

申請日期	88.4.78
案 號	88108150
類 別	C07K 14/21, C12N 15/31

(以上各欄由本局填註)

公告本

528760

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	胜肽重複免疫原
	英 文	"PEPTIDE REPEAT IMMUNOGENS"
二、發明 創作人	姓 名	1.黃 昭 蓮 2.徐 嘉 澤 3.丁 俊 仁
	國 籍	1.2.3. 均中華民國
三、申請人	住、居所	1.台北市南港區研究院路2段61巷3弄20-1號3樓 2.台南縣西港鄉西港村29鄰堀子頭67號 3.新竹市東大路二段172巷29號3樓
	姓 名 (名稱)	中央研究院
三、申請人	國 籍	中華民國
	住、居所 (事務所)	台北市南港區研究院路2段128號
三、申請人	代 表 人 姓 名	李 遠 哲

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國（地區）	申請專利，申請日期：	案號：	， ☐ 有 ☐ 無主張優先權
美國	1999年10月05日	09/412,558	☒ 有 ☐ 無主張優先權

有關微生物已寄存於：	，寄存日期：	，寄存號碼：
食品工業發展研究所	2000年04月25日	CCRC 940293

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

發明之背景

要成功開發蛋白質系疫苗通常必須在增加特定抗原之免疫原性與該增加引起之潛在毒性之間達到巧妙平衡。舉例言之，在動物研究中使用之有效佐劑(例如完全佛洛德(Freud)佐劑)，毒性可能太高而無法用於為人類製備之疫苗中。

發明之概要

本發明係基於發現對胜肽類抗原產生免疫反應之新穎手段而完成，該新穎手段包含將胜肽多鏈化以及將所得之多鏈體(concatemer)與假單胞菌外毒素之受器結合區域融合。該融合蛋白質在多種哺乳動物中會誘生抗原-特異性抗體，且未觀察到或極少觀察到毒性。

所以，本發明之特徵為提供一種多胜肽，其包括(1)胜肽序列之至少二個複本(例如至少12或16個複本)，以及(2)假單胞菌外毒素A之受器結合區域。

胜肽序列在長度上必須具有至少2個胺基酸(例如長度為至少3, 5, 7, 9或10個胺基酸)。在較佳實施例中，胜肽序列之長度少於1000個胺基酸(例如長度少於500, 100, 50或20個胺基酸)。該胜肽序列包括任何可引起有利免疫反應之抗原，諸如促性腺激素釋放荷爾蒙(GnRH)(例如EHWSYGLRPG [序列識別編號：1])，或牛痘病毒外套蛋白質之片段(例如LIGICVAVTVAI [序列識別編號：2])。

受器結合區域為與LDL/ α_2 -顯微球蛋白細胞受器特異性結合之多胜肽中之胺基酸序列。受器結合區域之一例為銅

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(2)

綠假單胞菌外毒素 A (PE) 之胺基酸 1-252 (區域 1a) :

mhliphwiplvaslgllaggssasaeeafdlwnecakacvldlk
 dgvrssrmsvdpaiadtngqgvlyhysmvlegndalklaidnals
 itsdgltirleggvepnkpvrtsytrqargswslnwlvpighekp
 snikvfihelnagnqlshmspiytiemgdellaklardatffvra
 hesnemqptlaishagvsvvmaqtqprrekrwsewasgkvlclld
 pldgvylnlaqqrcnlddtwegkiyrv(序列識別編號: 3)

方才所述序列之變異型(包括取代、刪除或添加), 只要受器結合區域能與 LDL/ α_2 -顯微球蛋白細胞受器特異性結合, 即被允許使用。

多胜肽中各種單元之位置可加以改變, 惟其前提為該多胜肽在哺乳動物中必須仍能引起免疫反應。舉例言之, 胜肽序列之所有複本可呈一串聯系列, 亦即所有複本形成單一區段之胜肽重複單元, 任何二個複本之間未插入其他胺基酸。此外, 只要多胜肽做為抗原之期望功能未受到干擾, 受器結合區域可位於多胜肽之任何位置(例如在 N-端、在 C-端、在內部或在胜肽序列之二複本之間)。

本發明亦包括編碼本發明多胜肽之核酸(例如表現載體, 包括病毒載體)。該核酸可被用於製備裸 DNA 系疫苗, 或被用於大量製造本發明之多胜肽。

此外, 本發明之另一特徵為提供一種製造多胜肽之方法, 其包含(1)提供本發明之核酸, (2)將該核酸引進細胞(例如細菌或真核細胞, 包括細胞系及原始細胞), 以及(3)在細胞中表現多胜肽。

