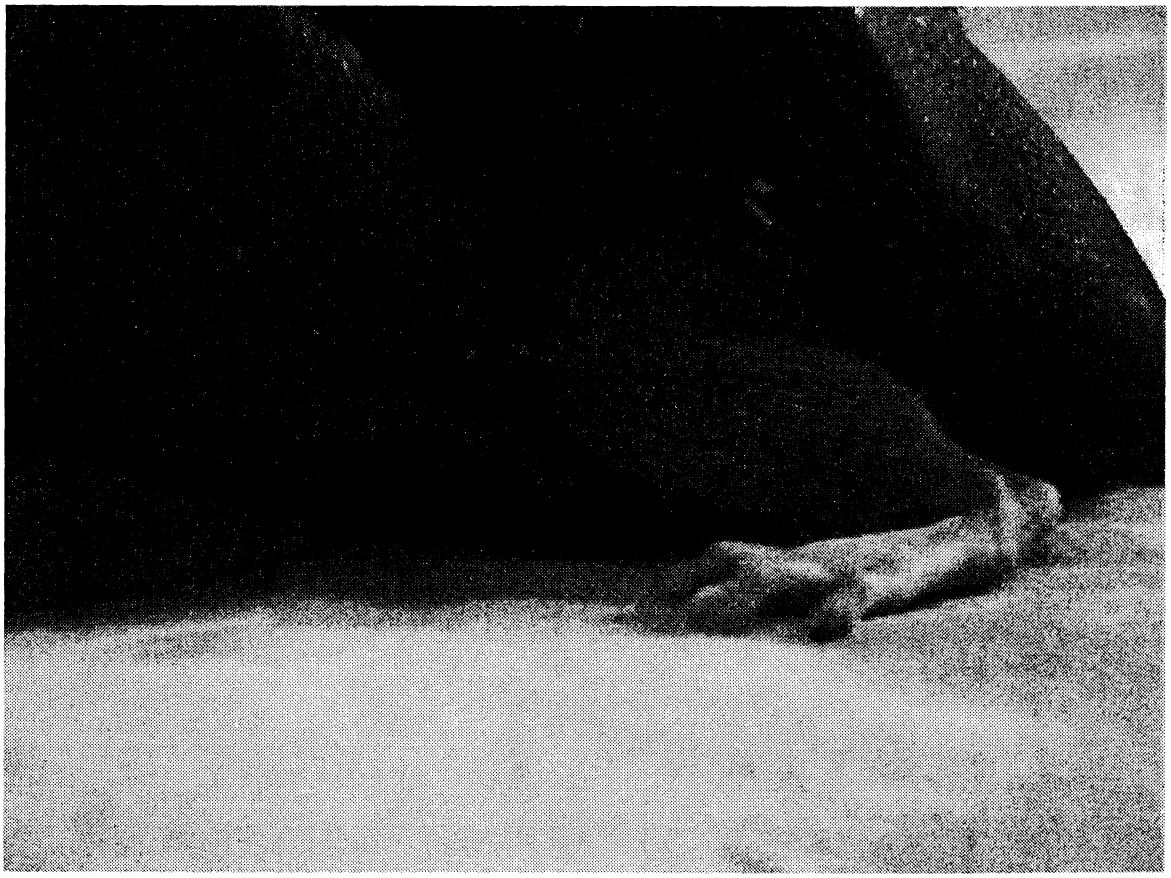
第 8A 圖



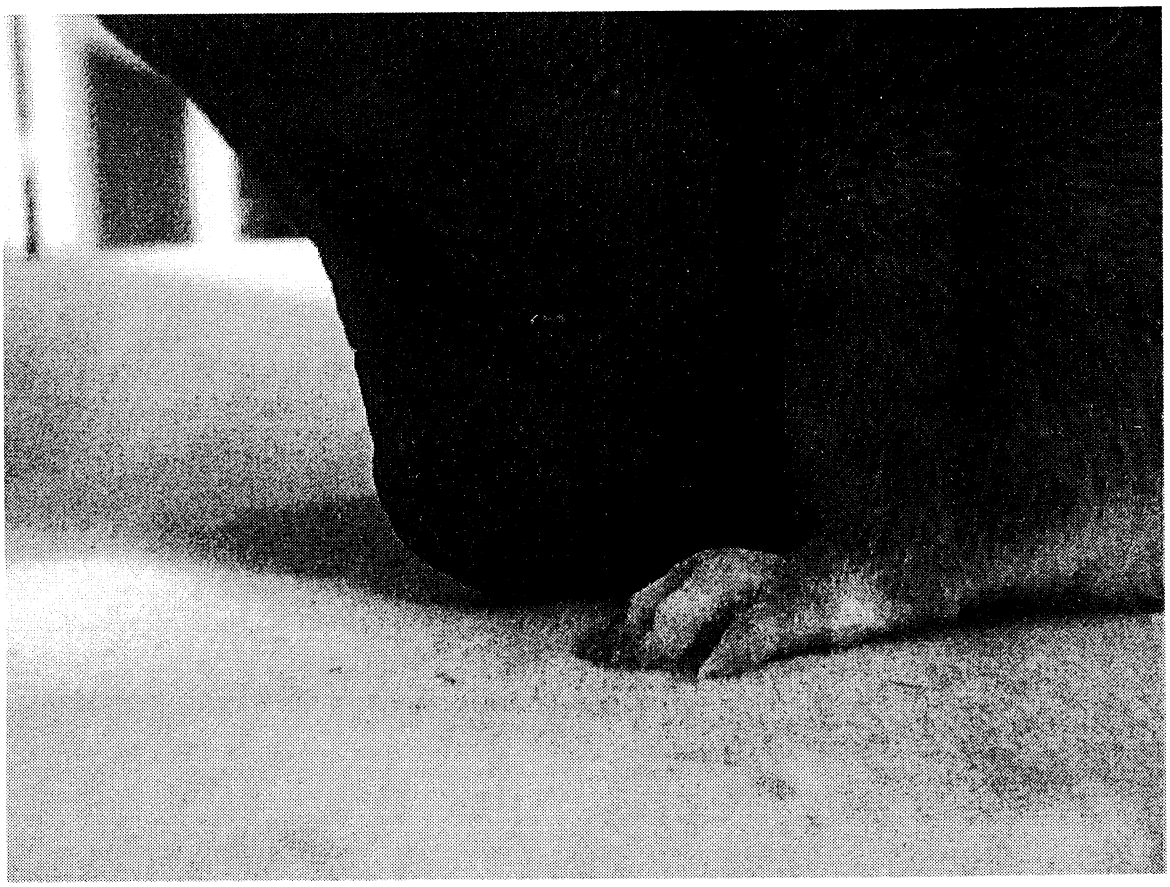
第 8B 圖



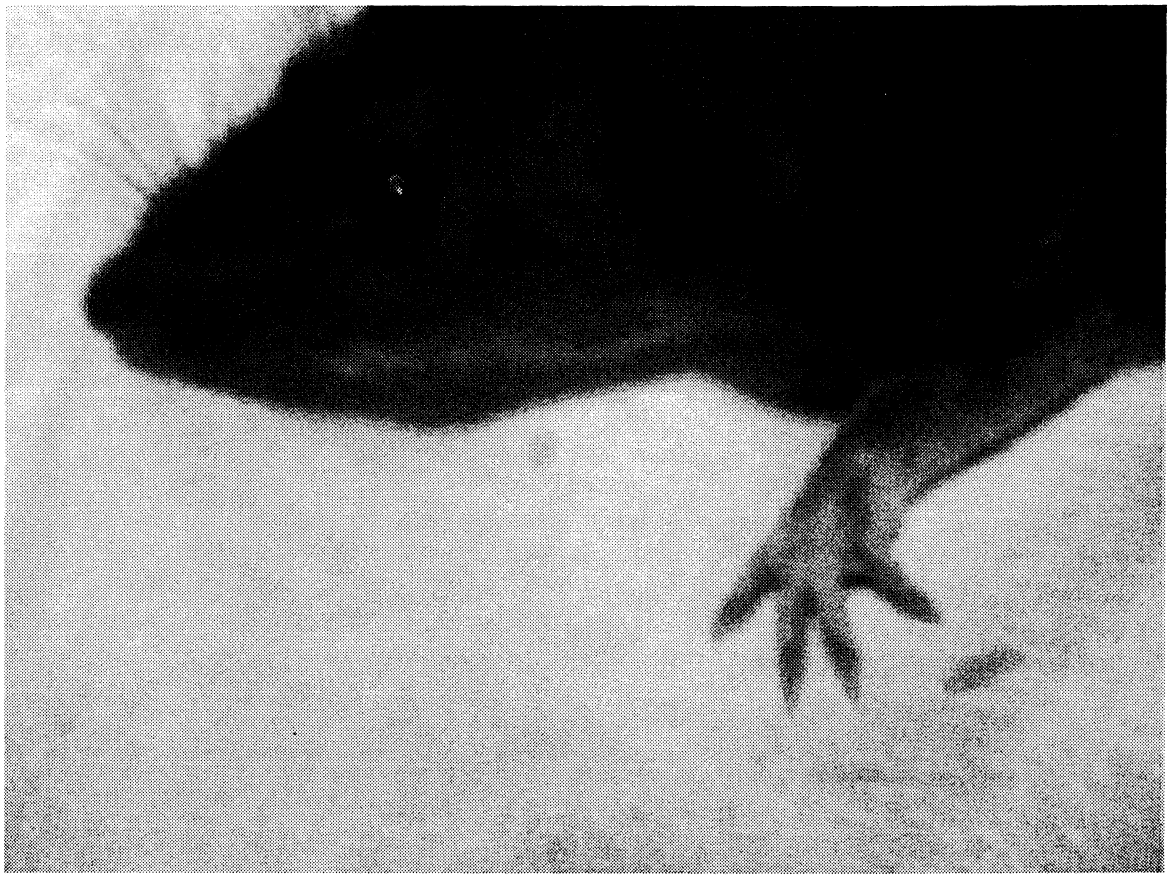
第 8C 圖



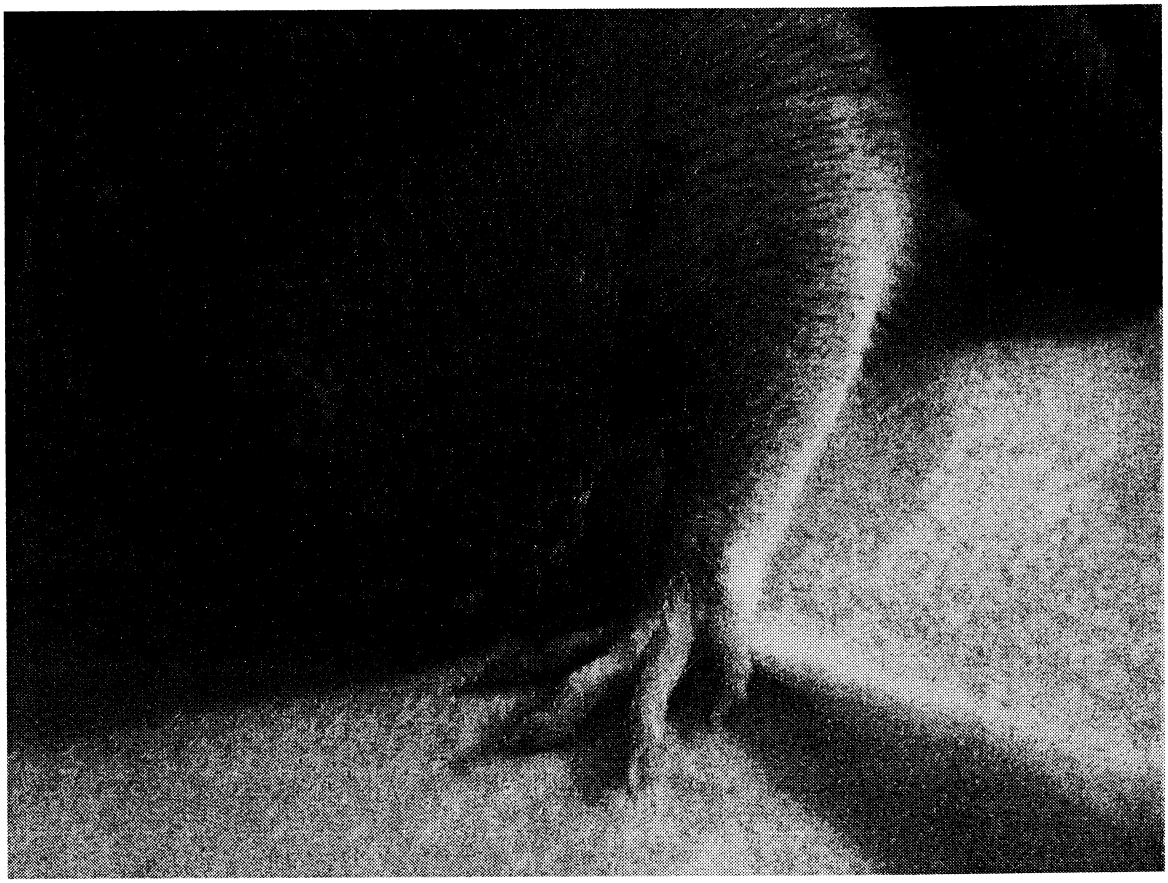
第 8D 圖



第 8E 圖



