

公告本

申請日期	86.4.12
案 號	86104708
類 別	C01K14/52, C12N15/62, 15/63.

A4
C4

A61K38/21

557301

Int. C16
(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	雜合性干擾素組成物及使用方法
	英 文	HYBRID INTERFERON COMPOSITIONS AND METHODS OF USE
二、發明 創作人	姓 名	(1) 豪沃德 M·強森 (2) 普瑞姆 S·薩部拉曼尼亞 (3) 卡羅 H·龐茲爾
	國 籍	美 國
	住、居所	(1) 美國, 佛州 32606 甘斯維爾西北 75 街 4404 號 (2) 美國, 佛州 32601, 甘斯維爾 171 公寓, 西南 16 大道 1111 號 (3) 美國, 馬利蘭州 20905, 銀泉市, 管石路 215 號
三、申請人	姓 名 (名稱)	佛羅里達大學
	國 籍	美 國
	住、居所 (事務所)	美國, 佛羅里達州 32611, 甘斯維爾, 葛林特館 186 號
	代 表 人 姓 名	羅南 M·庫得拉

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

美國(地區) 申請專利，申請日期：1996.4.12. 案號：08/63,328，有 無主張優先權

有關微生物已寄存於：，寄存日期：，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (/)

發明領域

本發明相關於雜合性 (hybrid) 干擾素蛋白質類, 其包括衍生自干擾素 - τ 的區域 (們) 及衍生自另一種干擾素的區域 (們)。

參考資料

Aguet, M., and Mogensen, K.E., in INTERFERON. VOLUME 5 (Gresser, L., Ed.) Academic, New York, pp. 1-22 (1983)。

Arrnstrong, J.P., Methods Enzymol 78 381-387 (1986)。

Ausubel, F.M., 等人, in CURRENT PROTOCOL IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc., Media, PA (1988)。

Bayne, M.L, 等人, Gene 66:235 (1988)。

Bazer, F.W., 等人, J. Animal Sci. 57(Supp. 2):425 (1983)。

五、發明說明 (2)

Bazer, F.W., 等人, J. Production and Fertility
76:841 (1986)。

Bazer, F.W., 等人, Biology of Reproduction,
vol.40;(Supplement 1):63, (Abstract) (1989)。

Bazer, F.W., 等人, PCT 公開案 W0/94/10313, 公開
於 11 May, 1994。

Bearnes, 等人, Biorechniques 11: 378 (1991)。

Benoit, P., 等人, J. Immunol. 150(3):707 (1993)
。

Bormem, E.M., 等人, J. Bio. Response Modifiers
3:580 (1984)。

Boyer, S.J, 等人, J. Biol. Regul. Homeost
Agents. 6(3):99-102 (1992)。

Capon, D.J., 等人, E.P. 專利 No. 88622, 頒於
September 14, 1983。

五、發明說明(3)

Crea, R., U.S. 專利 No. 4,888,286, 頒於
December 19, 1989。

Creasey, A., 等人, U.S. 專利 No. 4,758,428, 頒
於 July 19, 1988。

Creasey, A. 等人, U.S. 專利 No. 4,569,908, 頒於
February 11, 1986。

Crowe, S. M., 等人, AIDS Res. Hum.
Retroviruses 3(2): 135 (1987)。

Curnber, J.A., 等人, Methods in Enzymology
112:207 (1985)。

Dalgleish, 等人, Nature 312:763 (1984)。

Davis, G.L., 等人, N. England J. Med. 321:1501
(1989)。

Davis, G.L., 等人, Theriogenology 38:867 (1992)

。

五、發明說明(4)

Degre, M., Int. J. Cancer 14:699 703 (1974)。

DeMaeyer, E., 等人, Interferons and Other Regulatory Cytokines, John Wiley and Sons, New York (1988)。

Dianzani, F., J. Interferon Res., Special Issue, 5/92:109 (1992)。

Duncan, R.J.S. 等人. Anal Biochem 182: 68 (1983)。

Dusheiko, G.M., 等人, J. Hematology 3(Supl. 2):S199 (1986)。

Dworkin-Rastl, E., 等人, U.S. 專利 No. 4,820,638, 頒於 April 11, 1989。

Eaton, M.A.W., 等人, U.S. 專利 No. 4,719,180, 頒於 January 12, 1988。

Ecker, D.J., 等人, J. Biol. Chem. 264:7715-7719

五、發明說明 (5)

(1989)。

Elliot, S., 等人., J. Biol. Chem, 261 ;2936

(1986)。

Ernst, J.F., DNA 5:483 (1986)。

Familetti, P.C., 等人, Meth. Enzymol. 78:387

(1981)。

Feher, Z., 等人, Curr. 基因 t. 16:461 (1989)。

Fent, K., and :Zbinden, G., Trends Pharm. Sci.

8:100-105 (1987)。

Finter, N.B., 等人, Drugs 42(5):749 (1991)。

Fish, E.N., J. Interferon Res. 12:257 266

(1992)。

Foa, P., 等人, 細胞 Tissue Kinet. 15(4):399404

(1982)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (6)

Francis, M.L., 等人, AIDS Res. and Human Retroviruses 8(2): 199 (1992)。

Frangioni, J.V., 等人, Anal. Biochem. 210(1):179-187 (1993)。

Godkin, J.D.等人, J. Reprod. Fert. 65:141 (1982)。

Goeddel, D. U.S. 專利 No. 4,678,751, 頒於 July 7, 1987。

Goeddel, D. U.K. 專利 No. 4,456,748, 頒於 June 26, 1984。

Goeddel, D. U.S. 專利 No. 4,414,150, 頒於 November 8, 1983。

Griggs, N.D.等人, J.Immunol. 149: 517 (1992)。

Guan, K.L. 等人, Anal. Biochem. 192(2):262 267 (1991)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明 (7)

Gunther, A., 等人, U.S. 專利 No. 4,917,887, 頒於 April 1790。

Hakes, D.J., 等人, Anal. Biochem. 202(2):293-298 (1992)。

Hansen, P.J, 等人, U.S. 專利 No 4,997,646. 頒於 5 March, 1991。

Harlow, E., 等人, in Antibody: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)。

Helmer, S.D., 等人, J. Reprod. Fert. 79:83-91 (1987)。

Hitzeman, R.A., 等人, U.S. 專利 No. 4,775,622, 頒於 October 4, 1988。

Hoffman, A. E., 等人, Virology 147: 326 (1985)。

Howatson, etal., J. Endocrinol. 119:531 (1988)

五、發明說明 (8)

- Imakawa, K., 等人, Nature 330:377 (1987)。
- Imakawa, K., 等人, Mol. Endocrinol. 3: 127-139 (1989)。
- Jarpe, M.A., 等人, Protein Engin. 7:863-867 (1994)。
- Johnson, W.C., Jr., Methods in Enzymology 210:426-477 (1992)。
- Kashima, H., 等人, Laryngoscope 98:334 (1988)。
- Krown, S.E., in MECHANISMS OF INTERFERON ACTIONS, (Pfeffer, L.M., ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, Vol. II, pp. 143-178, (1987)。
- Kyte, J., 等人, J. Mol. Biol. 157: 105 (1982)
- Langer, J.A., and Pestka, S., Methods Enzymol.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(9)

119:305-311。

Langford, M. P., 等人., Meth. Enzymol. 78:
339 (1981)。

Lawrence, etal., Nucl. Acids. Res. 13:1777
(1985)。

Leibowitz, P.J., 等人, U.S. 專利 No. 4,892,743,
頒於 January 9, 1990.

Li, J., 及 Roberts, R.M., J. Biol. Chem.
269:13544-13550 (1994)。

Lowry, O.H., 等人, J. Biol. Chem. 193:265-275
(1951)。

Ludwig, D.L., 等人, Gene 132:33 (1993)。

Maniatis, T., 等人, in MOLECULAR CLONING: A
LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory
(1982)。

五、發明說明(10)

Martin, E.W., In: DISPENSING OF MEDICATION: A PRACTICAL MANUAL ON THE FORMULATION AND DISPENSING OF MEDICAL PRODUCTIONS (Hoover, J.E., Ed.), 8th edition, Mack Publishing Co., Easton, PA., (1976)。

McInnes, B., 等人, J. Interferon Res. 9(3):305-314 (1989)。

McPherson, G.A., J. Pharmacol. Methods 14:213-228 (1985)。

Mullis, K.B., U. S. 專利 No. 4,683,202, 頒於 28 July, 1987。

Mullis, K.B., 等人, U.S. 專利 No. 4,683,195, 頒於 28 July 1987。

Miyoslii, E., 等人, Int. J. Cancer 52(1) 137-140 (1992)。

Nagy, 等人, Int. J. Canc. 32:321 (1983)。

Oeda, K., 等人, U.S. 專利 No. 4,766,068, 頒於

五、發明說明 (//)

August 23, 1988。

Oldham, R.K, Hospital Practice 20:71 (1985)。

Paulesu, 等人, J. Biol. Regul. Homeost. Agents
5;81 (1991)。

Pearson, W.R. and Lipman, D.J., PNAS
85:2444-2448 (1988)。

Pearson, W.R., Methods in Enzymology 183 63 98
(1990)。

Pederson, 等人, Science 235:790 (1987)。

Perczel, A., 等人, Protein Engineering 4(Supp.
6):669-679 (1991)。

Pontzer, C.H., 等人, Biochem. Biophys. Res.
Comm. 152:801 (1988)。

Pontzer, C H., 等人, Cancer Res. 51 :5304
(1991)。

五、發明說明 (f~)

Poste, G., 等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA
78:6226 (1981)。

Quesada, I.R., 等人, N. England J. Med 310: 15
(1984)。

Reilly P.R., 等人, in BACULOVIRUS EXPRESSION
VECTOR: A LABORATORY MANUAL (1992)。

Rothstein. R., DNA CLONING: A PRACTICAL
APPROACH, Vol. II (Glover, D.M., Eds) Oxford: IRL
Press, pp. 46-66 (1986)。

Rubinstein, M., and Orchansky, P., CRC Cnt.
Rev. Biochem. 21:249-275 (1986)。

Ruegg, C.L., 等人, J. Interferon Res.
10:621-626 (1990)。

Rutter, W.J., 等人, U.S. 專利 No. 4,769,238, 頒
於 September 6, 1988. Sabin, E., 等人,
Bio/Technology 7:705-709 (1989)。

五、發明說明 (13)

Sambrook, J., 等人, in MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratoryr Cold Spring Harbor. NY) (1989)。

Sanger, 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463 (1977)。

Sato, K., 等人, U.S. 專利 No. 4,780,530, 頒於 January 25, 1988。

Senda, T., 等人, EMBO J. 11(9):3193-3201 (1992)。

Shaw, K.J., 等人, DNA 7: 117 (1988)。

Shen, L.P., er al., Sci. Sin. 29:856 (1986)。

Shoulders, C.C., 等人, Nucleic Acids Res. 10(16):4873-4882 (1982)。

Sloma, A., 等人, U.S. 專利 No. 4,748,233, 頒於 May 31, 1988。

五、發明說明(14)

Smith, D.B., 等人, 基因 67:31 (1988)。

Smith, P.K., 等人, Anal. Biochem. 150:76 (1985)

。

Stabinsky, Y. U S. 專利 No. 4,897.471, 頒於
January 30, 1990。

Stewart, H T, 等人, J. Endocrinol. 115:R13
(1987)。

Todd, R.F., 等人, Leuk. Res. 5(6):491-495
(1981)。

Vallet, I. L., 等人, Biol. Reprod. 37: 1307
(1987)。

Vallet, J.L., 等人, J. Endocrinology 117:R5- R8
(1988)。

Wallis, S.C, 等人, EMBO J. 2(12):2369-2373
(1983)。

五、發明說明 (15)

Whaley, A. E., 等人., J. Biol. Chem. 269:
10846-10868 (1994)。

Wang, C.Y., 等人, U.S. 專利 No. 4,879,212, 頒於
7 November, 1989。

Wang, C.Y., 等人, U.S. 專利 No. 4,735,X96, 頒於
5 April 1988

Wilson, 等人, Biology of Reproduction
20(1):101A Abstract (1979)。

Wu, D.A., 等人, DNA 10:201 (1991)。

Yoshio, T., 等人, U.S. 專利 No. 4,849,350. 等人
July 18, 1989。

Zoon, K.C., 等人, Methods Enzymol. 119:312- 315
(1986)。

發明背景

五、發明說明(16)

多種不同的哺乳類之胚體 (conceptus) 膜或滋胚外層 (trophectoderm) 產生的生化訊息藉以建立並維持懷孕 (Bazer, 等人, 1983)。其中一種蛋白質, 羊滋養層蛋白質-1 (oTP-1), 是一種低分子量的蛋白質, 其乃於懷孕 10 到 21 天由羊胚體膜所分泌 (Wilson, 等人, 1979; Bazer, 等人, 1986)。蛋白質 oTP-1 已知可抑制子宮分泌前列腺素 $F_2 - \alpha$, 其可引起沒有懷孕的羊之卵巢內的黃體進行生理及內分泌上的崩解 (Bazer, 等人, 1986)。據此, oTP-1 有抗黃體崩解的生物活性。oTP-1 的主要角色被認為與懷孕的構築有關。

oTP-1 後來也被發現 (i) 其與多種物種的干擾素 α (IFN- α) 有某程度上的相似性 (50-70%) (Imakawa, 等人, 1987), (ii) 其可與第一類干擾素的受體結合 (Stewart, 等人, 1987)。儘管與 IFN α 有一些相似性, oTP-1 和 IFN α 有以下許多不同的面貌可茲區分: oTP-1 在生殖生化上的角色 (其他的干擾素, 並沒有任何已知的在生化上, 控制生殖循環的角色); oTP-1 乃由滋養層細胞所產生 (IFN- α 乃得自於淋巴細胞); oTP-1 的大小 -172 個氨基酸 (IFN- α 一般為 166 個氨基酸), oTP-1 稍具病毒誘發性 (IFN- α 具強病毒誘發性)。國際干擾素組織認為 oTP-1 屬於完全新一類的干擾素, 且被命名為干擾素 τ (IFN τ)。此希臘字 tau 表示滋養層之意。

干擾素已被區分為兩類: 第 I 型干擾素, 其包括 IFN α

五、發明說明 (17)

, IFN β , 及 IFN ω (亦為 IFN α II); 第二型干擾素, 其以 IFN γ 為代表 (DeMaeyer等, 所回顧, 1988)。人類被估計至少有 17 種 IFN α 非對偶基因, 至少約 2 或 3 種 IFN β 非對偶基因, 及一單一的 IFN γ 基因。

IFN α 已知可抑制多種不同細胞的增殖。IFN α 在抑制血液性惡性腫瘤, 例如毛狀細胞白血病, 特別有效 (Quesada, 等人, 1984)。此外, 此類蛋白質已知有控制以下病歷的活性: 多發性骨髓細胞癌, 慢性淋巴球白血病, 低階淋巴瘤, 卡波西氏 (Kaposi's) 肉瘤, 慢性骨髓細胞白血病, 腎細胞瘤, 膀胱瘤及卵巢瘤 (Bonnem, 等人, 1984; Oldham, 1985)。干擾素及干擾素受器在某些自體免疫及發炎的疾病病發中所扮演的角色也已被研究 (Benoit, 等人, 1993)。

IFN α 也可用來對抗多種不同病毒的入侵 (Finter, 等人, 1991)。干擾素 alpha 有控制人類乳頭狀病毒感染, B型肝炎, 及 C型肝炎感染的活性 (Finter, 等人, 1991; Kashima, 等人, 1988; Dusheiko, 等人, 1986; Davis, 等人, 1989)。

然而, 很明顯的, IFN α 的效用乃被限制於其毒性: 干擾素的使用於癌症, 自體免疫的失序, 及病毒疾病的治療, 已導致嚴重的副作用, 如發燒, 發冷, 厭食, 失重, 及疲勞 (Pontzer, 等人, 1991; Oldham, 1985)。這些副作用通常需要

五、發明說明 (18)

(i)降低干擾素的劑量，此亦減低其療效，或(ii)停止病人類的治療。其毒性已減低此類蛋白質在抗病毒及抗增殖，以降低人類及動物疾病的治療的方面的利用性。

發明總論

在一方面，本發明包含嵌合性(chimeric)核酸分子，其編碼雜合性(hybrid)干擾素融合多肽類。每種分子由5'端片段部份(segment)及3'端片段部份(segment)所組成，5'端片段部份(segment)編碼干擾素- τ 之多肽之N-端胺基酸序列，3'端片段部份(segment)編碼非- τ 干擾素型I多肽之C-端胺基酸序列。此兩片段部份(segment)的剪裁位於相關於成熟的干擾素多肽部份之約略介於殘基8及37之間的區域。非- τ 干擾素第I型之多肽類之實例包括干擾素alpha及干擾素beta。在一個具體事實中，5'端片段部份(segment)進而包含一領導子序列。

5'端片段部份(segment)所編碼序列的實例包括被包含於選自下列一群組的序列者： SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, 及 SEQ ID NO:53。特別是，包含於 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:15或 SEQ ID NO:35的

五、發明說明 (19)

序列。5'端片段部份(segment)亦可編碼一來自上列任一序列的共同序列(consensus sequence),或一內部一致的序列。偏好的具體事實為衍生自人類來源的序列,如 SEQ ID NO:15或 SEQ ID NO:35。

3'端片段部份(segment)可包括,根據不同的具體事實,衍生自干擾素 alpha1, alpha2, beta或 omega之胺基酸序列。3'端片段部份(segment)亦可編碼一來自上列任一序列的共同序列(consensus sequence),或一內部一致的序列。偏好的具體事實為衍生自人類來源的序列,如一人類 IFN α 或人類 IFN β 。

在一般性具體事實中,此兩片段部份(segment)的剪裁位於相關於成熟的干擾素多肽部份之約略介於殘基 8及 28之間的區域。在另一個一般性具體事實中,此兩片段部份(segment)的剪裁位於相關於成熟的干擾素多肽部份之約略介於殘基 8及 22之間的區域。在另一個一般性具體事實中,此兩片段部份(segment)的剪裁位於相關於成熟的干擾素多肽部份之約略介於殘基 8及 16之間的區域。在一偏好的具體事實中,此兩片段部份(segment)的剪裁位於相關於成熟的干擾素多肽之殘基 22的區域。

在其他一般性具體事實中,干擾素- τ 多肽可為人類或

五、發明說明 (✓)

反芻動物(例如羊)干擾素- τ 多肽,且非- τ 干擾素第I型之多肽可同樣地為人類或非人類干擾素第I型之多肽。在一偏好的具體事實中,干擾素- τ 多肽為一羊干擾素- τ 多肽,且非- τ 干擾素第I型多肽為一人類干擾素型I多肽。

本發明之例示性嵌合性(chimeric)核酸分子為SEQ ID NO:54, 其具有5'-端片段部份(segment),編碼人類IFN τ 之胺基酸1-28(來自SEQ ID NO:3)及3'-端片段部份(segment),其編碼人類IFN α 之胺基酸29-167(株落pIFN105; Genbank HUMIFNN Acc. M28585)。

上述任何嵌合性(chimeric)核酸分子可進而包含一領導子序列。

在一相關方面,本發明包含一雜合性(hybrid)干擾素融合多肽,其由第一個片段部份(segment)及第二個片段部份(segment)組成,第一個片段部份(segment)包含干擾素- τ 多肽之N-端胺基酸序列,且第二個片段部份包含一種非- τ 干擾素第I型之多肽之C-端胺基酸序列。此兩個片段部份(segment)在成熟的干擾素多肽區域中約略殘基8及37之間結合。特異性具體事實為上述針對嵌合性(chimeric)胺基酸分子者。干擾素- α 及干擾素- β 為此類非- τ 型I干擾素類。當干擾素被用於醫藥配方或治療應用時,此類雜合

五、發明說明 (21)

性 (hybrid) 融合物可被用於降低非- τ 型 I 干擾素類的毒性。

在不同的具體事實中，第一個片段部份 (segment) 可具有胺基酸序列，其被包含於選自包括 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, 及 SEQ ID NO:53 群組的序列。偏好的具體事實為其中相關於人類干擾素 τ 之序列，如 SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO:35。

於一般性具體事實中，此兩片段部份 (segment) 的剪裁位於相關於成熟的干擾素多肽部份之約略介於殘基 8 及 28 之間的區域。在另一個一般性具體事實中，此兩片段部份 (segment) 的剪裁位於相關於成熟的干擾素多肽部份之約略介於殘基 8 及 22 之間的區域。在另一個一般性具體事實中，此兩片段部份 (segment) 的剪裁位於相關於成熟的干擾素多肽部份之約略介於殘基 8 及 16 之間的區域。

在另一方面，本發明包含一種表現載體，其具有包含一開放譯讀序列 (ORF) 之核酸，該開放譯讀序列編碼雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽，其包括上述核酸及多肽序列。該載體進而包含調節性序列，其有效於在宿主細胞中表現

五、發明說明 (ㄉㄉ)

該開放譯讀序列 :此種序列可為內源性 (如自然發生的 IFN 領導子序列),或異源性 (如在酵母菌, 哺乳動物細胞, 昆蟲細胞, 組織培養物或細菌表現系統中可被辨識之一分泌性訊號)。在表現載體中, 調節性序列亦可包括, 5' 至該核酸序列, 一啟動子區域及一 ATG 開始密碼子, 其與雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽編碼性序列 (嵌合性 (chimeric) 核酸分子) 為於同譯讀架內, 及 3' 至該編碼性序列, 一轉譯終止訊號, 接著為一轉錄終止訊號。進而, 本發明包含一種重組性生產雜合性干擾素融合多肽的方法, 其使用本發明之表現載體。該表現載體被導入合適的宿主細胞。該宿主細胞隨後於造成該 ORF 序列表現的條件下進行培養。

在進一步具體事實中, 本發明包含一種重組性生產雜合性干擾素融合多肽的方法。在此方法中, 該包含編碼一雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽開放譯讀序列 (ORF) 之表現載體, 被導入合適的宿主細胞中, 其中該載體被設計可在宿主細胞中表現 ORF。被轉形的宿主細胞隨後於造成表現 ORF 序列的條件下進行培養。很多載體及其相關之宿主有利於本發明方法之實際進行, 包括 lambda gt11 噬菌體載體及大腸桿菌細胞。其他宿主細胞包括酵母菌, 哺乳細胞, 昆蟲細胞, 組織培養物, 植物細胞培養物, 轉殖基因植物或細菌性表現系統。

五、發明說明 (✓)

本發明進而包含一種抑制腫瘤細胞生長的方法。在該方法中，將腫瘤細胞與有效抑制腫瘤細胞生長的濃度之一雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽接觸。該雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽可為任何可接受的藥學配方的一部份。生長可經由一雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽加以抑制的腫瘤細胞包括，但不限於，上皮瘤細胞，造血細胞性癌細胞，白血癌細胞，淋巴瘤細胞，及黑色素瘤細胞。在一具體事實，腫瘤細胞為類固醇-敏感性腫瘤細胞，例如，乳腺腫瘤細胞。

在本發明另一方面，雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽類被用於抑制病毒複製的方法中。在該方法中，以病毒感染的細胞與在該細胞中有效抑制病毒複製劑量之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽接觸。該雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽可為任何可接受的藥學配方的一部份。RNA及DNA病毒兩者皆可經由雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽類加以抑制。例示性RNA病毒包括貓白血癌病毒，羊進行性肺炎病毒，羊緩慢病毒，馬感染性貧血病毒，牛免疫缺陷病毒，維斯納-美帝 (visna-maedi) 病毒，山羊關節炎腦膜炎病毒，人類免疫缺陷病毒 (HIV) 或肝炎c病毒 (HCV)。一例示性DNA病毒為肝炎B病毒 (HBV)。

五、發明說明 (24)

在另一方面，本發明包含一種在需要此種治療的個體身上治療自體免疫疾病的方法。在一具體事實中，自體免疫疾病為多發性硬化症。該方法包含施用至該個體身上一醫藥上有效量之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽。該雜合性 (hybrid) 干擾素 (hybIFN) 的施用方式可為，例如，口服或經由靜脈內或肌肉內注射。口服施用的 HybIFN 偏好為個體所攝取。

其他本發明之具體事實包括一種在需要此種治療的個體身上治療紅斑性狼瘡，第 I 型糖尿病，及類風濕性關節炎的方法。該方法包含施用至該個體身上一醫藥上有效量之本發明之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽。

當下列發明詳述與所附圖示一起閱讀時，本發明這些及其他目的及特質將被充份理解。

圖示簡述

圖 1A, 1B, 1C, 1D 及 1E 表示 $0vIFN\tau$ 之一合成性基因的核酸編碼性序列，其被設計成包括 19 個在編碼性序列中平均間隔之獨特的限制酶位置。

圖 2 顯示用於製造編碼 $0vIFN\tau$ 之合成性基因的選殖策

五、發明說明 (✓S)

略。

圖 3 顯示人類干擾素- τ 基因及羊干擾素- τ 基因之經預期之蛋白質序列的比較。歧異性胺基酸類經由在核酸序列之下行之另一種胺基酸表示。

圖 4 表示 OvIFN τ 及 IFN α 兩者能夠劇烈地降低 HL-60 細胞生長的數據。

圖 5 表示 rHuIFN α 有細胞毒殺性但 OvIFN τ 沒有的數據。在此圖中，三個重複實驗之一的數據以平均%存活率+SD 表示。

圖 6 表示衍生自 IFN τ 之多肽類的序列。

圖 7 表示 OvIFN τ 序列之完整核酸及胺基酸序列。

圖 8 表示當 IFN τ 被用於處理周圍血液單核球細胞時，可支持相對於 IFN α 而言沒有細胞毒殺性的數據。

圖 9 顯示以 IFN τ 處理人類皮膚 T 細胞淋巴瘤細胞系，HUT78 的結果。

五、發明說明 (76)

圖 10 顯示以 IFN τ 處理人類 T 細胞淋巴瘤細胞系，H9 的結果。

圖 11A 表示相對於 FIV (貓免疫缺陷病毒) 複製，以完整 OvIFN τ 對衍生自 OvIFN τ 之多肽類的肽抑制作用數據。圖 11B 表示相對於 HIV (人類免疫缺陷病毒) 複製，以完整 OvIFN τ 對衍生自 OvIFN τ 之多肽類的肽抑制作用數據。

圖 12 表示 IFN τ 的抗病毒性活性被 IFN τ - 衍生性肽類抑制的數據。

圖 13 表示 OvIFN τ 的抗病毒性活性被 IFN τ - 衍生性肽類抑制的數據。

圖 14 表示牛 IFN α 的抗病毒性活性被 IFN τ - 衍生性肽類抑制的數據。

圖 15 表示人 IFN α 的抗病毒性活性被 IFN τ - 衍生性肽類抑制的數據。

圖 16 表示牛 IFN γ 的抗病毒性活性被 IFN τ - 衍生性肽類抑制的數據。

五、發明說明 (✓)

圖 17 表示 IFN τ 的抗病毒性活性之抗 -IFN τ - 衍生性肽抗血清抑制作用的數據。

圖 18 表示放射線標定的 IFN τ 對細胞結合之抗 -IFN τ - 衍生性肽抗血清抑制作用的數據。

圖 19A 及 19B 表示編碼 IFN τ 多肽類之核酸序列的比對。

圖 20A 及 20B 表示編碼 IFN τ 多肽類之胺基酸序列的比對。

圖 21 表示 IFN τ 與 IFN β 之細胞毒殺性的比較數據。

圖 22A 及 22B 顯示 IFN α A (Fig. 22A) 及 IFN τ (Fig. 22B) 對 MoBK 細胞的細胞毒殺性趨勢。

圖 23A 及 23B 顯示 IFN τ 對 IFN α A 之於 MDBK 細胞之細胞毒殺性的影響。

圖 24A 及 24B 顯示 125 I-IFN τ (Fig. 24A) 及 125 I-IFN α A (Fig. 24B) 對 MDBK 細胞的結合作用, 以及結合數據之史考察氏 (Scatchard) 作圖。

五、發明說明 (>8)

圖 25A 及 25B 顯示 IFN τ (Fig. 25A) 及 IFN α A (Fig. 25B) 對 MDBK 細胞的競爭性結合。

圖 26 顯示相對於前-免疫-處理對照組 (空心柱形), IFN τ 及 IFN α A 對 MDBK 細胞之結合經由抗血清之抑制, 該抗血清係對抗 IFN τ 之 N 端 (固體柱形) 及 C 端 (點畫柱形)。

圖 27A 及 27B 顯示 IFN τ (Fig. 27A) 及 IFN α A (Fig. 27B) 對 MDBK 細胞的劑量-反應/佔據曲線, 最大抗病毒性活性百分比 (○), 細胞毒殺性 (□), 及結合 (◇)。

圖 28 顯示雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽的圖示。

序列簡述

SEQ ID NO:1 為編碼羊干擾素- τ (OvIFN τ) 的合成性基因的核苷酸序列。同時顯示被編碼的胺基酸序列。

SEQ ID NO:2 為成熟 OvIFN τ 蛋白質的胺基酸序列。

SEQ ID NO:3 為一合成性核苷酸序列, 其編碼成熟的人類干擾素- τ (HuIFN τ) 蛋白質。

五、發明說明 (79)

SEQ ID NO:4 成熟的 HuIFN τ 1 蛋白質之胺基酸序列。

SEQ ID NO:5為SEQ ID NO:2之片段 1-37 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:6為SEQ ID NO:2之片段 34-64 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:7為SEQ ID NO:2之片段 62-92 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:8為SEQ ID NO:2之片段 90-122 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:9為為SEQ ID NO:2之片段 119-150 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:10為SEQ ID NO:2之片段 139-172 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:11為具有領導子序列之天然 HuIFN τ 1 基因之核苷酸序列。

五、發明說明(30)

SEQ ID NO: 12為 SEQ ID NO. 11之經預測的胺基酸編碼性序列。

SEQ ID NO:13為根據本發明之 25-元體合成性寡核苷酸。

SEQ ID NO:14為根據本發明之 25-元體合成性寡核苷酸。

SEQ ID NO: 15為 SEQ ID NO:4之片段 1-37 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:16為 SEQ ID NO:4之片段 34-64 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:17為 SEQ ID NO:4之片段 62-92 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:18為 SEQ ID NO:4之片段 90-122 之胺基酸序列。

SEQ ID NO: 19為 SEQ ID NO:4之片段 119-150 之胺基

五、發明說明 (2 |)

酸序列。

SEQ ID NO:20為SEQ ID NO:4之片段 139-172 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:21為 cDNA HuIFN τ 6之核苷酸序列。

SEQ ID NO:22 為SEQ ID NO:21所表示序列所編碼的胺基酸序列。

SEQ ID NO:23為 cDNA HuIFN τ 7之核苷酸序列。

SEQ ID NO:24為SEQ ID NO:23所表示序列所編碼的胺基酸序列。

SEQ ID NO:25為 cDNA HuIFN τ 4之核苷酸序列。

SEQ ID NO:26為SEQ ID NO:25所表示序列所編碼的胺基酸序列。

SEQ ID NO:27為 cDNA HuIFN τ 5之核苷酸序列。

SEQ ID NO:28為SEQ ID NO:27所表示序列所編碼的胺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (32)

基 酸 序 列 。

SEQ ID NO:29為基因體性 DNA 株落 HuIFN τ 2之核苷酸序列。

SEQ ID NO:30為SEQ ID NO:29所表示序列所編碼的胺基酸序列。

SEQ ID NO:31為含領導子序列之天然 HuIFN τ 基因之基因體性 DNA 株落 HuIFN τ 3之核苷酸序列。

SEQ ID NO:32 為SEQ ID NO:31所表示序列所編碼的胺基酸序列 (包括領導子序列) 。

SEQ ID NO:33為不含領導子序列之天然 HuIFN τ 基因之基因體性 DNA 株落 HuIFN τ 3之核苷酸序列。

SEQ ID NO:34為 HuIFN τ 3所編碼之成熟人類 IFN τ 蛋白質之經預測之胺基酸序列，其經SEQ ID No:33所示之序列加以編碼。

SEQ ID NO:35為SEQ ID NO:33之片段 1-37 之胺基酸序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (33)

SEQ ID NO:36為SEQ ID NO:33之片段 34-64 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:37為SEQ ID NO:33之片段 62-92 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:38為SEQ ID NO:33之片段 90-122 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:39為SEQ ID NO:33之片段 119-150 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:40為SEQ ID NO:33之片段 139-172 之胺基酸序列。

SEQ ID NO 41為SEQ ID NO:32之片段 1-23 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:42為SEQ ID NO:11之片段 1-23 之胺基酸序列。

SEQ ID NO:43為不含領導子序列之DNA 株落 HuIFN τ 1

五、發明說明(34)

之核苷酸序列。

SEQ ID NO:44為HuIFN γ 1所編碼之成熟人類IFN γ 蛋白質之經預測之胺基酸序列，其經SEQ ID No:43所示之序列加以編碼。

SEQ ID NO:45為來自序列A40068之片段1-37(成熟的序列)之經預測的胺基酸序列(Bin 12, Accession #gi 108955)，其編碼牛TP-1(株落bTP509)。

SEQ ID NO:46為來自序列BovTPH1Bcds1之片段1-37(成熟的序列)之經預測的胺基酸序列(Bin 13, Accession #gi 163767)，其編碼牛TP-1。

SEQ ID NO:47為來自序列BovTPH1Ccds1之片段1-37(成熟的序列)之經預測的胺基酸序列(Bin 14, Accession #gi 163769)，其編碼牛TP-1。

SEQ ID NO:48為來自序列A39505之片段1-37(成熟的序列)之經預測的胺基酸序列(Bin 15, Accession #gi 163767)，其編碼牛TP-1(株落bTP4)。

SEQ ID NO:49為來自序列OATP1P5cds1之片段1-37(

五、發明說明(35)

成熟的序列)之經預測的胺基酸序列(Bin 16, Accession #gi 1412), 其編碼羊 TPp5。

SEQ ID NO:50為來自序列OATP1P3cds1之片段1-37(成熟的序列)之經預測的胺基酸序列(Bin 17, Accession #gi 1410), 其編碼羊 TPp3。

SEQ ID NO:51為來自序列SHP010TPcds1之片段1-37(成熟的序列)之經預測的胺基酸序列(Bin 18, Accession #gi 165821), 其編碼羊 TP-1。

SEQ ID NO:52為來自序列SHP02TPcds1之片段1-37(成熟的序列)之經預測的胺基酸序列(Bin 19, Accession #gi 165823), 其編碼羊 TP-1。

SEQ ID NO 53為來自序列GOTCTP1cds1之片段1-37(成熟的序列)之經預測的胺基酸序列(Bin 21, Accession #gi 164117), 其編碼 Capra hircus IFN τ 。

SEQ ID NO:54為衍生自人類DNA之嵌合性(chimeric)核酸分子之核苷酸序列, 其具有5'-端片段部份(segment), 其編碼人類 IFN τ 之胺基酸1-28(來自SEQ ID NO:3)及3'-端片段部份(segment), 其編碼人類 IFN τ 之胺基酸

五、發明說明(36)

29-167 (株落 pIFN105; Genbank HUMIFNN Acc. M28585)

。

SEQ ID NO:55 來自 SEQ ID NO:54之經預測的胺基酸
序列。

發明詳述

I. 定義

干擾素- τ (IFN τ)相關於干擾素蛋白質族中的任何一種和 (a)SEQ ID No:2或 (b)SEQ ID No:34具有高於70%,偏好高於80%,或較偏好高於90%的胺基酸相似性。胺基酸相似性可以用程式,例如 LALIGN軟體,以其內定值來決定。此軟體可以在 FASTA軟體第1.7版中的序列比較程式找到 (Pearson and Lipman,1988; Pearson,1990;程式可取得於 William R. Pearson, 生物化學系, box440, Jordan Hall, Charlottesville, VA)。干擾素 τ 蛋白質具有至少以下群組特性中的一種:(a)在胚胎/胎兒階段經由滋胚外層/胎盤進行表現, (b)抗黃體崩解性質, (c)抗病毒性質, (d)抗細胞增殖性質。IFN τ 可以由許多的來源獲得,包括牛,羊,及人類。

五、發明說明(37)

干擾素- τ 多肽有介於約 15 到 172 個氨基酸，其取得於干擾素- τ 胺基酸序列，而所述 15 到 172 個胺基酸於初始的干擾素- τ 中為連續的。兩個或多個此種 15-172 胺基酸區域，也可以被組合起來而形成一多肽，其連結區域通常並非連續如其初始蛋白質一般。

一種聚核苷酸序列或片段為"衍生自"另一種聚核苷酸序列或片段，其條件為該種聚核苷酸序列或片段包含與由其衍生之序列或片段相同的核苷酸序列。例如，一細菌性質體包含一種插入物，其"衍生自"一經選擇的人類基因。假如在插入物中的聚核苷酸序列與被選擇之人類基因之聚核苷酸序列相同。

同樣的，一種多肽序列或片段為"衍生自"另一種多肽序列或片段，其條件為該種多肽序列或片段包含與由其衍生之序列或片段相同的胺基酸序列。

百分比(%)相似性，其與兩個胺基酸序列有關，係指在兩個序列中相同的殘基%，其條件為序列係適當地比對且"間隙"不被認為違反比對原則。換句話說，假如一個間隙需要被插入第一個序列來選擇性將其與第二個序列比對，則%相同性僅使用與一相關的胺基酸殘基形成配對者進行計算(即，計算不考慮在第二個序列中位於第一個序列的"間隙"中的

五、發明說明 (38)

殘基)。最佳的比對被定義為得到最高%相同性評分的對比。此種對比可以使用"基因WORKS"程式進行。或者,比對可以使用局部的比對程式LALIGN,以ktup為1,內設參數及內設PAM進行。

治療一疾病,乃意指施用一具療效的物質以降低疾病的症狀及或減輕疾病的嚴重性。

II. 干擾素- τ 之單離及定性

A. 羊及牛干擾素- τ

1. 干擾素- τ 編碼性序列

羊干擾素- τ (OvIFN τ) 為一主要的胚體 (conceptus) 膜分泌性蛋白質, 其在綿羊母體辨識的關鍵期間產自胚胎性滋胚外層 (trophectoderm)。一個成熟的 OvIFN τ 的單離物的長度為172個胺基酸 (SEQ ID NO:2)。該 cDNA 編碼性序列包含在成熟蛋白質的胺基端之額外 23個胺基酸 (Imakawa, 等人, 1987)。此 OvIFN τ 分離物之編碼性序列示於圖 7。

相關於其他干擾素類, OvIFN τ 與干擾素 α 共有約 45

五、發明說明 (39)

至 68% 胺基酸相似性且與干擾素 - ω s (IFN ω s) 最大序列相似性約為 68%。

關於 OvIFN τ 蛋白質的分離，胚體 (conceptuses) 自懷孕的綿羊的收集並於體外在先前所述之修正性最低必須培養基 (Minimum Essential Medium, Godkin, 等人, 1982) 中進行培養。胚體 (conceptus) 在懷孕的不同日進行收集，而以交配的第一天為第 0 天。OvIFN τ 自胚體 (conceptuses) 培養基中純化，該培養基見述於 Vallet, 等人, 1987 and Godkin, 等人, 1982。

OvIFN τ 的均質性經硫酸十二烷基酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE; Maniatis, 等人, 1982; Ausubel, 等人, 1988) 進行分析。在經純化的 OvIFN τ 檢體中蛋白質濃度使用 bicinchoninic (BCA) 試驗 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Smith, P.K., 等人, 1985) 決定。與 OvIFN τ 具同質性的蛋白質自母牛中分離 (BoIFN τ ; Helmer, 等人, 1987; Imakawa, 等人, 1989)。OvIFN τ 及 BoIFN τ (i) 在懷孕的母體辨識中具有類似的功能，且 (ii) 在成熟的蛋白質類之間共有高度胺基酸及核苷酸序列相似性。介於 OvIFN τ 及 BoIFN τ 之核酸序列相似性以 5' 非-編碼性區域而言為 76.3%，以編碼性區域而言為 89.7%，以 3' 非-編碼性區域而言為 91.9%。胺基酸序列相似性為 80.4%。

五、發明說明 (40)

實施例 1 描述 OvIFN τ 的生殖功能。OvIFN τ 及重組性人類干擾素 - α 2 (rHuIFN α) 以不同的濃度被輸入牝羊的子宮腔內。黃體的生命經由檢查發情期間隔 (interestrus) 期間, 助孕酮分泌的維持, 及前列腺素分泌的抑制進行分析 (Davis, 等人, 1992)。比較這些檢查的數據顯示當 OvIFN τ 以 100 微克/日施用時, 發情期間隔 (interestrus) 期間的延長相當時間, 且當施用 rHuIFN α 時沒有任何有意義的影響。這些數據支持之結論為 OvIFN τ 明顯地影響發情周期的生化事件。

干擾素 - τ 在生殖周期的不同階段的抗病毒特性亦予以檢驗 (實施例 2)。胚體 (conceptus) 培養物使用得自綿羊發情期第 12 至 16 天的胚體 (conceptus) 建立。對來自每個胚體 (conceptus) 培養物之上清液的抗病毒活性進行試驗。培養物上清液具有增強性抗病毒性活性, 其與至發情後第 16 天為止之胚體 (conceptus) 進而發育有關。

2. IFN τ 之重組性生產

重組性 OvIFN τ 使用細菌性及酵母菌細胞進行生產。OvIFN τ 之胺基酸編碼性序列被用於產生一相關性 DNA 編碼性序列, 其密碼子的使用很適合在大腸桿菌中表現 (實

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(41)