五、發明說明 (3)

本發明之多胜肽及核酸可被用於提供新穎抗原以及對特异性胜肽序列能引起免疫反應之疫苗。此等抗原可被配製成在哺乳動物及人類中安全且有效之疫苗，或至少可在人類及/或動物模式(包括靈長類動物模式)中測試其效力。

本發明之其他特徵及優點從下文之圖式及詳細說明，以及申請專利範圍中可很容易明白。

圖式之簡要說明

圖1為在本發明之多胜肽中 useful 之 GnRH 胜肽之序列(序列識別編號：1)以及編碼該序列或其部份之引子之序列(寡聚物 A 為序列識別編號：4；寡聚物 B 為序列識別編號：5)。

圖2係說明如何將圖1之引子延長、變性而後黏接，以製造編碼胜肽序列之多鏈體之核酸之流程圖。

圖3係說明如何將圖2所示之多鏈體核酸進行最終之 PCR 擴增，以在多鏈體之端部引進終止密碼子(stop codon)及供選殖用之適當限制性核酸內切酶切斷部位之流程圖。轉接引子 A 被定名為序列識別編號：6。轉接引子 B 被定名為序列識別編號：7。含有 EcoRI 部位之 5' 伸出部序列被定名為序列識別編號：8。含有 SacII 部位之 5' 伸出部序列被定名為序列識別編號：9。

詳細說明

本發明係關於具有胜肽類抗原之多個複本且該抗原與假單胞菌外毒素之受器結合區域融合之新穎多胜肽。咸信胜肽類抗原之多個複本會使各單元體胜肽序列中存在之抗原決定部位之免疫展現性增加，惟其機制尚不清楚。此外，

五、發明說明 (4)

咸信外毒素片段會增加多胜肽與抗原展現細胞間之結合，藉此促使胜肽序列被攝取及展現。

I. 抗體之產生

本發明之多胜肽可被用於產生會與單元體胜肽序列特異性結合之抗體。此等抗體，於診斷及/或治療措施需要增加、抑制或檢測任何含有胜肽序列展現之抗原決定部位之分子時，可被使用。

更特定而言，各種宿主動物可藉注射含有本發明多胜肽之組合物而被免疫。該宿主動物包括兔子、小鼠、天竺鼠及家鼠。可視宿主之種類使用各種佐劑以增加免疫反應，此等佐劑包括(但非限於)佛洛德佐劑(完全及不完全佐劑)、礦物質凝膠諸如氫氧化鋁、界面活性劑諸如溶血卵磷脂、普盧蘭尼克(pluronic)多元醇、多陰離子化合物、胜肽、油性乳液、鑰孔蠃血藍素(keyhole limpet hemo-cyanin)、二硝基酚、以及對人類使用具潛力之佐劑諸如BCG(bacille Calmette-Guerin，卡氏桿菌)及小棒桿菌(Corynebacterium parvum)。

抗體包括多株抗體、單株抗體、人型化或嵌合抗體、單鏈抗體、Fab片段、F(ab')₂片段、以及用Fab表現庫產生之分子。

單株抗體(對特定抗原之同質群抗體)可用上述多胜肽及標準融合瘤技術製備(例如參考Kohler et al., Nature 256:495, 1975; Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511, 1976; Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:292, 1976; Hammerling et al., In: Monoclonal

五、發明說明 (5)

Antibodies and T cell Hybridomas, Elsevier, NY, 1981 ; 美國專利 4,376,110 號 ; Kosber et al., Immunology Today 4:72, 1983 ; Cole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026, 1983 ; 以及 Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1983)。該抗體可屬於任何免疫球蛋白類別，此等類別包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 及其任何亞類。本發明之產單株抗體融合瘤可在試管中或活體內培養。融合瘤在活體內能生產高滴度單株抗體之能力使此法成為優異之生產方法。

該抗體例如可被用於檢測生物檢體中抗原之存在而做為診斷測定法之一部份，其亦可被用於評估其他治療措施之醫療效力。

此外，可以使用被開發來生產「嵌合抗體」之技術 (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851, 1984 ; Neuberger et al., Nature 312:604, 1984 ; Takeda et al., Nature 314:452, 1984)，該技術係將來自具有適當抗原特異性之鼠抗體分子之基因與來自具有適當生物活性之人類抗體分子之基因拼接。嵌合抗體為分子中之不同部分衍生自不同種類動物者，諸如具有衍生自鼠單株抗體之可變區及人類免疫球蛋白之恆定區者。