第 8F 圖



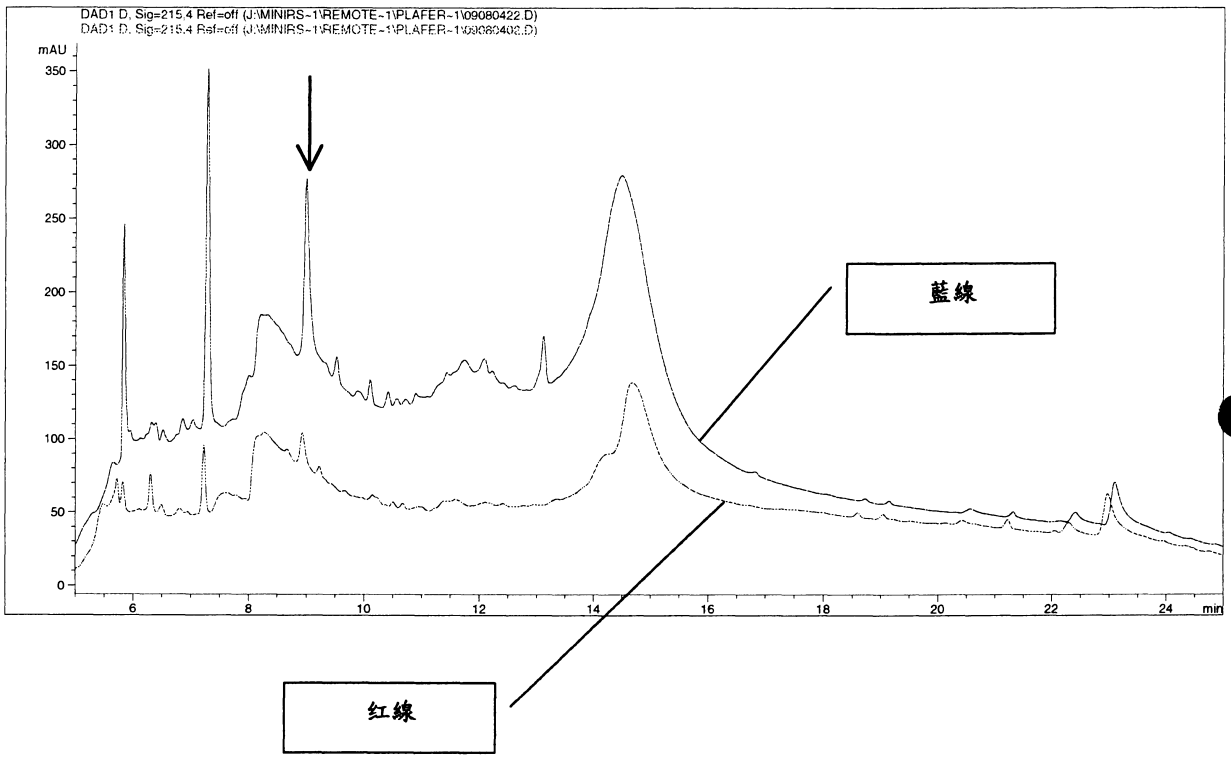
第 8G 圖



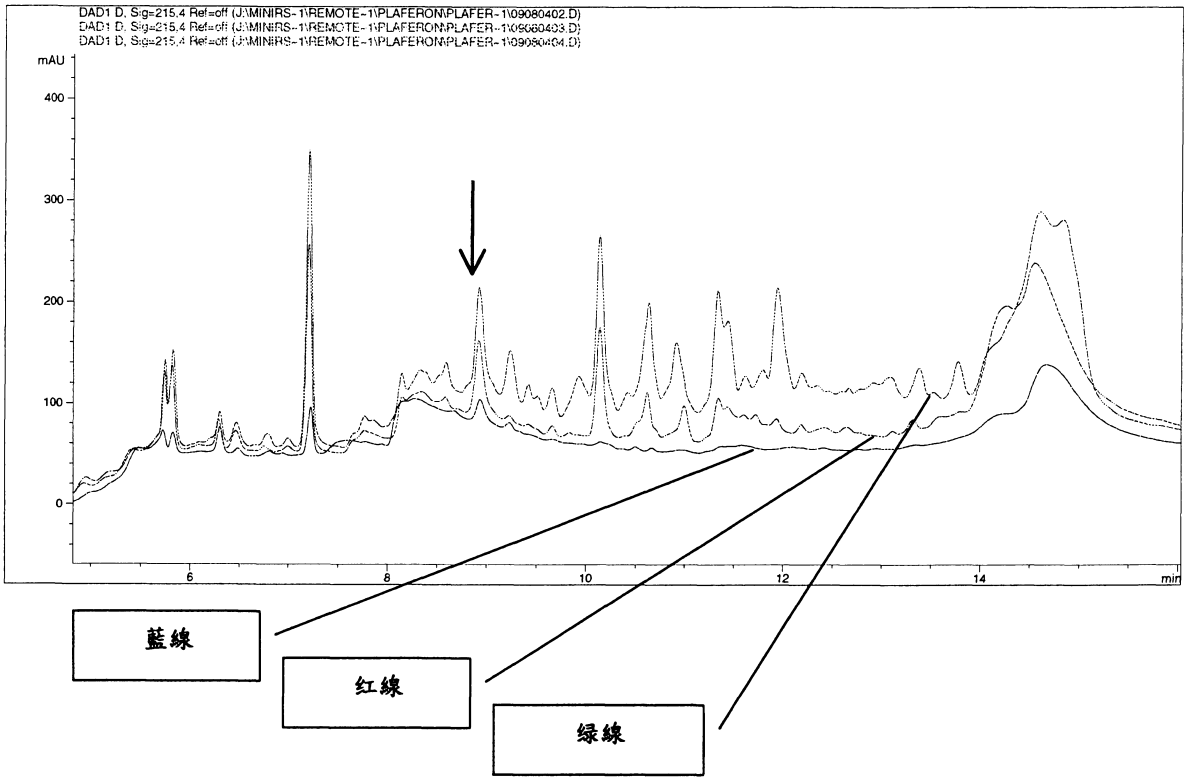
第 8H 圖



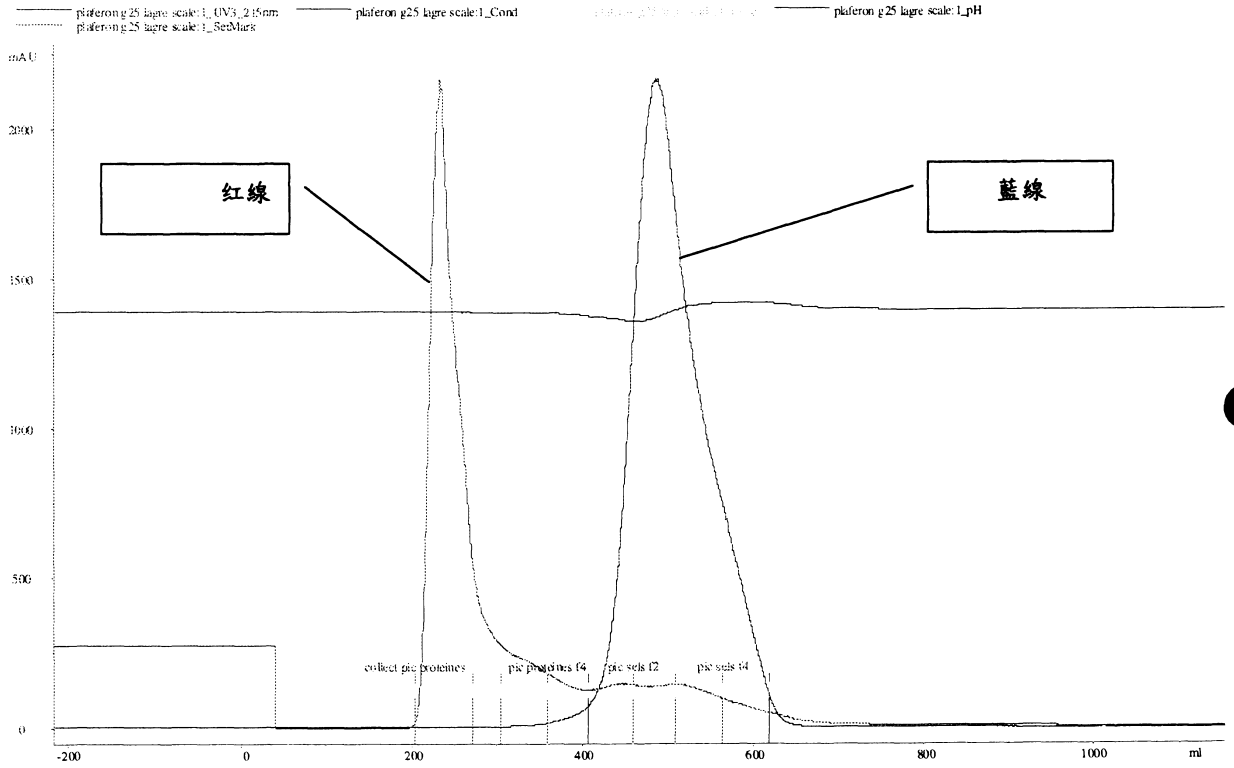
第 9 圖


DAD1 D, Sig=215,4 Ref=off (J:\MINIRS~1\REMOTE~1\PLAFER~1\09080422.D)