施例 3)。DNA 編碼性序列經由寡核苷酸之依順序加成作用而被合成性地構築。被選殖的寡核苷酸使用圖 2 所列示的限制酶切割及黏接作用而被融合成為單一聚核苷酸。該聚核苷酸編碼性序列具有被示於 SEQ ID NO: 1 之序列。

為了表現重組性干擾素多肽類，如本發明合成性 OvIFN γ 或雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽類，嵌合性 (chimeric) 編碼性序列可被置於很多細菌性表現載體中：例如，lambda gtl1 (Promega, Madison WI); pGEX (Smith, D.B., 等人, 1988); pGEMEX (Promega); 及 pBS (Strata基因, La Jolla CA) 載體。亦可使用包含合適的啟動子之其他細菌性表現載體，如包含 T7 RNA 聚合酶啟動子或 tac 啟動子。實施例 3 描述將 OvIFN γ 合成性聚核苷酸選殖進入一修正性 pIN III omp-A 表現載體中。OvIFN γ 蛋白質的生產經由加入 IPTG 加以誘發。可溶性重組性 IFN γ 經由音波震盪或滲透性分離作用而自細胞中釋出。

該蛋白質可進一步經由標準方法進行純化，包括尺寸大小分離作用（管柱色層分析或前操作性 (preoperative) 凝膠電泳作用）或親和性色層分析，例如，使用抗-干擾素抗體（固體支持物可得自 Pharmacia, Piscataway NJ）。蛋白質製備物亦可進行濃縮，例如，經由過濾 (Amicon,

五、發明說明 (42)

Danvers, Mass.) 。

合成性 0vIFN τ 基因亦被選殖進入酵母菌選殖性載體 pBS24Ub (實施例 4; Sabin. 等人, 1989; Ecker, 等人, 1989)。合成性連接子被構築而使得 0vIFN τ 編碼性序列同架性 (in-frame) 融合至載體中的汎醜素 (ubiquitin) 編碼性序列。得到的連接位置可以於體內之將汎醜素 (ubiquitin) 序列自 0vIFN τ 序列切出。

重組性質體 pBS24Ub-IFN τ 被轉形進入啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)。被轉形的酵母菌細胞被培養, 溶解且將重組性 IFN τ (r-IFN τ) 蛋白質自細胞溶解物中分離。

r-IFN τ 的份量經由放射性免疫試驗加以定量。對被純化的 r-IFN τ 進行微定序作用。結果顯示與天然 0vIFN τ 整個前 15 個胺基酸相同。這些結果亦確認汎醜素 (ubiquitin)/IFN τ 融合蛋白質在體內經過正確的加工。

由此方法得到的重組性 IFN τ 表現抗病毒性活性, 其類似於自培養胚體 (conceptus) 膜的培養基中純化的 IFN τ 之抗病毒性活性。

五、發明說明 (43)

其他酵母菌載體可用於實施本發明。他們包括 2
micron 質體載體 (Ludwig, 等人, 1993), 酵母菌嵌入性
質體 (YIps; 例如, Shaw, 等人, 1988), YEP 載體
(Shen, 等人, 1986), 酵母菌著絲點 (centromere) 質體
(YCps; 例如, Ernst, 1986), 及類似物。偏好的是, 載體
包括一表現序列匣 (cassette), 其包含一有效的酵母菌啟動
子, 如 MF α 1 啟動子 (Ernst, 1986; Bayne, 等人
, 1988), GADPH 啟動子 (甘油醛-3-磷酸-去氫酶; Wu, 等人
, 1991), 半乳糖-誘發性 GAL10 啟動子 (Ludwig, 等人,
1993; Feher, 等人, 1989; Shen, 等人, 1986), 或甲醇-調
節性醇氧化酶 (AOX) 啟動子。AOX 啟動子在巴斯德畢赤
酵母菌 (*Pichia Pastoris*) 宿主細胞中特別有利的 [例如,
AOX 啟動子在包含於 *Pichia* 表現套組 (其得自 Invitrogen,
San Diego, CA) 之 pHIL 及 pPIC 載體中被利用]。

該表現序列匣 (cassette) 可包括額外的元件來協助重
組蛋白質的表現及純化, 及 / 或協助將該序列匣 (cassette)
插入一載體或一酵母菌染色體。例如, 該序列匣
(cassette) 可包括一訊號序列來指揮該蛋白質的分泌。一
適於在不同酵母菌表現載體中使用的例示性訊號序列為 MF
 α 1 前-原訊號序列 (Bayne, 等人, 1988; Ludwig, 等人,
1993; Shaw, 等人, 1988)。亦可使用其他的訊號序列。例
如, Pho1 訊號序列 (Elliot, 等人, 1986) 在巴斯德畢赤

五、發明說明 (ψψ)

酵母菌 (*Pichia Pastoris*) 及龐畢裂殖酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*) 宿主細胞中特別有效

例示性表現序列匣 (cassette) 包括 (i) 一種含 (5' 至 3') AOX 啟動子, Pho1 訊號序列, 及 DNA 序列編碼 $\text{OvIFN}\tau$ 之序列匣 (cassette), 以供在巴斯德畢赤酵母菌 (*P. Pastoris*) 宿主細胞中表現, 及 (ii) 一種含 (5' 至 3') MF α 1 啟動子, MF α 1 前-原訊號序列, 及編碼本發明之干擾素組成物之 DNA 序列之序列匣 (cassette), 以供在啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 宿主細胞中表現。

適合本發明之額外酵母菌載體包括, 但不限於, 其他具有可調節表現之載體 (Hitzeman, 等人, 1988; Rutter, 等人, 1988; Oeda, 等人, 1988)。酵母菌轉形宿主典型上為啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*), 然而, 如上所示, 其他合適的酵母菌也可以被使用 (例如, 龐畢裂殖酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*), 巴斯德畢赤酵母菌 (*Pichia Pastoris*) 及類似物)。

編碼一干擾素多肽的 DNA 可以被選殖進入任何商業化可得的載體以使得多肽在合適的宿主系統中表現。這些系統包括上述細菌性及酵母菌表現系統以及下列: 桿狀病毒 (*Baculovirus*) 表現系統 (Reilly, 等人, 1992; Beames,

五、發明說明 (45)

等人, 1991; Clontech, Palo Alto CA); 植物細胞表現系統, 轉殖基因性植物表現系統 (例如, S.B. Gelvin and R.A. Schilperoot, Plant Molecular Biology, 1988), 及在哺乳動物細胞中的表現系統 (Clontech, Palo Alto CA Gibco-BRL, Gaithersburg MD)。這些重組性多肽可以融合蛋白質類或以天然蛋白質類形式加以表現。很多特徵可以被工程加入表現載體中, 如領導子序列, 其促進被表現的序列分泌至培養基中。該重組性生產的多肽類典型上自被溶解的細胞或培養基中分離。純化作用可以本技藝中習知的方法進行, 包括鹽離析作用, 離子交換色層分析, 及親和性色層分析。免疫親和性色層分析可以如上所述使用基於 IFN 多肽類產生之抗體。

B. 人類干擾素 - τ

1. 編碼干擾素 - τ 蛋白質之人類基因體性序列之鑑定及選殖

人類基因體性 DNA 針對類似於干擾素 - τ 的序列進行篩選 (實施例 5)。數個與 ovIFN τ cDNA 探針發生雜交反應的序列被確認出。數個含人類干擾素 - τ 之部份序列的選殖株隨後被單離 (實施例 6)。合成兩個合成性 25-元體寡核苷酸, 其相關於來自 ovIFN τ cDNA 的序列 (Imakawa, 等人, 1987;

五、發明說明 (Ψb)

Whaley, 等人, 1994)。這些引子使用於增幅反應中, 該增幅反應使用衍生自下列兩個 cDNA 基因庫的 DNA: 人類胎盤及自懷孕終期 (term) 胎盤單離之人類滋胚內質母細胞 (cytotrophoblast) 細胞。所得到被增幅的 DNA 片段被電泳性分離並將含人類 IFN τ 增幅產物的條帶分離。將增幅產物類進行次選殖且將被插入的增幅產物使用二去氧終止方法進行定序。

來自這些選殖株中的 5 個的序列比較, 顯示在分離株之間具有高度的序列相似性, 但是序列並不相同的。這些結果建議人類干擾素 - τ 基因有多種變異型存在。核苷酸及蛋白質序列的分析建議人類干擾素 τ 基因可基於序列相似性被分類成三個群組。這些群組敘述如後。

實施例 7 描述數個全長的人類 IFN τ 基因的分離。高分子量 DNA 自人類周邊血液單核細胞 (PBMCs) 中分離且進行尺寸-分離。每個部分使用聚合酶鏈反應以試驗 IFN τ 序列的存在: 來自受試增幅陽性之部分的 DNA 分子被用於產生在 λ gt11 中的次基因體基因庫。

此次基因體基因庫塗佈於瓊脂平板上並與 0vIFN τ cDNA 探針 (實施例 7A) 進行雜交。與探針發生雜交反應的約 20 個選殖株被確認。相關於陽性選殖株的菌斑進行繼代

五、發明說明 (47)

培養，分離 DNA 並經由增幅反應使用 OvIFN τ 引子進行分析。在這 20 個菌斑中，6 個菌斑產生陽性 PCR 訊號。自這 6 個選殖株的噬菌體被純化且嵌入物被定序。自這 6 個選殖株之一之一個嵌入物在後續的篩選中作為雜交作用探針。

來自 λ gt11 次基因體性基因庫之重組性噬菌體使用剛敘述之雜交作用探針進行定序 (實施例 7B)。得到陽性雜交作用訊號之五個選殖株被分離且對嵌入物進行定序。來自其中三個選殖株的序列是重複的，且得到的共通性核酸序列 (HuIFN τ 1) 示於 SEQ ID NO:11，而經預測之蛋白質編碼性序列示於 SEQ ID NO:12。經預測的成熟蛋白質編碼性序列示於 SEQ ID NO:4。來自另兩個選殖株的序列示於 SEQ ID NO:29 (HuIFN τ 2) 及 SEQ ID NO:31 (HuIFN τ 3)。來自 HuIFN τ 2 之經預測的成熟的胺基酸序列示於 SEQ ID No:30。

來自 HuIFN τ 3 之經預測的成熟的胺基酸序列示於 SEQ ID No:32，且成熟的胺基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示。將人類干擾素 - τ 基因之一 (SEQ ID NO:4) 之經預測的蛋白質序列與羊干擾素 - τ 基因進行比較 (圖 3)，顯示序列相似性的程度及胺基酸位階的歧異。

七個人類干擾素 - τ 核酸序列之核酸序列，如本發明所

五、發明說明 (48)

述者 (實施例 6 及 7), 與羊干擾素- τ 進行的比對示於圖 19A 及 19B。OvIFN τ (oIFN τ), HuIFN τ 1, HuIFN τ 2, 及 HuIFN τ 3 的序列開始於圖 19A 的左上角之起始 ATG 密碼子且繼續到該圖的第二頁。HuIFN τ 4, HuIFN τ 5, HuIFN τ 6 及 HuIFN τ 7 大約開始於圖 19A 下半之 CAG 密碼子, 其位於胺基酸位置 40 (至驚歎號之右方) 且繼續到該圖的第二頁。HuIFN τ 4, HuIFN τ 5, HuIFN τ 6 及 HuIFN τ 7 之每個選殖株的 5' 及 3' 端以驚歎號表示。

OvIFN τ 之完整編碼性序列示於每個比對組的最上列。在其他序列的核苷酸僅在其不同於 OvIFN τ 之位置進行標示。小寫字母表示不導致胺基酸改變之核苷酸改變, 而大寫字母表示導致胺基酸取代之核苷酸改變。

七個相關胺基酸序列的比對, 其以類似於上述的方法加以進行, 示於圖 20A 及 20B。如上所述, OvIFN τ 之完整的胺基酸序列示於最上列, 且其他序列的胺基酸僅在與羊序列不同處加以標示。

比對檢驗顯示該七個序列可以分成三個群組。群組 I 包含 HuIFN τ 1 及 HuIFN τ 2, 群組 II 包含 HuIFN τ 3, HuIFN τ 4 及 HuIFN τ 5, 且群組 III 包含 HuIFN τ 6 及 HuIFN τ 7。這些群組可表示具有不同細胞性功能之干擾素-

五、發明說明 (49)

τ 基因家族。

這些群組分類係基於下列特徵。在成熟的蛋白質類中，群組 I HuIFN τ 在胺基酸位置編號 95 (編號相關於圖 20A 至 20B) 具有天門冬胺酸 (ASN)，在胺基酸位置編號 104 具有甲硫胺酸 (MET)，且在胺基酸位置編號 120 具有白胺酸 (LEU)；群組 II HuIFN τ 在胺基酸位置編號 95 具有天門冬胺酸 (ASP)，在胺基酸位置編號 104 具有酥胺酸 (THR)，且在胺基酸位置編號 120 具有甲硫胺酸 (MET)；且群組 III HuIFN τ 在胺基酸位置編號 72 具有精胺酸 (ARG)，在胺基酸位置編號 120 具有纈胺酸 (Val)，且在胺基酸位置編號 122 具有絲胺酸 (Ser)。

如 SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, 及 SEQ ID NO:34 所示之核酸及多肽人類 IFN τ 序列可用於作為偵測進一步人類 IFN τ 編碼性序列及/或偽基因之分離物的特異性引子及探針的來源。進而，如上所述，每一物種之 IFN τ 蛋白質可能超過一種變異型以上且超過一種編碼性序列。用於實施本發明的特異性核酸探針及與 IFN τ 多肽具有反

五、發明說明 (50)

應性的抗體，可有利於根據本發明所揭示的方法單離未經證實之哺乳動物干擾素- τ 變異物。

2. 干擾素- τ 在人類組織中表現的定性

人類胎盤 cDNA 基因庫及羊 cDNA 基因庫經由對 OvIFN τ cDNA 探針進行雜交作用而進行分析(實施例 8)。此 DNA 雜交作用分析建議來自人類 cDNA 基因庫之 IFN τ 訊號約為使用羊 cDNA 基因庫所得到訊號的 1/100。OvIFN τ cDNAs 約構成 0.4% 之羊 cDNA 基因庫。據此，對 OvIFN τ 探針有反應之多量人類 cDNAs 顯然至少在產生 cDNA 基因庫之懷孕終期(term)胎盤中很低。對在人類懷孕終期(term)胎盤及羊膜細胞中 HuIFN τ mRNA 的存在進行分析。分析結果建議 HuIFN τ mRNA 存在於 feto-胎盤繫屬物中。aminocytes 亦表現相關於 OvIFN τ 引子及人類探針的訊息，此建議 IFN τ mRNA 的表現不限於懷孕終期(term)胎盤。另外，針對 HuIFN τ 之 RT-PCR 分析用於填離自成人淋巴細胞總細胞性 RNA：結果建議 IFN τ mRNA 存在於淋巴細胞中。

干擾素- τ 在人類組織中的表現亦使用原位(in situ)雜交作用(實施例 9)進行檢驗。對來自四個健康的，相異的懷孕終期(term)及前三個月人類胎盤的切片進行檢驗。

五、發明說明 (51)

此分析使用衍生自 OvIFN γ cDNA 序列之 cDNA 探針 (實施例 9B)。原位 (in situ) 雜交作用使用反義 RNA 探針進行。在三個分別的實驗中, 特異性雜交作用在所有的懷孕終期 (term) 及前三個月的胎盤組織中觀察到。

前三個月之胎盤絨毛 (包括融合滋胚母細胞 (syncytiotrophoblast) 之外層, 下層的滋胚內質母細胞 (cytotrophoblast), 及具有不同間葉 (mesenchymal) 細胞種類之中央柱狀區域) 顯示在滋胚內質母細胞 (cytotrophoblast) 細胞中有最高的 IFN γ 轉錄物水平。在融合滋胚母細胞 (syncytiotrophoblast) 及柱狀細胞中有不高但是為可偵測的水平。類似的轉錄物表現型態可見於懷孕終期 (term) 組織之胎盤絨毛但是訊號偵測的水平很低。前三個月之絨毛外滋胚母細胞 (trophoblast) 顯示最高量的訊息, 且當出現於絨膜內母體血液空間時染色呈陽性。

Howatsont 等人, (1988) 留意到在前三個月及懷孕終期 (term) 組織中的絨毛膜性絨毛之融合滋胚母細胞 (syncytiotrophoblast) 中會生產 IFN α 。同時, Paulesu, 等人 (1991) 觀察在絨毛外滋胚母細胞 (trophoblast) 及融合滋胚母細胞 (syncytiotrophoblast) 之 IFN α , 注意到當與懷孕終期所採取的胎盤比較, 在前三個月的胎盤組織有更強烈及多量的反應性。這些調查者使用對抗人類 IFN α 亞類

五、發明說明 (52)

的抗體，且沒有人觀察到任何 IFN α 在絨毛性滋胚內質母細胞 (cytotrophoblast)。

本結果顯示人類 IFN τ 基因在早期胎盤組織中經由絨毛外滋胚母細胞 (trophoblast) 的游移而高度表現，但在絨毛性融合滋胚母細胞 (syncytiotrophoblast)，滋胚內質母細胞 (cytotrophoblast)，及不同的柱狀細胞也會表現。這些結果顯示在人類懷孕組織偵測 IFN τ 轉錄物，且 IFN τ 表現在前三個月之胎盤的絨毛性滋胚內質母細胞 (cytotrophoblast) 及絨毛外滋胚母細胞 (trophoblast)。

C. 干擾素 - τ 之抗病毒性特性

OvIFN τ 的抗病毒活性已針對很多病毒進行 [評估，包括 RNA 及 DNA 病毒。被純化至均質態的 OvIFN τ 之相對特異活性在抗病毒性試驗中進行評估 (實施例 10)。OvIFN τ 比 rBoIFN α 或 rBoIFN β 具有較高的特異性抗病毒性活性 (實施例 10, 表 3)。

本發明之一優點為 OvIFN τ 具有良好的抗病毒性活性，其伴隨有限的細胞毒殺性影響。高度純化的 OvIFN τ 針對暴露於貓 AIDS 及人類 AIDS 反轉錄病毒之周邊血液淋巴細胞的抗-反轉錄病毒及細胞毒殺性影響進行試驗 (Bazer, 等

五、發明說明 (53)

人, 1987)。貓 AIDS 緩慢病毒在貓產生一慢性類 AIDS 症狀且為人類 AIDS 之一種模式 (Pederson, 等人, 1987)。每一種病毒在周邊血液淋巴細胞 (PBL) 中的複製經由培養上清液中隨時間的反轉錄酶 (RT) 活性加以監測。

為了決定 $IFN\tau$ 對 FIV 及 HIV 之抗病毒性活性, RNA-依賴性 DNA 聚合酶 RT 活性在以 $0vIFN\tau$ 處理之 FIV- 及 HIV- 感染的貓及人類 PBL 培養物中進行試驗 (實施例 11)。當細胞在 $0vIFN\tau$ 的存在下進行培養時, FIV 的複製被降低到約對照數值的三分之一。 $0vIFN\tau$ 的加入產生一快速, 劑量-依賴性之反轉錄酶 (RT) 活性降低 (實施例 11, 表 4)。雖然低至 0.62 微毫克/毫升的 $IFN\tau$ 的濃度可抑制病毒的複製, 對 RT-活性具有較大影響的較高濃度 (40 微毫克/毫升) 對細胞沒有毒性影響。此結果建議與在 $0vIFN\tau$ 的存在下所培養細胞的對照數值比較, 貓免疫缺陷病毒的複製明顯的降低。

$IFN\tau$ 顯然對帶有反轉錄病毒的細胞沒有毒性。即使當 $IFN\tau$ 以每毫升培養基 40 微毫克存在時亦是如此。 $IFN\tau$ 的此濃度相當於約 alpha 干擾素之 8,000 抗病毒性單位--當 $0vIFN\tau$ 及 $HuIFN\alpha$ 針對其保護 Madin-Darby 牛腎細胞免於被水泡性口腔炎 (vesicular stomatitis) 病毒溶解的能力進行試驗時 (溶解試驗見述於 Pontzer, 等人, 1988)。

五、發明說明 (54)

IFN τ 對 HIV 在人類細胞中複製的活性進行測試。已被 HIV 感染的人類周邊淋巴細胞以不同濃度之 IFN τ 進行處理 (實施例 12)。HIV 在周邊血液淋巴細胞中的複製經由培養上清液中隨時間的反轉錄酶 (RT) 活性加以監測。在 IFN τ 濃度的一範圍內生產明顯的抗-HIV 效果 (實施例 12, 表 5)。僅 10 微毫克/毫升的濃度在 6 天後就造成 RT 活性降低超過 50%。500 微毫克/毫升的濃度在 10 天內造成 RT 活性降低 90%。進而, 沒有任何證據顯示肇因於施用 IFN τ 之細胞毒殺性效果 (實施例 12, 表 5)。

進而, IFN τ 對 HIV 抗病毒性效果經由以不同份量之重組性 IFN τ 或重組性人類 IFN α 在 HIV 感染之時處理人類 PBMC 細胞進行評估 (實施例 19)。來自這些實驗的數據 (實施例 19, 表 II) 所支持的結論為, 在類似的濃度下, IFN α 及 IFN τ 有效地降低 HIV 在人類淋巴細胞中的複製。然而, 細胞以 IFN α 處理導致細胞毒殺性, 但是以 IFN τ 進行處理卻觀察不到細胞毒殺性, 即使是使用較高濃度之 IFN τ 。即使是使用兩百倍於干擾素 -alpha II 之劑量, 使用 IFN τ 沒有觀察到細胞毒殺性。

FIV 及 HIV 反轉錄酶本身在缺少 PBL 時並不會受到 IFN τ 的影響。因此, 抗病毒性活性並非肇因對病毒 RT 的直接

五、發明說明 (15)

效果。

干擾素- τ 已顯示可在肝細胞中抑制肝炎 B 病毒 DNA 複製 (實施例 19)。一衍生自肝細胞之人類細胞系以肝炎 B 病毒 (HBV) 轉染之後，被用於測試 IFN τ 之抗病毒性效果。細胞以一個濃度範圍內的 IFN α 及 IFN τ 加以處理。與沒有干擾素的對照組比較，IFN α 及 IFN τ 可降低 DNA 生產近兩倍。

為了顯示干擾素的效果係專一於感染病毒且不是一般細胞新陳代謝的結果，肝細胞針對 IFN α 及 IFN τ 對肝特異性 mRNA 生產的影響進行檢驗 (實施例 19)。兩種肝細胞特異性蛋白質類，Apo E 及 Apo A1，雜交作用分析進行偵測。對於兩種肝特異性 mRNA 之 mRNA 生產在使用濃度達 40,000 單位/毫升之 IFN α 或 IFN τ 時皆沒有明顯降低。進而，在此試驗中沒有證據顯示使用 IFN τ 造成的細胞毒性。

重組性羊干擾素 τ (roIFN τ) 對羊緩慢病毒 (OvLV) 複製的影響亦進行評估。體外影響經由將連續稀釋的 OvLV 去感染山羊滑膜細胞。被感染的細胞每天以 roIFN τ (0-2,500 抗病毒性單位/毫升 [AVU/毫升]) 處理 6 至 12 天，並對病毒複製及細胞病變 (CPE，例如，如實施例 2 所

五、發明說明 (16)

述)進行評估。

評估方法包括病毒生長曲線,細胞株落增殖試驗(例如,如實施例13,14或15所述),融合形成試驗(例如,見述於Nagy,等人,1983;Dalglish,等人,1984),及原病毒DNA經由PCR及反轉錄酶試驗(Mullis,1987;Mullis,等人,1987)之定量試驗。OvLV效價及CPE(80-99%)的降低($p < 0.001$)於roIFN τ -處理之培養物中觀察到。

於體內roIFN τ 經由將 5×10^6 TCID₅₀之OvLV株85/34接種於24個新生羊而進行試驗。這些小羊中的11隻每天以 $10^5 - 10^6$ AVU/公斤之roIFN τ 處理一次直到接種後(PI)30天並之後每星期處理二次。十三隻小羊被用於作為對照組。在血液中的病毒效價,其經由終點稀釋方法加以決定,在兩組小羊中均於PI之4-6週達到高峰。roIFN τ -處理之小羊中的OvLV相對於對照組動物被降低。在PI四週時得到最大的降低量,其中相對於對照組動物,在被處理的動物中OvLV效價為90%之降低($p < 0.01$)。

上述的OvLV研究指出重組性ovIFN τ 可以明顯地降低OvLV複製,並建議IFN τ 可被用於控制緩慢-病毒感染引起的臨床疾病。與其他的抗病毒數據一起考量,這些結果建議IFN τ 為一有效性對抗眾多病毒之抗病毒劑,包括RNA及

五、發明說明 (57)

DNA病毒。

本發明之干擾素組成物可有利於作為獸醫應用，其包括，但不限於，治療下列病毒感染：貓白血癌病毒，羊進行性肺炎病毒，羊緩慢病毒，馬感染性貧血病毒，牛免疫缺陷病毒，維斯納-美帝 (visna-maedi) 病毒，及山羊關節炎腦膜炎。

人類-衍生性干擾素組成物類可被用於治療，例如，下列的病毒疾病：人類免疫缺陷病毒 (HIV)，肝炎 c 病毒 (HCV) 及肝炎 B 病毒 (HBV)。

D. IFN τ 之抗株落繁殖性特性

IFN τ 對細胞性生長的影響亦被檢查。在一個分析當中，抗-細胞性生長活性使用一株落抑制試驗進行檢驗 (實施例 13)。人類羊膜 (WISH) 或 MDBK 細胞以低細胞細胞密度覆蓋，以形成源自單細胞的株落。干擾素的稀釋液被加入三份孔中且將培養碟進行培育以便讓株落形成。IFN τ 在這些試驗中抑制株落大小及數目。IFN τ 比人類 IFN α 更有效地抑制人類細胞系 (WISH) 之細胞株落增殖。IFN τ 之抗株落繁殖性活性為劑量-依賴性。高濃度的 IFN τ 阻止株落增殖，然而細胞存活性沒有不利影響。

五、發明說明 (58)

基於細胞周期的分析，其使用流式細胞計測儀，IFN γ 顯然抑制細胞完成S相的進行。這些結果顯示 IFN γ 之抗株落繁殖性效果，及強調其低細胞毒殺性。

IFN γ 之抗株落繁殖性效果亦針對大鼠及牛細胞系進行研究（實施例 14）。³H-胸腺密核苷併入的比率被用於評估細胞株落繁殖的速率。得到的數據顯示 IFN γ 對每株受試細胞系均劇烈地降低細胞性株落增殖（實施例 14，表 7）。

IFN γ 之抗株落繁殖性活性及沒有毒性進一步使用一系列之人類腫瘤細胞系進行檢驗（實施例 15）。不同的人類或細胞系選自 NIH 抗贅瘤新生劑篩選步驟中所使用的標準細胞系（Pontzer, 等人, 1991）。至少針對來自每個主要贅瘤新生性範疇中的一個細胞系進行檢驗。下列的細胞系得自美國標準菌種中心（12301 Parklawn Dr., Rockville MD 20852）：

NCI-H460	人類 肺 大 細胞 上皮癌；
DLD-1	人類 大腸 腺 上皮癌；
SK-MEL-28	人類 惡性 黑色素瘤；
ACHN	人類 腎 腺 上皮癌；
HL-60	人類 原骨髓細胞性 白血癌；
H9	人類 T 細胞 淋巴瘤；

五、發明說明 (5f)

HUT 78 人類皮膚 T 細胞 淋巴瘤； 及
MCF7 人類乳房腺上皮癌。

如上所述，抗株落繁殖性活性經由測量³H-胸腺核苷併入已以 IFN τ 處理之細胞而進行評估。介於不同處理之間的明顯不同經由變異數分析及史嘉菲氏 (Scheffe) F-試驗進行評估。細胞周期分析以流式細胞計測儀進行。MCF7 (乳房腺上皮癌) 株落增殖之 IFN τ 抑制的檢查顯示 IFN τ 以劑量依賴性方式降低 MCF7 株落增殖。使用 10,000 單位/毫升之 IFN τ 可觀察到³H-胸腺核苷之 50% 降低 (實施例 15, 表 8)。此細胞系早先已被發現對抗-雌激素處理沒有反應。

IFN τ 及 IFN α 之抗株落繁殖性效果的比較使用 HL-60 (人類原骨髓細胞性白血癌) 細胞進行。以原骨髓細胞性白血癌 HL-60 得到的結果為比較 IFN τ 與人類 IFN α 所得到結果的代表 (實施例 15)。兩種 IFN 的濃度低到 100 單位/毫升仍可產生明顯的 (> 60%) 生長抑制。IFN 提高份量進而抑制種瘤細胞株落增殖 (圖 4)。高劑量之 HuIFN α ，但不是 OvIFN τ ，具細胞毒殺性 (圖 5)。使用 IFN α 使細胞的存活率降低至 80%。相反的，當 IFN τ 以 10,000 單位/毫升施用時，近 100% 之 IFN τ -處理的細胞仍然存活。因此，雖然兩種干擾素抑制株落增殖，僅有 IFN τ 沒有細胞毒殺性。缺少毒性提供 IFN τ 用於體內治療的優點。

五、發明說明 (60)

當以 $IFN\tau$ 進行處理時，人類皮膚 T 細胞淋巴瘤，HUT 78，與 HL-60 有類似的反應（實施例 15，圖 9）。 $0vIFN\tau$ 及 $rHuIFN\tau$ 均降低 HUT 78 細胞生長，但 $IFN\alpha$ 對細胞存活性顯示不良影響。

T 細胞淋巴瘤 H9 較前述腫瘤細胞系對於 $IFN\alpha$ 的抗株落繁殖性影響更不敏感。雖然 $IFN\alpha$ 對於 H9 細胞沒有毒性，它無法在任何檢驗濃度下明顯抑制細胞分裂（實施例 15，圖 10）。相反的， $IFN\tau$ 被觀察到可降低 H9 生長至約 60%。因此，僅 $0vIFN\tau$ 為此 T 細胞淋巴瘤的有效生長抑制劑。

在三個額外的腫瘤細胞系（NCI-H460，DLD-1 及 SK-MEL-28）中， $IFN\tau$ 及 $IFN\alpha$ 為同樣有效的抗腫瘤劑。在黑色素瘤 SK-MEL-28 中，經由 $IFN\alpha$ 之株落增殖抑制伴隨 13% 存活率降低而達成，然而 $IFN\tau$ 沒有細胞毒殺性。在大部份被檢驗的腫瘤中， $IFN\tau$ 相等於或優於 $IFN\alpha$ 作為抗腫瘤新生劑以對抗人類腫瘤。

$IFN\tau$ 表現抗株落繁殖性活性以對抗人類腫瘤細胞而沒有毒性，且較人類 $IFN\alpha$ 相同或更加有效。 $IFN\alpha$ 之臨床試驗顯示其為有效的抗腫瘤劑（Dianzani, 1992; Krown,

五、發明說明(61)

1987)。 $IFN\tau$ 作為治療劑的優點為沒有高劑量 $IFN\alpha$ 之毒性。

$IFN\tau$ 另外應用於對抗腫瘤,如卡波西氏(Kaposi's)肉瘤(相關於HIV感染),其中 $IFN\tau$ 之抗贅瘤新生性效果為與 $IFN\tau$ 抑制反轉錄病毒生長的能力結合。

干擾素- τ 治療的活體內功效在老鼠系統中檢驗(實施例16)。 $B16-F10$ 為一同基因性老鼠可轉移的腫瘤,其由於肺部惡性轉移之高發生率而被選擇(Poste等人,1981)。干擾素治療始於導入腫瘤細胞後3天。 $IFN\tau$ 於活體內之施用劇烈地降低 $B16-F10$ 肺腫瘤。因此, $IFN\tau$ 顯然為活體內及活體外有效的抗贅瘤新生性。

這些結果建議本發明之干擾素組成物類可用於抑制或降低腫瘤細胞生長的方法,包括但不限於下列腫瘤細胞:人類上皮瘤細胞,造血細胞性癌細胞,人類白血癌細胞,人類淋巴瘤細胞,人類黑色素瘤細胞及類固醇-敏感性腫瘤細胞(例如乳腺腫瘤細胞)。

E. 第1型 IFN 作為自體免疫紊亂之治療

本發明之組成物類及方法類可用於治療性處理及因此

五、發明說明 (62)

減輕眾多免疫系統-相關之紊亂,其特徵為過高-或過低-活性之免疫系統功能。此類紊亂包括高過敏產生性及自體免疫疾病,包括多發性硬化,第I型(胰島素依賴性)糖尿病,紅斑性狼瘡,肌萎縮脊髓側索硬化,克若氏(Crohn's)症,風濕性關節炎,胃炎,氣喘,過敏,牛皮癬及類似者。

F. 口服施用 IFN τ 的效用

以下用以支持本發明的實驗及詳細說明,顯示出口服施用 IFN τ 多肽組成物與被注射之 IFN τ 組成物,在利於以 IFN τ 治療的疾病或狀況方面,如自體免疫疾病(例如,多發性硬化),有同等的效力。

不只在利於以 IFN τ 治療的疾病(EAE)方面有效,口服施用 IFN τ 在施用的途徑方面,相較於被注射之 IFN τ 成分的方法,其優越性比預期的高。例如用口服施用 IFN τ ,在被治療的個體中,所產生的血清抗體明顯較低。這有好處,因為口服施用 IFN τ 較不可能因宿主的免疫反應而失去其效力(也就是治療上的敏感度,及/或藥的劑量因而顯著降低),且個體所接受的治療較不會因免疫反應,而有不好的副作用。

G. 干擾素之細胞毒殺性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明 (b)

IFN τ 優於其他干擾素,如 IFN α , 的優點為以治療性劑量之 IFN τ 治療個體顯然無關於細胞毒殺性。特別是,在 IFN- β 引發毒性的濃度下,IFN- τ 顯然為非毒性的。顯示此結果的實驗中,L929細胞以相異濃度的 oIFN τ 或 MuIFN- β 加以處理 (Lee Biomolecular, San Diego, CA),其濃度範圍自 6000U/毫升至 200,000U/毫升 (實施例 19E)。

oIFN τ , MuIFN- β 或培養基 (對照組) 在時間為零時加入且細胞進行培育 72 個小時。實驗結果示於圖 21。活細胞的比例 (相對於對照組) 沿 y 軸標出 (± 標準誤)。百分之一百相當於以培養基處理時 L929 細胞之存活率。結果顯示 oIFN τ 基本上在濃度達 100,000 U/毫升時為無毒的,且在整個化合物治療範圍中較 MuIFN- β 的毒性明顯為低。

早先已顯示以第 I 型的 IFN, IFN α 及 IFN β , 在人類及動物之體內治療會引發毒性,其所彰顯的副作用包括發燒,昏睡,心悸,體重減輕,及白血球減少症 (Degre, 1974; Fent 及 Zbinden, 1987)。以 IFN τ , IFN β 及 IFN α (10⁵ U/注射) 治療在 NZW 老鼠中對於總白血球細胞 (WBC), 總淋巴細胞數量及重量測量 (表 13) 的活體內效果如實施例 19F 所述進行檢驗。介於 IFN τ 處理及未處理老鼠之間沒有觀察到任何 WBC, 淋巴細胞數量或重量變化之不同。

五、發明說明 (64)

比較而言， $IFN\beta$ 處理的老鼠於注射後 12 小時顯示 31.7% 淋巴細胞計數下降 31.7%。進而， $IFN\beta$ 注射 24 小時後淋巴細胞計數持續下降。 $IFN\alpha$ 處理的老鼠在注射後 24 小時顯示淋巴細胞下降 55.8% 及明顯的體重下降。支持本發明的額外試驗顯示 $IFN\tau$ 在高劑量不會抑制骨髓。因此， $IFN\tau$ 顯示在活體內缺少毒性，不像 $IFN\beta$ 及 $IFN\alpha$ 在周邊血液及重量測量的研究中的結果。如下所述，支持本發明的實驗中指出 $IFN\tau$ 相對於 $IFN\beta$ 及 $IFN\alpha$ 之降低毒性，如上所總結者，可歸因於在 $IFN\tau$ N-端之 37 個胺基酸序列，以及將這些序列取代在非- τ 型 I 干擾素，如 $IFN\beta$ 及 / 或 $IFN\alpha$ 之相關序列可給予所得到的雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽類降低的毒性。

III. 干擾素- τ 多肽片段及 $IFN-\tau$ 及 $IFN-\alpha$ 對型 I 干擾素受體的差別性辯識

A. $IFN\tau$ 多肽片段

$IFN\tau$ 多樣化活性，其強效及缺少細胞毒殺性，如本說明書所揭示者，建議此新穎干擾素之結構 / 功能分析之重要性。 $0vIFN\tau$ 功能的結構基礎使用相關於完整 $0vIFN\tau$ 序列之六個重複性合成性肽類 (圖 6)。衍生自羊 $IFN\tau$ 序列的相關多肽示於 SEQ ID NO: 5 至 SEQ ID NO: 10。表示胺基酸

五、發明說明 (65)

1-37, 62-92 及 139-172 之三個肽類已顯示可抑制 IFN τ 抗病毒性活性(實施例 17)。肽類在濃度為 300 μ M 及更高時為有效的競爭者。

代表 OvIFN τ , OvIFN τ (139-172), 及內部肽 OvIFN τ (62-92) 之 C-端區域的合成性多肽, 可抑制 IFN τ 及 rBoIFN τ 抗病毒性活性至同樣程度, 然而肽 OvIFN τ (1-37) 之 N-端有效於抑制 OvIFN τ 抗病毒活性。劑量-反應劑量指出 IFN τ (62-92) 及 IFN τ (139-172) 可抑制 IFN τ 抗病毒性活性至類似的程度。同樣可阻斷 IFN τ 抗病毒性活性之肽類亦阻斷重組性牛 IFN α (rBoIFN α) 之抗病毒性活性; 重組性牛 IFN γ 不受到肽類的影響。這兩個 IFN τ 肽類可以代表針對 IFN τ 及相異 IFN α 之同樣受體結合區域。

兩種合成性肽類 OvIFN τ (1-37) 及 OvIFN τ (139-172) 亦可阻斷 OvIFN τ 抗-FIV 及抗-HIV 活性(實施例 17; 圖 11A 及 11B)。雖然兩種肽類可阻斷 FIV RT 活性, 僅有 C-端肽, OvIFN τ (139-172), 顯示對於貓細胞系, Fc9 為一有效率的水泡性口腔炎 (vesicular stomatitis) 病毒活性抑制劑。

對抗 IFN τ 肽類之多株抗-肽抗血清得到如上述多肽抑

五、發明說明(66)

制研究中的類似結果。直接對抗相同三個區域 (OvIFN τ (1-37), IFN τ (62-92) 及 IFN τ (139-172)) 的抗體阻斷 OvIFN τ 功能, 確定這三個區 (domain) 在抗病毒性活性的重要性 (實施例 17)。這些肽類雖然明顯地結合至干擾素受體, 在細胞中並不會激發干擾素-類似效果。

IFN τ 之抗株落繁殖性活性 (實施例 11, 表 II) 涉及該分子之進一步區域, 因為 IFN τ (119-150) 為 OvIFN τ -誘發之細胞株落增殖降低的最有效抑制劑。此結果建議該分子之該區域中最初負責抑制細胞生長者為 IFN τ (119-150) 區域。IFN τ 分子之該區域可有利於單獨存在或融合至蛋白質類 (如血清白蛋白, 抗體或干擾素 alpha 多肽) 作為一抗贅瘤新生性藥劑。介於衍生自人類干擾素- α 之 N-端肽及血清白蛋白之共軛性蛋白質已顯示具有抗細胞性株落增殖活性 (Ruegg, 等人, 1990)。

最後, ^{1 2 5} I-OvIFN τ 至其於 MDBK 細胞上受體的結合可以經由對抗 6 種肽類中的 4 種加以阻斷; 該 4 種多肽類代表 OvIFN τ 之胺基酸 1-37, 62-92, 119-150 及 139-172。此結果反映多重結合區 (domain) 以及這些區域的功能明顯性。因為 IFN τ 之相異的區域涉及相異的功能的激發, 經選擇的胺基酸的修正可潛在性造成具有選擇性生物活性的 IFN τ -類似干擾素。

五、發明說明 (67)

人類 IFN τ 蛋白質之多肽片段，其具有類似於上述 OvIFN τ 多肽類的活性，係基於上述針對 OvIFN τ 多肽片段的數據以及在此揭示 HuIFN τ 序列的資料被提出。此類人類-序列衍生性多肽包括，但不限於，下列 SEQ ID NO: 15 至 SEQ ID NO: 20，及 SEQ ID NO: 35 至 SEQ ID NO: 40。

B. IFN- τ 及 IFN- α 對於型-I 干擾素受體之效果及交互作用

與上述及實施例 17 所述肽拮抗劑研究一致的是，見述於實施例 18 的實驗顯示高濃度（達 10-倍過量）之 OvIFN τ 無法競爭受體及阻斷人類 IFN α A 對 MDBK 細胞的毒性影響。OvIFN τ 及人類 IFN α A 之相對抗病毒性，細胞毒殺性，受體結合，及受體競爭特性的比較提供結合子-受體交互作用位階的瞭解。IFN τ 及 IFN α A 具有類似的特異性抗病毒性活性，如前所述（Pontzer, 等人, 1988）。然而，如實施例 18 所示，IFN α A 較 IFN τ 對受體具有約 10-倍低的 Kd 且因此，對受體具有較高的結合親和性。進而在使用 ¹²⁵I-IFN τ 或 IFN α A 之結合競爭試驗中，IFN α A 較 IFN τ 七倍有效（Figs. 24A, 及 24B）。因為每個細胞對 IFN τ 及 IFN α A 的結合位置數目非常類似，且 IFN τ 與 IFN α A 競爭結合，顯然 IFN α A 及 IFN τ 辨識相同受體複合體。