另外，生產單鏈抗體之技術 (美國專利 4,946,778 號，4,946,778 號及 4,704,692 號) 可被修改而用於生產對抗特定胜肽抗原之單鏈抗體。單鏈抗體藉將 Fv 區之重鏈及輕鏈片段經由胺基酸橋連接，生成單鏈多胜肽而形成。

五、發明說明 (6)

能鑑識特異性抗原決定部位並與其結合之抗體片段可藉已知之技術製造。舉例言之，此等片段包括(但非限於)藉胃蛋白酶消化抗體分子而製造之 $F(ab')_2$ 片段，以及藉還原 $F(ab')_2$ 片段之二硫鍵而生成之Fab片段。

II. 疫苗組合物之製造及使用

本發明包括疫苗組合物(例如經腸道外給予之可注射疫苗)，其含有至少一種本發明之多胜肽以及視情況可含有醫藥上允許之載劑，諸如稀釋劑，如磷酸鹽緩衝之食鹽水或碳酸氫鹽溶液(例如0.24M $NaHCO_3$)。組合物使用之載劑根據投藥之方式及途徑以及標準醫藥劑實務來選擇。適當的醫藥載劑及稀釋劑，以及其之使用在藥劑上之必要性被說明於萊明登藥劑學(Remington's Pharmaceutical Sciences)。若需要，該新穎疫苗組合物亦可包括佐劑，例如霍亂毒素、大腸桿菌熱不安定性腸毒素(LT)、脂質體(liposome)或免疫刺激性複合物(ISCOM)。

疫苗之投與量，可由熟習本技藝人士視多胜肽中之特定胜肽抗原、佐劑是否與抗原一起投與、被一起投與之佐劑之類型、投藥之方式及頻率以及期望之作用(例如保護或治療)來決定。一般而言，該新穎疫苗抗原之投與量為成人每劑在1微克(μg)至100毫克之範圍內。若佐劑與疫苗一起投與，成人每劑通常在1微微克(1 ng)至1毫克之範圍內。需要時，可重複投與，此由熟習本技藝人士決定。舉例言之，第一劑之後，可追加3劑，每劑相隔一星期。在第一次免疫之後8至12星期可給予追加注射，並於16至20星期給

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (7)

予第二次追加注射，追加注射係使用相同的配方。從個別接受注射者取得血清或T-細胞，以測試對抗神經毒素之疫苗是否引起免疫反應。測定對抗特異性抗原之抗體及細胞毒殺性T-細胞之方法為本技藝所熟知。需要時可以給予額外之追加劑量。藉著改變多胜肽之量，多胜肽中胜肽抗原之複本數目及投與之頻率，可以使免疫方案達到最佳而引起最大之免疫反應。

在將上述組合物投與人類之前，宜在動物中先進行毒性及效力測試。在效力測試之一例中，小鼠(例如瑞士-威柏斯特鼠)經由口服或腸道外途徑接種含有本發明多胜肽之組合物。就對抗感染物之疫苗而言，初始接種之後或視需要而追加接種之後，用LD₉₅劑量之感染物挑釁小鼠(以及接受偽疫苗接種之對應對照小鼠)。亦可用死亡以外之指標做為試驗終點。若接種疫苗之小鼠之死亡率低於接種偽疫苗之小鼠者則被判定為有效。死亡率間之差異較佳在統計學上具顯著性。在上述測試法中可用兔子取代小鼠。

另外，新穎之疫苗組合物可以ISCOMs投與。在多種使用ISCOMs做為抗原之輸送載體之感染症實驗模型(包括弓形蟲病及伊普斯田-巴爾病毒(Epstein-Barr)-誘生之腫瘤)中，曾產生保護性免疫力。曾發現被包埋在ISCOMs中之抗原於劑量低達1微克(μ g)時，仍會產生類型I調理之細胞毒殺性T細胞反應(Takahashi et al., Nature 344:873-875, 1990)。

相信熟習本技藝者，根據上述揭示之內容及下文之說明無需費心研究，即可充分利用本發明。下列實例僅係例示

五、發明說明 (8)

說明熟習本技藝人士該如何實施本發明，而非以任何方式限制揭示內容之其餘部分。本揭示文引用之任何刊物皆被納入本文以供參考。

實例1：對抗促性腺激素釋放荷爾蒙之多鏈體型疫苗

促性腺激素釋放荷爾蒙(GnRH)為由下視丘之弓形核生產之十胜肽，其在人類中可調節黃體化激素及濾泡-刺激性激素之表現，最終將調節性腺之發育。此外，GnRH及其受器之表現增加與多種腫瘤有關，此等腫瘤包括乳房、卵巢、子宮內膜及前列腺之癌症。例如參考Imai et al., Cancer 74:2555-2561, 1994；Eidne et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 64:425-435, 1987；以及Irmer et al., Cancer Res. 55:817-822, 1995。所以對抗GnRH之抗體可提供一種調控生殖激素活性及/或癌症發育及惡化之手段。