mAU
350
300
250
200
150
100
50
0
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
min
藍線
紅線

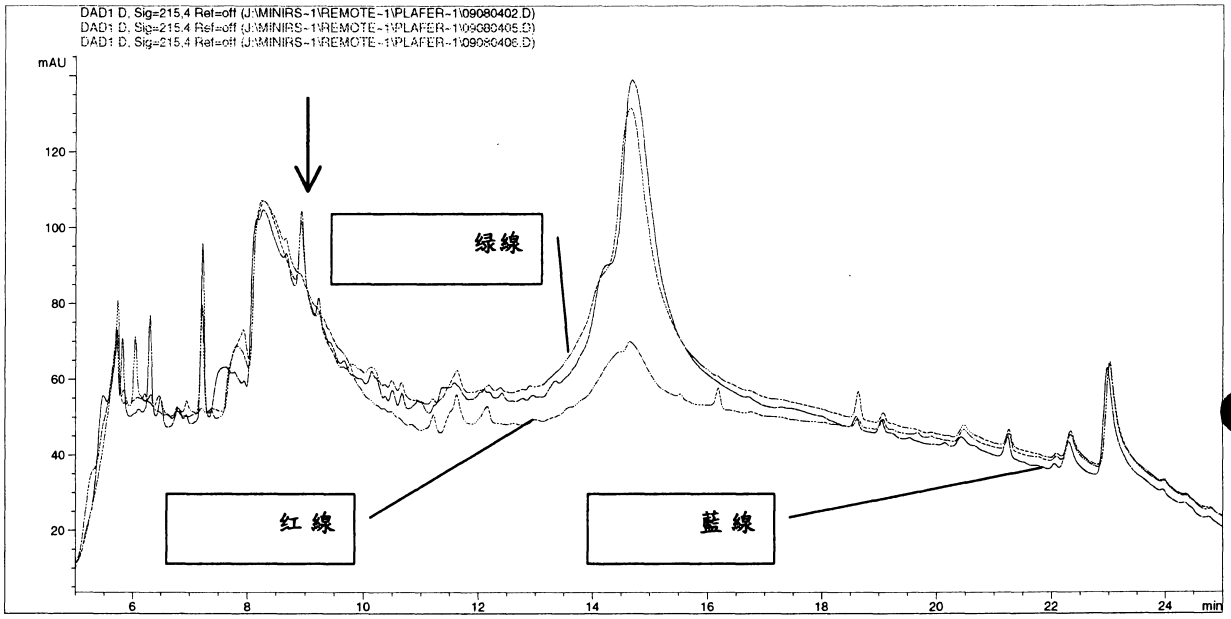
第 10 圖


DAD1 D, Sig=215,4 Ref=off (J:\MINIRS-1\REMOTE-1\PLAFERON\PLAFER-1\09080402.D)
DAD1 D, Sig=215,4 Ref=off (J:\MINIRS-1\REMOTE-1\PLAFERON\PLAFER-1\09080403.D)
DAD1 D, Sig=215,4 Ref=off (J:\MINIRS-1\REMOTE-1\PLAFERON\PLAFER-1\09080404.D)
mAU
400
300
200
100
0
6
8
10
12
14
min
藍線
紅線
绿線