五、發明說明 (6f)

針對細胞毒殺性及抗病毒性活性之劑量-反應/佔據曲線的比較 (Figs. 27A及 27B) 顯示細胞毒殺性有關最大的受體佔據以及因此結合親和性; IFN α A具有較大的結合親和性且因此具有實質上較大的毒性。在另一方面, 抗病毒性活性在造成受體非常少部份的佔據的濃度時為最大的且無法以平衡結合數據代表。

支持本發明的實驗亦顯示羊 IFN τ , 類似 IFN α A, 可以引發型 I 受體-相關性激酶 Tyk2及轉錄因子 Stat1 α 及 Stat2 之非常快速的磷酸化作用。在既有之以 IFN τ 及 IFN α A刺激的時間規模下, 顯然僅有小部份的受體需要被佔據以誘發 Tyk2, Stat1 α , 及 Stat2的磷酸化作用。放在一起考慮, 這些數據建議這些訊號轉導蛋白質類的磷酸化作用不足以誘發與 "其他" 型 I 之 IFN (即, IFN- τ 以外的第 I 型之 IFN) 相關之細胞性毒性。

IFN α A對受體之較高的結合親和性及 IFN τ 與 IFN α A 的差別競爭特性亦建議兩種 IFN差別性辨識受體。使用合成性肽拮抗劑之支持本發明的實驗, 包括實施例 17中所描述的實驗, 顯示 C-端肽 IFN τ -- (139-172) (SEQ ID NO:10) 對 IFN α A 及 IFN τ 的活性有競爭性, 但是 N-端肽 IFN τ -(1-37) (SEQ ID NO:5) 於 5- 至 10-倍高濃度僅有

五、發明說明 (b)

效於對抗 IFN τ 活性。使用對抗 IFN τ -- (139-172) 及 IFN τ -(1-37) 之抗血清之實驗已顯示對 IFN τ -(1-37) 的抗血清僅阻斷 IFN τ 的結合，然而對 IFN τ (139-172) 之抗血清阻斷 IFN α 及 IFN τ 兩者。這些數據建議 IFN τ 及 IFN α A之 N-端部份代表高-親和性結合之明顯決定位 (determinant)，且介於 IFN α A及 IFN τ 之間的高-親和性平衡結合的不同處係由於在這些分子的 N端之受體交互作用的不同。據此，這些分子的 N端亦顯示 IFN 的細胞毒殺性效果之明顯決定位 (determinant)。

C. 雜合性 (hybrid) 干擾素融合蛋白質類

上述的數據綜合建議第 I 型干擾素之 C-端區域結合至第 I 型干擾素受體上的共同位置 (即，所在位置影響 IFN α 及 IFN τ 兩者之受體活化作用特性)，然而 N-端區域可能涉及獨特功能的激發 (即，結合的位置僅影響 IFN τ 之受體活化特性)。特別是，數據建議，相對於其他型 I 干擾素，例如，IFN α ，N-端區域負責 IFN τ 被降低的細胞毒殺性。

本發明利用有關 IFN τ 之 N端區域所帶來的減低毒性之觀察來支持嵌合性 (chimeric) DNA 構築體，該構築體係用於生產雜合性 (hybrid) 干擾素融合蛋白質類，其具有衍生自 IFN τ 之 N-端部份及衍生自非- τ 干擾素第 I 型之多肽之 C-

五、發明說明 (70)

端部份，該非- τ 干擾素第I型之多肽作為治療劑的效果因其相對高的細胞毒殺性而降低。此類非- τ 干擾素第I型之多肽類的實施例包括IFN τ 及IFN α 的相異型。

有關 Fig. 28, 此雜合性 (hybrid) 干擾素融合蛋白質或多肽 40, 其編碼嵌合性 (chimeric) 核酸分子, 具有 N-端 42 及 C-端 44。該融合蛋白質包括第一個 (N-端) 片段部份 46 及第二個 (C-端的) 片段部份 (segment) 48。N-端的片段部份 (segment) 包含干擾素- τ 多肽之 N-端胺基酸序列, 其經由嵌合性 (chimeric) 核酸分子之 5' 端片段部份 (segment) 加以編碼。C-端的片段部份包含非- τ 干擾素第I型之多肽之 C-端的胺基酸序列及干擾素- τ 多肽之胺基酸序列, 其經由嵌合性 (chimeric) 核酸分子之 3' 端片段部份 (segment) 加以編碼。此兩個片段部份 (segment) 接合或剪裁在交接位置 50 接合或剪裁, 該位置位於的區域 (接合區域) 相關於成熟的干擾素多肽的部份, 其約介於胺基酸殘基 8 及 37 之間。注意成熟的 IFN τ 多肽典型上始自完整序列中位於胺基酸 24 之半胱胺酸 (完整序列包含領導子序列且始自甲硫胺酸)。

該接合區域被包含於 37 個胺基酸之 N-端的肽 (SEQ ID NO:5) 中, 該肽被使用於上述的實驗中。數個 IFN τ , IFN α 及 IFN β 選殖株之成熟胺基酸序列介於胺基酸 1 及 37 之

五、發明說明 (71)

間的比對顯示在序列中最大的歧異程度發生近於 N-端。特別是，序列間最高程度的歧異發生於胺基酸 1 及 16 之間，而介於胺基酸 17 及 28 之間具有中等程度的歧異。介於胺基酸 29 及 37 之間的區域在相異的型 -I 干擾素之間相當具有保守性，且被認為相關於型 -I 干擾素受體結合交互作用 (Fish, 1992)。

最佳的接合 (即，位於相關干擾素 τ 序列之上游之胺基酸殘基位置 (朝向 N-端或 5' 端)，以及位於另一種例如，IFN α 或 IFN τ 之干擾素序列之下游之胺基酸殘基位置 (朝向 C-端或 3' 端) 可以經由本發明所述的方法，該方法使用肽類或 DNA 序列，其編碼相關於在 IFN τ (1-37) 中較長及較短的區域之肽類，以及本發明所描述之功能性試驗 (如，抗病毒性，抗株落繁殖性及細胞毒殺性試驗) 加以確定。可以設想，例如，本發明之雜合性 (hybrid) 或雜混性 (chimeric) 干擾素，其含有干擾素 τ 之胺基酸 1-28 且殘餘的胺基酸來自非- τ 型 I 干擾素，具有與干擾素 τ 相關之毒性以及相關於此類第 I 型干擾素正常應有的生物活性。例如，IFN τ / IFN α 雜合物 (hybrid)，例如，可降低 IFN α 的毒性，但不會干擾 IFN α 抗病毒性特性。

如上所述，本發明之干擾素融合蛋白質類所具有的胺基酸序列中，成熟的干擾素蛋白質之前約 8 至 37 個胺基

五、發明說明 (72)

酸具有 IFN τ 分子的序列，且殘餘的胺基酸具有非- τ 干擾素第 I 型之多肽之序列。干擾素融合蛋白質之前 8-37 個胺基酸之例示性序列可選自包括示於本發明之序列 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, 及 SEQ ID NO:53。

殘餘的序列（即，“第二個”胺基酸序列，C-端片段部份 (segment)，其經由嵌合性 (chimeric) 核酸分子之 3' 端片段部份 (segment) 加以編碼）可選自任何合適的非- τ 干擾素第 I 型之多肽，如干擾素 alpha（例如，alpha-1 或 alpha-2），干擾素 beta，干擾素 omega，雜合性 (hybrid) 干擾素或共通性干擾素。針對非- τ 第 I 型干擾素的序列為本技藝所熟知者。例如，雜合性 (hybrid) 干擾素之例示性序列為 Gunther, 等人, 1990, Leibowitz, 等人, 1990, Goeddel, 1983, 1984, 1987, 及 Creasey, 等人, 1988) 所提供。共通性干擾素之例示性序列為 Stabinsky, 1990 所提供。例示性干擾素 alpha 序列見述於 Capon, 1983, Dworkin-Rastl, 1989, Sato, 1988 及 Sloma, 1988。額外的干擾素 alpha 及 beta 序列為 Fish, 1992 所提供。合適的序列可得自 GenBank 或其他公用序列儲存庫。

五、發明說明 (17)

3'-端或C-端片段部份(segment)開始之非- τ 第I型干擾素胺基酸殘基部份的決定經由將親代序列作最佳比對及工程製造一接合而完成,使得所得到的嵌合性(chimeric)干擾素分子的序列完美地與(i)在5'端或N-端片段部份(segment)之干擾素 τ 親代序列,及(ii)在3'端或C-端片段部份之非- τ 第I型干擾素親代序列對齊。該親代序列,當然為一種干擾素序列,其衍生出5'端或N-端片段部份(segment)及3'端或C-端的片段部份(segment)。

3'-端或C-端片段部份(segment)開始之非- τ 第I型干擾素胺基酸殘基位置典型上為5'-端或N-端的IFN- τ 片段部份(segment)之最後胺基酸殘基後的數目。例如,在一雜合性(hybrid)干擾素融合蛋白質中,前十個胺基酸具有SEQ ID NO:5之前十個胺基酸的序列,殘餘的胺基酸可具有成熟的干擾素alpha(例如,IFN- α Con1,其見述於Fish, 1992)的序列減去干擾素alpha的前十個胺基酸。

本發明之偏好具體事實為融合蛋白質類,其中N-端及C-端的片段部份(segment)的序列係衍生自人類干擾素序列。例如,在構築體中,前,例如,28個胺基酸相關於SEQ ID NO 15或SEQ ID NO 35之前28個胺基酸,且殘餘的序列相關於人類干擾素alpha或beta。人類干擾素 τ 序列示於,例如, Bazer,等人, 1994。人類干擾素alpha及beta序列

五、發明說明 (74)

可得自 GenBank。

將被理解的是，雖然干擾素融合蛋白質類被描述為“成熟的”蛋白質類，即，他們始於完整干擾素序列之殘基 24，本發明亦包含融合蛋白質類及嵌合性(chimeric)核酸分子，其所編碼的融合蛋白質類含有領導子序列，即，其係始自起始甲硫胺酸。在此類干擾素融合蛋白質中的領導子序列可衍生自 τ 或非- τ 第 I 型干擾素。進而，將被理解的是第一個及第二個片段的序列為“共通性”序列。換句話說，5' 片段部份(segment)的序列可能不是相關於“自然的”IFN τ ，但是相關於一經由比較被比對的序列及數個相異的IFN τ 所得到的共通性序列。同樣地，3' 片段部份(segment)的序列可能不是相關於“自然的”非- τ 第 I 型IFN，但是相關於一經由比較被比對的序列及數個相異的非- τ 第 I 型之 IFN 所得到的共通性序列。

或者，任一片段的序列可相關於“內部-一致性”序列，即，相關於其中每個位置包含至少在 IFN τ (針對 N-端片段部份(segment))或非- τ 第 I 型之 IFN (針對 C-端片段部份(segment))之自然發生之變異型(isoform)中於該位置可發現的殘基的序列，但是最後的序列既不相關於任何自然發生的變異型(isoform)，也不相關於任何共通性序列。例如，假如兩個變異型(isoform)，每個長為 3 個胺基酸，具

五、發明說明 (75)

有序列 "C R S" 及 "C K G", 內部一致性序列為 "C R G"。

進而, 將被瞭解的是本發明亦包含較複雜的嵌合物 (chimeras), 例如, 含有超過一個衍生自 IFN τ 之分開區域及/或超過一個來自另一個合適的干擾素的區域之嵌合物 (chimeras)。此類嵌合物 (chimera) 的出現, 例如, 當非- τ 第 I 型干擾素包括第二個 (C-端) 片段部份 (segment) 本身為一雜合性 (hybrid) 干擾素, 其由, 例如, alpha 干擾素及 beta 干擾素 (Creasey, 等人, 1986, 1988), alpha-1 及 alpha-2 干擾素 (Leibowitz, 等人, 1990) 或 alpha 干擾素及 omega 干擾素 (Gunther, 等人, 1990) 所組成。

如前文所指出, 本發明之雜合性 (hybrid) 干擾素融合蛋白質組成物可設想的優點為該組成物相對於已被證明具有療效的天然非- τ 第 I 型干擾素具有減低的毒性。該雜合性 (hybrid) 組成物類可具有相同於被驗證之非- τ 第 I 型之 IFN 之生物活性及 IFN τ 之減低的細胞毒殺性。

嵌合性 (chimeric) 核酸分子可以合成性或以標準分子級程序及操作 (Ausubel, 等人, 1988; Sambrook, 等人, 1989) 進行生產, 如本發明說明書所例示者。編碼親代多肽類 (來自該兩個多肽類之兩個片段部份 (segment) 形成之雜

五、發明說明 (76)

合性 (hybrid) 蛋白質自其衍生) 之 DNA 序列彼此鄰近選殖進入一表現載體, 其使用標準重組方法 (例如, 經由將不改變胺基酸序列之限制位置工程插入 DNA 序列, 切割質體, 並將合適的片段選殖進入被挑選的表現載體中)。合適的表現載體的實施例見述於前。

重組性雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽類隨後自如前述之載體生產, 純化並用於治療得益於干擾素治療之疾病及 / 或情況。

IV. 蛋白質模型化及蛋白質修飾

在前述章節中的數據顯示具有四個 0vIFN α 蛋白質之有關受體交互作用及生物活性的不連續位置之合成性肽類被確認。為了明瞭這些區域的結構相關性, 進行 IFN α 之三度結構模型化作用。一個三度空間模型會有利於詮釋已得的數據及未來結構 / 功能研究的設計。

A. 分子級蛋白質模型化作用

結合兩個全長重組性 0vIFN α 及 IFN β (其為習知三度空間結構之蛋白質, Senda, 等人, 1992) 之圓二向色性 (circular dichroism, Cn) 數據, 建立 0vIFN α 的模型。此模

五、發明說明 (17)

型最令人驚訝之特點在於 IFN τ 屬於具有四-螺旋束主要型態 (motif) 之蛋白質類別。IFN τ 之 CD 光譜置於 AVIV 60S 光譜極度計測儀上。使用兩種相異的方法進行二級結構評估, 及 Perczel, 等人, (1991) 之運算及 W.C. Johnson, Jr. (1992) 之變動性選擇。

光譜之二級結構估計指出 70-75 % 為 alpha 螺旋 (特徵為最少發生在 222 及 208 微毫米且最大發生在 190 微毫米)。變動性選擇運算估計分子的其他部份為 20% beta 片狀排列及 10% 轉折。Chang 的方法估計其他部份為 30% 不規則的纏繞。IFN τ 及 IFN β 序列的比對顯示介於兩個分子之間的相似性, 特別是在 IFN β 之習知螺旋結構區域。IFN τ 之序列分析亦顯示被提出的螺旋區域具有對質子具惰性 (apolar) 之周期性, 其指出四-螺旋束主要型態 (motif)。

最後的模型化步驟為將 IFN β 碳骨幹之 IFN β x-線結晶圖形座標應用於 IFN τ 序列。如前文所述加以確認之 IFN τ 之功能活性被局限於分子的一端且被發現緊鄰空間上的近端。此發現符合 IFN τ 上之多重結合位置同時與第 I 型之 IFN 受體發生交互作用。

三度空間模型化數據與上述功能數據共同提供將序列

五、發明說明 (70)

變異導入特異性 IFN γ 區域以促進經挑選的功能 (例如, 抗病毒性或抗細胞性株落增殖) 或將經挑選功能的區域 (們) 換成其他干擾素分子 (例如, 抗病毒性, 抗贅瘤新生性, 或減低的細胞毒殺性) 的必要資訊。

B. 重組性及合成性操作

實施例 3 描述 OvIFN γ 之合成性基因的構築。簡而言之, OvIFN γ 之胺基酸序列自 OvIFN γ cDNA (Imakawa, 等人, 1987) 使用大腸桿菌之最佳的密碼子使用方式進行逆轉譯。該序列被製成含有 20 個單一的限制位置, 其間隔分佈於該構築體的全長中。此 540 個鹽基對之合成性基因序列被分成 11 個寡核苷酸片段。個別的片段被合成及以單股或雙股形式選殖進入 pTZ19R, pTZ18R 或 pBluescript, 並進行增幅及融合。該合成性 OvIFN γ 構築體隨後被選殖進入一經修飾之 pIN-III-ompA 表現載體中以便在細菌中表現, 並且亦選殖進入酵母菌表現質體。以類似方式構築的人類 IFN γ 合成性基因 (SEQ ID NO:3) 經過設計, 構築並於酵母菌細胞中表現。

OvIFN γ 合成性基因在酵母菌中的表現 (實施例 4) 使得重組性 IFN γ 在啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中過量生產: 大量的 (5-20 毫克/公升) 重組性 IFN γ 可以自可溶解的酵母菌萃取物使用順序性離子交換及分子級篩色層分

五、發明說明 (9)

析。以此方式純化的重組性 IFN τ 表現類似於天然 OvIFN τ 之良好的抗病毒性活性 (2至 3×10^8 單位/毫克)。

該合成性基因構築體協助導入可能促進抗腫瘤 (抗細胞性株落繁殖性) 及抗病毒性活性的突變。進而, 負責不同功能之分子的分開區域可以獨立地進行修飾以產生具有喜好功能之分子。例如, 兩個刪減突變物, OvIFN τ (1-162) 及 OvIFN τ (1-166), 已被構築而用於羧基端序列在 IFN τ 分子中的角色。

額外的突變 IFN τ 分子已被構築以確認對抗株落繁殖性活性很重要的殘基。例如, 一特別殘基, TYR 123 在 IFN α 之抗細胞性株落繁殖性活性中被暗示 (McInnes, 等人, 1989)。TYR 123 在 IFN τ 中的相等物被包含於肽 OvIFN τ (119-150) 中: 此多肽抑制 OvIFN τ 及人類 IFN α 抗株落繁殖性活性。將 TYR 123 轉變為保守性 (TRP) 及非保守性 (ASP) 取代物的突變, 以及刪除此殘基的突變序列俱被製出。TYR 123 的密碼子係位於 Ssp1 位置中; 將此位置去掉已用於篩選。突變的 IFN τ 之抗株落繁殖性活性已如本發明所述進行評估。

相關於本發明之 IFN τ 多肽類之合成性肽類可以被製出。合成性肽類可經由商業化合成或使用本技藝中標準方法

五、發明說明 (續)

及儀器 (Applied Biosystems, Foster City, USA) 進行合成。

或者，編碼肽類之寡核苷酸序列或可直接經由寡核苷酸合成的標準方法加以合成，或在編碼性序列很大的情形下，經由一系列之選殖性步驟加以合成，這些步驟涉及相關於編碼性序列之多重寡核苷酸片段之縱向排列 (tandem array) (Crea, 1989; Yoshio, 等人, 1989; Eaton, 等人, 1988)。寡核苷酸編碼性序列可以標準重組性步驟 (Maniatis 等人, 1982; Ausubel 等人, 1988) 加以表現。

上述干擾素- τ 多肽類的生物活性可以單獨使用干擾素- τ 多肽或與其他前文或後文所述之其他蛋白質類共軛或融合加以利用。

V. 融合蛋白質的生產

在另一方面，本發明包含干擾素- τ ，干擾素- τ -衍生性多肽類或雜合性 (hybrid) 干擾素共價性連接於第二個多肽以形成一融合性或雜合性 (hybrid) 蛋白質。製造此類蛋白質之干擾素- τ 序列可為如上所述之重組性生產的干擾素- τ 或其生物活性部份。

五、發明說明 (M)

例如，當干擾素- τ 被用於抑制病毒表現時，顯示抗病毒性活性之衍生自 IFN τ 之多肽類可有利地與一可溶性肽融合，該肽如，血清白蛋白，抗體（例如，特異性對抗病毒-特異性細胞表面抗原），或干擾素 alpha 多肽。在一具體事實中，其如上所述相關於雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽類，該 IFN τ 多肽類提供一種降低其他干擾素分子（例如，IFN β 或IFN α ）毒性的方法，該方法經由以具有較低毒性之相關干擾素- τ 區域去取代此類干擾素之相關於毒性之區域。在另一個具體事實中，融合蛋白質被生產而包含具有抗細胞性株落增殖特性之干擾素- τ 區域。此類區域可得自，例如，在本發明所揭示之人類干擾素- τ 序列。

本發明之融合蛋白質類可以經由化學接合或經由重組技術而形成。在前一個方法中，干擾素及第二個經選擇之多肽經由供共價結合之傳統偶合劑加以修飾。在一供將可溶性血清白蛋白偶合至干擾素多肽的例示性方法中，血清白蛋白以硫乙酸 N-丁二亞醯胺基-S-乙醯基酯 (Duncan, 等人, 1983) 進行衍生製備，產製出硫化的血清白蛋白。被活化的血清白蛋白多肽隨後與以丙酸 3-(2-吡啶基二硫) N-丁二亞醯胺基酯進行衍生的干擾素 (Cumber, 等人, 1985) 進行反應，生產經由一雙硫鍵連接的融合蛋白質。

作為一種替代方法，重組性干擾素可以用半胱胺酸殘

五、發明說明 (82)

基使得干擾素雙硫鍵偶合至被活化的結合子，因此簡化了偶合反應。用於生產重組性干擾素- τ 之干擾素- τ 表現載體可以加以修飾而根據位置導向致突變作用之標準方法插入內部或末端的半胱胺酸密碼子 (Ausubel, 等人, 1988)。

在一個方法當中，融合的蛋白質使用一表現載體進行重組性製備，其中第二個被挑選的多肽之編碼性序列被接合至干擾素- τ 編碼性序列。例如，人類血清白蛋白編碼性序列可以同架 (in-frame) 方式融合至干擾素- τ 多肽之編碼性序列，如，SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:39。該融合蛋白質隨後使用合適的宿主細胞的進行表現。該融合蛋白質可經由分子級篩及離子交換色層分析的方法加以純化，若有必要，可額外經由聚丙烯醯胺凝膠電泳性分離及/或 HPLC 色層分析加以分析。

將由前文瞭解的是含有干擾素- τ 的融合蛋白質類如何被製備。上述融合的一種變化為交換干擾素- τ 及被挑選的第二個蛋白質分子於融合蛋白質 (例如，羧基端對胺基端融合)內部的位址。進而，天然干擾素- τ 多肽之內部部份 (例如，介於 15 及 172個胺基酸的胺基酸區域) 可以被組合成為的多肽類為其中兩個或多個此類干擾素- τ 部份係連續的，而其在天然蛋白質中正常為不連續的。

五、發明說明 (83)

VI. 與干擾素- τ 反應的抗體

含有本發明之多肽抗原與穀胱甘肽-S-轉移酶 (Sj26) 蛋白質融合的融合蛋白質類可以使用 pGEX-GLI 載體系統在大腸桿菌 JM101 細胞中表現。被融合的 Sj26 蛋白質可以簡易地使用穀胱甘肽基質親和性色層分析 (Smith, D.B., 等人, 1988) 進行分離。IFN蛋白質類之表現及部份純化見述於實施例 21, 且可應用於本發明所述序列編碼之可溶的, 被誘發的多肽。

不溶性 GST (sj26) 融合蛋白質類可經由製備性凝膠電泳作用加以純化。

或者, IFN τ 半乳糖苷酶融合蛋白質類可以見述於實施例 20 的方法進行單離。

本發明亦包括一表現載體, 如上述 lambda gt11 或 pGEX 載體, 其包含 IFN τ 編碼性序列及表現控制元件, 其使得編碼性區域於一合適的宿主中表現。控制元件基因確實包括一啟動子, 轉譯起始密碼子, 及轉譯及轉錄終止序列, 以及將嵌入物導入載體的插入位置。

編碼喜好之多肽的 DNA 可以被選殖進入任何載體 (討論

五、發明說明 (87)

如上)中以在合適的宿主系統中表現多肽。這些重組性多肽類可以融合蛋白質類形式或以天然蛋白質類形式表現。很多的特徵可以被工程置入表現載體中，如領導子序列，其可促進被表現的序列分泌至培養基中。重組性生產之IFN，及自其衍生的多肽類，典型上自被溶解的細胞或培養基中分離。純化可以經由本技藝習知的方法進行，其包括鹽分級純化，離子交換色層分析，及親和性色層分析。免疫親和性色層分析可以使用對抗經選擇之IFN τ 或雜合性(hybrid)干擾素抗原的抗體進行。

在另一方面，本發明包含特異性抗體，其直接對抗本發明之多肽。特別是，為了製備抗體，經一宿主動物，如一兔子，以被純化抗原或融合蛋白質抗原進行免疫。雜合性(hybrid)，或融合的蛋白質類可使用多種衍生自其他蛋白質類，如 β -半乳糖苷酶或穀胱甘肽-S-轉移酶之編碼性序列加以生產。宿主血清或血漿經過適當的時間間隔後收集，且此血清針對對抗抗原的抗體特異性進行試驗。實施例21描述生產兔子血清抗體的生產，其對在Sj26/hybIFN雜合性(hybrid)蛋白質中的hybIFN抗原具有特異性。這些技術可以應用於所有的hybIFN分子及自其所衍生的多肽類。

被免疫動物之gamma球蛋白部份或IgG抗體可以經由，例如，飽和的硫酸銨或DEAE Sephadex，或嫻於本技藝人士

五、發明說明 (85)

所習知用於生產多株抗體的其他技術。

或者，經純化的蛋白質或融合蛋白質可被用於生產單株抗體。來自以挑選的多肽抗原進行免疫的動物之脾臟或淋巴細胞被移出並使其不死化或經由嫻於本技藝人士所習知的方法製備融合瘤 (Harlow, 等人, 1988)。淋巴細胞可以來自周邊血液細胞中分離。Epstein-Barr 病毒 (EBV) 可用於不死化人類淋巴細胞或一融合協同者可用於生產融合瘤。

經由不死化細胞所分泌之抗體被篩選以決定分泌具喜好特異性的抗體的選殖株，例如，經由使用 ELISA 或西方 blot 方法 (Ausubel 等人, 1988)。支持本發明所進行之實驗已產製出四種融合瘤，其生產對羊 IFN γ 單株具特異性的抗體。

多肽類之抗原性區域通常相當小，典型上約 7 至 10 個胺基酸的長度。較小的片段已被確認為抗原性區域。干擾素 - γ 多肽抗原如前述加以確認。得到的 DNA 編碼性區域可以融合蛋白質類形式或被分離多肽類的形式被重組性表現。

另外，一些胺基酸序列可以方便地加以化學合成

五、發明說明 (86)

(Applied Biosystems, Foster City CA)。經由任何此類方法得到的抗原可直接用於抗體的生產或其可以偶合至合適的載體分子。許多此類載體在本技藝中為習知的且為商業化可得的 (例如, Pierce, Rockford IL)。

與 IFN τ 或雜合性 (hybrid) 干擾素具反應性的抗體有利於, 例如, 分析結構/功能的相關性。

VII. 用途

A. 生殖方面

雖然 IFN τ 和 IFN α 家族在結構和有效抗病毒的性質有相似性, IFN α 並無如 IFN τ 與生殖有關的性質。例如, 基因合成的人類 IFN α 和 IFN τ 比較起來, 並無控制發情間期的效用, 即使是施用兩倍的劑量 (Davis, 等人, 1992)。

因此, 雖然 IFN τ 和其他 IFN 在結構上有相似性, 其有著獨特的性質: 例如, 有明顯影響動情循環的能力。

本發明中的人類 IFN τ 成分可用以提升生殖能力及延長雌性哺乳類之黃體的壽命, 其見述於 Hansen, 等人, 1991), 其合併於本說明書中作為參考文獻。此外, 人類的 IFN τ

五、發明說明 (87)

可用於控制子宮及 / 或胎兒 - 胎盤組織的生長及發育。人類的 IFN τ 特別有利於治療人類, 因同種的蛋白質較不會引起潛在的抗原反應。

B. 抗病毒性特性

第 I 型干擾素表現良好的抗病毒性特性。IFN τ 之抗病毒活性有廣效的醫療應用而沒有經常和 IFN α 相關之毒性。雖然 IFN τ 存在於培養基可以抑制貓免疫缺陷病毒的反轉錄酶活性 (實施例 11), 但這並不是由於 IFN τ 直接對反轉錄酶的影響。反而是 IFN τ 顯然誘發宿主細胞生產對病毒的反轉錄酶具有抑制性的因子(們)。

IFN τ 以被發現可運用其對細胞無副作用的抗病毒活性: 沒有觀察到任何可將細胞毒性效果歸因於 IFN τ 施用的證據。這種缺乏毒性的特性, 使 IFN τ 在作為活體內治療劑上極具價值。缺少細胞毒性使 IFN τ 與大部份已知的抗病毒藥劑和所有其他干擾素有所區別。

包括含 IFN τ 之雜合性 (hybrid) 干擾素融合化合物的配方可以用於抑制病毒的複製。

雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽可用來影響胎兒及母

五、發明說明 (88)

體的免疫關係，例如，防止母體的病毒（如 HIV）傳遞到發育中的胎兒。人類 IFN τ 的成分對人類的治療特別有利，因同種的蛋白質較不會引起潛在的抗原反應。

C. 抗細胞性株落增殖特性

第 I 型之干擾素展現抗細胞株落增殖的良好活性。如本文所述之可用於抑制細胞的生長，且沒有和其他目前已知的有關干擾素之不良副作用。含有發明之雜合性 (hybrid) 干擾素化合物之配方可用來抑制，預防，或減緩瘤的成長。

此外，有些瘤的發生乃以動情激素為媒介。支持本發明而進行的實驗指出，IFN τ 可降低動情激素的接受器數目。因此，含 IFN τ 的組成物可特別有效地應用於治療或預防依賴動情激素的瘤。

D. 免疫系統紊亂

使用本發明的方法可以治療的疾病包括自體免疫，發炎，細胞增殖及超增殖，及免疫相關的疾病的皮膚症狀。本發明的方法，特別有利於治療免疫系統過敏相關的狀況。免疫系統過敏有 4 型 (Clayman, 1991)。第 I 型，或立即型 (immediate/anaphylactic) 過敏，乃肥大細胞在遇到過敏原

五、發明說明 (8f)

(例如花粉)時, 所引發的去顆粒作用所引起,其包括氣喘,過敏性鼻炎(稻草熱),蕁麻疹(hives),過敏性休克,及其他有過敏特性的疾病。第二型,或自體免疫過敏,乃肇因於抗體對抗自體細胞上的抗原所引起的。第三型過敏乃由於形成抗體/抗原複合體之堆積於不同的組織,且進一步活化免疫反應,其包括血清病,過敏性肺炎及偶或因施打疫苗後的水腫現象。第4型過敏乃由於致敏的T細胞釋放淋巴激素(lymphokine)所導致的發炎反應。實例包括接觸性皮膚炎,麻疹的出疹,及對某些藥的過敏反應。

導致一些個體過敏的某種狀況之機制, 一般而言尚不清楚,其可能有遺傳及外在的因素參與。例如,細菌,病毒,及藥物在啟動一遺傳上有自體免疫失調體質之個體的自體免疫反應方面,可能扮演某種角色。某幾型的過敏的同時發生,被推測其彼此間有所關聯。例如,某些患一般過敏的個體,被提出更易患自體免疫失調。

自體免疫失調可大略地被歸類成主要限於特殊器官及組織和可影響全身者。特別器官失調的例子(器官受影響者)包括多發性硬化(髓鞘質覆蓋神經的過程),第I型糖尿病,Hashimotos氏甲狀腺炎(甲狀腺),惡性貧血(胃),阿狄孫氏症(腎上腺),重症肌無力(神經肌肉接連處之乙醯膽胺接受器),風濕性關節炎(關節內層),葡萄膜炎(眼),牛皮癬(皮膚

五、發明說明 (P0)

),基聯-巴瑞氏症狀(神經細胞)及格芮氏(Grave's)甲狀腺腫(甲狀腺)。全身性自體免疫疾病包括系統性出血性狼瘡)及皮膚炎。

其他過敏性失調的例子,包括氣喘,出疹,異位性皮膚炎,接觸性皮膚炎,初疹性皮膚炎,皮脂性皮膚炎,鼻炎,扁平苔蘚,天皰瘡,大水泡性類天皰瘡,大泡性表皮鬆懈,血管水腫,脈管炎,紅斑,皮膚的嗜伊紅血球過多,簇狀禿髮,動脈硬化,初期膽汁性硬變及腎病變症候群。相關的疾病包括腸炎,如局部性迴腸炎,直腸炎,嗜伊紅血球過多胃腸炎,著色性蕁麻疹,炎性腸疾,克倫氏(Chrohn's)病,潰瘍性結腸炎,及食物性過敏。

用本發明方法治療特別有效之自體免疫疾病,包括多發性硬化,第I型(胰島素依賴性)糖尿病,紅斑性狼瘡,肌萎縮脊髓側索硬化,局部性迴腸炎,風濕性關節炎,胃炎,氣喘,葡萄膜炎,過敏,牛皮癬。

含有hybIFN的醫藥品可用於治療性處理並藉此減輕自體紊亂的症狀,如本文之前所述者。

E.干擾干擾素結合至受體

五、發明說明 (f1)

IFN τ 顯然與第 I 型之 IFN 受體經由分子上數個表位 (epitopes) 發生交互作用, 且這些區域區域或分別地或一起地達成 IFN τ 的不同功能。

本發明之多肽類有利於選擇性抑制干擾素結合至干擾素受體。如在本文中所特別描述的, 一些被揭示的肽類選擇性抑制 IFN τ 的抗病毒性活性, 然而其他卻抑制抗株落繁殖性活性。這些肽類的組合可用於抑制兩種活性。有利的是, 除了結合至干擾素受體及阻斷 IFN τ 活性, 這些肽類本身不會激發抗病毒性或抗株落繁殖性活性。

因此, 當希望防止由干擾素分子所誘發之免疫反應時, 此類多肽可被用於作為免疫調節性分子。這些肽類能被用於作為免疫抑制劑以防止, 例如, 對於組織移植之干擾素-媒介之免疫反應。其他種類之干擾素媒介之反應亦可被阻斷, 如 alpha 干擾素的細胞毒性效果。

F. 醫藥組成物

本發明之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽類可以根據已知的方法來調製以製備醫藥上有利的組成物。含干擾素或類干擾素化合物的配方已被描述 (例如, Martin, 1976)。一般而言, 本發明之組成物將被調製, 使得有效量的雜合性

五、發明說明 (f-)

(hybrid)干擾素與適當的載劑聯合以利於組成物之有效施用。

用於這些治療的組成物類亦可為多樣化的形式。這些形式包括，例如，固體，半-固體，及液體劑量形式，如錠劑，藥丸，藥粉，液體溶液或懸浮液，微脂體，栓劑，可注射的，及可輸入的溶液。偏好的形式視意欲的施用模式及治療應用而定。這些組成物亦偏好地包括傳統上醫藥上可接受的載劑及佐劑，其已為嫻於此技藝者所熟知。偏好的是，本發明之組成物為單位劑量的形式且通常一天施用至病人一次或多次。

雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽類或相關的多肽類，可以任何醫藥上可接受的劑量形式施用於病人，包括口服，吸入，鼻腔內噴灑，腹腔內施用，靜脈內施用，肌肉內施用，傷口內施用或皮下注射。特別是，用於其他干擾素化合物之組成物及方法可用於傳送這些化合物類。

本發明之化合物類的最初優點為 IFN γ 蛋白質類之極低的細胞毒殺性。由於此低細胞毒殺性，有可能以大於通常其他干擾素 (例如，IFN α) 化合物類所使用的濃度去施用雜合性 (hybrid) 干擾素組成物類。因此，可以想得到的是本發明之雜合性 (hybrid) 干擾素組成物可以施用的比率自約 5×10

五、發明說明 (13)

⁴ 至 20×10^6 單位/天至約 500×10^6 單位/天或更多。在一偏好的具體事實中,劑量約為 20×10^6 單位/天。高劑量偏好用於全身性施用。當然,應瞭解的是本發明之組成物及方法可與其他治療方法聯用。

一旦病人的情況得到改善,可依需要施用維持劑量。接下來,施用劑量或頻率,或兩者同時,可以降低至可維持改良情況的水平,其為症狀之函數。當症狀減輕至喜好的水平,治療應停止。然而病人可能需要在疾病症狀復發時進行基於長時間的間歇性治療。

本發明之組成物可以經由標準步驟施用來治療多樣化的癌症及病毒性疾病,其包括先前以其他干擾素治療顯現活性者。參見,例如, Finter, 等人, 1991; Dianzani, 1991; Francis, 等人, 1992, 及 U.S. 專利 Nos. 4,885,166 及 4,975,276。然而,如上所述,本發明之組成物具有特有的特徵及優點,包括其治療這些情況而不具毒性的能力。

G. 皮膚紊亂的治療

皮膚紊亂可以使用本發明之雜合性(hybrid)干擾素進行創傷內施用,其中配方及劑量將視施用方法及待治療之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (14)

創傷的大小及嚴重性而定。偏好的方法包括皮膚內及皮下注射。亦有可能對大的創傷進行多次注射，且單一病人的皮膚上多個創傷可以一次治療。施用的計劃表可為嫻於本技藝者加以決定。針對持續釋出所設計之配方可以降低施用的頻率。

H. 全身性治療

全身性治療基本上在各種應用當中是一樣的。有可能為靜脈內，皮下及/或肌肉內劑型，且在治療方法為可植入時，針對持續釋出所設計之配方為特別有利的。病人亦可使用可植入的皮下導管，貯藥器，或泵加以治療。

I. 局部治療

以本發明之雜合性(hybrid)干擾素融合多肽類進行的局部治療有利於治療在特異性器官中的癌症。治療可以經由動脈內輸入完成。插管可以手術方式或動脈攝影術植入去直接治療受影響的器官。皮下通道，與插管連接，可用於慢性治療，或可使用可植入的，可填充式泵。

以下的實施例乃用以說明，而非限制本發明。

五、發明說明 (95)

材料與方法

限制內核酶，T4 DNA 黏接酶，T4 聚核苷酸激酶，Taq DNA 聚合酶，及牛小腸去磷酸酶係購自 New England Biolabs (Beverly, MA) 或 Promega Biotech (Madison, WI)：這些反應劑根據製造商的指示進行使用。針對定序反應，使用 "SEQUENASE DNA II" 定序組套 (United States Biochemical Corporation, Cleveland OH)。免疫移漬法及其他反應劑係來自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) 或 Fisher Scientific (Needham, MA)。硝基纖維濾膜得自 Schleicher and Schuell (Keene, NH)。

合成性寡核苷酸連接子及引子使用商業化可得的自動化寡核苷酸合成儀 (例如，ABI 型之 380B-02 DNA 合成儀 (Applied Biosystems, Foster City, CA))。或者，慣用的經設計合成性寡核苷酸可以購自，例如，Synthetic Genetics (San Diego, CA)。cDNA 合成組套及不規則預示 (priming) 標定套組係得自 Boehringer-Mannheim Biochemical (BMB, Indianapolis, IN)。

編碼肽類之寡核苷酸序列或可直接經由寡核苷酸合成的標準方法加以合成，或在編碼性序列很大的情形下，經由一系列之選殖性步驟加以合成，這些步驟涉及相關於編碼

五、發明說明 (96)

性序列之多重寡核苷酸片段之縱向排列 (tandem array) (Crea, 1989; Yoshio, 等人, 1989; Eaton, 等人, 1988)。寡核苷酸編碼性序列可以標準重組性步驟 (Maniatis 等人, 1982; Ausubel 等人, 1988) 加以表現。或者, 肽類可直接經由標準活體外技術 (Applied Biosystems, Foster City CA) 直接合成。

重組性人類 $IFN\alpha$ (Hu $IFN\alpha$) 及 rBo $IFN\gamma$ 得自 Genentech Inc. (South San Francisco, CA)。重組性人類 $IFN\alpha$ (rHu $IFN\alpha$) 之參考製備得自國家衛生院: rHu $IFN\alpha$ 可商業上得自 Lee Biomolecular (San Diego, CA)。經純化之重組性人類 $IFN\alpha A$ (2×10^8 單位/毫克) 得自 Biosource International (Camarillo, CA)。除非另有指示, 蛋白質濃度使用 bicinchoninic 酸試驗組套 (Pierce, Rockford IL) 根據廠商的指示進行決定。

有關多株及單株抗體工作之一般操作程序, 包括抗體自血清中純化, 係經由標準步驟 (Harlow, 等人, 1988) 進行。Pierce (Rockford, IL) 為許多抗體反應劑的來源。

對 Tyk2, Stat1 α , 及 Stat2 具特異性之親和性-純化的兔子抗肽抗體購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。單株抗磷酸酪胺酸抗體 (4G10) 得自 Upstate

五、發明說明 (99)

Biotechnology (Lake Placid, NY)。西方移漬法使用促進性化學冷光 (ECL) 偵測組套 (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) 顯色。

牛腎細胞系 MDBK 及人類博基氏 (Burkitt's) 淋巴瘤細胞系 Daudi 係得自美國標準菌種中心 (ATCC; Rockville, MD)。Daudi 細胞在添加 20% 胎牛血清及抗生素之 RPMI 1640 培養基 (Gibco/BRL Gaithersburg, MD) 中生長。MDBK 細胞在添加 10% 馬血清及抗生素之伊格氏 (Eagle's) 最低基本培養基 (EMEM) (Gibco/BRL) 中生長。在此研究中所有組織培養基，血清及 IFN 對內毒素均為陰性，其以使用釐阿米巴細胞溶解物的試驗 (Associates of Cape Cod, Woods Hole, MA) 於 0.07 微毫克/毫升的靈敏度下進行。