為了製造含有與受器結合區域融合之GnRH多鏈體之抗原，使用如圖1-3所列出之下述方法。該方法被命名為模板重複PCR(TRPCR)。

設計二供TRPCR用之寡核苷酸(圖1)。寡核苷酸A編碼標的抗原GnRH。寡核苷酸B與寡核苷酸A互補。將寡核苷酸A分成5'半部A1及3'半部A2，二半部為等長。將寡核苷酸B分成5'半部B1及3'半部B2，二半部亦為等長。A1與B1互補以及A2與B2互補。

熱循環器被設定為於94℃變性30秒，於37℃黏接30秒，以及於72℃延長30秒。使用寡核苷酸A及B進行30個循環之PCR，最後於72℃延長10分鐘。如圖2所例示說明者，該

五、發明說明 (9)

PCR應產生含有重複GnRH編碼序列之DNA。

二轉接引子(轉子A及轉子B)被設計成能在重複開放譯碼區(ORF)之終端添加一適當終止密碼子及在ORF之旁側添加二適當的限制性核酸內切酶切斷部位(圖3)。在該步驟(被命名為轉接PCR)中,PCR之模板為上文製得之TRPCR產物之100倍稀釋液。熱循環器被如上述設定,不過變性被設定為1分鐘而非30秒。生成之PCR產物在5'端含有一SacII部位及在3'端含有一EcoRI部位,以及在ORF之終端含有一終止密碼子。

然後將TPPCR及轉接PCR之產物在聚丙烯醯胺凝膠上檢定。大部分之TPPCR產物之長度為500 bp至700 bp。轉接PCR之後,產物呈梯形分布,最低帶含有GnRH DNA重複單元之二聚物以及移行最緩慢之帶含有較高次之多元體。重複單元之數目為3到至少12。一含有12個重複單元之GnRH編碼序列之純系(clone)被選擇用於進行進一步研究。

將編碼12個重複單元之GnRH之DNA片段次選殖入質體pPEDI中,其中該pPEDI質體係藉著將pJH14(Hwang et al., J. Biol. Chem. 264:2379-2384, 1989)中PE之編碼Ia區域之序列選殖入pET(Novagen公司提供)而製得。該質體表現一含有PE之Ia區域(包括毒素之毒素受器結合區域)以及在其N-端含有經His₆標籤之多胜肽。GnRH重複單元被插在PE結構基因之3'端而製得pPEDIG12。該表現載體製造之蛋白質被命名為PEIa-GnRH12。

將pPEDIG12轉形入BL21(DE3)*lysS*中。將轉形體在含有苜

五、發明說明 (10)

基青黴素(50微克/毫升)、氯黴素(25微克/毫升)及四環素(10微克/毫升)之LB培養基中，於37℃培養。當培養物之A₆₀₀達到0.2時，將IPTG加到培養基中並使其最終濃度為0.1 mM。將細胞再培養90分鐘，然後收取。既然PEIa-GnRH12以內涵體之形式被過度表現，因此用6 M尿素萃取細胞。

然後將萃取物用Novagen pET His-Tag 系統純化。將含有PEIa-GnRH12之部分收集及對50 mM乙酸銨(pH 4.0)透析。當貯存於4℃時，PEIa-GnRH12可保持安定至少6個月。進行鎳-瓊脂糖親和管柱層析後，將PEIa-GnRH12單離，其藉SDS-PAGE測定時，純度為約95%。

為測試該新穎免疫原，將6星期大之紐西蘭雌兔用PEIa-GnRH12免疫。將含100微克PEIa-GnRH12及125微克磷酸鋁(pH7.0)之注射液0.5毫升在第一時點(出生後6星期)注射入兔子中。第一次免疫後一星期，將0.5毫升相同之注射液注射入兔子中以進行第二次免疫，繼而在第一次免疫後二星期給予同樣之注射。三次免疫後，收集血清以進行ELISA及免疫吸漬分析。為測試該對抗多元體抗原之抗體究竟是針對單元體之抗原決定部位，還是針對橫跨單元體間連接部之抗原決定部位，製造數種含有GnRH之各種多元體之GST融合蛋白質以做為ELISA之標靶。

在被免疫兔子中製造之抗體無法識別單獨的GST，而血清之5000倍稀釋液可以識別所有GST-GnRH融合蛋白質，而且不論GST融合蛋白質含有多少GnRH重複單元，識別程度均相同。此結果暗示回應免疫原產生之抗體大部分能識別