第 11 圖

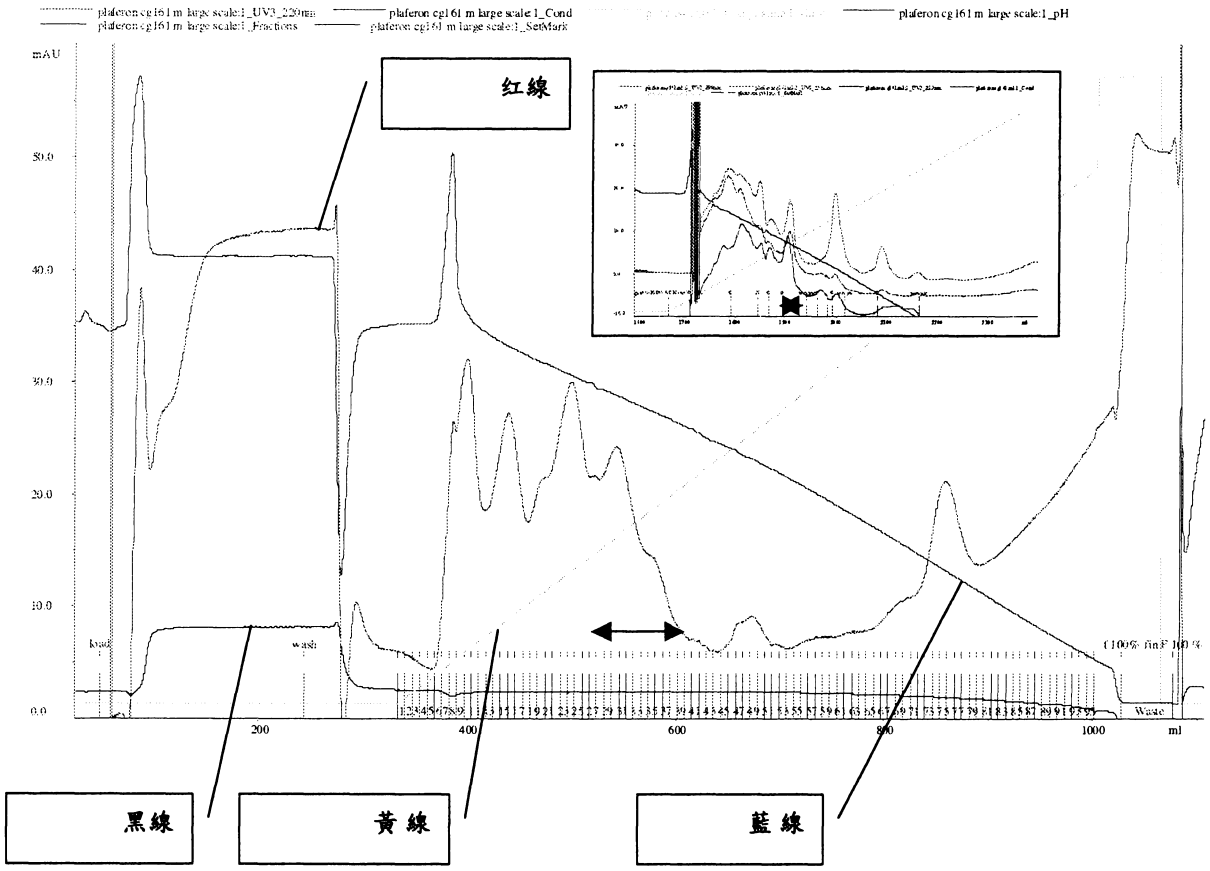

plaferon g25 lagre scale:1_UV3_215nm
plaferon g25 lagre scale:1_SetMark
plaferon g25 lagre scale:1_Cond
plaferon g25 lagre scale:1_pH
mAU
2000
1500
1000
500
0
红線
藍線
collect pic proteines
pic proteines f4
pic sels f2
pic sels f4
-200
0
200
400
600
800
1000
ml

第 12 圖

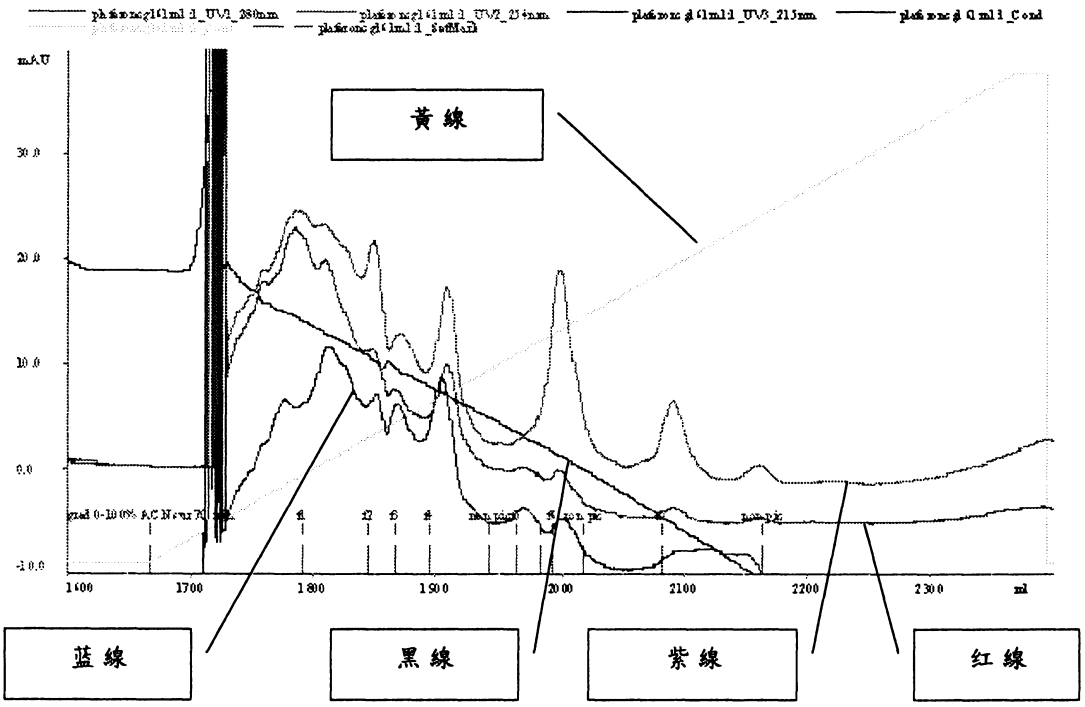

DAD1 D, Sig=215,4 Ref=off (J:\MINIRS~1\REMOTE~1\PLAFER~1\09080402.D)
DAD1 D, Sig=215,4 Ref=off (J:\MINIRS~1\REMOTE~1\PLAFER~1\09080405.D)
DAD1 D, Sig=215,4 Ref=off (J:\MINIRS~1\REMOTE~1\PLAFER~1\09080406.D)
mAU
120
100
80
60
40
20
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
min
绿線
红線
藍線