一般用 ELISA 測抗體的方法

96 孔的聚苯乙烯盤 Immulon II (PGC)，覆以 5 微克/毫升溶於 0.1 mM 碳酸鹽/碳酸氫鹽的抗原 (每孔 100 微克)，pH 9.5。此盤乃以石蠟膜封起來，於 4°C 下過夜。

96 孔培養皿乃予以抽氣及覆蓋 300 毫升之 10% 的 NG S 並置於 37°C 下一個鐘頭。

五、發明說明 (98)

96孔培養皿乃以PBS 0.5% "Tween"來清洗5次。

抗血清以0.1M, pH 7.2的PBS來稀釋。所要的血清稀釋濃度(0.1mM)乃加於每一孔,並於37°C置於盤內一小時。96孔培養皿以PBS 0.5% "Tween"來清洗5次。

接合羊抗人類抗血清之馬蘿蔔過氧化氫酵素(HRP)(Cappel, Durham, NC)用0.1M, pH7.2的PBS來稀釋至1/5000倍。每個孔加入該受質0.1毫升。將96孔培養皿置於37°C下30分鐘,然後以PBS清洗5次。

Sigma ABTS(受質)在加入96孔培養皿之前才製備。

反應劑含有50毫升之0.05M的檸檬酸, pH4.2, 0.078毫升之30%過氧化氫溶液及15毫克之ABTS。0.1毫升的受質加入每一個孔後,置於室溫下30分鐘。反應以0.05毫升之5%的SDS(w/v)來終止。相對的吸收度於410微米波長下測量。

實施例 1

IFN γ 之生殖性功能

五、發明說明 (Pf)

對干擾素- τ 對於黃體的影響進行檢查。IFN τ 以表1中的濃度被輸入牝羊的子宮腔中。重組性人類IFN α (rHuIFN α) 以類似的濃度輸入。另外,使用接受對照蛋白質類對照組動物。黃體的壽命經由檢查發情期間隔(interestrus)期間,助孕酮分泌的維持,及前列腺素分泌的抑制進行分析(Davis,等人,1992)。

表 1

干擾素對生殖性生理的影響

干擾素	處理	發情期間隔期間(天數) (平均)
對照組	-	17.3
rHuIFN α	100 微克/天	16.0
	200 微克/天	16.0
	2000微克/天	19.0

-102-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (續)

0vIFN τ	100 微克/天	27.2
--------------	----------	------

比較對照組動物及接受 0vIFN τ 的動物之發情期間隔，當 IFN τ 以 100 微克/天進行施用時，顯示期間有相當之延長。另一方面，比較對照組動物及接受重組性人類 IFN α 的動物之發情期間隔，顯示 rHuIFN α 沒有任何有意義的效果。

這些結果顯示干擾素 - τ 具有明顯影響生殖性周期之生化事件的能力。

實施例 2

干擾素 - τ 在生殖性周期之不同狀態的抗病毒活性

胚體 (conceptus) 培養物使用得自綿羊發情期第 12 至 16 天的胚體 (conceptus) 建立。對來自每個胚體 (conceptus) 培養物之上清液的抗病毒活性，使用細胞病變影響試驗 (Familetti, 等人, 1981) 進行試驗。簡而言之，IFN τ 或其他 IFN 的稀釋液與 Madin-Darby 牛腎 (MDBK) 細胞於 37°C 培育 16-18 小時。培育之後，病毒複製之抑制於一細胞病變性影

五、發明說明 (10/)

響試驗中使用水泡性口腔炎 (vesicular stomatitis) 病毒 (VSV) 作為挑戰病毒 (Armstrong, 1981) 而加以決定。

一個抗病毒性單位引起單層細胞的破壞降低 50%，其標準係相對於未加處理之受到 VSV 侵犯的 MDBK 細胞 (對照組盤)。特異性活性使用正常的羊纖維母細胞 (Shnf) 於一病毒斑抑制試驗 (Langford, 等人, 1981) 中進行評估。每一時間至少檢驗三個檢體，且每個檢體檢驗三次。示於表 2 的結果以平均單位 / 毫升表示。

表 2

胚體培養物及尿膜及羊膜液之 IFN γ 抗病毒性活性

	天數	檢體	單位 / 毫升
胚體培養物	10	9	< 3
	12	5	34
	13	6	4.5 x 10 ³

五、發明說明 (102)

	14	3	7.7×10^3
	16	12	2.0×10^6
尿膜液	60	3	1.4×10^3
	100	4	11
	140	3	<3
羊膜液	60	3	22
	100	4	<3

培養物上清液具有與胚體進而發育有關之增強抗病毒性活性(表2)。

實施例 3

OvIFN τ 之胺基酸編碼性序列 (Imakawa, 等人, 1987) 被用於產生相關之 DNA 編碼性序列, 其使用在大腸桿菌中表現之最佳的密碼子使用方式。連接子序列被加入 5' 及 3' 端以

五、發明說明 (103)

幫助在細菌性表現載體中選殖。該核苷酸序列被設計成包括 19 個獨特的限制酶位置，其平均間隔分佈於編碼序列中（圖 1A 及 1B）。

核苷酸序列被分成十一個寡核苷酸片段，其大小範圍自 33 至 75 個鹽基。十一個寡核苷酸中每一個於 380-B 2-管柱 DNA 合成儀（Applied Biosystems）中合成並以單股或雙股形式選殖進入下列載體之中：“pBLUESCRIPT+(KS)”（Strata gene, LaJolla, CA），pTZ18R（Pharmacia, Piscataway, NJ），或 pTZ19R（Pharmacia, Piscataway, NJ）選殖性載體。

載體被轉形進入大腸桿菌 K. 菌株 “XL1-BLUE”（*recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 (r κ ⁻, m κ ⁺) supE44 relA1 λ ⁻ (lac), {F', proAB, lacqZ Δ M15, Tn10(tet-R)}），其可於商業上得自 Stratagene (La Jolla, CA)。被轉形的細胞生長於添加安比西林（50 微克/毫升）之 L 培養液中。寡核苷酸的選殖及融合使用標準重組 DNA 技術進行。*

選殖載體以合適的限制酶進行切割以插入合成性寡核苷酸。載體以牛小腸鹼性去磷酸酶（CIP）加以處理以去除末端的磷酸基團。寡核苷酸被磷酸化且以單股或雙股分子形式使用 T4 DNA 黏接酶選殖進入合適的載體。當單股被導

五、發明說明 (104)

入選殖載體中，第二股在轉染之後由細菌性宿主完成。

就雙股性選殖而言，寡核苷酸首先與其合成性互補股黏合，且隨後黏接至選殖載體。E. coli K12 菌株 SB221 或 NM522 隨後以黏接反應物進行轉形。當有關甲基作用-敏感性 *StuI* 及 *ClaI* 限制位置時，大腸桿菌菌株 GM109 被用於選殖。限制酶分析在每一個選殖步驟針對純化的 DNA 進行分析。

被選殖的寡核苷酸使用圖 2 所列示之限制酶切割及黏接反應被融合至單股聚核苷酸。含寡核苷酸的 DNA 片段典型上經過在低熔點瓊脂糖凝膠上電泳性大小分級後進行分離 (Maniatis, 等人, 1982; Sambrook, 等人, 1989; Ausubel, 等人, 1988)。得到的 IFN γ 聚核苷酸編碼性序列至位置 16 至 531：其為 172 個胺基酸之編碼性序列。

最終聚核苷酸之核苷酸序列經由 DNA 定序使用二去氧鏈終止法加以確認。

全長 *StuI*/*SstI* 片段 (540 bp; 圖 2) 被選殖進入一經修鄭的 pIN III omp-A 表現載體中且被轉形進入勝任性大腸桿菌之 SB221 菌株。為了表現 IFN γ 蛋白質，攜帶表現載體的細胞於含安比西林之 L-培養液中生長至 OD (550 微

五、發明說明 (105)

毫米) 為 0.1-1, 其以 IPTG 誘發 3小時並經由離心收集細胞。可溶性重組性 IFN τ 自細胞中經由音波震盪或滲透性分離而釋出。

實施例 4

在酵母菌中表現 IFN τ

根據實施例 3 合成之合成性 IFN τ 基因, 其兩側在 5' 端為 *Stu*I 限制酶位置且在 3' 端為 *Sac*I 限制酶位置。

A. 合成性 IFN τ 基因的分離

兩個寡核苷酸引子 (SEQ ID NO:13 及 SEQ ID NO:14) 被用於於聚合酶鏈反應中將連接子連接至合成性 IFN τ 基因。在 5' 端的連接子使得合成性 IFN τ 基因被放置於可正確地與在酵母菌選殖性載體 pBS24Ub (Chiron Corp., Emeryville, CA) 中的汎醜素 (ubiquitin) 編碼性序列一起讀出的位置。該連接子亦構築一個汎醜素 (ubiquitin)-IFN τ 接合區域, 其使得汎醜素 (ubiquitin) 序列在活體內自 IFN τ 序列切除。5' 寡核苷酸亦編碼 *Sac*II 限制內核酶切割位置。3' 寡核苷酸包含一 *Stu*I 切割位置。

五、發明說明 (06)

攜帶合成性 IFN τ 基因的載體 (實施例 3) 自大腸桿菌菌株 "XLI-BLUE" 中經由鹼性溶解方法進行純化。被分離的載體在 10 mM Tris, pH 8.0/1 mM EDTA/10 mM NaCl 中被稀釋 50 倍。PCR 反應以 100 微升體積使用 Taq DNA 聚合酶及引子 SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 14 進行。被增幅的片段以 StuI 及 SacII 進行切割。這些被切割的片段被黏接至 "pBLUESCRIPT +(KS)" 之 SacII 及 SmaI 位置。

得到的質體被命名為 pBSY-IFN τ 。DNA 序列使用雙股 DNA 作為模版進行增幅。

B. 表現質體的構築

質體 pBSY-IFN τ 以 SacII 及 EcoRV 進行切割且分離出含有合成性 IFN τ 基因的片段。酵母菌表現載體 pBS24Ub (Sabin, 等人, 1989; Ecker, 等人, 1989) 以 SalI 進行切割。鈍端使用 T4DNA 聚合酶產生。載體 DNA 以酚進行萃取並以乙醇進行沉澱 (Sambrook, 等人, 1989)。被回收的直線化質體以 SacII 進行切割, 經由瓊脂糖凝膠電泳作用加以純化, 並黏接至自 pBSY-IFN τ 單離之 SacII-EcoRV 片段。得到的重組性質體被命名為 pBS24Ub-IFN τ 。

重組性質體 pBS24Ub-IFN τ 被轉形導入大腸桿菌中。

五、發明說明 (107)

含有 IFN τ 嵌入物之重組性選殖株被分離且經由限制酵素分析加以確認。來自含有 IFN τ 編碼性序列之選殖株之質體 DNA 被用於啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 之轉形作用 (Rothstein, 1986)。轉形作用混合物被植於尿嘧啶缺少的培養基中且於 30°C 進行培養 3-5 天。將菌落劃於培養皿上且維持於尿嘧啶及白胺酸缺少的培養基中 (Rothstein, 1986)。

C. 表現試驗

就小規模表現而言，將單一啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) AB116 含有 pBS24Ub-IFN τ 的株落自白胺酸及尿嘧啶缺少的盤中挑出並使其於 30°C 在 YEP 培養基 (1% 酵母菌萃取物, 2% 朊, 其於引發性條件時含 1% 葡萄糖, 於非引發性條件下含 8% 葡萄糖) 中生長。收集細胞溶解物並於 15% 丙烯醯胺, 0.4% 雙丙烯醯胺進行 SDS-PAGE (Sambrook, 等人, 1989)。被分離之蛋白質類經由考馬氏 (Coomassie) 藍染色進行觀察。

重組性 IFN τ 經由免疫移漬法進行觀察, 該免疫移漬法在將離析的細胞萃取物電轉移至 "NYTRAN" 濾紙上時, 使用對抗羊 IFN τ 的單株抗體或多株抗血清 (Rothstein, 1986)。

五、發明說明 (108)

就大規模表現而言，pBS24-IFN τ 於 30°C 在含有 8% 葡萄糖之 5 x 尿嘧啶及白胺酸缺少的培養基中生長 24 小時。此培養物在含有 1% 葡萄糖之 YEP 培養基稀釋 20 倍且進一步培育 24-36 小時。

細胞經由離心加以收集，於 50 mM Tris, pH 7.6, /1 mM EDTA 中清洗且再懸浮於含有 1 mM PMSF 的清洗緩衝液。細胞使用小珠撞擊儀器 (Biospec Products, Bartlesville, OK) 進行溶解。溶解物於 43,000 x g 進行離心 20 分鐘。將上清液部份回收並進行下述的純化程序。

D.roIFN τ 自酵母菌細胞溶解物中純化

上清液部份被裝於 1 x 10 公分之 DEAE 管柱中且以 10 mM Tris, pH 8.0 加以清洗。被滯留的蛋白質類以 300 毫升，在 10 mM Tris 中 0 至 0.5 M NaCl 梯度，pH 8.0 的溶液加以洗提。收集 3 毫升之分管溶液。分管 17-26 含有重組物 (roIFN τ) 之十微升樣本們於 15% 之 SDS-聚丙烯醯胺凝膠上進行電泳分離。凝膠以考馬氏 (Coomassie) 藍進行染色。分管 18, 19, 及 20 含有最大量之 roIFN τ 。這些分管液個別裝於 1.5 x 90 公分 Sephadex S-200 管柱上且蛋白

五、發明說明 (10)

質類被解析為兩個波峰。

每個蛋白質波峰(25微升)之少量於15%SDS-聚丙烯醯胺凝膠上進行電泳分離且蛋白質類以考馬氏(Coomassie)染色進行觀察。

被純化之含roIFN τ 的分管液進行匯合且roIFN τ 的份量經由放射性免疫試驗(Vallet.等人, 1988)進行決定。總蛋白質的濃度經由Lowry蛋白質試驗(Lowry, 等人, 1951)加以決定。

被純化的roIFN τ 之微定序顯示與天然IFN τ 在前15個胺基酸為相同的,確定汎醜素(ubiquitin)/roIFN τ 融合蛋白質在活體內被正確加工。

被純化的roIFN τ 顯示每毫克蛋白質具2至3 x 10⁸單位之抗病毒活性(n = 3份複製盤),其類似於自胚體(conceptus)-制約性培養基所純化之IFN τ 之抗病毒性活性(2 x 10⁸ U/毫克)。

實施例 5

人類高分子量DNA之Southern氏移漬法分析

五、發明說明 (1/10)

來自健康捐血者的人類靜脈血液檢體被收集於肝素處理之試管中且周邊血液淋巴細胞經由密度-梯度離心使用 Ficoll-Isopaque 梯度 (1.077 公克/毫升) (Sigma Chemical Co.) 進行分離。高分子量 (HMW) 的 DNA 自這些細胞 (Sambrook, 等人, 1989) 中分離。

HMW DNA 之兩個 10 微克之檢體以限制內核酶 HindIII 或 PstI (Promega) 於 37°C 進行切割 2 小時，並將 DNA 片段在 0.8% 瓊脂糖凝膠 (Bio-Rad, Richmond, CA) 中以 75 伏特進行電泳分離 8 小時。這些 DNA 片段被轉移至一尼龍膜 (IBI-International Biotechnologies, Inc., New Haven, CT) 上。膜於 80°C 進行烘烤 2 小時且於 42°C 在下述前雜交溶液中進行培育 4 小時：5 x SSC (1 x SSC 為 0.15 M NaCl 及 0.15 M 檸檬酸鈉)，50% vol/vol 之甲醯胺，0.6% (wt/vol) SDS，0.5% (wt/vol) 脫脂奶粉，20 mM Tris-HCl (pH 7.5)，4 mM EDTA，及 0.5 毫克/毫升單股鱈魚精子 DNA (Promega)。

該濾膜隨後於一雜交作用溶液 (5 x SSC, 20% vol/vol 甲醯胺，0.6% (wt/vol) SDS, 0.5% (wt/vol) 脫脂奶粉，20 mM Tris-HCl (pH 7.5)，4 mM EDTA，及 2×10^8 cpm/毫升 32 P-標定的 OvIFN γ cDNA (Imakawa, 等

五、發明說明 (//)

人, 1987) 於 42°C 進行培育 18 小時。濾膜於 42°C 以 2 x SSC 及 0.1% (wt/vol) SDS 加以清洗並於 -80°C 在一加強幕的存在下曝光於 X-ray 底片 (XAR, Eastman Kodak Rochester, NY) 48 小時。

自動放射攝影在以 PstI 切割之約 3.4 kb DNA 及在以 PstI 切割之 DNA 之較小的 (約 3.0 kb) 片段偵測到雜交作用訊號。這些結果指出人類 DNA 序列中存在互補於 OvIFN τ cDNA 探針的序列。

實施例 6

經由 PCR 分離人類 IFN τ cDNA 之部份序列

兩個合成性寡核苷酸 (每個為 25-元體) 被合成, 其相關於 OvIFN τ cDNA (編號根據 cap 位置, Imakawa, 等人, 1987) DNA 序列之核苷酸自 231 至 255 (內含於 SEQ ID NO: 13) 及 566 至 590 (內含於 SEQ ID NO: 14)。這些引子分別含有限制內核酶 PstI 及 EcoRI 的切割位置。SEQ ID NO: 13 被修飾成為含有 EcoRI 位置, 其始於位置 569。

DNA 從下列兩個 cDNA 基因庫之約 1×10^5 病毒斑形成單位 (pfu): 人類懷孕終期 (term) 胎盤 (Clontech,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (//2)

Inc., Palo Alto, CA) 及人類懷孕終期 (term) 滋胚內質母細胞 (cytotrophoblast) (Dr. J.F. Strauss, University of Pennsylvania, Philadelphia PA) 中分離出來。此 DNA 被用於聚合酶鏈反應 (PCR) 增幅作用 (Mullis, 1987; Mullis, 等人, 1987; Perkin Elmer Cetus Corp. Norwalk CT)。增幅反應使用引子 SEQ ID NO:13/SEQ ID NO:14進行 30個周期 (45°C, 1m; 72°C, 2m; 94°C, 1m) (加熱周期儀器及反應劑, Perkin Elmer Cetus)。

增幅反應產物被電泳分離 (100 伏特, 於一 1.5%瓊脂糖凝膠上 (Bio-Rad)) 並轉移至一尼龍膜 (IBI)上。該膜於 80°C 烘烤 2小時並如前述進行前雜交作用, 且以 ^{32}P -標定的 $0\text{vIFN}\alpha$ cDNA。該膜以 5 x SSC/0.1% (wt/vol) SDS 於 42°C 進行清洗 5 分鐘並於 2 x SSC/0.1% (wt/vol) SDS 內於 42°C 進行清洗 2 分鐘。其隨後於一加強幕的存在下在 -80°C 曝光於 "XAR" (Eastman Kodak) X-ray 底片達 24 小時。偵測到可與被標定的探針 DNA 產物進行雜交的增幅產物。

PCR 以上述方式進行。被增幅的產物以限制內核酶 EcoRI and PstI (Promega) 於 37°C 切割 90分鐘。得到的 DNA 片段以上述方式進行電泳分離且含有 $1\text{FN}\alpha$ 增幅產物的

五、發明說明 (113)

條帶自凝膠上裁下。DNA 片段經由電提作用 (electroelution) 回收，被次選殖進入 EcoRI/PstI 切割的 - 去磷酸化質體 pUC19 並使用氯化鈣方法 (Sambrook, 等人., 1989) 轉形進入大腸桿菌菌株 JM 101 (Promega)。質體被分離且被嵌入的增幅產物使用二去氧終止法 (Sanger, 等人., 1977; "SEQUENASE" reactions, United States Biochemical, Cleveland, OH) 進行定序。核苷酸序列被決定後與其他 IFN 序列之被推估的胺基酸序列使用 "DNA STAR SOFTWARE" (Madison, WI) 進行比較。

這選殖株的序列的比較顯示下列四種相異的選殖株：來自人類胎盤基因庫，HuIFN γ 6 (299 bp), HuIFN γ 7 (288 bp) 及 HuIFN γ 4 (307 bp)，其於其核苷酸序列表現 95% 之一致性；來自滋胚內質母細胞 (cytotrophoblast) 基因庫的選殖株 CTB 35 (HuIFN γ 5; 294 鹽基對)，其分別與 HuIFN γ 6 及 HuIFN γ 4 具有 95% 及 98% 的一致性。

實施例 7

全長人類 IFN γ 基因的分離

十毫克之 PBMC HMW DNA 以限制內核酶 EcoRI 於一 0.8 % 瓊脂糖凝膠進行切割並進行電泳性分析。含有 DNA 片

五、發明說明 (114)

段-大小為 1.5 至 10 kb 一系列樣本(例如 : 1.5 至 2.5 kb, 2.5 kb 至 3 kb)自凝膠上裁下。DNA被電提及純化。每個 DNA 樣本以前述方法使用 the OvIFN τ 引子進行增幅。任何樣本的DNA分子只要產生陽性 PCR 訊號就玄加以選殖進入 λ gt11 (次基因體性 λ gt11 基因庫)。

A. 含有互補於 OvIFN τ 序列之選殖株之PCR確認

λ gt11 噬菌體隨後種於盤中以形成斑且斑-取出雜交反應使用 32 P-標定的 OvIFN τ cDNA探針進行。約 20 個選殖株被確認與探針進行雜交反應。

與探針發生雜交反應的斑進一步經由 PCR使用上述的 OvIFN τ 引子進行確認。產生陽性PCR訊號之六個斑被純化。來自這些選殖株之噬菌體DNA被分離且以 EcoRI 限制內核醯進行切割。DNA 嵌入物被次選殖於 pUC19 載體中且其核苷序列經由二去氧核苷定序方法加以決定。

B. 含有互補於 PCR-陽性噬菌體之序列的選殖株之雜交作用確認

來自 λ gt 11之次基因體性基因庫之重組性噬菌體於大腸桿菌 Y 1080 中傳佈且與大腸桿菌 Y1090 以約 20,000

五、發明說明 (115)

斑 /150 毫米盤的密度植於盤中。盤以兩份硝基纖維濾膜覆蓋，其與來自如上所述六個人類 IFN τ cDNA 選殖株之一的 32 P-標定的探針進行雜交反應。

得到陽性雜交作用訊號之選殖株進一步加以篩選及純化。來自雜合交反應-陽性選殖株之噬菌體 DNA 被分離，以 EcoRI 進行切割，次選殖進入 pUC19 載體並加以定序。序列的資料隨後被分析。

1. HuIFN τ 1

三個選殖株產生重疊的序列資料超過 800 個鹽基，其相對於 mRNA cap 位置（選殖株從兩個方向定序）。匯整的核酸序列資料示於 SEQ ID NO: 11 且經預測的蛋白質編碼性序列示於 SEQ ID NO: 12。此基因之經預測的成熟的蛋白質序列 (SEQ ID NO: 12) 與 OvIFN τ 之經預測的蛋白質序列的比較示於圖 3。

2. HuIFN τ 2, HuIFN τ 3

得到陽性雜交作用訊號 (HuIFN τ 2 及 HuIFN τ 3) 之兩個額外的選殖株被篩選，純化，且噬菌體 DNA 以上述方式進行次選殖及定序。這兩個選殖株的序列示於圖 19A

五、發明說明(116)

及 19B。如圖 19A 及 19B 所瞭解的，兩個選殖株 (HuIFN τ 2 及 HuIFN τ 3) 之核苷酸序列類似於 HuIFN τ 1 及 OvIFN τ 。

HuIFN τ 2 (SEQ ID NO:29)，可為一偽-基因，因為其顯然在位置 115-117 包含終止密碼子。該序列 SEQ ID NO:29 顯示沒有領導子序列。領導子序列示於圖 20A。如在圖 20A 之 HuIFN τ 2 所示，出現於成熟的 HuIFN τ 1 之第一個胺基酸 (一 CYS 殘基) 並沒有出現於 HuIFN τ 2 序列中。據此，示於 SEQ ID NO.29 之經預測的胺基酸序列相關於沒有第一個 CYS 殘基及內部終止密碼子之成熟的 IFN τ 蛋白質。

在核酸編碼性序列中的內部終止密碼子之修正可以經由標準的方法以一胺基酸密碼子，例如，編碼 GLN 者來取代終止密碼子。胺基酸 GLN 出現其他人類 IFN τ (HuIFN τ) 之分離株的此位置。若十分需要，標準的重組性操作亦允許導入 CYS 殘基。

HuIFN τ 3 (SEQ ID NO:31) 顯然編碼一人類 IFN τ 蛋白質。整個蛋白質之被轉譯的胺基酸序列，包括領導子序列，示於 SEQ ID NO:32。成熟的蛋白質之被轉譯的胺基酸序列示於 SEQ ID NO:34。

五、發明說明 (117)

實施例 8

HuIFN γ mRNA 經由 RT-PCR 進行分析

人類胎盤 cDNA 基因庫及羊 cDNA 基因庫，其自第 15-16 天之胚膜 (conceptuses) 構築，以上述方式經由與 OvIFN γ cDNA 探針進行雜交作用加以分析。cDNA 於瓊脂糖凝膠上依大小分離並轉移至濾膜上 (Maniatis, 等人, 1982; Sambrook, 等人, 1989)。以 OvIFN γ 探針進行的 Southern 移漬分析顯示來自人類 cDNA 基因庫的自動放射攝影訊號約為使用 OvIFN γ cDNA 基因庫所得訊號之 1/100。

HuIFN γ mRNA 在人類懷孕終期 (term) 胎盤及羊膜細胞 (26 周, 2 百萬個細胞) 的存在使用反轉錄酶 -PCR (RT-PCR) 方法 (Clontech Laboratorie, Palo Alto, CA) 進行分析。

自人類胎盤, 羊膜細胞及羊胚體 (conceptuses) 分離之總細胞性 RNA (tcRNA) 使用引子 SEQ ID NO: 14 進行逆轉錄。引子 SEQ ID NO: 13 隨後被加入反應混合物中且聚合酶鏈反應進行 40 個周期。PCR 產物於瓊脂糖凝膠上依大小分離並轉移至濾膜上。在濾膜上的 DNA 與 ^{32}P -標定的

五、發明說明 (118)

OvIFN τ 及 HuIFN τ cDNAs進行雜交。這些分析的結果顯示人類 IFN τ mRNA 存在於胎兒-胎盤繫屬物中。羊膜細胞亦表現相關於 OvIFN τ 引子及人類探針的訊息。

另外，對 HuIFN τ 進行之 RT-PCR 分析被應用於單離自成人淋巴細胞之 tcrRNA。密度測量分析顯示 IFN τ mRNA 存在於淋巴細胞中。

實施例 9

原位 (in situ) 雜交作用

A. 組織

來自四個健康的，相異的期間及前三個月之人類胎盤之 semiserial 5- μ 石蠟包埋切片的玻片進進行檢驗。

B. cRNA 探針的製備

來自由 OvIFN τ 被增幅的基因庫所分離的 cDNA 選殖株，相關於 OvIFN τ cDNA 鹽基 #77-736 (鹽基 #1為 cap 位置；OvIFN τ cDNA 之開放譯讀序列為鹽基 #81-665；圖 7) 的一片段被次選殖進入轉錄作用載體，pBS (New

五、發明說明 (119)

England Biolabs)。數個 pBS 選殖株被分離，進行次選殖，並將其核苷酸進行定序。在此選殖株中，一 3' 片段（鹽基 #425-736）使用限制內核酶 NlaIV 及 EcoRI 剪下並次選殖進入轉錄作用載體 pBS。此載體被命名為 pBS/0vIFN τ 。

將 pBS/0vIFN τ 質體切成線狀後，經由活體外轉錄作用使用 T7 RNA 聚合酶 (Stratagene) 合成反義 cRNA 探針 (Sambrook, 等人, 1989)。微量的 ³H-CTP (NEN-DuPont, Cambridge, MA) 被用於轉錄反應。以 digoxigenin (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) 進行標定的 dUTP 被併入 cRNA 中且產率經由 TCA 沉澱作用及閃爍計數進行估計。

C 雜交作用

原位 (in situ) 雜交作用使用反義 RNA 探針進行，其為 Lawrence, 等人 (1985) 的方式而具有下列修正處。去石蠟及水化的切片於室溫下在含有 5 mM MgCl₂ 之磷酸鹽緩衝性食鹽水 (PBS) 中進行前雜交作用 10 分鐘。在切片中的核酸於 65°C 在 50% 甲醯胺 / 2 x SSC 中進行進行變性 10 分鐘。切片隨後於 37°C 與含有 0.3 微克 / 毫升之 digoxigenin-標定的 cRNA 探針之雜交作用雞尾酒 (30 微

五、發明說明 (120)

升/玻片) 培育一整夜且在 37°C 於 50 甲醯胺 / 1 x SSC 中進行清洗 30 分鐘。最後的清洗在室溫下於 1x SSC 及 0.1 x SSC 中進行 30 分鐘。切片以 0.5% Triton X-100 (Sigma) 及 0.5% 脫脂奶粉進行阻斷 30 分鐘。

雜交作用訊號使用與鹼性去磷酸酶 (Boehringer-Mannheim) 接合的純化的綿羊抗 digoxigenin Fab 片段進行偵測。在未結合的抗體被移除以後, 硝基藍四銻 / 5-溴 - 4-氯 - 3-吡啶基 - 磷酸鹽受質 (Promega) 及 levamisole (Becton Laboratories, Burlingame, CA) 被加入, 以便經由比色性受質的產生進行訊號偵測。組織以甲基綠 (Sigma) 進行對比染色, 脫水, 並黏附於玻片上。作為對照組, 一些組織切片以 100 微克 / 毫升之胰 RNaseA (Sigma) 於 37°C 預先處理 30 分鐘。該 RNase 於玻片上以 400 單位之 RNase 抑制劑 (Promega) 加以去活化。玻片隨後在 250 毫升之 PBS / 5 mM MgCl₂ 中清洗兩次。在另外的對照組實驗中, tRNA (Sigma) 取代 digoxigenin 探針的使用。

在三個分別的實驗中, 所有的懷孕終期 (term) 及前三個月胎盤組織內以不同的 OvIFN γ cRNA 探針濃度及阻斷劑觀察到特異性雜交反應。

包括融合滋胚母細胞 (syncytiotrophoblast) 的外層,

五、發明說明 (1>1)

滋胚內質母細胞 (cytotrophoblast) 之下置層，及具有不同間葉 (mesenchymal) 細胞種類之中央柱狀區域之前三個月胎盤絨毛顯示在滋胚內質母細胞 (cytotrophoblast) 細胞中具有最高的 IFN γ 轉錄水平。在融合滋胚母細胞 (syncytiotrophoblast) 及柱狀細胞中則有較弱但可偵測的水平。類似的轉錄物表現發現於懷孕終期 (term) 組織中的胎盤絨毛內，但是訊號偵測的水平很低。前三個月絨毛外 trophoblast 顯示訊息的最高量，且在母體血液空間中出現時染色呈陽性反應。

實施例 10

IFN γ 之抗病毒性活性

被純化至均質狀態的 OvIFN γ 之相對特異性活性於抗病毒性試驗中進行評估。抗病毒性試驗基本上以見述於實施例 2 的方式進行。特異性活性以抗病毒性單位 / 得自抗病毒性試驗之毫克蛋白質表示，該抗病毒性試驗使用 Madin-Darby 牛腎 (MDBK) 細胞或綿羊正常纖維母細胞 (Shnf)。所有的樣本同時進行試驗以消除試驗之間的差異性。表 3 的結果為四個決定值的平均，其中標準偏差少於平均值之 10%。

五、發明說明 (122)

表 3

IFN τ 及已知 IFN 的抗病毒性活性

	特異性活性	
	MDBK	Shnf
OvIFN τ	2×10^8	3×10^8
rBoIFN α	6×10^7	1×10^7
rBoIFN γ	4.5×10^6	3×10^6
NIH rHuIFN α	2.2×10^8	2.2×10^8
rHuIFN α	2.9×10^5	4.3×10^5

IFN τ 具有較 rBoIFN α 或 rBoIFN γ 為高的特異性活性 (表 3)。NIH rHuIFN α 之標準製備物具有類似的特異性活性，然而 rHuIFN α 之商業製備物表現低度特異性抗病毒性活

五、發明說明 (123)

性。使用牛或羊細胞得到差不多的相對抗病毒性活性。

實施例 11

IFN τ 之抗-反轉錄病毒活性及細胞毒性影響

高度純化的 OvIFN τ 針對抗-反轉錄病毒及細胞毒殺性效果於暴露於貓免疫缺陷反轉錄病毒之貓周邊血液淋巴細胞進行試驗。此緩慢病毒在貓產生一慢性 AIDS-類似性症候群且為人類 AIDS (Pederson, 等人, 1987) 的一種模式。該病毒於周邊血液淋巴細胞中的複製經由在培養物上清液中的反轉錄酶活性對時間進行監測。來自這些試驗的數據示於表 4。

表4

OvIFN τ 對 FIV 複製的影響

IFN τ 濃度(微毫克/毫升)	RT活性(cpm/毫升)

-126-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (174)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

實驗 1	收穫天數				
	第2天	第5天	第 8天	第 12天	第15天
0.00	93,908	363,042	289,874	171,185	125,400
0.62	77,243	179,842	172,100	218,281	73,039
1.25	94,587	101,873	122,216	71,916	50,038
2.50	63,676	72,320	140,783	75,001	36,105
5.00	69,348	82,928	90,737	49,546	36,299
實驗 2	收穫天數				
	第 2天	第 5天	第 8天	第 13天	第17天
0.0	210,569	305,048	279,556	500,634	611,542
2.5	121,082	106,815	108,882	201,676	195,356
5.0	223,975	185,579	108,114	175,196	173,881

-127-

五、發明說明 (1/5)

10.0	167,425	113,631	125,131	131,649	129,364
20.0	204,879	80,399	59,458	78,277	72,179
40.0	133,768	54,905	31,606	72,580	53,493

0vIFN γ 的加入產生一快速，劑量-依賴性的反轉錄酶 (RT) 活性降低 (表 4)。雖然濃度低到 0.62 微毫克/毫升之 IFN γ 可抑制病毒複製，對 RT-活性具有更佳效果之更高的濃度 (40 微毫克/毫升) 對細胞沒有毒性影響。這些結果建議當細胞在 0vIFN γ 存在下進行培養時，貓免疫缺陷病毒的複製相對於對照組數值被明顯地降低。

IFN γ 顯然對於攜帶反轉錄病毒的細胞沒有細胞毒殺性影響。即使當 IFN γ 的濃度為每毫升培養基 40 微毫克時亦為如此。

實施例 12

五、發明說明 (1×6)

IFN γ 亦針對抗人類細胞中 HIV 感染的活性進行試驗。已感染 HIV 的人類周邊血液淋巴細胞 (Crowe, 等人, 1987) 以不同濃度的 OvIFN γ 進行處理。HIV 在周邊血液淋巴細胞中的複製經由在培養物上清液中的反轉錄酶活性對時間進行監測。反轉錄酶活性基本上根據 Hoffman, 等人 (1985) 的方法進行測量。來自這些試驗的數據示於表 5。

表 5

OvIFN γ 對 HIV 在周邊血液淋巴細胞中複製的影響

IFN γ 濃度 (微毫克 / 毫升)	RT 活性			
	第 6 天		第 10 天	
	cpm/毫升	%降低	cpm/毫升	%降低
0	4,214	-	25,994	-
10	2,046	51	9,883	62
50	1,794	57	4,962	81

- 129 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (17)

100	1,770	58	3,012	88
500	1,686	60	2,670	90
1000	1,499	64	2,971	89

如表 5 所示, $0vIFN\gamma$ 的濃度產生明顯的抗病毒性效果。僅 10 微毫克 / 毫升造成 RT 活性在六天後降低超過 50%。濃度 500 微毫克 / 毫升造成 RT 活性在 10 天內降低 90%。

人類周邊血液淋巴細胞在以一定範圍濃度 $IFN\gamma$ 處理 3 至 13 天後的存活率經由錐蟲藍排出進行評估。此存活率分析的結果示於表 6。

表 6

$0vIFN\gamma$ 對被 HIV 感染的周邊血液淋巴細胞的存活率的影響

$IFN\gamma$ 濃度	存活細胞 / 毫升 $\times 10^5$
----------------	-------------------------

五、發明說明 (128)

(微毫克/毫升)	第 3 天	第 6 天	第 13 天
0	16.0	7.5	5.3
10	13.0	7.5	6.0
50	13.0	11.5	9.0
100	15.0	8.5	9.5
500	16.5	12.0	11.0
1000	21.9 1	9.5	18.5

示於表 6 的數據沒有顯示任何可歸因於施用 IFN τ 之細胞毒殺性效果之證據。

實施例 13

細胞性生長的抑制

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (1 > 9)

IFN τ 對細胞性生長的效果進行檢驗。抗-細胞性生長活性使用株落抑制試驗加以檢驗。人類羊膜 (WISH) 或 MDBK 細胞以低細胞密度種植以形成源自單一細胞的株落。細胞以 200 或 400 個細胞/孔的密度於 24 孔培養皿中在添加 2% 胎牛血清 (FBS) 及必需和非必需胺基酸之 HMEM 內進行培養。不同稀釋度的干擾素被加入三套孔中, 並將盤培育 8 天使得株落形成。株落以結晶紫染色後進行觀察, 並加以計數。細胞周期分析以含有 0.5% "spent" 培養基之 HMEM 進行額外 7 天。WISH 細胞使用前不須同步化。

為了檢驗 IFN τ 活性, 細胞以 2.5×10^5 細胞/孔的密度被再種於含有具 10% FBS 之 HMEM 之 6 孔培養皿中。0vIFN τ 單獨或與肽類混合之不同稀釋度被加入, 最後體積達到 1 毫升。將盤於 37°C 及 5% CO₂ 下培育 12, 15, 18, 24, 或 48 小時。細胞以胰蛋白酶處理, 經由低速離心收集, 並進行清洗。細胞沉澱被吸乾並在每管中加入 250 微升之核染色溶液 (於 100 毫升之 H₂O 中有 5 毫克碘化普羅比錠 (propidium iodide), 0.3 毫升 NP40 及 0.1 公克檸檬酸鈉)。將管於室溫培育。10 分鐘後每管加入 250 微升之 RNase (500 單位/毫升於 1.12% 檸檬酸鈉中) 並繼續培育 20 分鐘。細胞核經由 44 微米篩目濾出, 並於一 FACStar (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 中使用 DNA Star 2.0 軟體分析。

五、發明說明 (130)

在使用牛上皮細胞系 MDBK 及人類羊膜細胞系 WISH 兩者之株落形成之細胞性生長試驗中, OvIFN τ 抑制株落的大小及數目。羊的 IFN τ 較人類 IFN α 對人類細胞系有更多的影響力; 因此, 在種類交錯的活性更為有效。其活性為劑量-依賴性, 且株落增殖的抑制在低到 1 單位/毫升的濃度時也觀察得到。高達 50,000 單位/毫升 (抗病毒性活性單位/毫升) 的濃度中止株落增殖, 然而細胞存活率未受不利影響。

經由使用碘化普羅比錠 (propidium iodide)-染色之 WISH 細胞進行之流式細胞計測儀所作的細胞周期分析, 顯示在以 OvIFN τ 處理 48 小時後細胞在 G2/M 階段的比例增加。IFN τ 因此顯示可抑制細胞進入 S 相。羊的 IFN τ 抗株落繁殖性效果可早在培養後 12 小時觀察到, 並可持續 6 天。

上述結果顯示 IFN τ 之抗株落繁殖性效果以及低細胞毒殺性。

實施例 14

IFN τ 之進一步抗株落繁殖性效果

五、發明說明 (12 |)

$0vIFN\tau$ 之抗株落繁殖性效果針對大鼠細胞系及牛細胞系進行研究。 3H -胸腺嘧啶併入的比率被用於評估細胞性株落增殖的比率。

大鼠 (MtBr7.c5) 或牛腎 (MDBK) 細胞被種於沒有酚紅之 DME-F12 培養基中, 該培養基添加 3% 以包覆右旋糖的活性碳進行脫除處理之 Controlled Process Serum Replacement 2 (CPSR 2, Sigma) 及 5% 以包覆右旋糖的活性碳進行脫除處理之胎牛血清 (FBS)。經過貼附約 15-18 個小時以後, 細胞以沒有血清的 DME-F12 培養基清洗一次。培養基以沒有酚紅的 DME-F12 培養基取代, 其添加 3% 脫離處理之 CPSR2, 1% 脫離處理之 FBS ("3/1" 培養基) 或以含有不同抗病毒活性單位之 $0vIFN\tau$ 之 3/1 培養基取代, 抗病毒活性單位的決定係根據針對干擾素之水泡性口腔炎 (vesicular stomatitis) 病毒挑戰試驗 (實施例 2)。含有緩衝液之類似稀釋度的培養基 (未稀釋的緩衝液 = 10 mM Tris, 330 mM NaCl, [TS]), 其中溶有 $0vIFN\tau$, 被用於作為對照組。

在處理後約 48 小時, 細胞以 3H -胸腺核苷進行波段標定 2 小時。三氯乙酸 (TCA) 可沉澱的併入的計數經由閃爍計數加以決定。每次處理包括參份。 $0vIFN\tau$ 處理的平均值與含有類似稀釋度的載劑 TS 緩衝液進行比較。這些實驗

五、發明說明 (132)

的結果顯示於表 7。

表 7

^3H -胸腺核苷 併入

處理	^3H -胸腺核苷 併入的降低
實驗 1: MtBr7.c5 (大鼠)	
3/1	-
10^3 u OvIFN τ /毫升	0 (+12)
1:5000 TS	-
10^4 u OvIFN τ /毫升	24
1:500 TS	-
10^5 u OvIFN τ /毫升	87