五、發明說明 (11)

單元體 GnRH 抗原決定部位，而無法識別多鏈化創造之任何雜合抗原決定部位。

GST- GnRH1 及 GST- GnRH5 被用做 ELISA 特異性標靶。來自被三次免疫之兔子之血清，經 10,000 倍稀釋，能識別 GST- GnRH1 及 GST- GnRH5 且識別程度相同，藉此可以確證對抗免疫原之免疫反應係針對 GnRH 單元體-特異性抗原決定部位。

為證明新穎免疫原引起之抗體具生理活性，監測被免疫兔子之卵巢發育。兔子亦用 PEIa-TopN8 免疫以做為對照組，其中該 PEIa-TopN8 為含有 PE 之 Ia 區且與 8 重複單元之 10 胺基酸拓撲同分異構酶 N-端胜肽融合之多胜肽。被 PEIa-TopN8 免疫之兔子顯示正常的卵巢發育，而被 PEIa- GnRH12 免疫之兔子之卵巢在尺寸上顯著減少。因此，製造之 GnRH 免疫原可被用來誘生在治療 GnRH- 相關疾病上之自體抗體。

為進一步證明新穎 GnRH 免疫原之用途，亦將小鼠及豬用 PEIa-GnRH12 免疫。小鼠免疫計畫與上述兔子免疫計畫相同，不過每隻小鼠每次注射含有 10 微克 PEIa-GnRH12 及 25 微克磷酸鋁 (pH7.0) 之注射液 100 微升。另外，24 日大之豬注射含有 10 毫克 PEIa- GnRH12 及 250 微克磷酸鋁 (pH7.0) 之注射液 1 毫升一次。GnRH- 特異性抗體在小鼠及豬以及兔子中均易被引起，此顯示該抗原在各種動物中均會引起免疫反應。再者，單次免疫足以引起免疫反應。

實例 2：對抗牛痘病毒之多元體疫苗

五、發明說明 (12)

使用上文實例1所述之PCR，構築含有牛痘病毒外套蛋白質胜肽 LIGICVAVTVAI(序列識別編號：2)之重複單元之DNA序列，以代替GnRH胜肽序列。按照實例1之方法，製造及純化含有16個重複單元之病毒外套蛋白質胜肽之PE融合蛋白質。

將六星期大之兔子注射含有100微克病毒胜肽重複抗原及100微克完全佛洛德佐劑之注射液1毫升。四星期後，該兔子接受第二次1毫升之注射液，該注射液含有100微克抗原及100微克不完全佛洛德佐劑。第一次免疫後8星期，將兔子注射含100微克抗原(不含佐劑)之注射液1毫升。結果用病毒外套蛋白質免疫原免疫三次之兔子產生牛痘病毒-特異性抗體。

此顯示將重複單元之胜肽與PE受器結合區域連接之方法在製備第二種胜肽上亦成功。

寄存資訊

質體 pPEDI 已於西元 2000 年 4 月 25 日被寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為 CCRC 940293。

其他實施例

應了解雖然本發明在詳細說明中已被說明，但前述說明僅係例示性說明，而非限定本發明之範圍，本發明之範圍由隨附之申請專利範圍界定。其他態樣，優點及修改亦在本發明之範圍內。

四、中文發明摘要(發明之名稱： 胜肽重複免疫原)

本發明係關於一種多胜肽，其包括(1)假單胞菌(*Pseudomonas*)外毒素A之受器結合區域，以及(2)胜肽序列之至少2個複本。

英文發明摘要(發明之名稱：“PEPTIDE REPEAT IMMUNOGENS”)

The invention relates to a polypeptide including (1) a receptor binding domain of a *Pseudomonas* exotoxin A, and (2) at least two copies of a peptide sequence.