第 13 圖

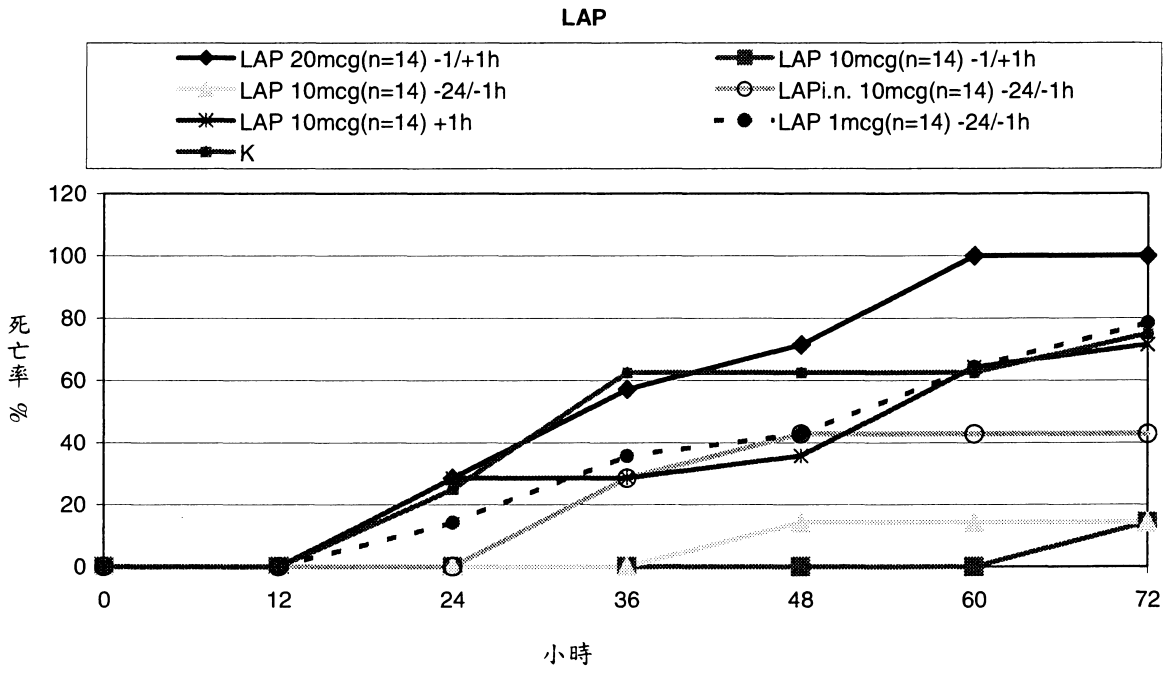
A


plaferon cg161 m large scale:1_UV3_220nm
plaferon cg161 m large scale:1_Cond
plaferon cg161 m large scale:1_pH
plaferon cg161 m large scale:1_Fractions
plaferon cg161 m large scale:1_SetMark
mAU
80.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
wash
200
400
600
800
1000
ml
Waste
紅線
黑線
黃線
藍線

B

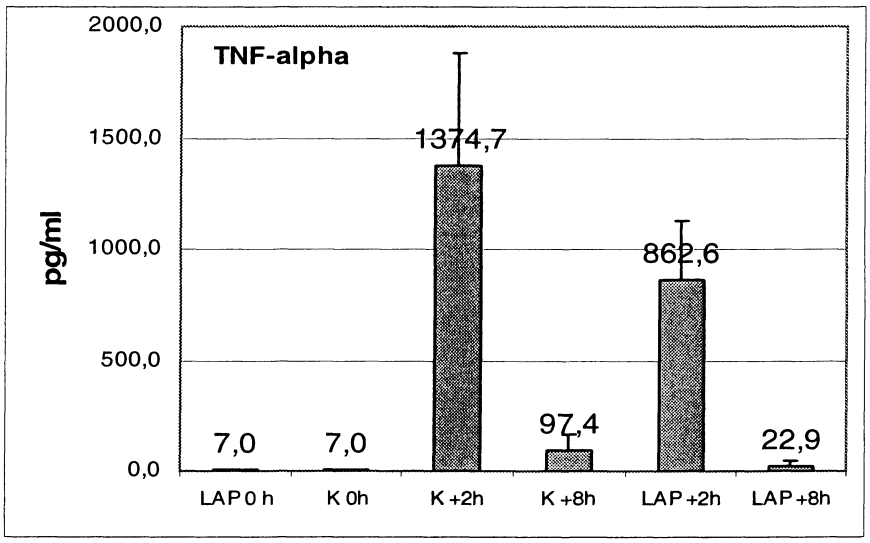

mAU
30.0
20.0
10.0
0.0
-10.0
1400
1700
1800
1900
2000
2100
2200
2300
ml
黃線
藍線
黑線
紫線
紅線

第 14 圖

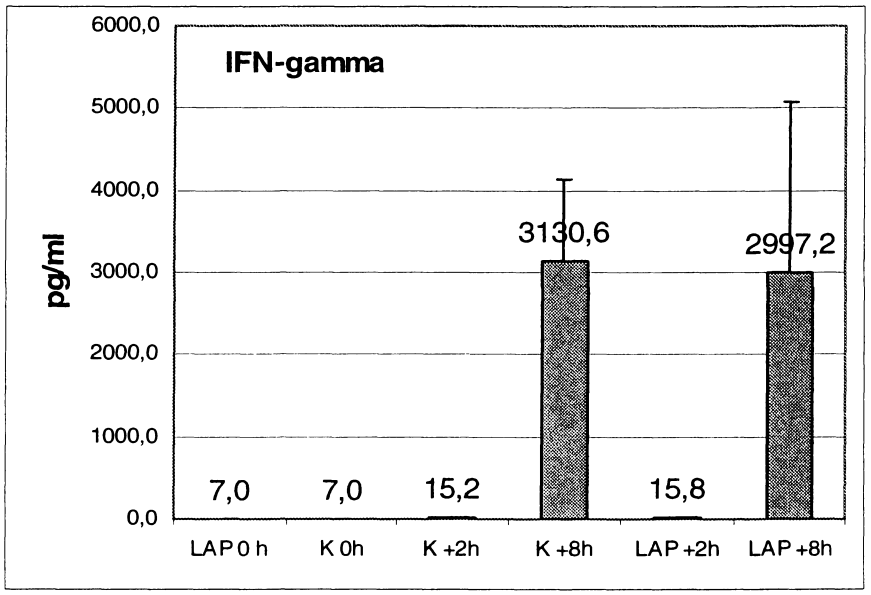

LAP
LAP 20mcg(n=14) -1/+1h
LAP 10mcg(n=14) -1/+1h
LAP 10mcg(n=14) -24/-1h
LAPi.n. 10mcg(n=14) -24/-1h
LAP 10mcg(n=14) +1h
LAP 1mcg(n=14) -24/-1h
K
120
100
80
60
40
20
0
死亡率 %
0
12
24
36
48
60
72
小時

第 15 圖

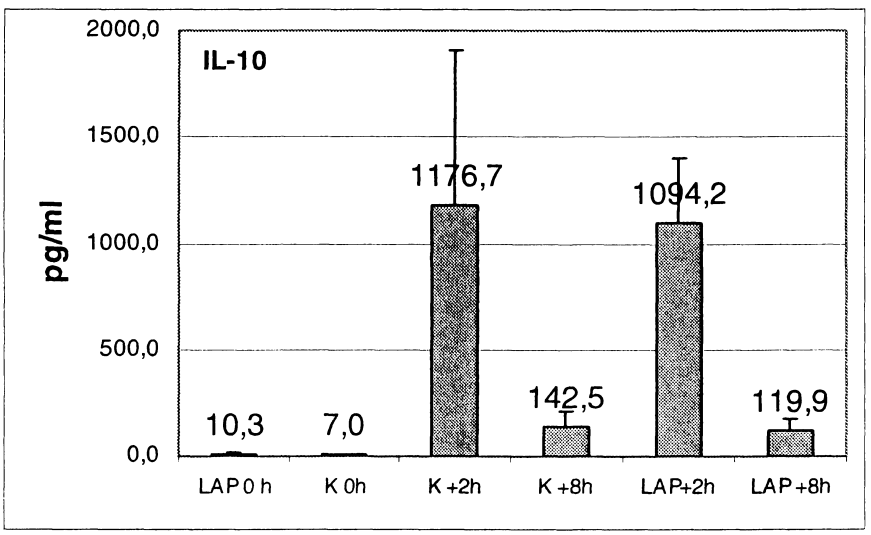
A


TNF-alpha
pg/ml
2000,0
1500,0
1000,0
500,0
0,0
1374,7
862,6
97,4
7,0
7,0
22,9
LAP 0 h
K 0h
K +2h
K +8h
LAP +2h
LAP +8h