五、發明說明 (133)

實驗 2: MDBK

3/1	-
10^3 u OvIFN τ /毫升	74
1:5000 TS	-
10^4 u OvIFN τ /毫升	83
1:500 TS	-
10^5 u OvIFN τ /毫升	83

由表 7 可知,對每個受試的細胞系而言, OvIFN τ 劇烈地降低細胞性株落增殖的速率(基於胸腺核苷的併入)。

實施例 15

IFN τ 對人類腫瘤細胞系之抗株落增殖效果

IFN τ 對人類腫瘤細胞系之抗株落增殖效果經由測量³

五、發明說明 (134)

H-胸腺核苷併入已以 $0\text{vIFN}\gamma$ 處理的細胞中的速率而進行評估。

針對基於懸浮性生長的腫瘤細胞系的實驗，1毫升之細胞以 $2.5-5 \times 10^5$ 細胞/孔的密度被種於24-孔培養皿中。三份的孔接受合適的培養基，100, 1,000或10,000單位/毫升之 $0\text{vIFN}\gamma$ 或 $\text{rHuIFN}\alpha 2\text{A}$ (Lee Biomolecular) 之相等抗病毒性濃度。經過48小時培育後，將細胞計數且存活率經由錐蟲藍排除法加以評估。

貼附性腫瘤細胞系以 2.5×10^5 個細胞/孔的密度以1毫升的體積種於6-孔培養皿中。各孔以上述的方式接受干擾素，但是在計數前以胰蛋白酶處理。

介於每次處理的明顯差異經由史嘉菲氏 (Scheffe's) F-試驗後分析變異數進行評估。細胞周期分析經由流式細胞計測儀使用碘化普羅比錠 (propidium iodide) 進行。

A. 乳房腺上皮瘤細胞

來自對數生長培養物，人類 MCF7 乳房腺上皮瘤細胞被種於沒有酚紅的 DME-F12培養基中，該培養基添加3%以包圍右旋糖的活性碳進行脫除處理之 Controlled Process

五、發明說明 (135)

Serum Replacement 2 (CPSR 2, Sigma) 及 5% 以包覆右旋糖的活性碳進行脫除處理之 FBS。經過貼附約 15-18 個小時以後，細胞以沒有血清的 DME-F12 培養基清洗一次。培養基以沒有酚紅的 DME-F12 培養基取代，其添加 3% 脫離處理之 CPSR2，1% 脫離處理之 FBS ("3/1" 培養基) 或以含有不同抗病毒活性單位之 OvIFN γ 之 3/1 培養基取代，抗病毒活性單位的決定係根據針對干擾素之水泡性口腔炎 (vesicular stomatitis) 病毒挑戰試驗 (實施例 2)。含有緩衝液之類似稀釋度的培養基 (未稀釋的緩衝液 = 10 mM Tris, 330 mM NaCl, [TS])，其中溶有 OvIFN γ ，被用於作為對照組。

三氯乙酸 (TCA) 可沉澱的併入的計數經由閃爍計數加以決定。每次處理包括參份。OvIFN γ 處理的平均值與含有類似稀釋度的載劑 TS 緩衝液進行比較。這些實驗的結果顯示於表 8。

表 8

3 H-胸腺核苷 併入

處理	3 H-胸腺核苷併入的降低

五、發明說明 (36)

MCF7 人類	
3/1	-
10^3 u 0vIFN τ /毫升	35
1:5000 TS	-
10^4 u 0vIFN τ /毫升	53
1:500 TS	-
10^5 u 0vIFN τ /毫升	70

由表 8 的結果可知, 0vIFN τ 能實質上降低胸腺核苷併入人類上皮瘤細胞系的速率。此顯示 0vIFN τ 在抑制腫瘤細胞株落增殖方面的效果, 特別是, 乳腺腫瘤細胞株落增殖。

B. 人類原骨髓細胞性白血癌。

0vIFN τ 及 IFN α 之抗株落繁殖性效果的比較使用 HL-60 (人類白血癌) 細胞 (Foa, 等人, 1982; Todd, 等人,

五、發明說明 (137)

1981) 進行,其基本上同於上述針對MDBK 細胞的程序。OvIFN τ 及HuIFN α 都可抑制 HL-60細胞株落增殖。三次實驗的一次以平均 %生長降低 \pm SD 表示於圖4。圖4 顯示OvIFN τ 及IFN α 能夠劇烈降低 HL-60 細胞的生長。每種化合物的生長減低在每個受試濃度下均超過 60%。在10,000 單位/毫升, OvIFN τ 引起生長降低約 80%,然而IFN α 引起生長降低100%。

然而,示於圖4的數據顯示,IFN α 降低生長的基本因子為其對細胞的毒性效果。在10,000 單位/毫升時,IFN α 的毒性使得細胞存活少於25%。相反的,當OvIFN τ 以10,000單位/毫升施用時,將近100%的細胞仍存活。

圖5 顯示的數據指出 rHuIFN α 具細胞毒性。在該圖中,三次實驗中的一次以平均 %存活率 \pm SD表示。

C. 人類皮膚 T 細胞淋巴瘤

當以IFN τ 處理時,皮膚 T 細胞淋巴瘤, HUT 78的反應與HL-60 類似(圖9)。OvIFN τ 及rHuIFN α 兩者皆可抑制 HUT 78 細胞生長,但是10,000單位/毫升之 rHuIFN α 可降低最初種植的細胞數(5×10^5)。此指出細胞存活率降低至約60%。

五、發明說明 (138)

以兩種干擾素處理後 48 小時，細胞周期分析（以細胞流式計測儀進行）顯示細胞在細胞周期 G2/M 相的比例增加（表 9）。在表 9 中，三次實驗中的一次的結果以細胞在細胞周期每個相的百分比表示。每個樣本分析 10,000 次事件。

此結果可能是由於細胞之細胞周期較緩慢進行之故。在這些以 10,000 單位/毫升之 rHuIFN α 處理的樣本中，佔很大百分比的事件具有低直度直行及高度側端分散，證明死細胞存在。此與數據得自株落增殖實驗的數據一致，而僅有 0vIFN γ 抑制 HUT 78 株落增殖而沒有毒性。

表 9

HUT 78 細胞周期分析

處理（單位/毫升）	G0/G1	S	G2/M
培養基	44.43	49.95	5.61
100 0vIFN γ	44.35	47.45	8.20

五、發明說明 (13p)

100 rHuIFN α	40.01	57.53	2.45
1,000 OvIFN γ	41.29	50.50	8.21
1,000 rHuIFN α	41.73	44.91	13.36
10,000 OvIFN γ	42.79	42.61	14.60
10,000 rHuIFN α	18.01	71.31	10.67 (細胞 死亡)

D. 人類 T 細胞淋巴瘤

T 細胞淋巴瘤細胞系 H9 對 IFN 之抗株落繁殖性效果比前述腫瘤細胞系不敏感。三次實驗中的一次的结果以平均%生長降低 \pm SD示於圖 10。雖然 rHuIFN α 對 H9 細胞沒有毒性，卻無法在任何受檢濃度下明顯地抑制細胞分裂。相反的，OvIFN γ 被觀察到可降低 H9 生長至約 60% (圖 10)。因此，僅有 OvIFN γ 為此 T 細胞淋巴瘤的有效生長抑制劑。

五、發明說明 (140)

上述結果展示 IFN τ 之抗株落繁殖性效果及其低細胞毒殺性。

實施例 16

以 OvIFN τ 進行初步活體內處理

三組 4 C57Bl/6 老鼠中每組經由尾靜脈給予 2.5×10^4 B16-F10 細胞：B16-F10 為一同基因性老鼠可轉移的腫瘤，其由於肺部惡性轉移之高發生率而被選擇 (Poste 等人, 1981)。干擾素治療始於導入腫瘤細胞後 3 天。每隻老鼠連續三天每天由靜脈接受 100 微升之單獨 PBS，含有 1×10^5 單位之 OvIFN τ 之 PBS，或含有 1×10^5 單位之重組性老鼠 IFN α (MuIFN α) 之 PBS。

老鼠在第 21 天殺死並將肺保存於 10% 緩衝性福馬林中。肺部惡性轉移的頻率與對照組老鼠 (PBS)，OvIFN τ - 處理之老鼠，及 MuIFN α - 處理之老鼠進行比較。這些活體內施用的結果顯示 OvIFN τ 劇烈地降低 B16-F10 肺腫瘤。這些結果支持 IFN τ 作為活體內抗贅瘤新生劑之用途。

實施例 17

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (141)

IFN τ 肽片段之競爭性結合

A. 基於 IFN τ 之肽類組斷 IFN τ 及 IFN- α 抗病毒性活性之能力

重疊性合成肽類相關於完整的 IFN τ 序列 (圖 6)。平均水療性 (hydropathicity) 值經由將每個胺基酸的水療性 (hydropathy) 數值總和除以在每個序列中的胺基酸數目。水療性 (hydropathy) 值得自 Kyte, 等人 (1982)。

這些肽類約為相同的分子量在整個親水性來看稍有不同。雖然有此不同, 所有的肽類都具有抗原性, 其經由產生兔子抗血清的效價大於 1:3,000 可知, 效價係以 ELISA (Harlow, et al., 1988) 進行測量。

這些肽類被用於抑制 OvIFN τ 及 rBoIFN α 的抗病毒性活性 (實施例 2)。此分析的結果示於圖 12: 1 mM N- 及 C-端肽類兩者可在使用 MDBK 細胞的實驗中有效阻斷 OvIFN τ 之抗病毒性活性。第三個肽, 代表胺基酸 62-92, 亦降低 IFN τ 抗病毒性活性 (70 % 抑制)。肽 ovIFN τ (119- 150) 顯示最小的抑制性活性。OvIFN τ (34-64) 及 (90- 122) 肽類沒有明顯的抑制性活性。

五、發明說明 (42)

0vIFN τ 抗病毒性活性之肽抑制作用亦進行檢驗如下：
 單層 Madin Darby 牛腎細胞與 40單位/毫升 0vIFN τ 在有或沒有不同濃度之 0vIFN τ 肽類的條件下進行培育(見圖 13)。在圖 13 中的結果以對照組(亦即，在沒有任何競爭性肽的條件下)抗病毒性活性的百分比表示。所示數據為 6 個重覆試驗的平均值。在 10^{-3} M 及 3×10^{-3} M 時，數據顯示 0vIFN τ (1-37)，(62-92)，(119-150)，及 (139-172) 的抑制作用明顯不同於 0vIFN τ (34-64) 及 (90-122)。在 10^{-3} M 時，0vIFN τ (139-172) 明顯不同於所有其他的肽類。明顯程度經由史嘉菲氏(Scheffe's) F 試驗後在 $p < 0.05$ 分析變異數進行分析。因此，0vIFN τ (1-37)，(62-92)，(119-150)，及 (139-172)，特別是 (139-172)，可代表 IFN τ 之受體結合區域。

0vIFN τ 肽類抑制牛 IFN α (BoIFN α) 抗病毒性活性的能力進行檢驗如下。單層 Madin Darby 牛腎細胞與 40 單位/毫升牛 IFN α 在有或沒有不同濃度之 0vIFN τ 肽類的條件下進行培育。結果示於圖 13 並以沒有 0vIFN τ 肽的對照組的抗病毒性活性的百分比表示。所示數據為 4 個重覆試驗的平均值。在 10^{-3} M 時，數據顯示 0vIFN τ (62-92)，(119-150)，及 (139-172) 的抑制作用明顯不同於 0vIFN τ (1-37)，(34-64) 及 (90-122)。在 3×10^{-3} M 時，

五、發明說明 (14)

0vIFN τ (139-172) 明顯不同於 0vIFN τ (1-37), (34-64) 及 (90-122)。明顯程度經由史嘉菲氏 (Scheffe's) F 試驗後在 $p < 0.05$ 下分析變異數進行分析。因此, 0vIFN τ (62-92), (119-150), 及 (139-172), 特別是 (139-172), 可代表 IFN τ 及牛 IFN α 之共同受體結合區域。

經由 0vIFN τ 肽對人類 IFN α 之抗病毒性活性之肽抑制作用亦進行檢驗。單層 Madin Darby 牛腎細胞與 40 單位/毫升 IFN α 在有或沒有不同濃度之 0vIFN τ 肽類的條件下進行培育。結果以沒有 0vIFN τ 肽的對照組的抗病毒性活性的百分比表示。數據示於圖 15 且為 3 個重覆試驗的平均值。在 10^{-3} M 時, 0vIFN τ (139-172) 明顯不同於所有其他的肽類。明顯程度經由史嘉菲氏 (Scheffe's) F 試驗後在 $p < 0.05$ 分析變異數進行分析。因此, 0vIFN τ (139-172) 可代表 IFN τ 及不同 IFN α 之共同受體結合區域。

上述 0vIFN τ 肽類顯然對 INF γ 的抗病毒性活性沒有效果。牛 IFN γ 抗病毒性活性之肽抑制作用進行評估如下。單層 Madin Darby 牛腎細胞與 40 單位/毫升 IFN γ 在有或沒有不同濃度之 0vIFN τ 肽類的條件下進行培育。結果以沒有 0vIFN τ 肽的對照組的抗病毒性活性的百分比表示。數據示於圖 16 且為 3 個重覆試驗的平均值。經由史嘉菲氏 (Scheffe's) F 試驗後在 $p < 0.05$ 分析變異數進行分析, 在

五、發明說明 (44)

肽之間沒有明顯的不同。

兩個合成性肽類 $0vIFN\gamma$ (1-37) 及 $0vIFN\gamma$ (139-172) 亦可阻斷 $0vIFN\gamma$ 抗 - FIV 及抗 - HIV 活性。反轉錄酶 (RT) 活性 (實施例 12 及 13) 以 14 天的期間在 FIV-感染的 FET-I 細胞 (1×10^6 /毫升) 及 HIV-感染的 HPBL (1×10^6 /毫升) 中加以監測。對照組培養物不給予 $0vIFN\gamma$ 。 $0vIFN\gamma$ 以 100 微毫克/毫升使用, 且肽類以 200 μ M 使用。來自代表性試驗的數據以 cpm/毫升培養物上清液表示, 且針對 FIV 感染的細胞示於圖 11A, 而 HIV 感染的細胞示於圖 11B。N- 及 C-端的 $0vIFN\gamma$ 顯示與其抗 - 反轉錄病毒活性有關。雖然兩種肽類可阻斷 FIV RT 活性, 僅有 C-端肽, $0vIFN\gamma$ (139- 172), 在貓細胞系 Fc9 為水泡性口腔炎 (vesicular stomatitis) 病毒活性的有效抑制劑。因此第 I 型 IFN 之 C-端區域可以結合至第 I 型 IFN 受體的共同位置, 而 N-端區域相關於激發此獨特功能。

B. 抗 - 肽血清

抗 - 肽抗血清抑制 $0vIFN\gamma$ 抗病毒性活性的能力亦予以決定。 $0vIFN\gamma$ 抗病毒性活性之抗肽抗血清抑制作用進行評估如下。單層 Madin Darby 牛腎細胞與 20 單位/毫升 IFN α 在 1:30 稀釋度之前免疫血清或對抗上述每一種 $0vIFN\gamma$ 肽

五、發明說明 (145)

之抗血清的存在下進行培育。在圖 17, 來自兩次重複實驗的結果以抗肽血清所產生 $0vIFN\gamma$ 抗病毒活性的抑制百分比平均值 \pm SD 表示, 該百分比係相對於合適的前免疫血清。明顯程度經由史嘉菲氏 (Scheffe's) F 試驗後在 $p < 0.05$ 分析變異數進行分析。與抗病毒活性之肽抑制作用一致的是, 含有對 $0vIFN\gamma$ (1-37), (62-92), 及 (139-172) 有免疫反應性的抗體之血清為 $0vIFN\gamma$ 抗病毒性活性之最有效抑制劑, 而直接抗 N-端的及 C-端肽的抗體的效果最好。

同樣的血清亦被用於檢驗對於 $IFN\gamma$ 結合至其受體的效果。

$IFN\gamma$ 結合試驗的進行如下。5 微克之 $IFN\gamma$ 以 500 μ Ci 之 $Na^{125}I$ (15 mCi/ μ g; Amersham Corporation, Arlington Heights, IL) 於 25 毫升之 0.5 M 磷酸鉀緩衝液, pH 7.4, 及 10 微升之 chloramine-T (5 毫克/毫升) 進行碘化 2 分鐘 (Griggs, 等人, 1992)。被碘化蛋白質之特異性活性為 137 μ Ci/毫克。為了結合試驗, 單層 MDBK 細胞以 paraformaldehyde 加以固定且以 5% 脫脂奶粉予以阻斷。細胞以 5 nM ^{125}I - $IFN\gamma$ 於含 1% BSA 之磷酸鹽緩衝性食鹽水中在有或沒有 1:30 稀釋度之含有抗 $IFN\gamma$ 肽類的抗體之血清或合適的前免疫血清的條件下於 4°C 進行培育 2 小時。特異性結合的評估經由與 100 倍

五、發明說明 (14b)

莫耳過量之未標定的 $IFN\tau$ 進行。36%特異性結合經由以 500 nM 未標定的 $IFN\tau$ 進行的競爭試驗中得到。例如，總計量結合為 6850 ± 133 ，且 100-倍莫耳過量之 $0vIFN\tau$ 產生每分鐘 4398 ± 158 計數值。培育之後，單層細胞清洗三次，與 1% 十二烷基硫酸鈉共溶，並計測放射活性。來自三次重複實驗的數據示於圖 18，其以抗肽血清所產生 $0vIFN\tau$ 特異性結合的降低百分比平均值 \pm 標準偏差表示，該百分比係相對於合適的前免疫血清。明顯差異程度經由史嘉菲氏 (Scheffe's) F 試驗後分析變異數進行評估。

同樣的血清 (其含對 $0vIFN\tau$ (1-37), $0vIFN\tau$ (62-92), 及 $0vIFN\tau$ (139-172) 具有免疫反應性的抗體) 為 $I-IFN\tau$ 結合至其於 MDBK 細胞上受體之最有效抑制劑。與其他 $IFN\tau$ -衍生之肽類具免疫反應性之血清缺少效果的情形並非效價對 $0vIFN\tau$ 的函數，因為相對於三個抑制性血清而言，每個血清對其有關的肽具有相等或較大效價：當對抗整個 $0vIFN\tau$ 分子之血清反應性對每個血清經由 ELISA 評估時，得到類似的結果。

這些肽類雖然明顯地結合至干擾素受體，但是在細胞中並沒有激發干擾素-類似的效果。

C. 抗-株落繁殖性活性

五、發明說明 (167)

針對 IFN γ 抗株落繁殖性活性之功能上重要位置亦使用合成性肽類進行檢驗 (表 10)。細胞性株落增殖如前述使用 MDBK 細胞進行。MDBK 細胞在實驗 1 及 2 中以 5×10^5 個細胞/孔或在實驗 3 中以 10×10^5 個細胞來進行,且單獨以培養基,以 300 單位/毫升濃度的 IFN γ 及以 1 mM 之肽類進行處理 48 小時。在三次重覆的實驗中每次計數兩份孔。就統計分析而言,數據基於只有培養基的情況進行常態分佈並經由 Least Significant Difference 多重比較試驗後分析變異數 ($p > 0.05$) 加以評估。

表 10

IFN γ 抗增殖活性之肽抑制作用

處理	實驗 1		實驗 2		實驗 3	
	細胞計數	存活率	細胞計數	存活率	細胞計數	存活率
培養基單獨	9.8×10^5	99%	13.0×10^5	96%	27.3×10^5	97%

-150-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (14頁)

IFN τ	5.0×10^5	98%	5.6×10^5	97%	8.3×10^5	97%
IFN τ + IFN τ (1-37)	6.3×10^5	100%	10.6×10^5	98%	13.4×10^5	100%
IFN τ + IFN τ (34-64)	5.3×10^5	96%	6.9×10^5	95%	16.0×10^5	98%
IFN τ + IFN τ (62-92)	6.5×10^5	97%	9.2×10^5	93%	8.9×10^5	96%
IFN τ + IFN τ (90-122)	5.9×10^5	100%	11.0×10^5	97%	19.6×10^5	98%
IFN τ + IFN τ (119-150)	8.4×10^5	100%	13.2×10^5	96%	31.8×10^5	90%
IFN τ + IFN τ (139-172)	5.1×10^5	100%	12.7×10^5	98%	18.9×10^5	98%

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (149)

當 MDBK 細胞之增殖已監測達兩天期間，細胞數目增加大約 2 倍伴隨大於 95% 之存活力。300 單位/毫升 OvIFN τ 之加入完全消除細胞增殖而不降低細胞存活力。羊的 IFN τ (119-150) 為 IFN τ 抗增殖活性之最有效抑制劑。

對抗 IFN τ (119-150) 之抗血清，其抑制 OvIFN τ 之結合至受體，亦保留 OvIFN τ 之抗增殖效果。數種其它肽，特別地 IFN τ (139-172)，保留 OvIFN τ 之抗增殖效果，但達到較少之程度。

實施例 18

IFN- τ 及 IFN- α 對第 I 型干擾素受體之差別性辨識

A. OvIFN τ 及人類 IFN- α A 在 MDBK 細胞上測試之相對細胞毒性

細胞毒性試驗係針對於 96-孔培養皿中長滿之 MDBK 細胞施行。受試細胞利用不同濃度(圖中所示)之 IFN，三份方式，於 100 微升補充 2% 新生牛血清之 EMEM 中進

五、發明說明 (153)

行處理，且對照組細胞利用培養基單獨加以處理。ovIFN γ DNA 編序列被選殖入 pHIL-S1 畢赤酵母菌 (Pichia) 表現質體中 (Invitrogen, San Diego, CA)，該質體利用 BglIII 加以切割，且直線化之質體依據製造商之說明被用來轉形巴斯德畢赤酵母菌 (Pichia pastoris 菌株 GS115; Invitrogen) 原生質球狀體。重組 OvIFN γ 蛋白經由被轉形之 His⁺ 酵母菌細胞加以表現並經由離子交換及羧基磷灰石色層分析從培養基進行純化至均勻 (0.8×10^8 單位/毫克)。經純化之重組人類 IFN α A (2×10^8 單位/毫克) 係得自 Biosource International (Camarillo, CA)。

細胞在 37°C 進行培養直到有意義的細胞死亡經由顯微鏡檢查而明顯。之後細胞利用結晶紫加以染色，培養皿進行清洗及空氣乾燥且染料利用 2-甲氧基乙醇 (甲基溶劑) 加以萃取。經洗提之染料的吸光度係在 570 微毫米進行測量。

結果顯示於圖 22A 及 22B 中。IFN γ 對於 MDBK 細胞的毒性要比 IFN α 減少至少 30 倍。針對 IFN α 引起 50% 細胞死亡之濃度，相較於針對 IFN γ 之約 8500 單位/毫升，約為 2500 單位/毫升。這些結果進而證實 IFN γ 及 IFN α 在它們的細胞毒性效果中顯著不同。

五、發明說明 (157)

B. 0ν IFN τ 不會抑制 IFN- α A-主導之細胞毒性。

次毒性濃度之 IFN τ 作為 IFN α 細胞毒性效果之競爭性拮抗劑的潛力係使用以上才敘述之細胞毒性試驗進行研究。

第一個實驗中，顯示於圖 23A 中，或是 IFN τ (50,000 單位/毫升)及/或 IFN α A(5,000 單位/毫升)被加至細胞，且試驗利用以上才敘述之細胞毒性試驗施行。數據顯示 IFN τ 處理，以 10 倍高於(但為次毒性) IFN α A 之濃度，並不會阻斷 IFN α A 對於 MDBK 細胞之毒性。

在第二個實驗中，顯示於圖 23B 中，細胞在加入 IFN α A (5,000 單位/毫升)之前利用 IFN τ (25,000 單位/毫升)在 37°C 下加以處理達 1 小時而不移除 IFN τ 。結果顯示加入 IFN α A 之前 1 小時加入 5 倍較高濃度之 IFN τ 並不會阻斷 IFN α A 之毒性。

綜合而言，這些結果顯示 IFN τ 對於 IFN α A 之細胞毒性效果為一不良的拮抗劑。有鑑於這兩種第 I 型干擾素之已建立結構及功能相似性(Jarpe, 等人, 1994)以

五、發明說明 (152)

及其對於 MDBK 細胞相似的特異抗病毒活性 (Pontzer, 等人, 1988), 這是一個令人驚訝的觀察。IFN γ 之無法阻斷 IFN α A 之細胞毒性建議這些 IFN 差別性地結合至第 I 型受體複合物, 也許啟始了不同的傳訊項目。

C. ¹²⁵I-標定之 IFN γ 及 IFN α 結合至 MDBK 細胞。

IFN α A 及 IFN γ 利用 Bolton-Flunter 試劑 (單一 [¹²⁵I] 碘代衍生物, 約 2000 Ci/毫莫耳, Amersham; 1 Ci = 37 GBq) 如上所述加以標定 (Langer 及 Pestka, 1986)。受標定蛋白質之特異活性為 40-70 μ Ci/微克。受標定之 IFN 保持對 MDBK 細胞之完整抗病毒活性, 其在 4°C 下維持不變達至少 4 週。

使用 MDBK 細胞之結合試驗如上所述針對 IFN α 加以施行 (Zoon, 等人 1986)。預冷至 4°C 之六孔培養皿中長滿之單層 MDBK 細胞與適當濃度之標定或未標定 IFN 於 2 毫升之完整生長培養基中 4°C 下針對 ¹²⁵I-IFN α A 進行培養達 4 小時或針對 ¹²⁵I-IFN γ 進行培養過夜 (\geq 17 小時) 以促使結合達到平衡。飽和結合數據係利用 "EBDA" 程式加以分析 (McPherson 1985)。

五、發明說明 (15)

結果顯示於圖 24A (125 I-IFN $_{\tau}$)及 24B (125 I-IFN $_{\alpha A}$)中。特異性結合係經由減去 100 倍過多相關未標定 IFN 存在下每種濃度所測定之非特異性結合而計算得到。針對 IFN $_{\tau}$ 之非特異性結合為 <20%且針對 IFN $_{\alpha A}$ 為 <7%。數值被圖示為平均值 \pm SE。每個圖形中的插入顯示結合數據之史考察氏 (Scatchard) 分析 (B, 結合; F; 游離)。

數據顯示 125 I-IFN $_{\tau}$ 以高特異性結合至 MDBK 細胞 (圖 24A)。結合之史考察氏 (Scatchard) 分析 (插入於圖 24A) 顯示清楚的 Kd 值 3.90×10^{-10} M。該 Kd 值位於不同 IFN $_{\alpha}$ 結合至不同細胞型之範圍內 (10^{-11} 至 10^{-9} M) (Rubinstein, 等人, 1986; Aguet, 等人, 1983) 且類似於重組牛 IFN $_{\alpha D}$ (3.5×10^{-10} M) 及重組牛 IFN $_{\tau}$ (3.7×10^{-10} M) 結合至牛子宮內膜之數值 (Li 及 Roberts, 1994)。然而, 125 I-IFN $_{\alpha A}$ 結合至 MDBK 細胞之史考察氏 (Scatchard) 分析 (圖 24B) 得到 IFN $_{\alpha A}$ 之清楚 Kd 值 4.45×10^{-11} M, 類似於先前所報告者 (6.0×10^{-11} M) (Zoon, 等人, 1986)。 125 I-IFN $_{\alpha A}$ 之總受體濃度 (4.62 pM) 非常類似於得自史考察氏 (Scatchard) 作圖之 125 I-IFN $_{\tau}$ (4.22 pM) 值。結果顯示 IFN $_{\tau A}$ 對於 MDBK 細胞上之 IFN 受體具有較 IFN $_{\tau}$ 低 10 倍之 Kd。進而, 結果顯示此結合親和力中之基本差異成為 ifn $_{\tau}$ 無法 "競爭" 受體並阻斷 IFN $_{\alpha A}$ 毒性之原因。

五、發明說明 (174)

D. 125 I-標定之 IFN τ 及 IFN α 之競爭性結合至 MDBK 細胞。

競爭性結合實驗被施行以確認 IFN τ 及 IFN α A 結合至相同的受體。六孔培養皿中長滿之單層 MDBK 細胞,三份方式,與標示濃度之未標定 IFN α A 或 IFN τ 及 $0.2 \text{ nM } ^{125}$ I-IFN τ (圖 25A)或 $0.02 \text{ nM } ^{125}$ I-IFN α A (圖 25B)進行培養。數值係以缺少競爭物下所測定之對照組特异性結合百分比方式呈現。100%值表示針對 125 I-IFN τ 為 $1673 \pm 51 \text{ cpm}$ (平均值 \pm SE)及針對 125 I-IFN α A 為 $1255.7 \pm 16.3 \text{ cpm}$ (平均值 \pm SE) 之平均特异性結合。係在針對 125 I-IFN τ 為 200 nM 未標定 IFN τ 存在下所測定 (11%非特异性結合)及針對 125 I-IFN α A 為 20 nM 未標定 IFN α A 存在下所測定 (5%非特异性結合)並自總結合中減去。

IFN α A 為 125 I-IFN τ 結合至 MDBK 細胞之有力競爭物 (圖 25A)。事實上,IFN α A 在抑制 125 I-IFN τ 達 50%程度之結合中要比 IFN τ 本身更有效 40 倍。相似的結果可在重組人類 IFN α D 被使用作為競爭物時得到。使用 125 I-IFN α A 之交互-競爭分析 (圖 25B)再次顯示 IFN α A 在替換 125 I-IFN α A 達 50%程度中要比 IFN τ 更有效

五、發明說明 (155)

> 40 倍。這些數據顯示 IFN α A 對於 MDBK 細胞上之 IFN 受體要比 IFN τ 具有較高之親和力，該結果與低 10 倍之 Kd 值相符。甚而，競爭實驗之結果提供過多 (5:1) IFN τ 無法阻斷 IFN α A 對於 MDBK 細胞之細胞毒性效果的解釋。

E. 抗 IFN τ 之 N-或 C-端之抗血清抑制 IFN 之結合至 MDBK 細胞

對抗如實施例 17 中所述 IFN τ 肽 IFN τ (1-37) (N-端； SEQ ID NO:5) 及 IFN τ (139-172) (C-端； SEQ ID NO:10) 所提引之兔子抗血清針對其阻斷 IFN α 及 IFN τ 結合至 MDBK 細胞之能力進行試驗。96 孔培養皿中長滿之單層 MDBK 細胞與 0.3 μ M 生物素化 IFN α 或 IFN τ 於含有 5% 胎牛血清及 1:30 稀釋之適當抗血清的磷酸-緩衝鹽水 (PBS) 中室溫下進行培育達 3 小時。利用含有 5% 胎牛血清的磷酸-緩衝鹽水加以清洗後，培養皿利用 "EXTRAVIDIN"-鹼性磷酸共軛物進行發色，其使用磷酸 p-硝基苯基酯作為受質 (Sigma Chemisal Co., St. Louis, MO)。IFN α 及 IFN τ 依據製造商說明利用 Immunopure NHS-LC-生物素化套組 (Pierce) 進行生物素化。特異性結合如上所述針對 ¹ ² ⁵ I-標定之 IFN 進行測定。

結果顯示於圖 26 中。實心條柱表示 IFN τ 及 IFN α A

五、發明說明 (156)

結合至 MDBK 細胞受到對抗 N-端所提引抗血清之抑制作用，而斜線條柱表示受到對抗 C-端所提引抗血清之抑制作用。數據以平均吸光度 \pm SD 方式表示。對照組檢體系利用前免疫血清加以處理（空心條柱）。

數據顯示針對 N-端肽 IFN τ (1-37) (SEQ ID NO :5) 之抗血清顯著地阻斷 IFN τ 之結合至 MDBK 細胞，但不阻斷 IFN α 之結合。相反地，針對 C-端肽 IFN τ (139 -172) (SEQ ID NO:10) 則阻斷 IFN τ 與 IFN α 之結合。這些發現與 IFN τ (1-37) 包含 IFN τ 所特有之表位且有助於 MDBK 細胞上 IFN τ 之結合與生物學活性的理論一致。甚而，數據顯示 IFN τ 與 IFN α 之 N 端的這種差別性交互作用至少部分說明對於 MDBK 細胞上受體之差別性競爭。

F. IFN τ 及 IFN α A 在 MDBK 細胞上之劑量 - 反應 / 佔據曲線。

針對 (i) 最大抗病毒活性百分比，(ii) 最大細胞毒性百分比，及 (iii) 針對 MDBK 細胞上 IFN τ 及 IFN α A 之最大結合百分比之劑量 - 反應 / 佔據曲線係使用以上所述之數據加以計算並於圖 27A (IFN τ) 及 27B (IFN α A) 中以濃度之函數方式加以繪製。抗病毒活性如實施例 2 中所述係經由使用水泡口腔炎病毒之細胞致病性 - 效果 - 抑制分析加以定

五、發明說明 (157)

量 (Armstrong 1981), 並使用 2×10^8 單位/毫克之數值針對 IFN α A 加以常態化。得自細胞毒性劑量-反應曲線及飽和結合曲線之數據以最大值百分比方式製圖。濃度係從抗病毒單位加以決定, 其針對 MDBK 細胞上之 IFN α A 使用 2.0×10^8 單位/毫克及針對 IFN τ 使用 0.8×10^8 單位/毫克之特異活性。符號使用如下: 最大抗病毒活性百分比 (○), 最大細胞毒性百分比 (□), 及最大結合百分比 (◇)。

結果證實細胞毒性與飽和結合至受體相關, 而抗病毒活性涉及受體之分次 (fractional) 佔據。換句話說, 毒性與 Kd 值有關。IFN α A 以大於 IFN τ 10 倍之親和力結合至 MDBK 細胞且在遠遠較低之濃度下具有毒性。兩種 IFN 之特異性抗病毒活性為相似的, 針對 IFN α A 之蛋白質為 2×10^8 單位/毫克及針對 IFN τ 為 0.8×10^8 單位/毫克, 其與誘導最大抗病毒活性伴隨僅少部分受體佔據互相一致。

G. 由 IFN τ 及 IFN α A 所誘導之 Tyk2, Stat1 α 及 Stat2 磷酸化。

IFN 之結合至受體係在細胞內經由訊號傳導機構進行轉譯, 其涉及一套由磷酸化所活化之酪胺酸激酶及轉錄因子。因此施行實驗以決定 IFN α 及 IFN τ 之結合差異在第 I 型受體-相關性酪胺酸激酶 Tyk2 及轉錄因子 Stat1 α 及

五、發明說明 (158)

Stat2 活化中之改變是否明顯。

於 RPMI 1640 培養基中之 Daudi 細胞 (每 1 毫升檢體 $4-5 \times 10^7$ 細胞) 係利用 IFN α A 或 IFN γ 以 5000 單位 / 毫升在 37°C 加以刺激或靜置未處理達 4 分鐘 (Tyk2) 或 10 分鐘 (Stat1 α 及 Stat2)。然後細胞在 500 微升含有 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 20 mM B-磷酸甘油酯, 2 mM Na₃VO₄, 0.05 mM p-硝基苯基-p-胍基苯甲酸酯 (得自於二甲基甲醯胺之儲備溶液), 亮肽素 (leupeptin) (10 微克 / 毫升), 胃蛋白酶抑制素 (pepstatin) (10 微克 / 毫升), 抑肽酶 (aprotinin) (10 微克 / 毫升), 苄咪 (5 微克 / 毫升), 1 mM 苯基甲烷磺醯氟, 10% (體積 / 體積) 甘油, 及 1% (體積 / 體積) "NONIDET P40" 之冰冷溶解緩衝液於 4 °C 下進行溶解達 20 分鐘。

利用 1 微克之抗-Tyk2 抗體, 或 1 微克抗-Stat1 α 及 1 微克抗-Stat2 抗體之混合物進行萃取物 (500 微升) 進行免疫沉澱及免疫轉漬後, 轉漬紙利用單株抗磷酸酪胺酸 (抗-PY) 抗體 (4G10) 進行探測且 Tyk2, Stat1 α 及 Stat2 之酪胺酸磷酸化係利用 ECL (Amersham) 加以偵測。然後該轉漬紙進行移除抗-PY 並以針對 Tyk2 蛋白之抗體或以針對 Stat1 α 及 Stat2 之抗體混合物進行再探測。

五、發明說明 (15f)

結果顯示 IFN τ 在 Tyk2 之磷酸化中與 IFN α 一樣有效。在未受刺激細胞及利用 IFN 加以刺激之細胞中 Tyk2 蛋白質之水平上並未觀察到差異。甚而, IFN τ 與 IFN α 可誘導 Stat1 α 及 Stat2 二者相當的磷酸化水平。再次地, 自受刺激細胞或未受刺激之細胞進行免疫沉澱得到之 Stat1 α 及 Stat2 蛋白質水平並未觀察到差異。因此, IFN τ 在活化這些與第 I 型受體相關蛋白之訊號傳導中, 在維持其與 IFN α 類之結構及功能相似性中均類似於 IFN α 。

實施例 19

IFN τ 之細胞性與抗病毒性效果之進一步分析

A. HIV 抗-病毒效果

IFN τ 對抗 HIV 之抗病毒效果係經由利用不同份量之重組羊 IFN τ (r-OvIFN τ) 或重組人類 IFN α 2a 在感染 HIV 的時候處理人類 PBMC 細胞而進行評估。IFN τ 在整個實驗中均存在。在第 7 天及第 14 天, p24 之製造進行測定(藉由 ELISA (Wang, 等人, 1988, 1989) 並與零藥物對照組進行比較。此分析結果呈現於表 11 中。

五、發明說明 (160)

表 11

藥物份量 單位 / 毫升		抑制 %	抑制 %
IFN α 2a	IFN τ	第 7 天	第 14 天
10	26	58%, 48%	91%, 91%
		48%, 45%	88%; 59%
100	260	68%, 74%	94%, 91%
		58%, 51%	82%, 70%
1,000	2600	89%, 86%	97%, 93%
		65%, 68%	87%, 79%
10,000	26,000	90%, 86%	99%, 99%
		77%, 85%	77%, 96%
		85%, 84%	96%, 86%

得自這些實驗之數據支持以下結論,在相當低濃度下,IFN α 2a 與 IFN τ 在刺激人類淋巴球中 HIV 之複製中均為有效的。

五、發明說明 (161)

B. PBMC 中的活體外細胞毒性試驗

人類 PBMC 以 5×10^5 細胞/毫升進行接種。細胞在第 0 天利用 3 微克/毫升之 PHA 加以刺激。細胞利用重組人類 IFN α 2A (以 10, 100, 1,000 及 10,000 單位/毫升之濃度) 及 IFN γ (以 2.6, 26, 260, 2,600, 26,000, 260,000, 及 2,600,000 單位/毫升之濃度) 以 200 微升/孔 (每種濃度作 4 份複製, 使用 96 孔平底培養皿) 加以處理。對照組培養物未給予干擾素。培育 4 天之後, 細胞使用 $1 \mu\text{Ci}$ /孔之 ^3H -胸苷進行脈衝達 9 小時。細胞進行收穫且標定胸苷之納入 DNA 進行測定 (圖 8)。

經由測量任何濃度之 IFN γ 時胸苷之攝入並未觀察到細胞毒性。然而 rHuIFN α 2 在 1,000 單位/毫升時對細胞有毒性。

在第二項實驗中, 相同的人類 PBMC 利用 100 單位/毫升或 10,000 單位/毫升之或者 IFN γ 或者人類 IFN α 2A 加以處理。培育 3 天或 8 天後, 存活細胞經由流式細胞光度術加以計算。分析結果呈現於表 12 中。

表 12

- 164 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (16)

處理 (單位 / 毫升)	存活細胞數目 x 10,000	
	第 3 天	第 8 天
未處理	735	840
IFN τ 100 單位 / 毫升	745	860
IFN τ 10,000 單位 / 毫升	695	910
IFN α 2a 100 單位 / 毫升	635	750
IFN α 2a 10,000 單位 / 毫升	680	495

在利用 IFN τ 加以處理之細胞中未觀察到細胞毒性。然而，IFN α 2a 處理之細胞中在第 3 天有 10% 的細胞死亡且在第 8 天有 49% 細胞死亡。

C. 肝細胞中抑制 B 型肝炎病毒 DNA 之複製

使用之細胞株，HepG2-T14，為一衍生自利用 B 型肝炎病毒 (HBV) 加以穿染之肝細胞的人類細胞。該細胞株半定性地製造 HBV 病毒：經過一段時間細胞株之製造 HBV 細胞

五、發明說明 (16)

內 DNA 及分泌之病毒減少。為了增加 HBV DNA 及病毒之製造至最大限，細胞利用 deAZA-C (5-氮雜胞苷；Miyoshi, 等人, 1992) 加以前處理以刺激病毒之製造。處理達 2-3 天且誘導份量約為 2 的倍數。

然後細胞利用水平 0, 5, 000, 10, 000, 20, 000 及 40, 000 單位每毫升之 IFN α 或 IFN τ 加以處理。

，相較於無藥物之對照組，所有水平之 IFN α 或 IFN τ 均降低 DNA 製造達約 2 之倍數。

D. 肝細胞中抑制肝特異性信使 RNA 之製造

肝細胞株 HepG2-T14 (如上所述) 針對 IFN α 及 IFN τ 對於肝特異性 mRNA 製造之效果進行檢視。細胞以濃度 0, 5, 000, 10, 000, 20, 000, 及 40, 000 單位每毫升之 IFN α 或 IFN τ 進行培育。負責肝細胞特異性蛋白 Apo E 及 Apo A1 之信使 RNA 係經由雜交分析進行偵測 (Sambrook, 等人, 1989; Maniatis, 等人, 1982), 其使用特異於這兩種 mRNA 之探針 (Shoulders, 等人, 1982; Wallis, 等人, 1983)。