GnRH

胜肽序列

E H W S Y G L R P G

DNA 序列

A 1 A 2
GAACATTGGTCATAT GGACTACGGCCGGGA
CTGTACCAGTATA CCTGATGCCGGCCCT
B 1 B 2

引子

寡聚物A
寡聚物B

A 1 A 2
GAACATTGGTCATAT GGACTACGGCCGGGA
CCTGATGCCGGCCCT CTGTACCAGTATA
B 2 B 1

圖 1

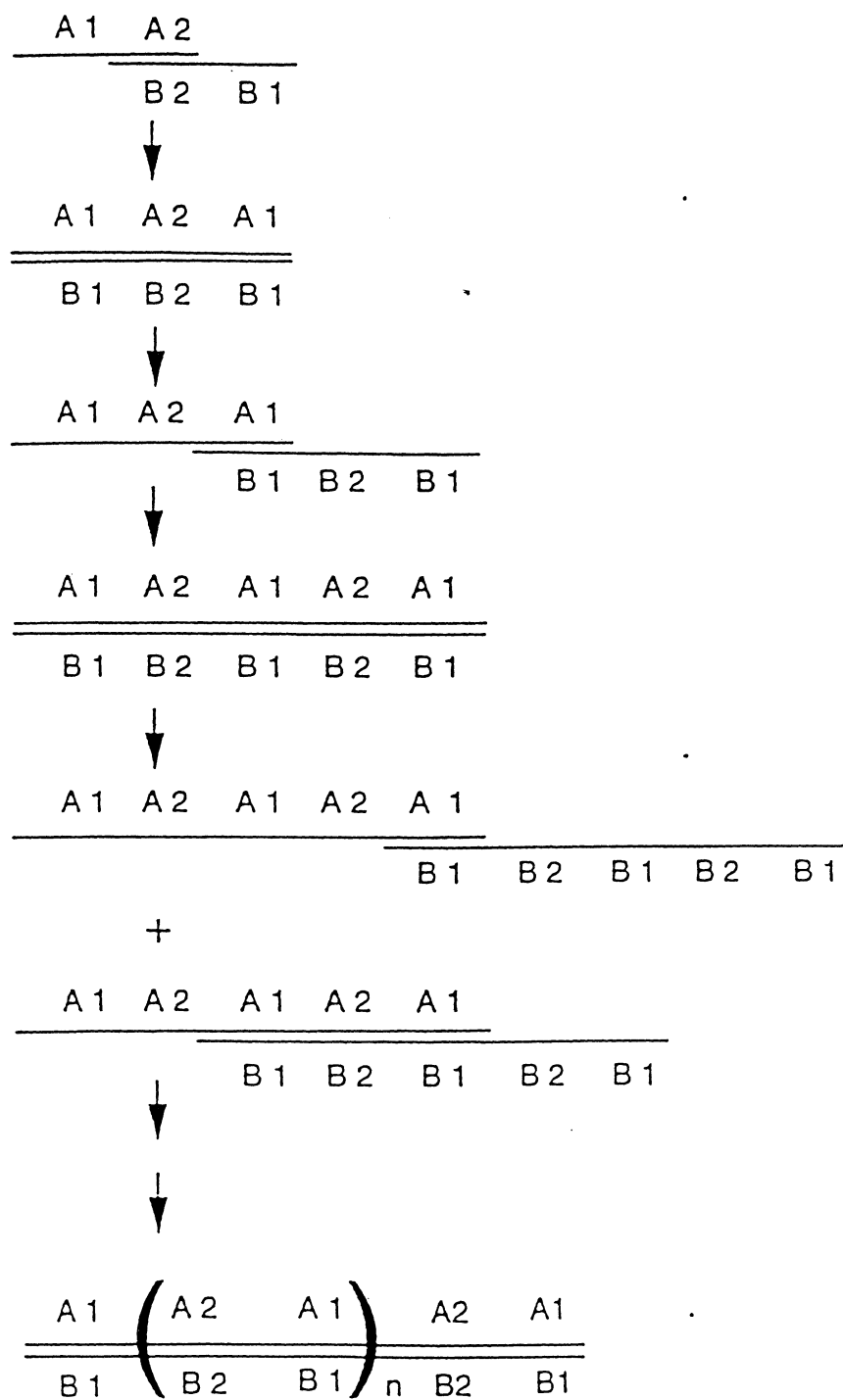


圖 2

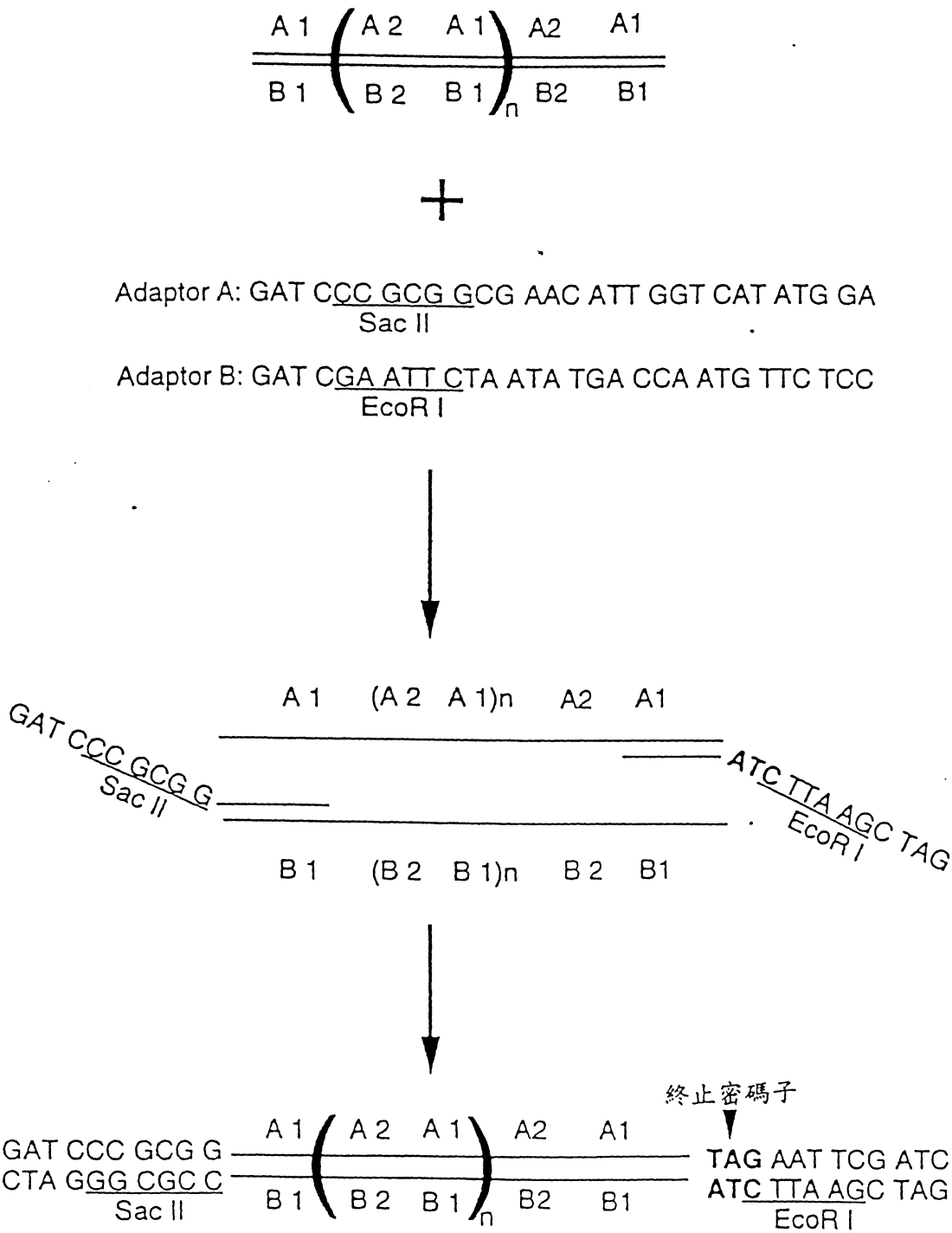


圖3

六、申請專利範圍

92. 2. 13修正
 年 月 日
 補充

公告本

1. 一種多胜肽，其包含（1）綠膿桿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）外毒素A之受器結合區域，以及（2）促性腺激素釋素之抗原決定部位之胜肽序列之至少二個複本，以串聯系列連續重複，
 其中綠膿桿菌外毒素A之受器結合區域為：
 MHLIPHWIPLVASLGLLAGGSSASAAEEAFDL
 WNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDPAIADTN
 GQGV LHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITSDG
 LTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWL
 VPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIE
 MGDELLAKLARDATFFVRAHESNEMQPTLAIS
 HAGVSVVMAQTQPRREKRWSEWASGKVLCLL
 DPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRV（序列識別編號：3）。
2. 根據申請專利範圍第1項之多胜肽，其中該促性腺激素釋素之抗原決定部位之胜肽序列包含EHWSYGLRPG（序列識別編號：1）。
3. 根據申請專利範圍第1項之多胜肽，其中該多胜肽包含促性腺激素釋素之抗原決定部位之胜肽序列之10至20個複本。
4. 一種核酸，其編碼申請專利範圍第1項之多胜肽。
5. 根據申請專利範圍第4項之核酸，其編碼申請專利範圍