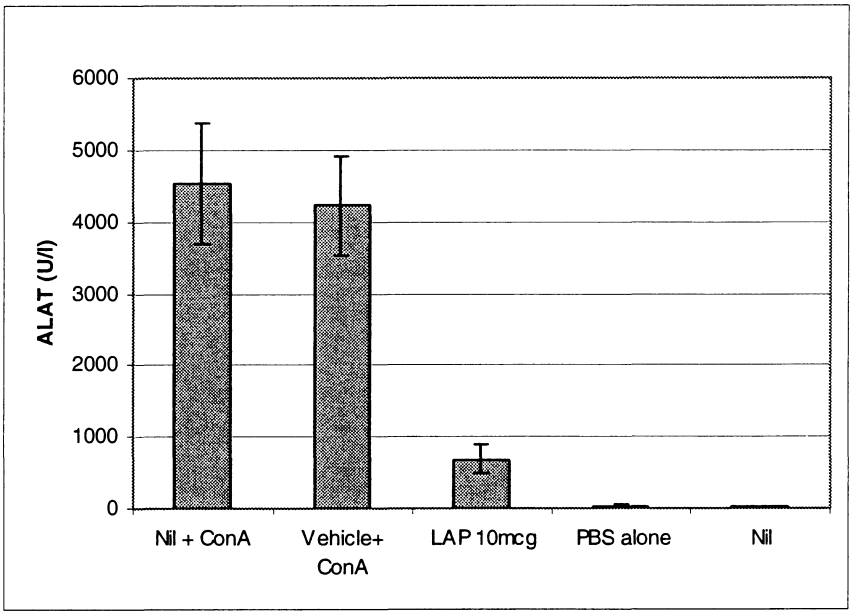
B


IFN-gamma
pg/ml
6000,0
5000,0
4000,0
3000,0
2000,0
1000,0
0,0
3130,6
2997,2
7,0
7,0
15,2
15,8
LAP 0 h
K 0h
K +2h
K +8h
LAP +2h
LAP +8h

C

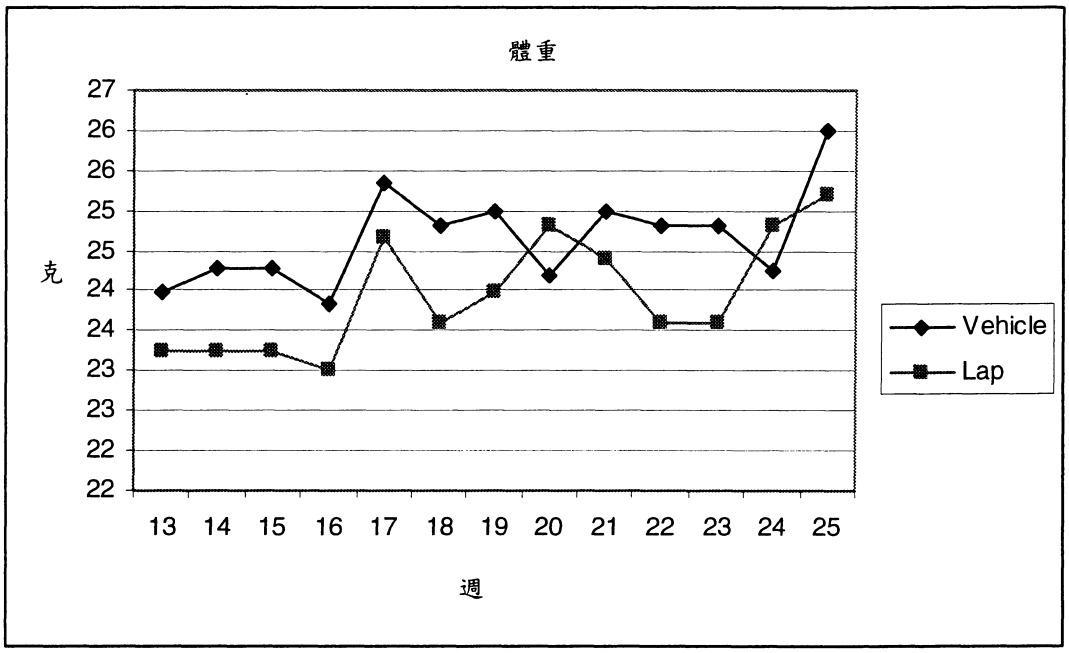

IL-10
pg/ml
2000,0
1500,0
1000,0
500,0
0,0
1176,7
1094,2
142,5
119,9
10,3
7,0
LAP 0 h
K 0h
K +2h
K +8h
LAP+2h
LAP +8h

第 16 圖

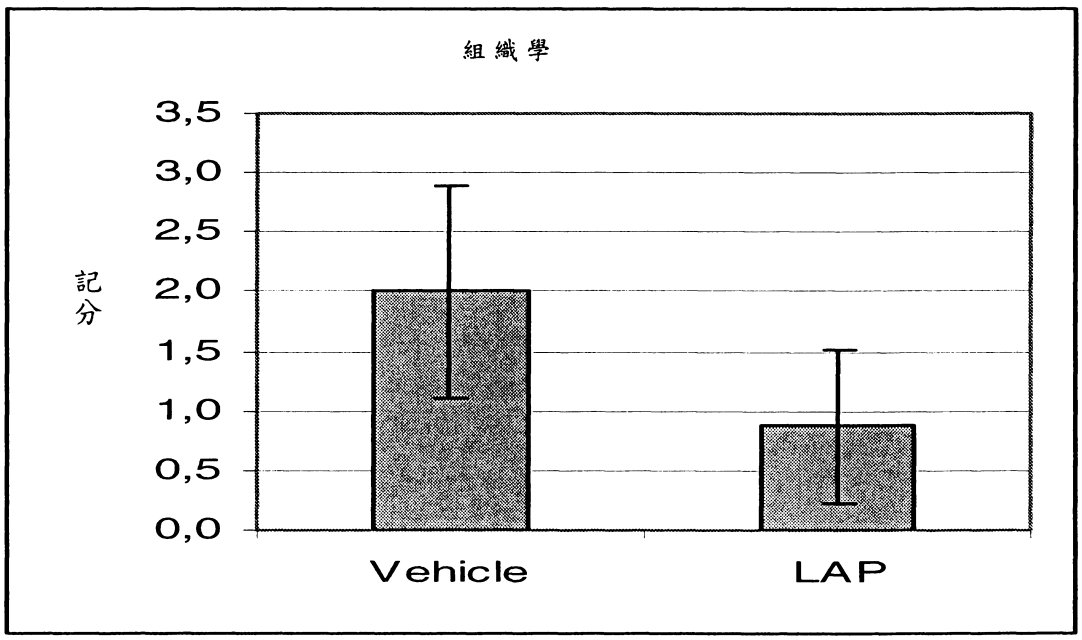

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
ALAT (U/l)
Nil + ConA
Vehicle+ ConA
LAP 10mcg
PBS alone
Nil