利用高達 40, 000 單位之 IFN α 或 IFN τ 對於 Apo E 或 Apo A1 mRNA 製造並未觀察到降低 mRNA 之製造。此結

五、發明說明 (164)

果建議前述實驗中病毒性 DNA 複製之降低並非肇因於 IFN 對於細胞性常態維持 (house-keeping) 活性之效果；反而，降低可能是肇因於宿主細胞中之特異性抑制病毒複製。

E. $IFN\beta$, $IFN\gamma$ 及 $IFN\tau$ 之活體外毒性 - L929 細胞分析

IFN 處理之毒性係在活體外使用老鼠 L929 細胞株進行測定。L929 細胞利用 6000 單位/毫升至 200,000 單位/毫升之 $0vIFN\gamma$ 或 $MuIFN\beta$ 加以處理。干擾素是在第 0 時被加入且細胞進行培養達 72 小時並利用結晶紫加以染色。存活細胞之百分比係經由在 405 微毫米下測量吸光度而進行測定。

示範性數據被顯示於圖 21 中。數值以存活力百分比 ± 標準差方式呈現，其中百分之百相等於單獨利用培養基加以處理之 L929 細胞存活力。在 6000 單位/毫升下， $IFN\beta$ - 處理細胞表現 $77.0 \pm 0.6\%$ 存活力。L929 細胞之存活力在 $IFN\beta$ 濃度增加時以劑量 - 依賴性方式降低。相反地，L929 細胞在任何試驗濃度 $IFN\tau$ 下之存活力未顯示降低。這些數據顯示，不同於 $IFN\beta$, $IFN\tau$ 在活體外高濃度下缺少毒性。

五、發明說明 (165)

綜合而言，以上總結之結果證明 $IFN\tau$ 在 $IFN\beta$ 誘導活體外及活體內毒性之濃度下基本上為無毒性的。

F. $IFN\beta$, $IFN\gamma$ 及 $IFN\tau$ 之活體內毒性-細胞計數及重量改變

利用 $IFN\tau$, $IFN\beta$ 及 $IFN\alpha$ (10^5 單位/注射)之活體內處理對於 NZW 老鼠中總白血球細胞 (WBC), 總淋巴球計數及重量測量之效果係如下進行評估。干擾素 ($0vIFN\tau$, $MuIFN\beta$, 及 $MuIFN\alpha$) 以 10^5 單位於總體積 0.2 毫升 PBS 中之濃度腹腔內方式注射 (i.p.) 入數組新英格蘭白 (NZW) 老鼠 Jackson Laboratories, Bar Harbor , ME)。三至四隻老鼠被包含於每一組中。白血球細胞 (WBC) 計數係在注射前及其後選擇之時間點 (典型地 12 及 24 小時) 使用血球細胞計數器及標準技術進行測定。分化 WBC 計數係在 Wright-Giemsa 染色之血液抹片上施行。注射前, 動物之重量分佈自 20 至 23 克。

結果總結於下列表 13 中。

表 13

經由白血球細胞計數及重量改變

百分比所測量之干擾素的活體內毒性

五、發明說明 (166)

IFN	細胞計數 (細胞數目 $\times 10^3$)				淋巴球	注射後 24
	注射前		注射後 12 小時		下降%	小時之重量
	總 WBC	淋巴球	總 WBC	淋巴球		改變 %
無	7.3 \pm 1.0	6.4 \pm 0.7	8.0 \pm 0.8	7.1 \pm 0.7	0	+0.5 \pm 0.7
τ	6.7 \pm 0.7	5.9 \pm 0.6	6.7 \pm 0.5	5.8 \pm 0.4	1.7	+1.3 \pm 0.5
β	7.0 \pm 1.4	6.0 \pm 0.5	6.8 \pm 0.8	4.1 \pm 0.3	31.7	-20.0 \pm 1.0
α	6.0 \pm 0.8	5.2 \pm 0.7	4.8 \pm 0.5	2.3 \pm 0.2	55.8	-8.5 \pm 2.0

IFN τ - 處理及未處理之老鼠間並未觀察到 WBC 計數，淋巴球計數或重量改變上之明顯差異。相反地，INF β - 處理之老鼠在注射後 12 小時之淋巴球計數中呈現 31.7 % 之下降，其持續達至少接下來的 12 小時。IFN α - 處理之老鼠

五、發明說明 (167)

在注射後 12 小時呈現 55.8% 淋巴球下降及明顯的失重。這些數據顯示，不同於 $INF\beta$ 及 $IFN\alpha$ ， $IFN\tau$ 在以上濃度時缺乏活體內毒性，如周邊血球細胞計數及重量測量所證明。

實施例 20

分離雜合性 (hybrid) 干擾素融合蛋白

與抗- β 半乳糖苷酶結合之瓊脂糖 4B 小珠係購自 Promega。該小珠被裝填於 2 毫升管柱中並連續利用含有 0.02% 疊氮化鈉及 10 毫升 TX 緩衝液 (10 mM Tris 緩衝液，pH 7.4，1% 抑肽酶 (aprotinin)) 之磷酸鹽 - 緩衝之鹽水加以清洗。

一雜合性 (hybrid) 干擾素編碼序列被選擇入 λ gt11 之多連接子位置。嵌合性 (chimeric) 編碼序列同譯讀架內方式與 λ gt11 中胺基端之 β 半乳糖苷酶放在一起。以 gt11/IFN 加以感染之潛溶原被用來接種 500 毫升之 NZYDT 培養液。培養物在 32 °C 下伴隨空氣曝露進行培育至 O.D. 值約 0.2 至 0.4，然後快速移至 43 °C 水槽中達 15 分鐘以誘導 gt11 肽之合成，並進而在 37 °C 下培育達 1 小時。細胞經由離心而被沉澱下來，懸浮於 10 毫升之溶解緩衝液中 (10 mM Tris, pH 7.4, 其包含 2% "TRITON

五、發明說明 (168)

X-100"及使用前才加入之 1 %抑肽酶 (aprotinin))。

懸浮之細胞被冷凍於液態氮中然後加以解凍,其導致基本上完全的細胞溶解。溶解物利用 DNaseI 加以處理以切割細菌的及噬菌體的 DNA,如溶解物中逐漸失去黏度所證明。不溶解之物質經由離心加以除去。

澄清之溶解物質被裝填至瓊脂糖管柱上,管柱兩端被封閉,且管柱被放置於迴轉振盪器室溫下達 2 小時及 4°C 下達 16 小時。管柱沉澱後,其利用 10 毫升之 TX 緩衝液加以清洗。融合蛋白利用 0.1 M 碳酸鹽/碳酸氫鹽緩衝液, pH10 進行洗提。典型地, 14 毫升的洗提緩衝液通過管柱,且融合蛋白是在最初 4-6 毫升之洗提液中被洗提出來。

含有融合蛋白之洗提液於 "CENTRICON-30"柱體 (Amicon, Danvers, Mass.)中進行濃縮。最終的蛋白濃縮物被再懸浮於,例如,400 微升之 PBS 緩衝液中。蛋白純度係經由 SDS-PAGE 進行分析。

對於多株抗體,純化之融合蛋白於 Freund 氏佐劑中以皮下方式被注射至兔子中。大約 1 毫克之融合蛋白在第 0 天及 21 天進行注射,且兔子血清典型地在第 6 及 8 週進行收集。

五、發明說明 (169)

實施例 21

抗-hybIFN 抗體之製備

A. 谷胱甘肽-S-轉移酶融合蛋白之表現

一雜合性 (hybrid) 干擾素編碼序列之嵌合性 (chimeric) 核酸分子被選殖入 pGEX 載體中 (Boyer, 等人, 1992; Frangioni, 等人, 1993; Guan, 等人, 1991; Hakes, 等人, 1992; Smith, D.B. 等人, 1988)。pGEX 載體 (Smith, D.B. 等人, 1988) 經由利用谷胱甘肽-S-轉移酶蛋白 (GST--sj26 編碼序列) 同譯讀架內方式插入凝血酶切割序列而加以修飾。此載體被命名為 pGEXthr。雜合性 (hybrid) IFN (hybIFN) 編碼序列與 sj26-凝血酶編碼序列 (Guan, 等人, 1991; Hakes, 等人, 1992) 以同譯讀架內方式放在一起。

雜合性 (hybrid) 干擾素編碼序列被連接至直線化之 pGEXthr 載體。連接混合物被轉形至大腸桿菌內且安比西林抗性菌落進行選擇。質體係分離自安比西林抗性菌落並經由限制酶切割進行分析以確認含有 IFN 插入物之菌落 (載體命名為 pGEXthr-hybIFN)。

五、發明說明 (170)

大腸桿菌株 XL-I Blue 係利用 pGEXthr-hybIFN 加以轉形並生長於 37°C 下過夜。DNA 係製備自隨意挑選之菌落。插入編碼序列之存在可典型地經由 (i) 限制切割圖譜排列, (ii) 使用標定之 hybIFN 探針進行雜交篩選 (即 Southern 分析), 或 (iii) 直接 DNA 序列分析而加以確認。

B. 融合蛋白之部分純化。

pGEXthr-hybIFN 選殖株過夜生長。過夜之培養物利用含有安比西林之 LB 培養基加以稀釋 1:10 並生長於 37°C 下達 1 小時。或者, 過夜培養物進行稀釋 1:100 並生長至加入 IPTG (異丙基- β -硫代半乳糖苷) 前 OD 為 0.5-1.0。IPTG (GIBCO-BRL, Gaithersburg MD) 被加至最終濃度 0.2-0.5 mM 以供誘導蛋白合成且培育典型地持續達 2-5 小時, 偏好為 3.5 小時。

細菌細胞係經由離心加以收穫並懸浮於 1/100 培養體積之 MTPBS (150 mM NaCl, 16 mM Na₂ HPO₄, 4 mM Na₂ HPO₄)。細胞經由溶菌酶, 音波振盪或法式 (French) 擠壓而加以溶解, 且溶解物經由離心而清除細胞殘渣。

一小部分得自 IPTG-誘導之 pGEXthr-hybIFN-包含細胞

五、發明說明 (17)

培養物之懸浮液以及一小部分得自 IPTG-誘導之 pGEXthr-載體單獨培養物之懸浮液利用 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳接著經由西方移漬法進行分析,如下所述。

需要時,萃取物可經由超過濾加以濃縮,其使用例如 "CENTRICON 10" 濾器。

或者,融合蛋白可經由一谷胱甘肽瓊脂糖親和管柱進行部分純化,如 Smith, D.B., 等人, 1988 中所詳述。此方法中, 100 毫升之培養物係過夜生長。培養物被稀釋至 1 公升,且細胞在 37°C 下生長另一小時。融合蛋白之表現係使用 IPTG 加以誘導。受誘導之培養物在 37°C 下生長達 3.5 小時。細胞進行收穫且音波振盪器被使用來溶解細胞。細胞殘渣進行沉澱且澄清溶解物被裝填至谷胱甘肽 "SEPHAROSE" 管柱上。該管柱利用數倍管柱之體積加以清洗。融合蛋白可伴隨減少之谷胱甘肽自親和力管柱被洗提出來並進行透析。IFN 可經由凝血酶之處理而自結合之雜合性 (hybrid) 蛋白被釋放出來。結合之雜合性 (hybrid) 蛋白的 sj26 及 hybIFN 片段之後可經由管柱或凝膠上之大小分別法加以分開。

或者,結合之雜合性 (hybrid) 蛋白的 hybIFN 部分可經由凝血酶之處理而自管柱被釋放出來 (Guan, 等人, 1991;

五、發明說明 (172)

Hakes, 等人, 1992)。

C : 對抗融合蛋白之抗體。

經純化 Sj26/IFN 融合蛋白於 Freund 氏佐劑中皮下方式被注射至兔子中。大約 1 毫克之融合蛋白在第 0 天及 21 天進行注射, 且兔子血清典型地在第 6 及 8 週進行收集。第二隻兔子利用得自對照組細菌溶解物之純化 sj26 蛋白以相似方法進行免疫。

得自以下細胞培養物之少量溶解物進行製備: (1) 利用 pGEXthr 及含有 hybIFN 插入物之 pGEXthr 加以感染之 KM392 細胞; 及 (2) 利用含有 hybIFN 插入物之 λ gt11 加以感染之細胞。少量溶解物及商業來源之 β -半乳糖苷酶係經由 SDS-PAGE 加以分別開, 且條帶被轉移至硝基纖維素濾紙以供西方移漬法之用 (Sambrook, 等人, 1989; Ausubel, 等人, 1988)。

總結期望之結果, 得自對照組 (Sj26) 兔子之血清對個別之 sj26 及 sj26 融合蛋白抗原為免疫活性的。得自利用 Sj26/hybIFN 融合蛋白所免疫之動物的血清可與所有的 Sj-26 及含有 hybIFN 編碼序列之 β -半乳糖苷酶融合蛋白進行反應, 其顯示伴隨 hybIFN 抗原之特異性免疫反應存在

五、發明說明 (173)

。沒有血清被期望與 β -半乳糖苷酶進行免疫反應。

存在於利用 Sj26/hybIFN 加以免疫之動物所得到血清中之抗-hybIFN 抗體可經由親和力色層分析加以純化(使用固定之重組性製造 hybIFN 作為結合子,基本上如以上供抗- β -半乳糖苷酶抗體之實施例 12 中所述)。

雖然本發明已利用針特殊方法及具體實施例之參考文獻加以描述,將被認知的是可做不同的修飾及改變而不背離本發明。

序列

(1)一般資料:

(i)申請者:佛羅里達大學

(ii)發明名稱:雜合性干擾素組成物及使用方法

(iii)序列數:55

(iv)通訊住址:

五、發明說明 (174)

(A) 收信者 : Dehlinger & Associates

(B) 街 : 350 Cambridge Ave., Suite 250

(C) 市 : Palo Alto

(D) 州 : CA

(E) ZIP : 94306

(v) 電腦可辨識的形式

(A) 媒體種類 : 磁碟片

(B) 電腦 : IBM PC 相容

(C) 作業系統 : PC-DOS/MS-DOS

(D) 軟體 : Patent In Release

#1.0, 版本 #1.25

(vi) 目前申請資料 :

五、發明說明 (175)

(A) 申請號碼 : US 08/631,328

(B) 申請日 : 11-April-1997

(C) 分類 :

(viii) 律師 / 代理人

(A) 名字 : Sholtz, Charles K.

(B) 註冊號碼 : 38,615

(C) 參考 / 卷宗號碼 : 5600-0201.41

(ix) 電子通訊資料

(A) 電話 : 415-324-0880

(B) 電話傳真 : 415-324-0960

(2) SEQ ID NO:1之資料 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (176)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：516 個鹽基對

(B) 種類：核 酸

(C) 股性：雙股

(D) 拓樸學：環狀

(ii) 分子種類：DNA

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(A) 生物：Ovis aries

(B) 品種：家畜品種

(D) 發育階段：囊胚 (胚泡)

(F) 組織種類：滋養外胚層

(G) 細胞型態：單核性 滋養外胚層 細胞

(vii) 立即來源：

(B) 株落：oTP-1a

(viii) 基因體位置：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (177)

(C) 單位：鹽基對

(ix) 特徵：

(A) 名稱/關鍵：CDS

(B) 位置：1..516

(x) 公開資料：

(A) 作者：Ott, Troy L

Van Heeke, Gino

Johnson, Howard M

Bazer, Fuller W

(B) 標題：Cloning and Expression in Saccharomyces
cerevisiae of a Synthetic Gene for the Type I
Trophoblast Interferon ovine Trophoblast
Protein-1: Purification and Antiviral Activity

(C) 期刊：J. Interferon Res.

(D) 冊數：11

(F) 頁數：357-364

(G) 日期：1991

(K) 在 SEQ ID NO:1之相關殘基：自 1 至 516

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.1:

-180-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (178)

TGC TAC CTG TCG CGA AAA CTG ATG CTG GAC GCT CGA GAA AAT TTA AAA 48

Cys Tyr Leu Ser Arg Lys Leu Met Leu Asp Ala Arg Glu Asn Leu Lys

1 5 10 15

CTG CTG GAC CGT ATG AAT CGA TTG TCT CCG CAC AGC TGC CTG CAA GAC 96

Leu Leu Asp Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Ser Cys Leu Gln Asp

20 25 30

CCG AAA GAC TTC GGT CTG CCG CAG GAA ATG GTT GAA GGT GAC CAA CTG 144

Arg Lys Asp Phe Gly Leu Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Asp Gln Leu

35 40 45

CAA AAA GAC CAA GCT TTC CCG GTA CTG TAT GAA ATG CTG CAG CAG TCT 192

Gln Lys Asp Gln Ala Phe Pro val Leu Tyr Glu Met Leu Gln Gln Ser

50 55 60

TTC AAC CTG TTC TAC ACT GAA CAT TCT TCG GCG GCT TGG GAC ACT ACT 240

Phe Asn Leu Phe Tyr Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr

65 70 75 80

CTT CTA GAA CAA CTG TGC ACT GGT CTG CAA CAG CAA CTG GAC CAT CTG 288

Leu Leu Glu Gln Leu Cys Thr Gly Leu Gln Gln Gln Leu Asp His Leu

85 90 95

GAC ACT TGC CGT GGC CAG GTT ATG GGT GAA GAA GAC TCT GAA CTG GGT 336

Asp Thr Cys Arg Gly Gln Val Met Gly Glu Glu Asp Ser Glu Leu Gly

100 105 110

AAC ATG GAT CCG ATC GTT ACT GTT AAA AAA TAT TTC CAG GGT ATC TAC 38

五、發明說明 (178)

Asn Met Asp Pro Ile Val Thr Val Lys Lys Tyr Phe Gln Gly Ile Tyr

115

120

125

GAC TAC CTG CAG GAA AAA GGT TAC TCT GAC TGC GCT TGG GAA ATC GTA 432

Asp Tyr Leu Gln Glu Lys Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val

130

135

140

CGC GTT GAA ATG ATG CGG GCC CTG ACT GTG TCG ACT ACT CTG CAA AAA 480

Arg Val Clu Met Met Arg Ala Leu Thr Val Ser Thr Thr Leu Gln Lys

145

150

155

160

CGG TTA ACT AAA ATG GGT GGT GAC CTG AAT TCT CCG 516

Arg Leu Thr Lys Met Gly Gly Asp Leu Asn Ser Pro

165

170

(2) SEQ ID NO:2之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：172 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

五、發明說明 (180)

(C) 個別分離種：成熟 OvIFNtau 蛋白質之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.2:

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

-183-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(181)

Arg Val Glu Met Met Arg Ala Leu Thr Val Ser Thr Thr Leu Gln Lys

145 150 155 160

Arg Leu Thr Lys Met Gly Gly Asp Leu Asn Ser Pro

165

170

(2) SEQ ID NO:3之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：516 個鹽基對

(B) 種類：核酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：cDNA

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：編碼成熟人類干擾素-tau 蛋白質
，HuIFNtau1，之合成性核苷序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.3：

五、發明說明 (182)

TGTGACTTGT CTCAAAACCA CGTTTTGGTT G&TAGAAAGA ACTTAAGACT ACTAGACGAA 60
 ATGAGACGTC TATCTCCACG CTTCTGTCTA CAAGACAGAA AGGACTTCGC TTTGCCTCAG 120
 GAAATGGTTG AAGGTGGCCA ACTACAAGAA GCTCAAGCGA TATCTGTTTT GCACGAAATG 180
 TTGCAACAAA GCTTCAACTT GTTCCACACC GAACACTCTT CGGCCGCTTG GGACACCACC 240
 TTGTTGGAAC AGCTCAGAAC CGGTTTGAC CAACAATTGG ACAACTTGA TGCATGTTTG 300
 GGTCAAGTTA TGGGTGAAGA AGACTCTGCT CTCGGGAGAA CCGGTCCAAC GCTAGCTTTG 360
 AAGAGATACT TCCAAGGTAT CCACGTTTAC TTGAAGGAAA AGGGTTACTC TGA CTGTGCT 420
 TGGGAAACCG TCGTCTAGA AATCATGCGT AGCTTCTCTT CTTTGATCAG CTGCAAGAA 480
 AGATTACGTA TGATGGACGG TGA CTGTGCTG AGCCCA 516

(2) SEQ ID NO:4之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：172 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：一種成熟 HuIFNtau 蛋白質, HuIFNtau1,

五、發明說明 (183)

之胺基酸序列

(xi) 序列描述: SEQ ID NO.4:

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

-186-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (184)

Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Ser Leu Ile Ser Leu Gln Glu

145 150 155 160

Arg Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu Ser Ser Pro

165 170

(2) SEQ ID NO:5之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.2之1-37片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.5：

Cys Tyr Leu Ser Arg Lys Leu Met Leu Asp Ala Arg Glu Asn Leu Lys

5 10 15

-187-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (185)

Leu Leu Asp Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Ser Cys Leu Gln Asp

20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly

35

(2) SEQ ID NO:6之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：31 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.2之34-64片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.6：

Lys Asp Phe Gly Leu Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Asp Gln Leu Gln

5 10 15

-188-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (186)

Lys Asp Gln Ala Phe Pro Val Leu Tyr Glu Met Leu Gln Gln Ser

20

25

30

(2) SEQ ID NO:7之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：31 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.2之62-92片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.7：

Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe Tyr Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp

5

10

15

Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Cys Thr Gly Leu Gln Gln Gln

20

25

30

-189-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (187)

(2) SEQ ID NO:8之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.2之90-122片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.8：

Gln Gln Gln Leu Asp His Leu Asp Thr Cys Arg Gly Gln Val Met Gly

5

10

15

Glu Glu Asp Ser Glu Leu Gly Asn Met Asp Pro Ile Val Thr Val Lys

20

25

30

Lys

五、發明說明 (188)

(2) SEQ ID NO:8之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.2之90-122片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.8：

Gln Gln Gln Leu Asp His Leu Asp Thr Cys Arg Gly Gln Val Met Gly

5 10 15

Glu Glu Asp Ser Glu Leu Gly Asn Met Asp Pro Ile Val Thr Val Lys

20 25 30

Lys

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (189)

(2) SEQ ID NO:9之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：32 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.2之119-150片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.9：

Thr Val Lys Lys Tyr Phe Gln Gly Ile Tyr Asp Tyr Leu Gln Glu Lys

5

10

15

Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Met Met Arg

20

25

30

(2) SEQ ID NO:10之資料：

五、發明說明 (190)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：34 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.2之139-172片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.10：

Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Met Met Arg Ala Leu Thr Val

5

10

15

Ser Thr Thr Leu Gln Lys Arg Leu Thr Lys Met Gly Gly Asp Leu Asn

20

25

30

Ser Pro

(2) SEQ ID NO:11之資料：

(i) 序列特徵：

五、發明說明 (191)

(A) 長度：588 個鹽基對

(B) 種類：核 酸

(C) 股性：雙股

(D) 拓撲學：環狀

(ii) 分子種類：DNA (基因體)

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(v) 原始來源：

(C) 個別分離種：具有領導子序列之 HuIFNtau1 人類干擾素 Tau 編碼序列

(ix) 特徵：

(A) 名稱/關鍵：CDS

(B) 位置：1..585

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.11:

ATG GCC TTC GTG CCC -194-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (192)

Met Ala Phe Val Leu Ser Leu Leu Met Ala Leu val Leu Val Ser Tyr
 1 5 10 15
 GGC CCA GGA GGA TCC CTG GGT TGT GAC CTG TCT CAG AAC CAC GTG CTG 96
 Gly Pro Gly Gly Ser Leu Gly Cys Asp Leu Ser Gln Asn His Val Leu
 20 25 30
 GTT GGC AGG AAG AAC CTC AGG CTC CTG GAC GAA ATG AGG AGA CTC TCC 144
 Val Gly Arg Lys Asn Leu Arg Leu Leu Asp Glu Met Arg Arg Leu Ser
 35 40 45
 CCT CGC TTT TGT CTG CAG GAC AGA AAA GAC TTC GCT TTA CCC CAG GAA 192
 Pro Arg Phe Cys Leu Gln Asp Arg Lys Asp Phe Ala Leu Pro Gln Glu
 50 55 60
 ATG GTG GAG GGC GGC CAG CTC CAG GAG GCC CAG GCC ATC TCT GTG CTC 240
 Met Val Glu Gly Gly Gln Leu Gln Glu Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu
 65 70 75 80
 CAT GAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC AAC CTC TTC CAC ACA GAG CAC TCC 288
 His Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Thr Glu His Ser
 85 90 95
 TCT GCT GCC TGG GAC ACC ACC CTC CTG GAG CAG CTC CGC ACT GGA CTC 336
 Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Arg Thr Gly Leu
 100 105 110
 CAT CAG CAG CTG GAC AAC CTG GAT GCC TGC CTG GGG CAG GTG ATG GGA 384
 His Gln Gln Leu Asp Asn Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln Val Met Gly
 115 120 125

五、發明說明 (193)

GAG GAA GAC TCT GCC CTG GGA AGG ACG GGC CCC ACC CTG GCT CTG AAG 432

Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala Leu Lys

130 135 140

AGG TAC TTC CAG GGC ATC CAT GTC TAC CTG AAA GAG AAG GGA TAG AGC 480

Arg Tyr Phe Gln Gly Ile His Val Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Ser

145 150 155 160

GAC TGC GCC TGG GAA ACC GTC AGA CTG GAA ATC ATG AGA TCC TTC TCT 528

Asp Cys Ala Trp Glu Thr Val Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser

165 170 175

TCA TTA ATC AGC TTG CAA GAA AGG TTA AGA ATG ATG GAT GGA GAC CTG 576

Ser Leu Ile Ser Leu Gln Glu Arg Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu

180 185 190

AGG TCA CCT TGA 588

Ser Ser Pro

195

(2) SEQ ID NO:12之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：195 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

五、發明說明 (194)

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(c) 個別分離種：SEQ ID NO.11(HuIFNtau1)之經預測之
胺基酸編碼序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.12：

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

五、發明說明 (195)

Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Arg Thr Gly Leu

100

105

110

His Gln Gln Leu Asp Asn Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln Val Met Gly

115

120

125

Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala Leu Lys

130

135

140

Arg Tyr Phe Gly Gly Ile His Val Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Ser

145

150

155

160

Asp Cys Ala Trp Glu Thr Val Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser

165

170

175

Ser Leu Ile Ser Leu Gln Glu Arg Leu Ala Met Met Asp Gly Asp Leu

180

185

190

Ser Ser Pro

195

(2) SEQ ID NO:13之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：25 個鹽基對

(B) 種類：核酸

(C) 股性：單股

(D) 拓撲學：線狀

五、發明說明 (19b)

(ii) 分子種類：DNA (合成性)

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：25元體合成性寡核苷

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.13:

CCTGTCTGCA GGACAGAAAA GACTT

25

(2) SEQ ID NO:14之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：25 個鹽基對

(B) 種類：核酸

(C) 股性：單股

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：DNA (合成性)

(vi) 原始來源：

-199-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (19)

(C) 個別分離種：25元體合成性寡核苷

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.14:

TCTGAATTCT GACGATTTCC CAGGC

25

(2) SEQ ID NO:15之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：肽

(iii) 假設性：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.4之1-37片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.15:

-200-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (198)

Cys Asp Leu Ser Gln Asn His Val Leu Val Gly Arg Lys Asn Leu Arg

1 5 10 15

Leu Leu Asp Glu Met Arg Arg Leu Ser Pro Arg Phe Cys Leu Gln Asp

20 25 30

Arg Lys Asp Phe Ala

(2) SEQ ID NO:16之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：31 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：肽

(iii) 假設性：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.4之34-64片段之胺基酸序列

-201-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (619)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.16：

Lys Asp Phe Ala Leu Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu Gln

1 5 10 15

Glu Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser

20 25 30

(2) SEQ ID NO:17之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：31 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：肽

(iii) 假設性：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.4之62-92片段之胺基酸序列

五、發明說明 (200)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.17:

Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp

5 10 15

Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Arg Thr Gly Leu His Gln Gln

20 25 30

(2) SEQ ID NO:18之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：肽

(iii) 假設性：無

(vi) 原始來源：

五、發明說明 (續)

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.4之99-122片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.18:

His Gln Gln Leu Asp Asn Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln Val Met Gly

5

10

15

Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala Leu Lys

20

25

30

Arg

(2) SEQ ID NO:19之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：32 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：肽

(iii) 假設性：無

五、發明說明 (22)

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.4之119-150片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.19：

Ala Leu Lys Arg Tyr Phe Gln Gly Ile His Val Tyr Leu Lys Glu Lys

1

5

10

15

Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Thr Val Arg Leu Glu Ile Met Arg

20

25

30

(2) SEQ ID NO:20之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：34 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：肽

(iii) 假設性：無

五、發明說明 (80)

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.4之139-172片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.20：

Cys Ala Trp Glu Thr Val Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Ser

1 5 10 15

Leu Ile Ser Leu Gln Glu Arg Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu Ser

20 25 30

Ser Pro

(2) SEQ ID NO:21之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：299 個鹽基對

(B) 種類：核 酸

(C) 股性：雙股

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：相對 mRNA之 cDNA

-206-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (204)

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：HuIFNtau6

(ix) 特徵：

(A) 名稱/關鍵：CDS

(B) 位置：1..298

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.21:

C CAG GAG ATG GTG GAG GGC GGC CAG CTC CAC CAG GCC CAG GCC ATC 46

Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu Gln Glu Ala Gln Ala Ile

1 5 10 15

TCT GTG CTC CAC AAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC AAC CTC TTC CAC ACA 94

Ser Val Leu His Lys Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Thr

20 25 30

GAG CGC TCC TCT GCT GCC TGG GAC ACC ACC CTC CTG GAG CAG CTC CGC 142

Glu Arg Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Arg

-207-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (yct)

35	40	45	
ACT GGA CTC CAT CAG CAG CTG GAT GAC CTG GAC GCC TGC CTG GGG CAG 190			
Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asp Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln			
50	55	60	
GTG ACG GGA GAG GAA GAC TCT GCC CTG GGA AGG ACG GGC CCC ACC CTG 238			
Val Thr Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu			
65	70	75	
GCC GTG AAG AGC TAC TTC CAG GGC ATC CAT ATC TAC CTG CAA GAG AAG 286			
Ala Val Lys Ser Tyr Phe Gln Gly Ile His Ile Tyr Leu Gln Glu Lys			
80	85	90	95
GGA TAC AGS CAC T			299
Gly Tyr Ser Asp			

(2) SEQ ID NO:22之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：99 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

五、發明說明 (206)

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.21(HuIFNtau6)之經預測之
胺基酸編碼序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.22：

Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu Gln Glu Ala Gln Ala Ile Ser

1 5 10 15

Val Leu His Lys Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Thr Glu

20 25 30

Arg Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Arg Thr

35 40 45

Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asp Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln val

50 55 60

Thr Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala

65 70 75 80

Val Lys Ser Tyr Phe Gln Gly Ile His Ile Tyr Leu Gln Glu Lys Gly

85 90 95

Tyr Ser Asp

(2) SEQ ID NO:23之資料：

五、發明說明 (20)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：288 個鹽基對

(B) 種類：核 酸

(C) 股性：雙股

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：相對 mRNA 之 cDNA

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：HuIFNtau7

(ix) 特徵：

(A) 名稱 / 關鍵：CDS

(B) 位置：1..286

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.23:

五、發明說明 (708)

C CAG GAG ATG GTG GAG GTC AGC CAG TTC CAG GAG GCC CAG GCC ATT 46

Gln Glu Met val Glu Val Ser Gln Phe Gln Glu Ala Gln Ala Ile

1 5 10 15

TCT GTG CTC CAT GAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC AAC CTC TTC CAC AAA 94

Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Lys

20 25 30

GAG CGC TCC TCT GCT GCC TGG GAC ACT ACC CTC CTG GAG CAG CTC CTC 142

Glu Arg Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Leu

35 40 45

ACT GGA CTC CAT CAG CAG CTG GAT GAC CTG GAT GCC TGT CTG GGG CAG 190

Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asp Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln

50 55 60

TTG ACT GGA GAG GAA GAC TCT GCC CTG GGA AGG ACG GGC CCC ACC CTG 288

Leu Thr Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu

65 70 75

GCC GTG AAG AGC TAC TTC CAG GGC ATC CAT GTC TAC CTG CAA GAG AAG 286

Ala Val Lys Ser Tyr Phe Gln Gly Ile His Val Tyr Leu Gln Glu Lys

80 85 90 95

GG 288

(2) SEQ ID NO:24之資料：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (20)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：95 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.23 (HuIFNtau7) 之經預測之
胺基酸編碼序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.24：

Gln Glu Met Val Glu Val Ser Gln Phe Gln Glu Ala Gln Ala Ile Ser

1 5 10 15

Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Lys Glu

20 25 30

Arg Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Leu Thr

35 40 45

Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asp Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln Leu

50 55 50

Thr Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala

-212-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (2/10)

65		70		75		80								
Val	Lys	Ser	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ile	His	Val	Tyr	Leu	Gln	Glu	Lys
				85					90					95

(2) SEQ ID NO:25之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：307 個鹽基對

(B) 種類：核 酸

(C) 股性：雙股

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：相對 mRNA 之 cDNA

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：HuIFNtau4

(ix) 特徵：

五、發明說明 (x¹)

(A) 名稱 / 關鍵 : CDS

(B) 位置 : 2...307

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO.25:

C CAG GAG ATG GTG GAG GGT GGC CAG CTC CAG GAG GCC CAG GCC ATC 46

Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu Gln Glu Ala Gln Ala Ile

1 5 10 15

TCT GTG CTC CAC GAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC AAC CTC TTC CAC ACA 94

Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Thr

20 25 30

GAG CAC TCC TCT GCT GCC TGG GAC ACC ACC CTC CTG GAG CAG CTC CGC 142

Glu His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Arg

35 40 45

ACT GGA CTC CAT CAG CAG CTG GAT GAC CTG GAT GCC TGC CTG GGG CAG 190

Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asp Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln

50 55 60

GTG ACG GGA GAG GAA GAC TCT GCC CTG GGA AGG ACG GGC CCC ACC CTG 238

Val Thr Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu

65 70 75

GCC ATG AAG ACG TAT TTC CAG GGC ATC CAT GTC TAC CTG AAA GAG AAG 286

Ala Met Lys Thr Tyr Phe Gln Gly Ile His Val Tyr Leu Lys Glu Lys

-214-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (5/7)

80	85	90	95
GGA TAT AGT GAC TGC GCC TGG			307
Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp			
	100		

(2) SEQ ID NO:26之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：102 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.25(HuIFNtau4)之經預測之
胺基酸編碼序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.26：

Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu Gln Glu Ala Gln Ala Ile Ser

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (213)

1	5	10	15
Val	Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Thr Glu		
	20	25	30
His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Arg Thr			
	35	40	45
Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asp Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln Val			
	50	55	60
Thr Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala			
65	70	75	80
Met Lys Thr Tyr Phe Gln Gly Ile His Val Tyr Leu Lys Glu Lys Gly			
	85	90	95
Tyr Ser Asp Cys Ala Trp			
	100		

(2) SEQ ID NO:27之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：294 個鹽基對

(B) 種類：核 酸

(C) 股性：雙股

(D) 拓撲學：線狀

五、發明說明 (214)

(ii) 分子種類：相對 mRNA 之 cDNA

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：HuIFNtau5

(ix) 特徵：

(A) 名稱/關鍵：CDS

(B) 位置：2..292

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.27:

C CAG GAG ATG GTG GAG GGT GGC CAG CTC CAG GAG GCC CAG GCC ATC 46

Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu Gln Glu Ala Gln Ala Ile

1 5 10 15

TCT GTG CTC CAC GAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC AAC CTC TTG CAC ACA 94

Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Thr

20 25 30

GAG CAC TCC TCT GCT GCC TGG GAC ACC ACC CTC CTG GAG CAG CTC CGC 142

-217-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (2/5)

Glu His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Arg

35

40

45

ACT GGA CTC CAT CAG CAG CTG GAT GAC CTG GAT GCC TGC CTG GGG CAG 190

Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asp Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln

50

55

60

GTG ACG GGA GAG GAA GAC TCT GCC CTG GGA AGG ACG GGC CCC ACC CTG 238

Val Thr Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu

65

70

75

GCC ATG AAG ACG TAT TTC CAG GGC ATC CAT GTC TAC CTG AAA GAG AAG 286

Ala Met Lys Thr Tyr Phe Gln Gly Ile His Val Tyr Leu Lys Glu Lys

80

85

90

95

GGA TAT AG

294

Gly Tyr

(2) SEQ ID NO:28之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：97 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

五、發明說明 (v/b)

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.27(HuIFNtau5)之經預測之
胺基酸編碼序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.28：

Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu Gln Glu Ala Gln Ala Ile Ser

1 5 10 15

Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Thr Glu

20 25 30

His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Arg Thr

35 40 45

Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asp Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln val

50 55 50

Thr Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala

65 70 75 80

Met Lys Thr Tyr Phe Gln Gly Ile His Val Tyr Leu Lys Glu Lys Gly

85 90 95

Tyr

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (217)

(2) SEQ ID NO:29之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：516 個鹽基對

(B) 種類：核 酸

(C) 股性：雙股

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：DNA (基因體)

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：HulFNtau2

(ix) 特徵：

(A) 名稱/關鍵：CDS

(B) 位置：1..516

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.29:

五、發明說明 (7/8)

GAC CTG TCT CAG AAC CAC GTG CTG GTT GGC AGG AAG AAC CTC AGG CTC 48

Asp Leu Ser Gln Asn His Val Leu Val Gly Arg Lys Asn Leu Arg Leu

1 5 10 15

CTG GAC CAA ATG AGG AGA CTC TCC CCT CGC TTT TGT CTG CAG GAC AGA 96

Leu Asp Gln Met Arg Arg Leu Ser Pro Arg Phe Cys Leu Gln Asp Arg

20 25 30

AAA GAC TTC GCT TTA CCC TAG GAA ATG GTG GAG GGC GGC CAG CTC CAG 144

Lys Asp Phe Ala Leu Pro Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu Gln

35 40 45

GAG GCC CAG GCC ATC TCT GTG CTC CAT GAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC 192

Glu Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe

50 55 60

AAC CTC TTC CAC ACA GAG CAC TCC TCT GCT GCC TGG GAC ACC ACC CTC 240

Asn Leu Phe His Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu

65 70 75 80

CTG GAG CAG CTC CGC ACT GGA CTC CAT CAG CAG CTG GAC AAC CTG GAT 288

Leu Glu Gln Leu Arg Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asn Leu Asp

85 90 95

GCC TGC CTG GGG CAG GTG ATG GGA CAG GAA GAC TCT GCC CTG GGA AGG 336

Ala Cys Leu Gly Gln Val Met Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg

100 105 110

ACG GGC CCC ACC CTG GCT CTG AAG AGG TAC TTC CAG GGC ATC CAT GTC 384

五、發明說明 (>19)

Thr Gly Pro Thr Leu Ala Leu Lys Arg Tyr Phe Gln Gly Ile His Val

115

120

125

TAC CTG AAA GAG AAG GGA TAC AGC GAC TGC GCC TGG GAA ACC GTC AGA 432

Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Thr Val Arg

130

135

140

GTG GAA ATC ATG AGA TCC TTC TCT TCA TTA ATC AGC TTG CAA GAA AGG 480

Val Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Ser Leu Ile Ser Leu Gln Glu Arg

145

150

155

160

TTA AGA ATG ATG GAT GGA GAC CTG AGC TCA CCT TGA 516

Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu Ser Ser Pro

165

170

(ix) 特徵:

(A) 名稱/關鍵: 修飾位置

(B) 位置: 115-117

(D) 其他資訊: /note= "為了使被編碼的蛋白質可以表現,

此位置可被修飾成編碼一胺基酸, 例如, Gln"

(2) SEQ ID NO:30之資料:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 171 個胺基酸

- 222 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (5/20)

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.29(HuIFNtau2)之經預測之
胺基酸編碼序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.30：

Asp Leu Ser Gln Asn His Val Leu Val Gly Arg Lys Asn Leu Arg Leu

1 5 10 15

Leu Asp Gln Met Arg Arg Leu Ser Pro Arg Phe Cys Leu Gln Asp Arg

20 25 30

Lys Asp Phe Ala Leu Pro Xaa Glu Met Val Clu Gly Gly Gln Leu Gln

35 40 45

Glu Ala Gln Ala Ile ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe

50 55 60

Asn Leu Phe His Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu

65 70 75 80

Leu Glu Gln Leu Arg Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asn Leu Asp

-223-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (ㄅㄨ)

85	90	95	
Ala Cys Leu Gly Gln Val Met Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg			
100	105	110	
Thr Gly Pro Thr Leu Ala Leu Lys Arg Tyr Phe Gln Gly Ile His Val			
115	120	125	
Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Thr Val Arg			
130	135	140	
Val Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Ser Leu Ile Ser Leu Gln Glu Arg			
145	150	155	160
Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu Ser Ser Pro			
165	170		

(ix) 特徵:

(A) 名稱/關鍵: 修飾位置

(B) 位置: 39

(D) 其他資訊: /note= "其中Xaa為一經選擇

的胺基酸, 例如, Gln"

(2) SEQ ID NO:31之資料:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 588 個鹽基對

(B) 種類: 核 酸

五、發明說明 (ㄅㄨ)

(C) 股性：雙股

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：DNA (基因體)

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：HuIFNtau3

(ix) 特徵：

(A) 名稱/關鍵：CDS

(B) 位置：1..588

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.31:

ATG GCC TTC GTG CTC TCT CTA CTC ATG GCC CTG GTG CTG GTC AGC TAC 48

Met Ala Phe Val Leu Ser Leu Leu Met Ala Leu Val Leu Val Ser Tyr

1 5 10 15

GGC CCG GGA GGA TCC CTG CGG TGT GAC CTG TCT CAG AAC CAC GTG CTG 96

-225-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (→✓b)

Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala Met Lys

130

135

140

Arg Tyr Phe Gln Gly Ile His Val Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Ser

145

150

155

160

Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser

165

170

175

Ser Ser Thr Ser Leu His Lys Arg Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu

180

185

190

Ser Ser Pro

195

(2) SEQ ID NO:33之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：518 個鹽基對

(B) 種類：核 酸

(C) 股性：雙股

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：DNA (基因體)

(iii) 假設性：無

五、發明說明 (續)

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：HuIFNtau3,成熟的,沒有領導子序列

(ix) 特徵：

(A) 名稱/關鍵：CDS

(B) 位置：1..518

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.33:

TGT GAC CTG TCT CAG AAC CAC GTG CTG GTT GGC AGC CAG AAC CTC AGG 48

Cys Asp Leu Ser Gln Asn His Val Leu Val Gly Ser Gln Asn Leu Arg

1 5 10 15

CTC CTG GGC CAA ATG AGG AGA CTC TCC CTT CGC TTC TGT CTG CAG GAC 96

Leu Leu Gly Gln Met Arg Arg Leu Ser Leu Arg Phe Cys Leu Gln Asp

20 25 30

AGA AAA GAC TTC GCT TTC CCC CAG GAG ATG GTG GAG GGT GGC CAG CTC 144

Arg Lys Asp Phe Ala Phe Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu

35 40 45

CAG GAG GCC CAG GCC ATC TCT GTG CTC CAC GAG ATG CTC CAG CAG AGC 192

Gln Glu Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser

-230-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (7/8)

50 55 60
 TTC AAC CTC TTC CAC ACA GAG CAC TCC TCT GCT GCC TGG GAC ACC ACC 240
 Phe Asn Leu Phe His Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr
 65 70 75 80
 CTC CTG GAG CAG CTC CGC ACT GGA CTC CAT CAG CAG CTG CAT GAC CTG 288
 Leu Leu Glu Gln Leu Arg Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asp Leu
 85 90 95
 GAT GCC TGC CTG GGG CAG GTG ACG GGA GAG GAA GAC TCT GCC CTG GGA 336
 Asp Ala Cys Leu Gly Gln Val Thr Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly
 100 105 110
 AGA ACG GGC CCC ACC CTG GCC ATG AAG AGG TAT TIC CAG GGC ATC CAT 384
 Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala Met Lys Arg Tyr Phe Gln Gly Ile His
 115 120 125
 GTC TAC CTG AAA GAG AAG GGA TAT AGT GAC TGC GCC TGG GAA ATT GTC 432
 Val Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val
 130 135 140
 AGA CTG GAA ATC ATG AGA TCC TTG TCT TCA TCA ACC AGC TTG CAC AAA 480
 Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Ser Ser Thr Ser Leu His Lys
 145 150 155 160
 AGG TTA AGA ATG ATG GAT GGA GAC CTG AGC TCA CCT TG 518
 Arg Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu Ser Ser Pro
 165 170

五、發明說明 (>>g)

(2) SEQ ID NO:34之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：172 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.34：

Cys Asp Leu Ser Gln Asn His Val Leu Val Gly Ser Gln Asn Leu Arg

1 5 10 15

Leu Leu Gly Gln Met Arg Arg Leu Ser Leu Arg Phe Cys Leu Gln Asp

20 25 30

Arg Lys Asp Phe Ala Phe Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu

35 40 45

Gln Glu Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Leu Glu Gln Ser

50 55 60

Phe Asn Leu Phe His Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr

65 70 75 80

-232-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (830)

Leu Leu Glu Gln Leu Arg Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asp Leu

85 90 95

Asp Ala Cys Leu Gly Gln Val Thr Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly

100 105 110

Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala Met Lys Arg Tyr Phe Gln Gly Ile His

115 120 125

Val Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val

130 135 140

Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Ser Ser Thr Ser Leu His Lys

145 150 155 160

Arg Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu Ser Ser Pro

165 170

(2) SEQ ID NO:35之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

五、發明說明 (531)

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.33之1-37片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.35：

Lys Asp Leu Ser Gln Asn His Val Leu Val Gly Ser Gln Asn Leu Arg

1 5 10 15

Leu Leu Gly Gln Met Arg Arg Leu Ser Leu Arg Phe Cys Leu Gln Asp

20 25 30

Arg Lys Asp Phe Ala

35

(2) SEQ ID NO:36之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：31 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

五、發明說明 (5) (2)

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.33之34-64片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.36：

Lys Asp Phe Ala Phe Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu Gln

1 5 10 15

Glu Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser

20 25 30

(2) SEQ ID NO:37之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：31 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.33之69-62片段之胺基酸序列

五、發明說明 (v)}))

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.37:

Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp

1 5 10 15

Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Arg Thr Gly Leu His Gln Gln

20 25 30

(2) SEQ ID NO:38之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：33 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.33之90-122片段之胺基酸序列

五、發明說明 (7) (4)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.38：

His Gln Gln Leu Asp Asp Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln Val Thr Gly

1 5 10 15

Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala Met Lys

20 25 30

Arg

(2) SEQ ID NO:39之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：32 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.33之119-150片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.39：

-237-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (733)

Ala Met Lys Arg Tyr Phe Gln Gly Ile His Val Tyr Leu Lys Glu Lys

1 5 10 15

Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Leu Glu Ile Met Arg

20 25 30

(2) SEQ ID NO:40之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：34 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.33之139-172片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.40：

五、發明說明 (736)

Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Ser

1 5 10 15

Ser Thr Ser Leu His Lys Arg Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu Ser

20 25 30

Ser Pro

(2) SEQ ID NO:41之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：23 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.32之1-23片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.41：

Met Ala Phe Val Leu Ser Leu Leu Met Ala Leu Val Leu Val Ser Tyr

五、發明說明 (737)

1 5 10 15

Gly Pro Gly Gly Ser Leu Arg

20

(2) SEQ ID NO:42之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：23 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：SEQ ID NO.11之1-23片段之胺基酸序列

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.42：

Met Ala Phe Val Leu Ser Leu Leu Met Ala Leu Val Leu Val Ser Tyr

1 5 10 15

-240-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (28)

Gly Pro Gly Gly Ser Leu Gly

20

(2) SEQ ID NO:43之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：519 個鹽基對

(B) 種類：核 酸

(C) 股性：雙股

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：DNA (基因體)

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：HuIFNtau1基因體衍生的DNA編碼序列，沒有領導子序列

(ix) 特徵：

(A) 名稱/關鍵：CDS

五、發明說明 (23)

(B) 位置：1..519

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.43:

TGT GAC CTG TCT CAG AAC CAC GTG CTG GTT GGC AGG AAG AAC CTC AGG 48

Cys Asp Leu Ser Gln Asn His Val Leu Val Gly Arg Lys Asn Leu Arg

1 5 10 15

CTC CTG GAC GAA ATG AGG AGA CTC TCC CCT CGC TTT TGT CTG CAG GAC 96

Leu Leu Asp Glu Met Arg Arg Leu Ser Pro Arg Phe Cys Leu Gln Asp

20 25 30

AGA AAA GAC TTC GCT TTA CCC CAG GAA ATG GTG GAG GGC GGC CAG CTC 144

Arg Lys Asp Phe Ala Leu Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Gly Gln Leu

35 40 45

CAG GAG GCC CAG GCC ATC TCT GTG CTC CAT GAG ATG CTC CAG CAG AGC 192

Gln Glu Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ser

50 55 60

TTC AAC CTC TTC CAC ACA GAG CAC TCC TCT GCT GCC TGG GAC ACC ACC 240

Phe Asn Leu Phe His Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr

65 70 75 80

CTC CTG GAG CAG CTC CGC ACT GGA CTC CAT CAG CAG CTG GAC AAC CTG 288

Leu Leu Glu Gln Leu Arg Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Asp Asn Leu

85 90 95

-242-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (740)

GAT GCC TGC CTG GGG CAG GTG ATG GGA GAG GAA GAC TCT GCC CTG GGA 336

Asp Ala Cys Leu Gly Gln Val Met Gly Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly

100

105

110

AGG ACG GGC CCC ACC CTG GCT CTG AAG AGG TAC TTC CAG GGC ATC CAT 384

Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala Leu Lys Arg Tyr Phe Gln Gly Ile His

115

120

125

GTC TAC CTG AAA GAG AAG GGA TAC AGC GAC TGC GCC TGG GAA ACC GTC 432

Val Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Thr Val

130

135

140

AGA CTG GAA ATC ATG AGA TCC TTG TCT TCA TTA ATC AGC TTG CAA GAA 480

Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Ser Leu Ile Ser Leu Gln Glu

145

150

155

160

AGG TTA AGA ATG ATG GAT GGA GAC CTG AGC TCA CCT TGA 519

Arg Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu Ser Ser Pro

165

170

(2) SEQ ID NO:44之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：172 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

五、發明說明 (241)

(ii) 分子種類：蛋白質

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.44：

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

-244-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (242)

130	135	140	
Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Ser Leu Ile Ser Leu Gln Glu			
145	150	155	16
Arg Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu Ser Ser Pro			
165	170		

(2) SEQ ID NO:45之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：Bin 12, A40068, Acc. gi 108955, 牛

TP-1 (株落 bTP509) (aa 1-37)

五、發明說明 (243)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.45：

Cys Tyr Leu Ser Glu Asp His Met Leu Gly Ala Arg Glu Asn Leu Arg

1 5 10 15

Leu Leu Ala Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Pro Cys Leu Gln Asp

20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly

35

(2) SEQ ID NO:46之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(iii) 假設性：無

五、發明說明 (844)

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：Bin 13, BovTPH1Bcds1, Acc. gi 163767
TP-1 (aa 1-37)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.46：

Cys Tyr Leu Ser Glu His His Ile Leu Gly Pro Arg Gln Asn Leu Ser

1 5 10 15

Leu Leu Ala Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Pro Cys Leu Gln Asp

20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly

35

(2) SEQ ID NO:47之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

五、發明說明 (y46)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：Bin 15, A39505, 牛 TP-1 (株落 bTP4)
(aa 1-37)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.48:

Cys Tyr Leu Ser Glu Asn His Met Leu Gly Ala Arg Glu Asn Leu Arg

1 5 10 15

Leu Leu Ala Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Pro Cys Leu Gln Asp

20 25 30

-249-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (> 47)

Arg Lys Asp Phe Gly

35

(2) SEQ ID NO:49之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：Bin 16, OATP1P5eds1, Acc. gi 1412, 羊
(aa 1-37)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.49:

-250-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

TPP5

五、發明說明 (74)

Cys Tyr Leu Ser Gln Arg Leu Met Leu Asp Ala Lys Glu Asn Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Ser Cys Leu Gln Asp
 20 25 30
 Arg Lys Asp Phe Gly
 35

(2) SEQ ID NO:50之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

五、發明說明 (x49)

(C) 個別分離種： Bin 17, 0ATP1P3cds1, Acc.
gi 1410, 羊 Tpp3 (aa 1-37)

(xi) 序列描述： SEQ ID NO.50:

Cys Tyr Leu Ser Gln Arg Leu Met Leu Asp Ala Arg Glu Asn Leu Lys

1 5 10 15

Leu Leu Asp Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Ser Cys Leu Gln Asp

20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly

35

(2) SEQ ID NO:51之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度： 37 個胺基酸

(B) 種類： 胺基酸

(D) 拓樸學： 線狀

(ii) 分子種類： 蛋白質

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (750)

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：Bin 18, SHP010TPcds1, Acc.

gi 165821, 羊 TP-1 (aa 1-37)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.51：

Cys Tyr Leu Ser Gln Arg Leu Met Leu Asp Ala Arg Glu Asn Leu Lys

1 5 10 15

Leu Leu Glu Pro Met Asn Arg Leu Ser Pro His Ser Cys Leu Gln Asp

20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly

35

(2) SEQ ID NO:52之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37 個胺基酸

- 253 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (√)

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：Bin 19, SHP02TPcds1, Acc.

gi 165823, 羊 TP-1 (aa 1-37)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.52:

Cys Tyr Leu Ser Gln Arg Leu Met Leu Asp Ala Arg Glu Asn Leu Arg

1 5 10 15

Leu Leu Asp Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Ser Cys Leu Gln Asp

20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly

35

五、發明說明 (52)

(2) SEQ ID NO:53之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：Bin 21, GOTCTP1eds1, Acc. gi 164117, Canra h
IFN tau (aa 1-37)

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.53：

Cys Tyr Leu Ser Arg Arg Leu Met Leu Asp Ala Arg Glu Asn Leu Arg

1

5

10

15

-255-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (25)

Leu Leu Asp Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Ser Cys Gln Gln Asp

20

25

30

Arg Lys Asp Phe Gly

35

(2) SEQ ID NO:54之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：498 個鹽基對

(B) 種類：核 酸

(C) 股性：雙股

(D) 拓撲學：線狀

(ii) 分子種類：DNA (基因體)

(iii) 假設性：無

(iv) 反義：無

(vi) 原始來源：

(C) 個別分離種：HuIFNtau/HuIFNalpha 雜合者

(1-28/29-167)

(ix) 特徵：

-256-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (7/ΔΨ)

(A) 名稱 / 關鍵 : CDS

(B) 位置 : 1..498

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO.54:

TGT GAC TTG TCT CAA AAC CAC GTT TTG GTT GGT AGA AAG AAC TTA AGA 48

Cys Asp Leu Ser Gln Asn His Val Leu Val Gly Arg Lys Asn Leu Arg

1 5 10 15

CTA CTA GAC GAA ATG AGA CGT CTA TCT CCA CGC TTC TGC CTG AAG GAC 96

Leu Leu Asp Glu Met Arg Arg Leu Ser Pro Arg Phe Cys Leu Lys Asp

20 25 30

AGA TAT GAT TTC GGA TTC CCC CAG GAG GTG TTT GAT GGC AAC CAG TTC 144

Arg Tyr Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Val Phe Asp Gly Asn Gln Phe

35 40 45

CAG AAG GCT CAA GCC ATC TCT GCC TTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ACC 192

Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Ala Phe His Glu Met Ile Gln Gln Thr

50 55 60

TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAT TCA TCT GCT GCT TGG GAT GAG ACC 240

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

65 70 75 80

CTC CTA GAC AAA TTC TAC ATT GAA CTT TTC CAG CAA CTG AAT GAC CTA 288

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Leu Asn Asp Leu

-257-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (A5)

85	90	95	
GAA GCC TGT GTG ACA CAG GAG GTT GGG GTG GAA GAG ATT GCC CTG ATG 336			
Glu Ala rys Val Thr Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Ile Ala Leu Met			
100	105	110	
AAT GAG GAC TCC ATC CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTT CAA AGA ATC ACT 384			
Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr			
115	120	125	
CTT TAT CTG ATG GGG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC 432			
Leu Tyr Leu Met Gly Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val			
130	135	140	
AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCC TTC TCT TTT TCA ACA AAC TTG CAA AAA 480			
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys			
145	150	155	160
GGA TTA AGA AGG AAG GAT			498
Gly Leu Arg Arg Lys Asp			
165			

(2) SEQ ID NO:55之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：166 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

- 258 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (5/16)

(D) 拓樸學：線狀

(ii) 分子種類：蛋白質

(xi) 序列描述：SEQ ID NO.55:

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

-259-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

泉

五、發明說明 (257)

Leu Tyr Leu Met Gly Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val

130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys

145 150 155 160

Gly Leu Arg Arg Lys Asp

165

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

四、中文發明摘要(發明之名稱:)

雜合性干擾素組成物及使用方法

本發明描述雜合性(hybrid)干擾素融合多肽類,其由第一個片段部份(segment)及第二個片段部份(segment)組成,第一個片段部份(segment)包含干擾素- τ 多肽之N-端胺基酸序列,且第二個片段部份(segment)包含一種非- τ 干擾素第I型之多肽之C-端胺基酸序列。此兩個片段部份(segment)在成熟的干擾素多肽區域中約略殘基8及37之間結合。本發明亦描述編碼干擾素融合多肽類的序列,含有此等序列之表現載體,及干擾素融合多肽類的治療應用。該等治療應用包括抗病毒性及抗細胞性株落增殖應用。本發明之干擾素融合多肽類之優點為用於處理細胞時沒有細胞毒

英文發明摘要(發明之名稱:)

ABSTRACT

The present invention describes hybrid interferon fusion polypeptides formed of a first segment that contains the N-terminal amino acid sequence of an interferon-tau polypeptide, and a second segment that contains the C-terminal amino acid sequence of a non-tau interferon type I polypeptide. The two segments are joined in the region of a mature interferon polypeptide between about residues 8 and 37. Also described are nucleic acid sequences encoding such interferon fusion polypeptides, expression vectors containing such sequences, and therapeutic applications of the interferon fusion polypeptides. The therapeutic applications include antiviral and anticellular proliferation applications. One advantage of the interferon fusion polypeptides of the present invention is that they do not have cytotoxic side-effects when used to treat cells.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱:)

殺性副作用。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

英文發明摘要 (發明之名稱:)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

列。

5. 如申請專利範圍第1項之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽，其中該第一個片段部份具有延伸自成熟的干擾素- τ 多肽之約胺基酸1至胺基酸殘基8至28之胺基酸序列且該第二個片段部份具有延伸自成熟的非- τ 干擾素第I型多肽之按照數字順序之胺基酸殘基9至29到C-端殘基之胺基酸序列。

6. 如申請專利範圍第1項之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽，其中該第一個片段部份具有延伸自成熟的干擾素- τ 多肽之約胺基酸1至胺基酸殘基8至22之胺基酸序列且該第二個片段部份具有延伸自成熟的非- τ 干擾素第I型多肽之按照數字順序之胺基酸殘基9至23到C-端殘基之胺基酸序列。

7. 如申請專利範圍第1項之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽，其中該第一個片段部份具有延伸自成熟的干擾素- τ 多肽之約胺基酸1至胺基酸殘基8至16之胺基酸序列且該第二個片段部份具有延伸自成熟的非- τ 干擾素第I型多肽之按照數字順序之胺基酸殘基9至17到C-端殘基之胺基酸序列。

六、申請專利範圍

8. 如申請專利範圍第1項之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽，其中干擾素- τ 多肽為一反芻類動物干擾素- τ 多肽且非- τ 干擾素第 I 型多肽為一人類非- τ 干擾素第 I 型多肽。

9. 如申請專利範圍第1項之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽，其中該非- τ 干擾素第 I 型多肽為干擾素- α 或干擾素- β 。

10. 一種主要由編碼如申請專利範圍第1項之雜合性干擾素融合多肽之開放譯讀序列 (ORF) 所組成的核酸。

11. 一種表現載體，其包括

(a) 如申請專利範圍第10項之核酸；及

(b) 調節性序列，其有效於在宿主細胞中表現該開放譯讀序列。

12. 一種重組性生產雜合性干擾素融合多肽的方法，其包括導入合適宿主細胞中一種重組性表現載體，該載體包含如申請專利範圍第10項之核酸，其中該載體被設計可在該宿主中表現該 ORF 序列表現，及將該宿主細胞於造成該

六、申請專利範圍

ORF 序列表現的條件下進行培養。

13. 一種在需要此種治療的個體身上治療自體免疫疾病的醫藥組成物，其包括一有效量之如申請專利範圍第1項之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽。

14. 一種抑制於個體中之腫瘤細胞生長的醫藥組成物，其包括抑制腫瘤細胞生長之有效量之如申請專利範圍第1項之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽。

15. 一種抑制病毒於個體中之經病毒感染之細胞中複製的醫藥組成物，其包括抑制細胞中之病毒複製之有效量之如申請專利範圍第1項之雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽。

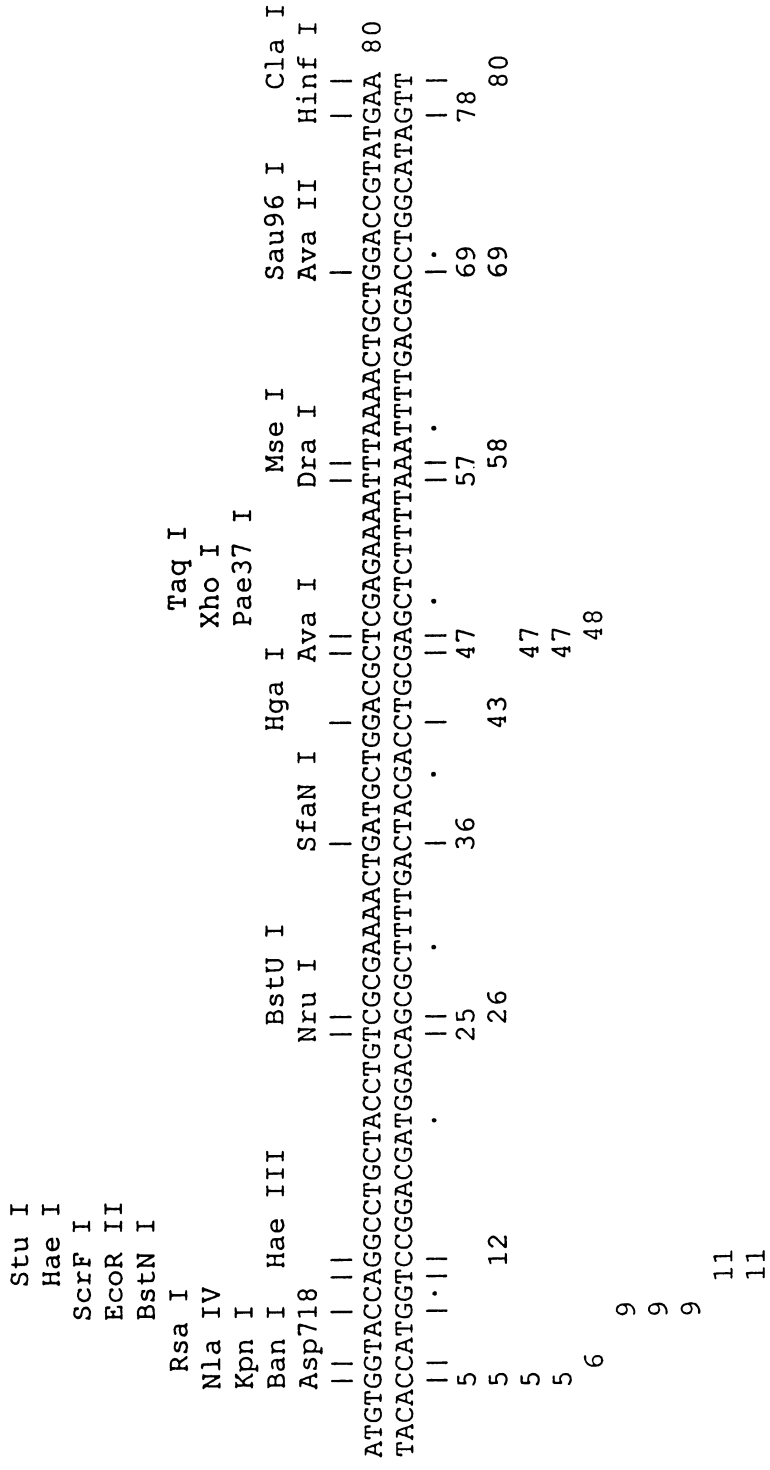
16. 如申請專利範圍第13至15項中任一項的醫藥組成物，其係製備成注射施用之配方。

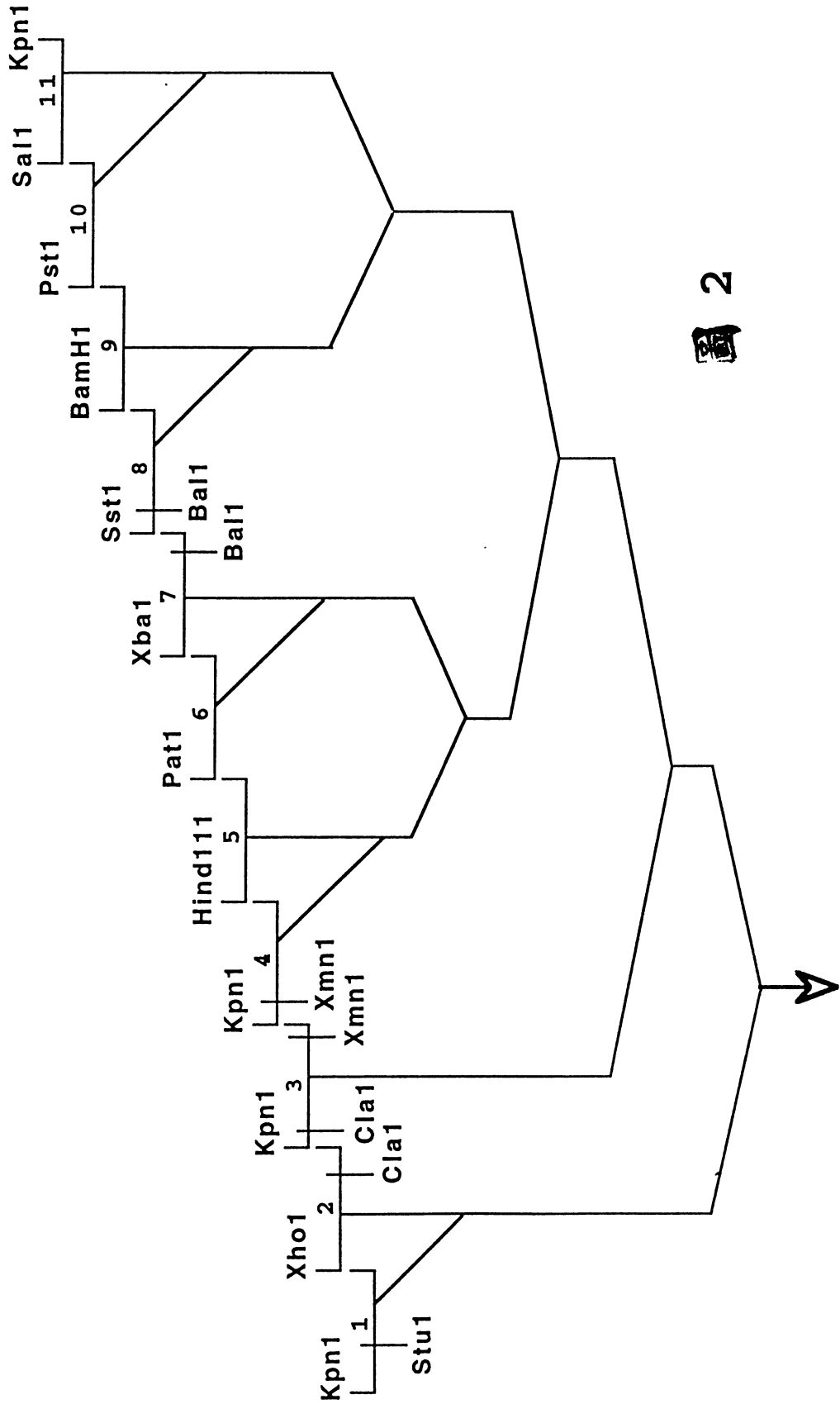
17. 如申請專利範圍第13至15項中任一項的醫藥組成物，其係製備成口服施用之配方。

圖 1A

METOTP-1.SEQ4 -> 限制酶位置

DNA 序列 540 b.p. ATGTGGTACCAG ... CCGTAAGGTACC 直線狀





2

```

                                -23                                -9
                                met ala phe val leu ser leu leu met ala leu val leu val ser
oIFNt      cccc ATG GCC TTC GTG CTC TCT CTA CTG ATG GCC CTG GTG CTG GTC AGC
huIFNt1    cccc ATG GCC TTC GTG CTC TCT CTA CTC ATG GCC CTG GTG CTG GTC AGC

-8                                -1 +1                                11
tyr gly pro gly gly ser leu gly cys tyr leu ser arg lys leu met leu asp ala
TAT GGC CCA GGA GGA TCT CTG GGT TGT TAC CTA TCT CGG AAA CTC ATG CTG GAT GCC
TAC GGC CCA GGA GGA TCC CTG GGT TGT GAC CTG TCT CAG AAC CAC GTG CTG GTT GGC
                                asp                                gln asn his val val gly

12                                30
arg glu asn leu lys leu leu asp arg met asn arg leu ser pro his ser cys leu
AGG GAG AAC CTC AAG CTC CTG GAC CGA ATG AAC AGA CTC TCC CCT CAT TCC TGT CTG
AGG AAG AAC CTC AGG CTC CTG GAC GAA ATG AGG AGA CTC TCC CCT CGC TTT TGT CTG
    lys            arg            glu            arg            arg phe

31                                49
gln asp arg lys asp phe gly leu pro gln glu met val glu gly arg gln leu gln
CAG GAC AGA AAA GAC TTT GGT CTT CCC CAG GAG ATG GTG GAG GGC GAC CAG CTC CAG
CAG GAC AGA AAA GAC TTC GCT TTA CCC CAG GAA ATG GTG GAG GGC GGC CAG CTC CAG
                                ala                                gly

50                                68
lys asp gln ala phe pro val leu tyr glu met leu gln gln ser phe asn leu phe
AAG GAC CAG GCC TTC CCT GTG CTC TAC GAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC AAC CTC TTC
GAG GCC CAG GCC ATC TCT GTG CTC CAT GAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC AAC CTC TTC
glu ala            ile ser            his

69                                87
tyr thr glu his ser ser ala ala trp asp thr thr leu leu glu gln leu cys thr
TAC ACA GAG CAC TCC TCT GCT GCC TGG GAC ACC ACC CTC CTG GAG CAG CTC TGC ACT
CAC ACA GAG CAC TCC TCT GCT GCC TGG GAC ACC ACC CTC CTG GAG CAG CTC CGC ACT
his                                arg

88                                106
gly leu gln gln gln leu asp his leu asp thr cys arg gly gln val met gly glu
GGA CTC CAA CAG CAG CTG GAC CAC CTG GAC ACC TGC AGG GGT CAA GTG ATG GGA GAG
GGA CTC CAT CAG CAG CTG GAC AAC CTG GAT GCC TGC CTG GGG CAG GTG ATG GGA GAG
    his            asn            ala            leu

107                                125
glu asp ser glu leu gly asn met asp pro ile val thr val lys lys tyr phe gln
GAA GAC TCT GAA CTG GGT AAC ATG GAC CCC ATT GTG ACC GTG AAG AAG TAC TTC CAG
GAA GAC TCT GCC CTG GGA AGG ACG GGC CCC ACC CTG GCT CTG AAG AGG TAC TTC CAG
    ala            arg thr gly            thr leu ala leu            arg

126                                144
gly ile tyr asp tyr leu gln glu lys gly tyr ser asp cys ala trp glu ile val
GGC ATC TAT GAC TAC CTG CAA GAG AAG GGA TAC AGC GAC TGC GCC TGG GAA ATC GTC
GGC ATC CAT GTC TAC CTG AAA GAG AAG GGA TAC AGC GAC TGC GCC TGG GAA ACC GTC
    his val            lys            thr

145                                163
arg val glu met met arg ala leu thr val ser thr thr leu gln lys arg leu thr
AGA GTC GAG ATG ATG AGA GCC CTC ACT GTA TCA ACC ACC TTG CAA AAA AGG TTA ACA
AGA CTG GAA ATC ATG AGA TCC TTC TCT TCA TTA ATC AGC TTG CAA GAA AGG TTA AGA
    leu            ile            ser phe ser ser leu ile ser            glu            arg

164                                172
lys met gly gly asp leu asn ser pro end
AAG ATG GGT GGA GAT CTG AAC TCA CCT TGA
AAG ATG GAT GGA GAC CTG AGC TCA CCT TGA
met            asp            ser

```

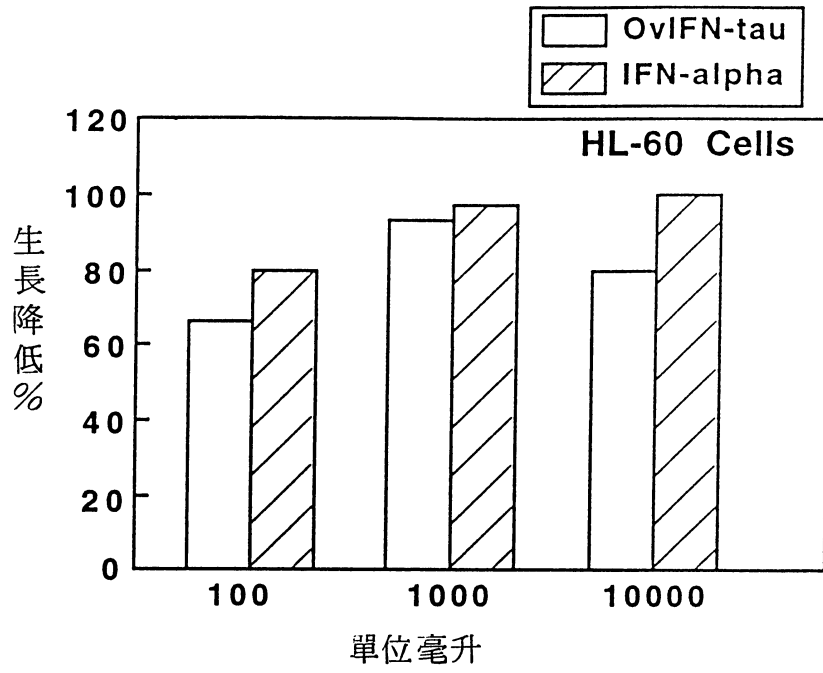


圖 4

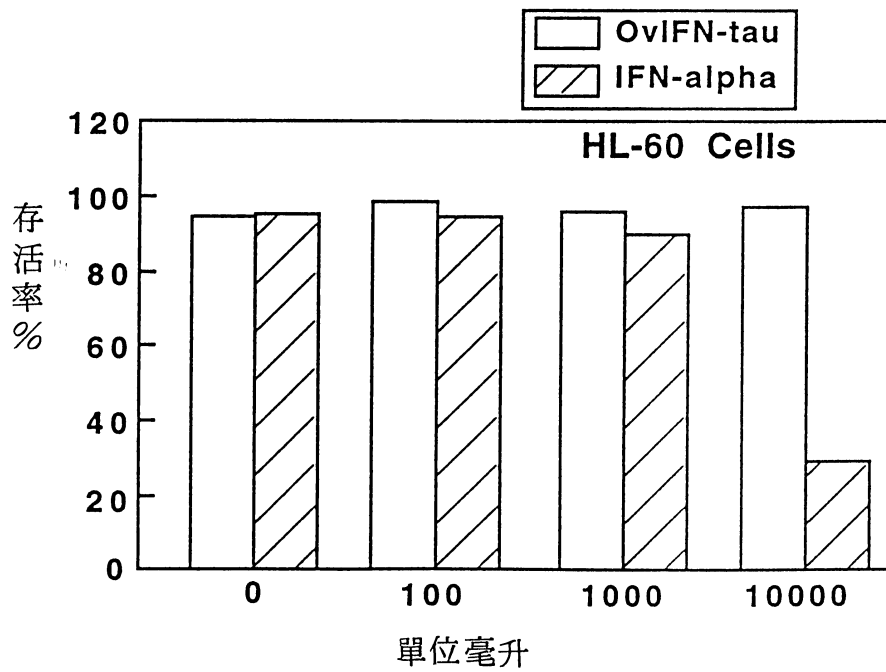


圖 5

肽	MW	HI*	序列
IFNt(1-37) (SEQ ID NO:5)	4465	-0.78	CYSLRKLMLDARENKLLDRMNRSLSPHSCLODRKDFG
IFNt(34-64) (SEQ ID NO:6)	3610	-0.72	KDFGLPQEMVEGDQLKDAQAFPVLYEMLQGS
IFNt(62-92) (SEQ ID NO:7)	3586	-0.53	QQSFNLFYTEHSSAAWDTLLEQLCTGLQQQ
IFNt(90-122) (SEQ ID NO:8)	3712	-0.86	QQQLDHLDTCRGQVMGEEDSELGNMDDPIVTVKK
IFNt(119-150) (SEQ ID NO:9)	3948	-0.56	TVKKYFQGIDYDLQEKGYSDCAWEIVRVEMMR
IFNt(139-172) (SEQ ID NO:10)	3818	-0.11	CAWEIVRVEMMRALTVSTTLQKRLTKMGDDLNSP

* 水療指數

圖 6

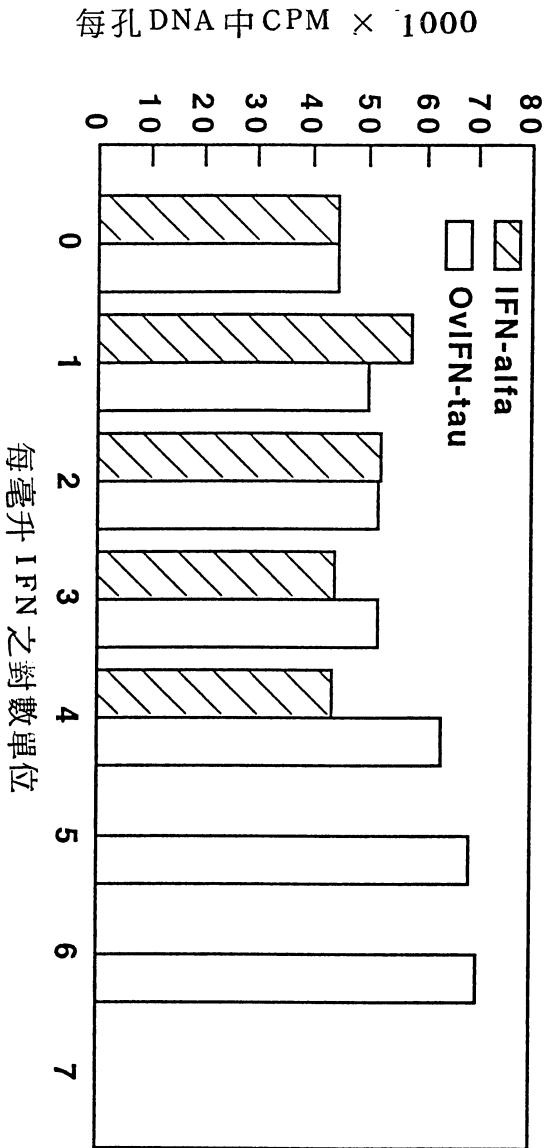


圖 8

1 80
 CTGAGATGGGATCAGAGAACCTACCTGAAGGTTCCCCCTGACCCCATCTCAGCCAGCCCAGCAGCAGCCGCATCTTCCCC

81 140
 ATG GCC TTC GTG CTC TCT CTA CTG ATG GCC CTG GTG CTG GTC AGC TAT GGC CCA GGA GGA
 S1 S20
 Met Ala Phe Val Leu Ser Leu Leu Met Ala Leu Val Leu Val Ser Tyr Gly Pro Gly Gly

141 200
 TCT CTG GGT TGT TAC CTA TCT CGG AAA CTC ATG CTG GAT GCC AGG GAG AAC CTC AAG CTC
 S21 17
 Ser Leu Gly Cys Tyr Leu Ser Arg Lys Leu Met Leu Asp Ala Arg Glu Asn Leu Lys Leu

201 260
 CTG GAC CGA ATG AAC AGA CTC TCC CCT CAT TCC TGT CTG CAG GAC AGA AAA GAC TTT GGT
 18 37
 Leu Asp Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Ser Cys Leu Gln Asp Arg Lys Asp Phe Gly

261 320
 CTT CCC CAG GAG ATG GTG GAG GGC GAC CAG CTC CAG AAG GAC CAG GCC TTC CCT GTG CTC
 38 57
 Leu Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Asp Gln Leu Gln Lys Asp Gln Ala Phe Pro Val Leu

321 380
 TAC GAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC AAC CTC TTC TAC ACA GAG CAC TCC TCT GCT GCC TGG
 58 77
 Tyr Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe Tyr Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp

381 440
 GAC ACC ACC CTC CTG GAG CAG CTC TGC ACT GGA CTC CAA CAG CAG CTG GAC CAC CTG GAC
 78 97
 Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Cys Thr Gly Leu Gln Gln Gln Leu Asp His Leu Asp

441 500
 ACC TGC AGG GGT CAA GTG ATG GGA GAG GAA GAC TCT GAA CTG GGT AAC ATG GAC CCC ATT
 98 117
 Thr Cys Arg Gly Gln Val Met Gly Glu Glu Asp Ser Glu Leu Gly Asn Met Asp Pro Ile

501 560
 GTG ACC GTG AAG AAG TAC TTC CAG GGC ATC TAT GAC TAC CTG CAA GAG AAG GGA TAC AGC
 118 137
 Val Thr Val Lys Lys Tyr Phe Gln Gly Ile Tyr Asp Tyr Leu Gln Glu Lys Gly Tyr Ser

561 620
 GAC TGC GCC TGG GAA ATC GTC AGA GTC GAG ATG ATG AGA GCC CTC ACT GTA TCA ACC ACC
 138 157
 Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Met Met Arg Ala Leu Thr Val Ser Thr Thr