六、申請專利範圍

第2項之多胜肽。

6. 根據申請專利範圍第4項之核酸，其編碼申請專利範圍第3項之多胜肽。

7. 一種製備多胜肽之方法，其包含：

(1) 提供申請專利範圍第4項之核酸，並接合至表現載體；

(2) 將該表現載體引進細胞中；

(3) 誘發細胞中表現多胜肽；及

(4) 分離、純化並鑑定該多胜肽。

8. 根據申請專利範圍第7項之方法，其包含：

(1) 提供申請專利範圍第5項之核酸，並接合至表現載體；

(2) 將該表現載體引進細胞中；

(3) 誘發細胞中表現多胜肽；及

(4) 分離、純化並鑑定該多胜肽。

9. 根據申請專利範圍第7項之方法，其包含：

(1) 提供申請專利範圍第6項之核酸，並接合至表現載體；

(2) 將該表現載體引進細胞中；

(3) 誘發細胞中表現多胜肽；及

(4) 分離、純化並鑑定該多胜肽。

10. 根據申請專利範圍第7至9項中任一項之方法，其中該

六、申請專利範圍

細胞係選自細菌、酵母菌、動物細胞及昆蟲細胞。

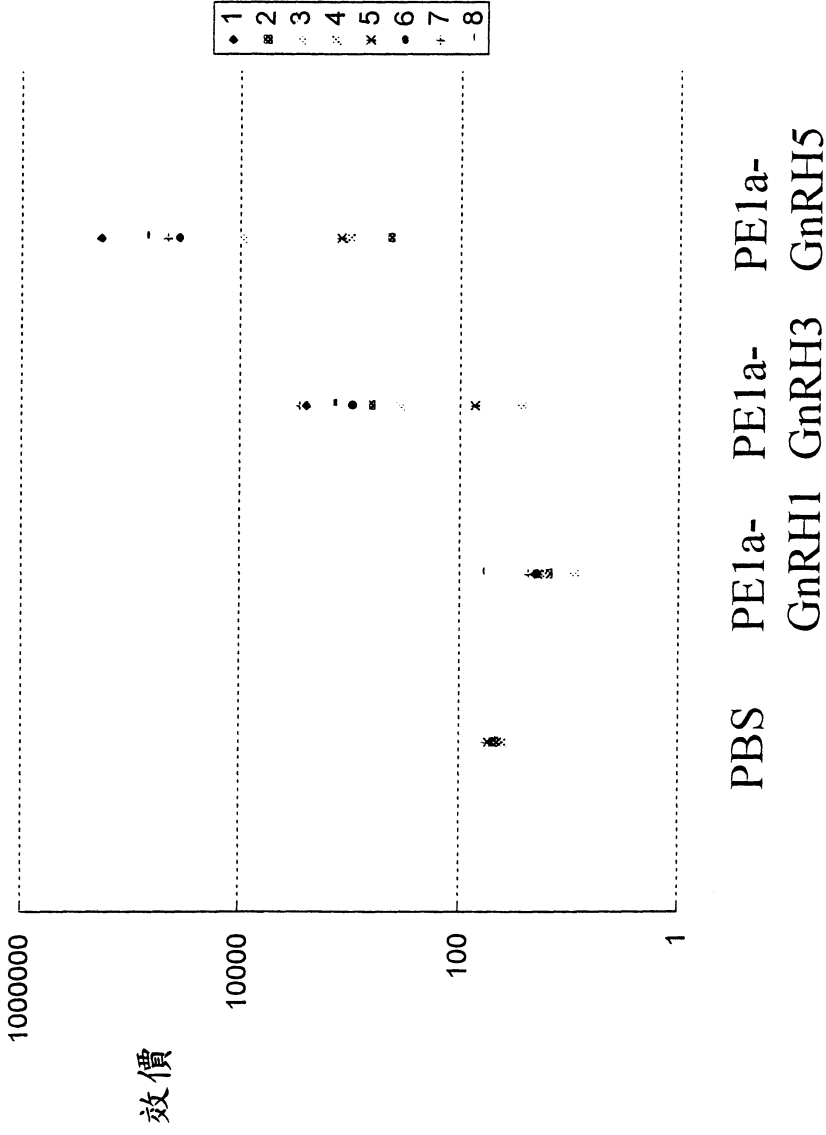
裝
訂

修正
補充
91.6.19

GnRH 重複數及抗-GnRH 抗體效價之研究

- 以含有不同 GnRH 重複數之 GnRH 抗原免疫老鼠
- PBS(100 微升)---8 隻老鼠
- PE1a-GnRH1(100 微克)---8 隻老鼠
- PE1a-GnRH3(100 微克)---8 隻老鼠
- PE1a-GnRH5(100 微克)---8 隻老鼠
- 佐劑：磷酸鋁
- 老鼠品種：BALB/c (8 週大，雌性)
- 免疫注射：皮下注射 (27G 注射筒)
- 第 2-4 組之老鼠係以 2 週之間隔免疫 3 次

抗-GnRH 抗體效價



GnRH 胺基酸序列：QHWSYGLRPG