第 17 圖

A

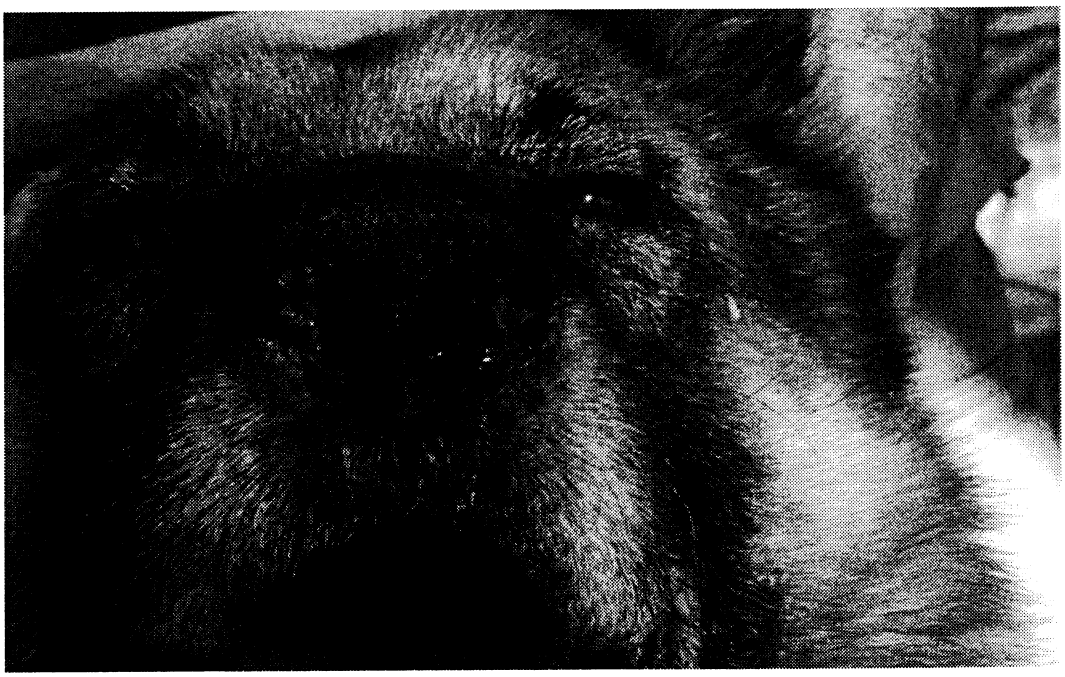

體重
克
27
26
26
25
25
24
24
23
23
22
22
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
週
Vehicle
Lap

B


組織學
記分
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Vehicle
LAP

第 18 圖

A



B



第 18 圖(續)

C



D



第 18 圖(續)



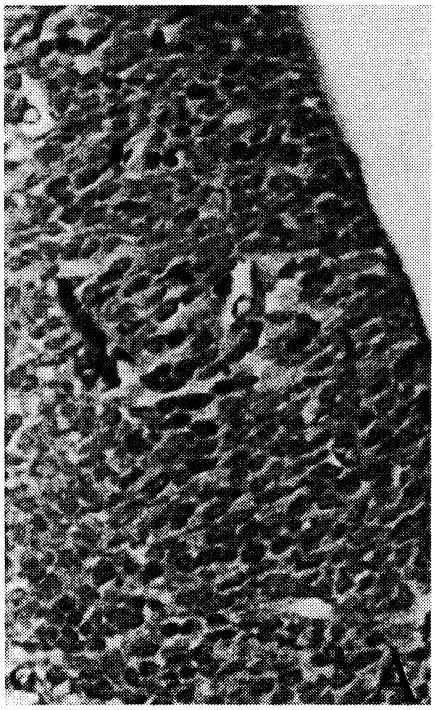
E

F

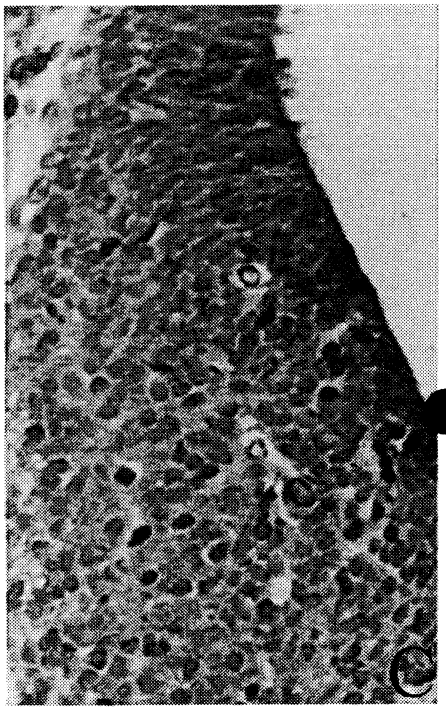


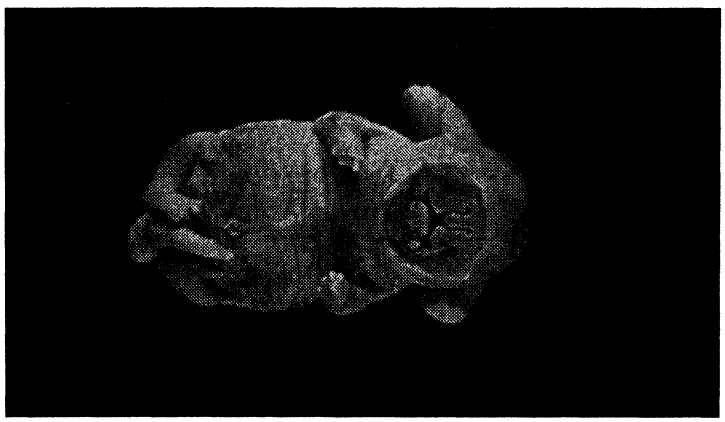
第 18 圖(續)

第 19 圖

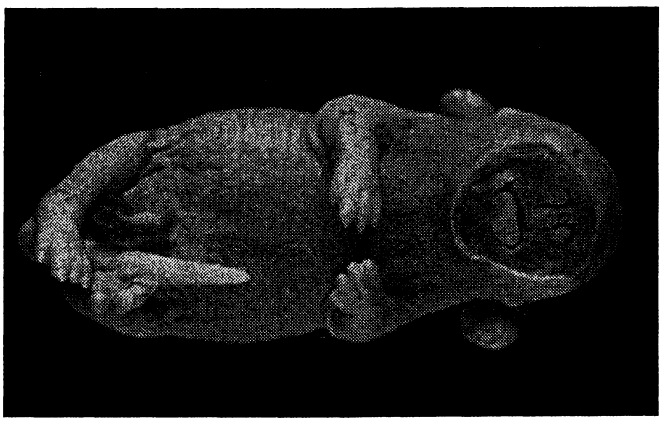








D



E

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 5 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明:

(無)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：