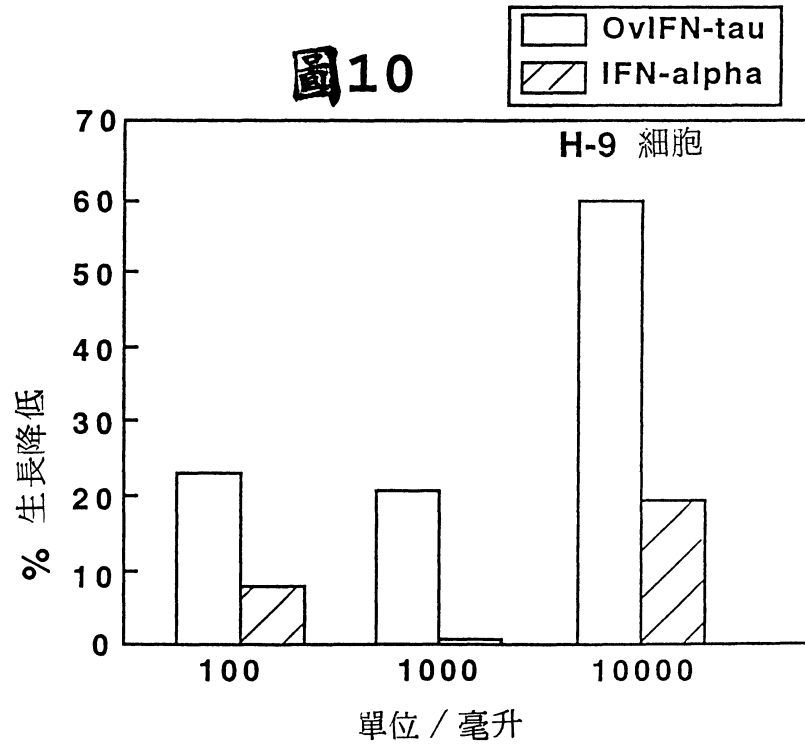
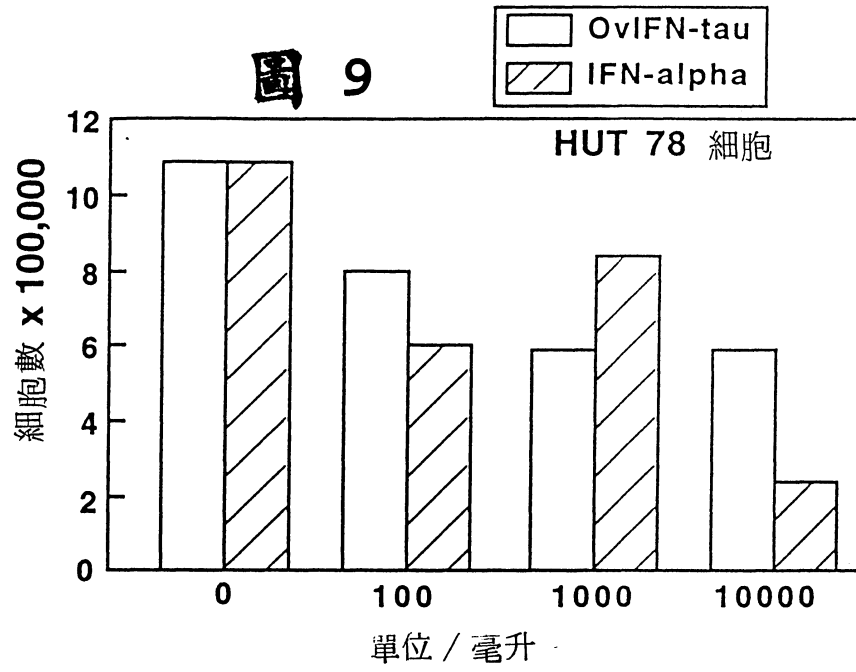
621 666
 TTG CAA AAA AGG TTA ACA AAG ATG GGT GGA GAT CTG AAC TCA CCT TGA TGACTCTTGCCGACTA
 158 172
 Leu Gln Lys Arg Leu Thr Lys Met Gly Gly Asp Leu Asn Ser Pro

764
 AGATGCCACATCAGCCTCCTACACCCGCTGTGTTTCATTTCAGAAGACTCTGATTCTGTCTCCAGCCACCAAATTCATTG

844
 AATTACTTTAGCTGATACTTTGTCTAGTAGTAAAAAGCAAGTAGATATAAAAGTATTCAGCTGTAGGGGCATGAGTCTCTGA

924
 AATGATGCCTTCCCTGATGTTATCTGTTGCTGATTTATTTATACCTTCTAGCATTAAACATACTTAAATATTAGGAAAT

972
 TTGTTAAGTTACATTTACATCTGTACATCATATTTAAATTTCTAAACAAAAA



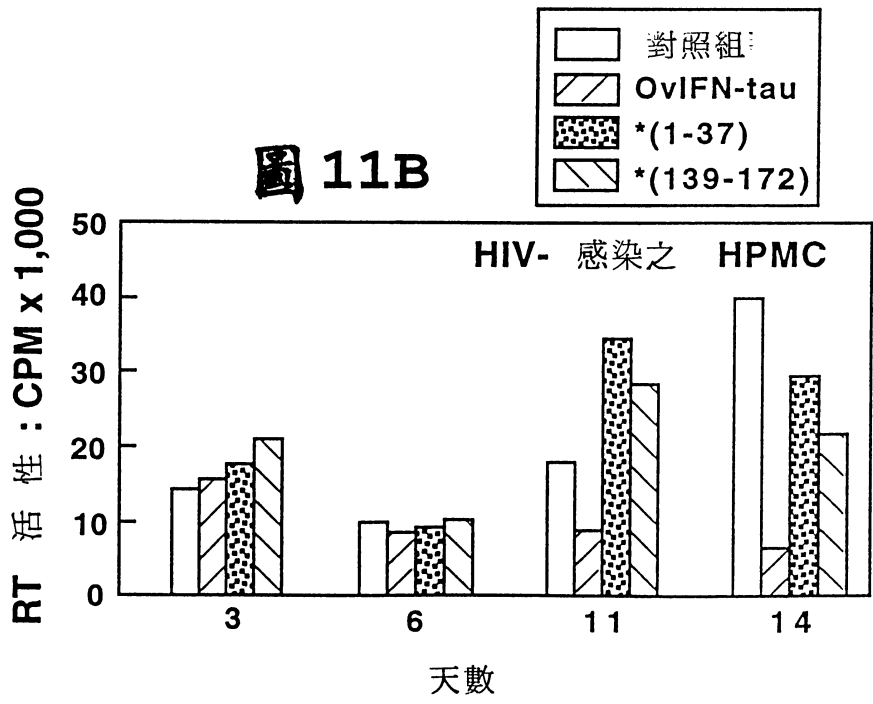
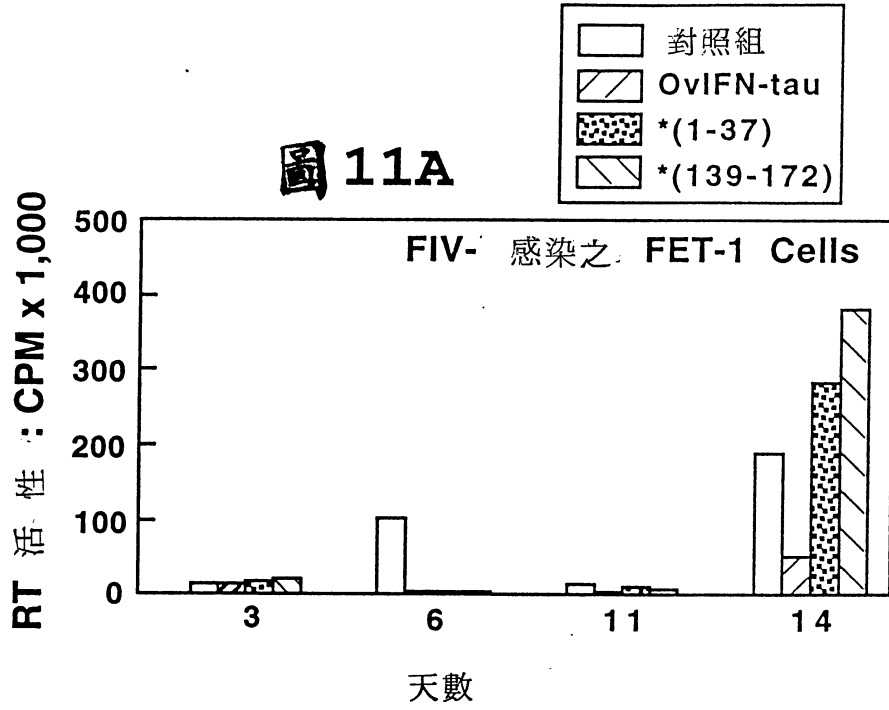


圖 12

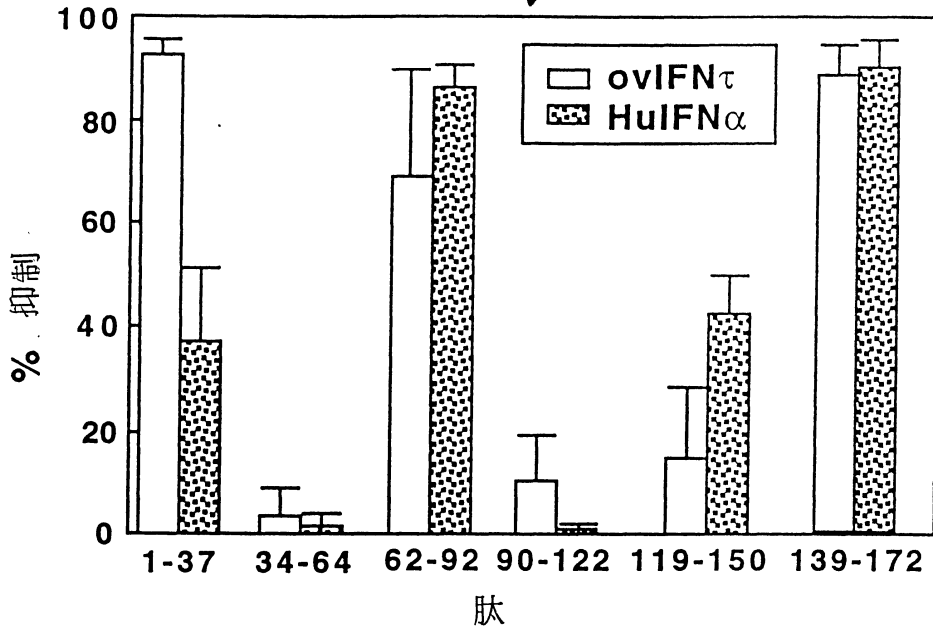


圖 13

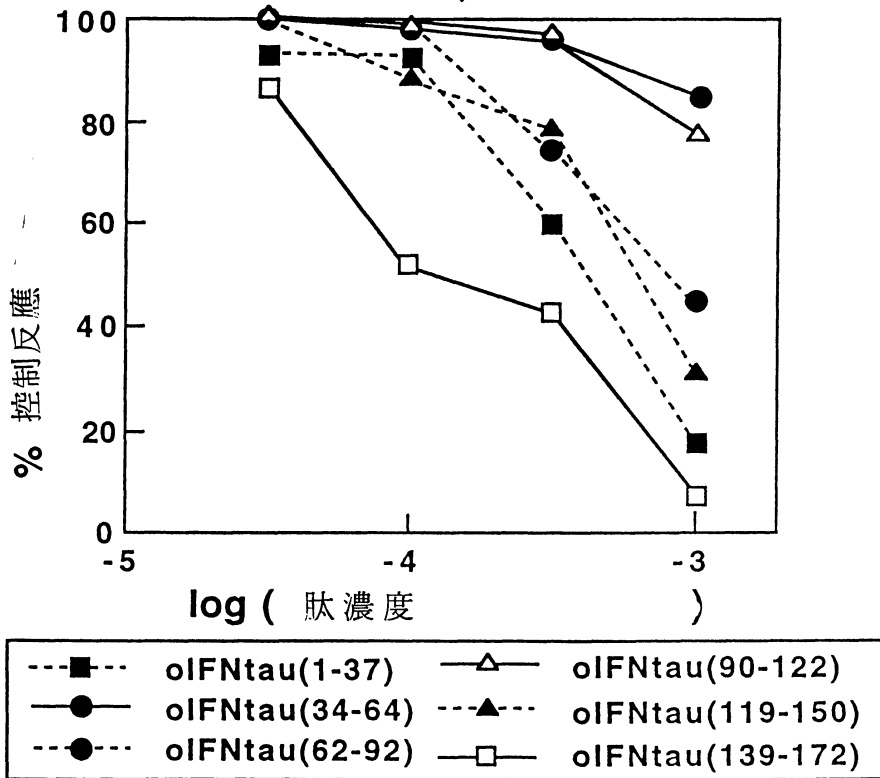
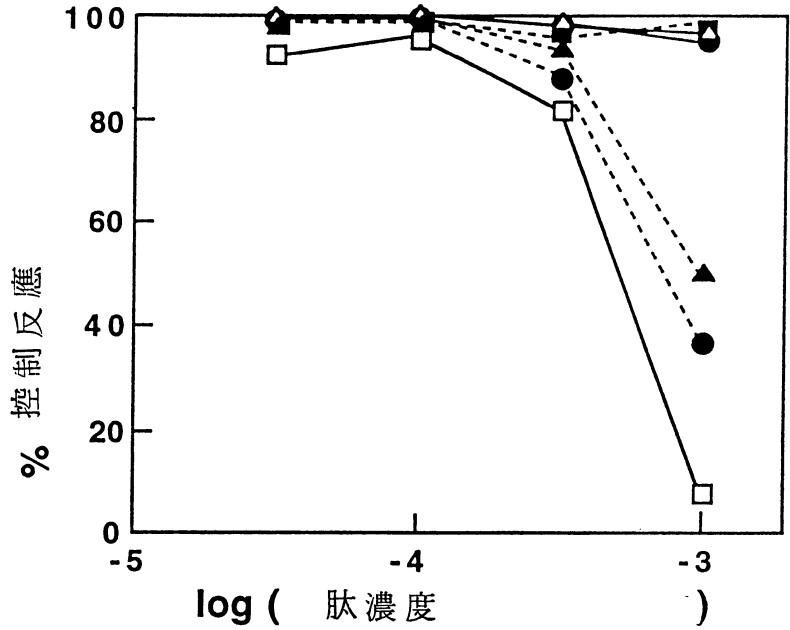


圖 14



- | | | | |
|---------|----------------|---------|------------------|
| ---■--- | oIFNtau(1-37) | —△— | oIFNtau(90-122) |
| —●— | oIFNtau(34-64) | ---▲--- | oIFNtau(119-150) |
| ---●--- | oIFNtau(62-92) | —□— | oIFNtau(139-172) |

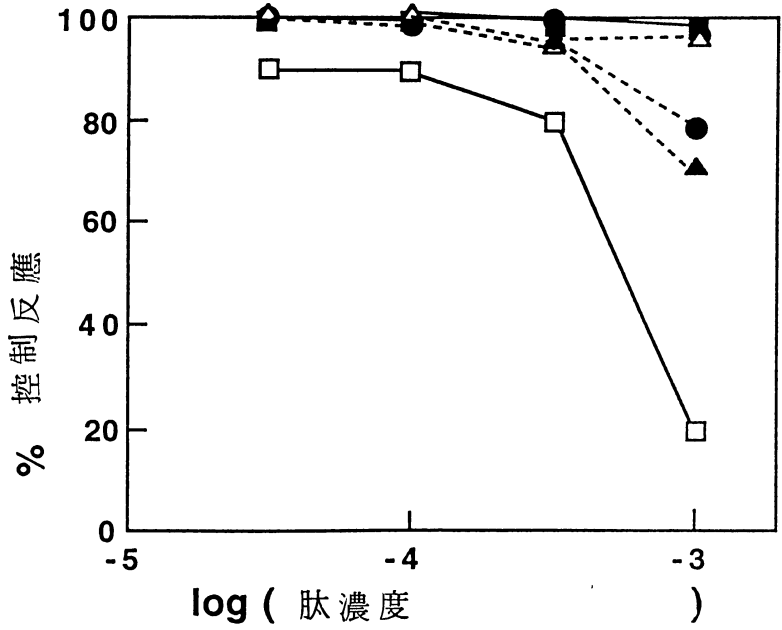


圖 15

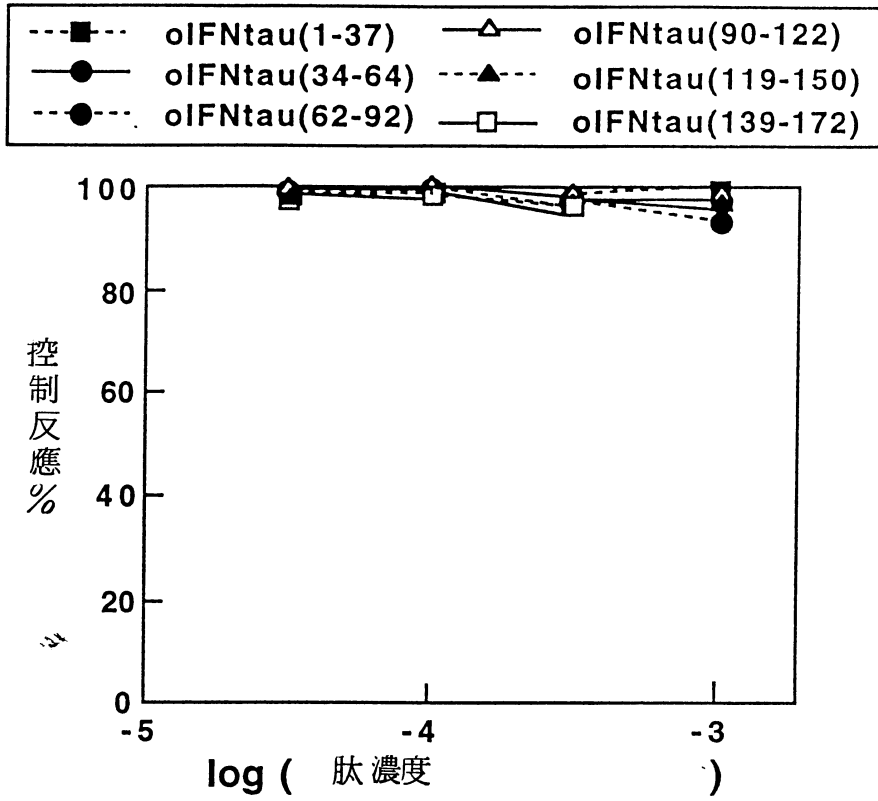


圖 16

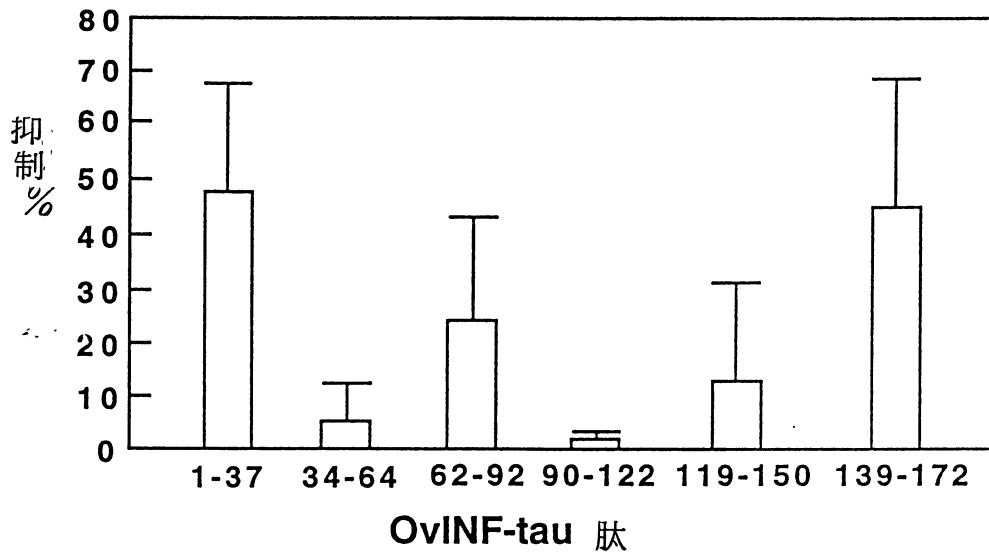


圖 17

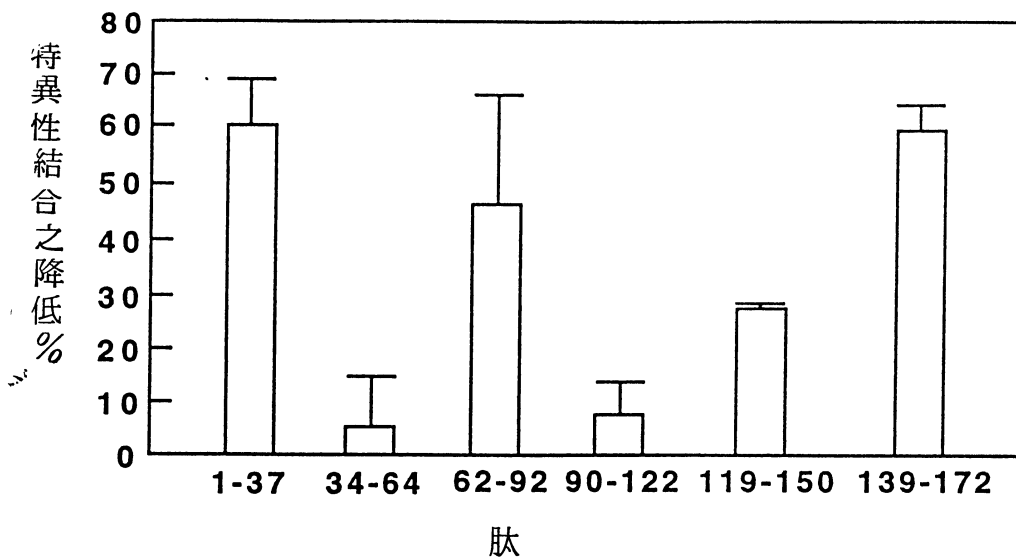


圖 18

```

                -23                                     -9
                Met ala phe val leu ser leu leu met ala leu val leu val ser
oINFt          cccc ATG GCC TTC GTG CTC TCT CTA CTG ATG GCC CTG GTG CTG GTC AGC
LEXY.5         cccc                                     c
TOSHI.9        cc                                     c
TOSHI.10       cc                                     c

-8             -1 +1                                     11
tyr gly pro gly gly ser leu gly cys tyr leu ser arg lys leu met leu asp ala
TAT GGC CCA GGA GGA TCT CTG GGT TGT TAC CTA TCT CGG AAA CTC ATG CTG GAT GCC
  c             c             G g             A C A G             T G
  c             c             (---)G g             A C A G             T G
  c             g             c             C G             G g             A C A G             T G

12             20                                     30
arg glu asn leu lys leu leu asp arg met asn arg leu ser pro his ser cys leu
AGG GAG AAC CTC AAG CTC CTG GAC CGA ATG AAC AGA CTC TCC CCT CAT TCC TGT CTG
  A             G             GA             GG             GC TT
  A             G             A             GG             GC TT
  C C             G             G A             GG             T GC T

31             40                                     49
gln asp arg lys asp phe gly leu pro gln glu met val glu gly asp gln leu gln
CAG GAC AGA AAA GAC TTT GGT CTT CCC CAG GAG ATG GTG GAG GGC GAC CAG CTC CAG
  c C t a             TAG a             G
  c C t a             TAG a             G
  c C t C             TAG a             t G
HuIFNt4          !             t G
HuIFNt5          !             t G
HuIFNt6          !             G
HuIFNt7          !             T AG             T

50             60                                     68
lys asp gln ala phe pro val leu tyr glu met leu gln gln ser phe asn leu phe
AAG GAC CAG GCC TTC CCT GTG CTC TAC GAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC AAC CTC TTC
G C             A T             C T
G C             A T             C T
G C             A T             C
G C             A T             C
G C             A T             C A
G C             A T T             C T

69             80                                     87
tyr thr glu his ser ser ala ala try asp thr thr leu leu glu gln leu cys thr
TAC ACA GAG CAC TCC TCT GCT GCC TGG GAC ACC ACC CTC CTG GAG CAG CTC TGC ACT
C             C
C             C
C             C
C             C
C             C
C             C
C             C
C             C
C             t             CT

```

圖 19A

88	90											100							106
gly	leu	gln	gln	gln	leu	asp	his	leu	asp	thr	cys	arg	gly	gln	val	met	gly	gln	
GGA	CTC	CAA	CAG	CAG	CTG	GAC	CAC	CTG	GAC	ACC	TGC	AGG	GGT	CAA	GTG	ATG	GGA	GAG	
	T						A		t	G		CT	g	g					
	T						A		t	G		CT	g	g					
	T					t	G		t	G		CT	g	g		C			
	T					t	G		t	G		CT	g	g		C			
	T					t	G		t	G		CT	g	g		C			
	T					t	G		t	G		CT	g	g		C			
	T					t	G		t	G	t	CT	g	g	T	CT			

107			110										120						125
gly	asp	ser	glu	leu	gly	asn	met	asp	pro	ile	val	thr	val	lys	lys	tyr	phe	gln	
GAA	GAC	TCT	GAA	CTG	GGT	AAC	ATG	GAC	CCC	ATT	GTG	ACC	GTG	AAG	AAG	TAC	TTC	CAG	
			CC		a	GG	C	G		CC	C	G	T	C		G			
			CC		a	GG	C	G		CC	C	G	T	C		G			
			CC		a	GA	C	G		CC	C	G	A		G	t			
			CC		a	GG	C	G		CC	C	G	A		C	t			
			CC		a	GG	C	G		CC	C	G	A		C	t			
			CC		a	GG	C	G		CC	C	G			GC				
			CC		a	GG	C	G		CC	C	G			GC				

126				130									140						144
gly	ile	tyr	asp	tyr	leu	gln	glu	lys	gly	tyr	ser	asp	cys	ala	trp	glu	ile	val	
GGC	ATC	TAT	GAC	TAC	CTG	CAA	GAG	AAG	GGA	TAC	AGC	GAC	TGC	GCC	TGG	GAA	ATC	GTC	
	C	T				A												C	
	C	T				A												C	
	C	T				A			t	t								t	
	C	T				A			t	t						!			
	C	T				A			t	!									
	C	AT											!						
	C	T							!										

145					150									160					163
arg	val	glu	met	met	arg	ala	leu	thr	val	ser	thr	thr	leu	gln	lys	arg	leu	thr	
AGA	GTC	GAG	ATG	ATG	AGA	GCC	CTC	ACT	GTA	TCA	ACC	ACC	TTG	CAA	AAA	AGG	TTA	ACA	
	C	G	a	C		T	T	T	TC	T	T	G			G			G	
	g	a	C			T	T	T	TC	T	T	G			G			G	
	C	G	a	C		T	t	g	T			G		C				G	

164								172
lys	met	gly	gly	asp	leu	asn	ser	pro
AAG	ATG	GGT	GGA	GAT	CTG	AAC	TCA	CCT
T		A		c		G		
T		A		c		G		
T		A		c		G		

```

                                -23 .                                -9
oTP-1      Met ala phe val leu ser leu leu met ala leu val leu val ser
LEXY.5
TOSHI.9
TOSHI.10

-8          -1 +1          11
tyr gly pro gly gly ser leu gly cys tyr leu ser arg lys leu met leu asp ala
                                asp          gln asn his val      val gly
                                (---)asp      gln asn his val      val gly
                                arg      asp      gln asn his val      val gly

12          20          30
arg glu asn leu lys leu leu asp arg met asn arg leu ser pro his ser cys leu
  lys          arg          glu          arg          arg phe
  lys          arg          gln          arg          arg phe
ser gln          arg          gly gln          arg          leu arg phe

31          40          49
gln asp arg lys asp phe gly leu pro gln glu met val glu gly asp gln leu gln
                                ala          gly
                                ala          gly
                                ala phe      gly
Clone 21          !          gly
Clone 35          !          gly
Clone 15          !          gly
Clone 18          !          val ser      phe

50          60          68
lys asp gln ala phe pro val leu tyr glu met leu gln gln ser phe asn leu phe
glu ala          ile ser          his
glu ala          ile ser          his
glu ala          ile ser          his
glu ala          ile ser          his
glu ala          ile ser          his lys
glu ala          ile ser          his

69          80          87
tyr thr glu his ser ser ala ala try asp thr thr leu leu glu gln leu cys thr
his          arg
his          arg
his          arg
his          arg
his          arg
his lys      arg          arg
his lys      arg          leu

```

88	90										100						106
gly	leu	gln	gln	leu	asp	his	leu	asp	thr	cys	arg	gly	gln	val	met	gly	glu
	his					asn			ala		leu						
	his					asn			ala		leu						
	his					asp			ala		leu			thr			
	his					asp			ala		leu			thr			
	his					asp			ala		leu			thr			
	his					asp			ala		leu			thr			
	his					asp			ala		leu		leu	thr			

107		110										120					125	
glu	asp	ser	glu	leu	gly	asn	met	asp	pro	ile	val	thr	val	lys	lys	tyr	phe	gln
		ala				arg	thr	gly		thr	leu	ala	leu		arg			
		ala				arg	thr	gly		thr	leu	ala	leu		arg			
		ala				arg	thr	gly		thr	leu	ala	met		arg			
		ala				arg	thr	gly		thr	leu	ala	met		thr			
		ala				arg	thr	gly		thr	leu	ala	met		thr			
		ala				arg	thr	gly		thr	leu	ala		ser				
		ala				arg	thr	gly		thr	leu	ala		ser				

126			130										140				144	
gly	ile	tyr	asp	tyr	leu	gln	glu	lys	gly	tyr	ser	asp	cys	ala	trp	glu	ile	val
	his	val				lys											thr	
	his	val				lys												
	his	val				lys												
	his	val				lys												
	his	val				lys				!								
	his	ile											!					
	his	val								!								

145				150										160			163	
arg	val	glu	met	met	arg	ala	leu	thr	val	ser	thr	thr	leu	gln	lys	arg	leu	thr
	leu		ile			ser	phe	ser	ser	leu	ile	ser			glu		arg	
			ile			ser	phe	ser	ser	leu	ile	ser			glu		arg	
	leu		ile			ser		ser	ser			ser	his				arg	

164								172	
lys	met	gly	gly	asp	leu	asn	ser	pro	<u>stop</u>
met		asp				ser			<u>stop</u>
met		asp				ser			<u>stop</u>
met		asp				ser			<u>stop</u>

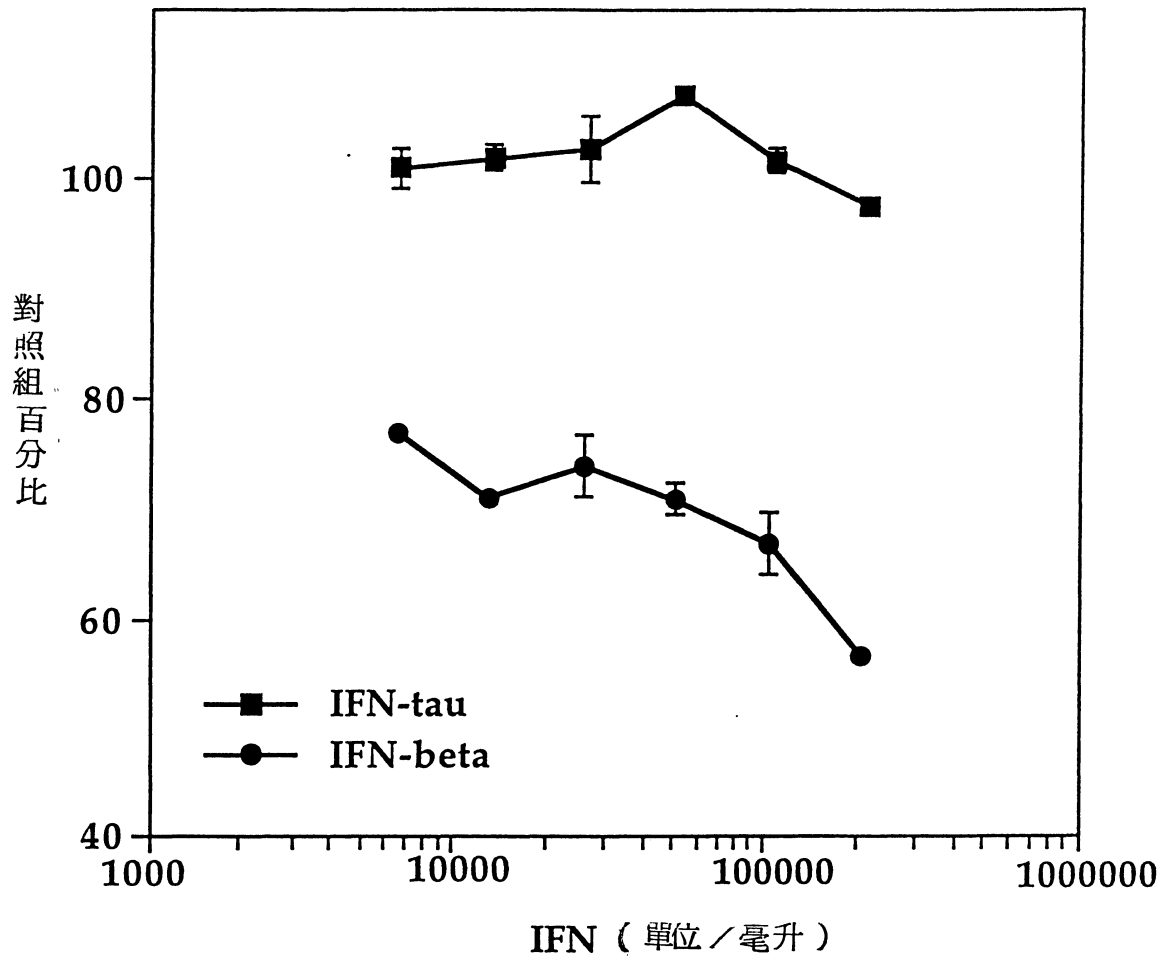


圖 21

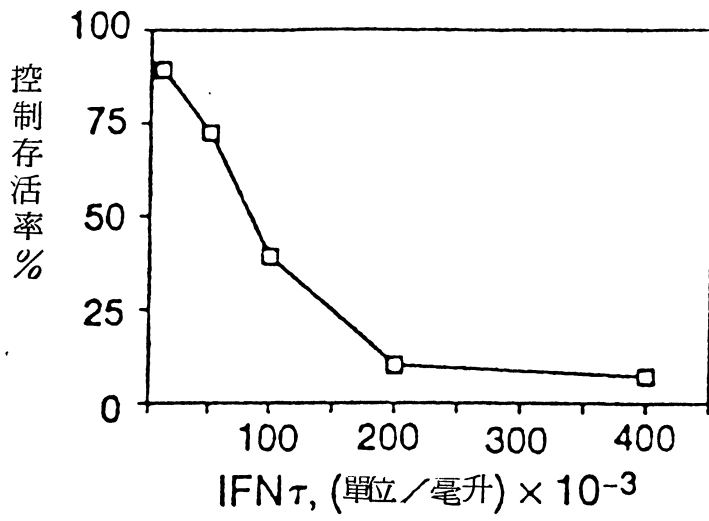


圖 22A

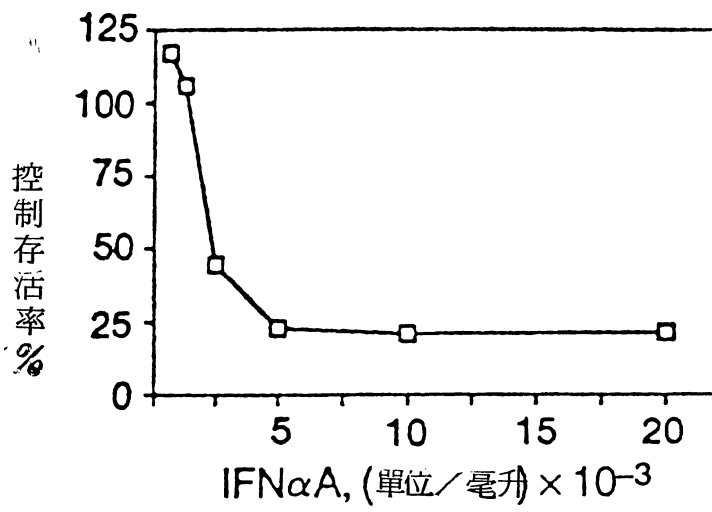


圖 22B

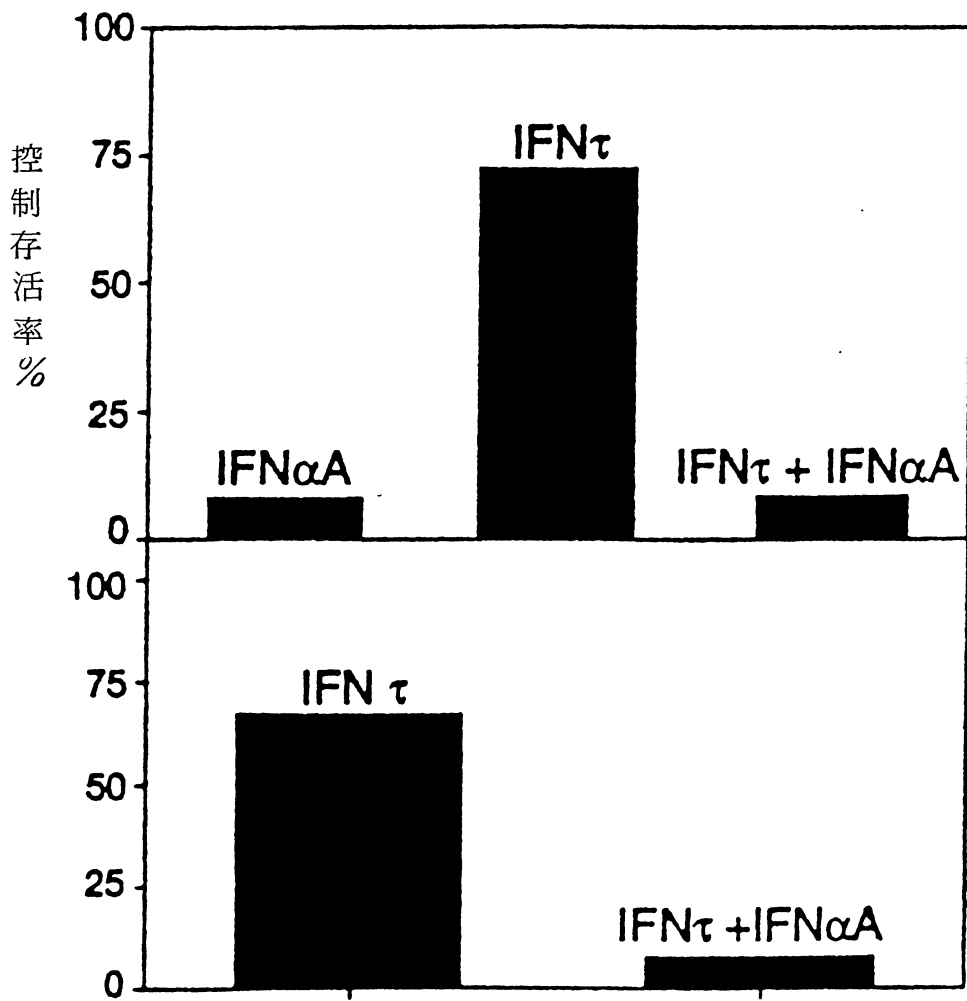


圖 23A

圖 23B

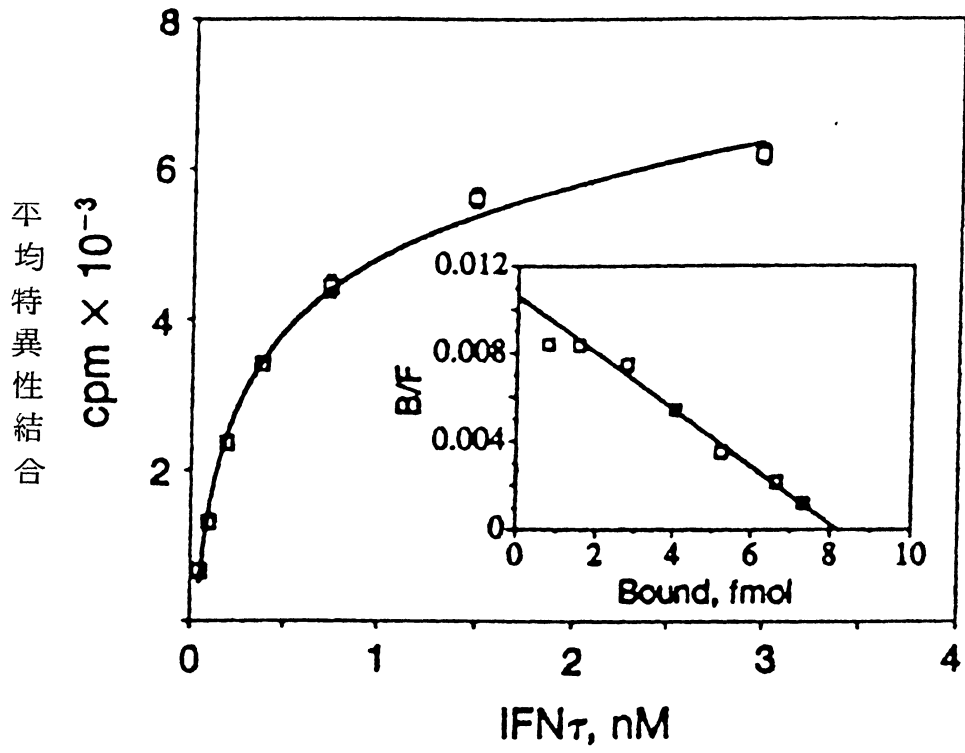


圖 24A

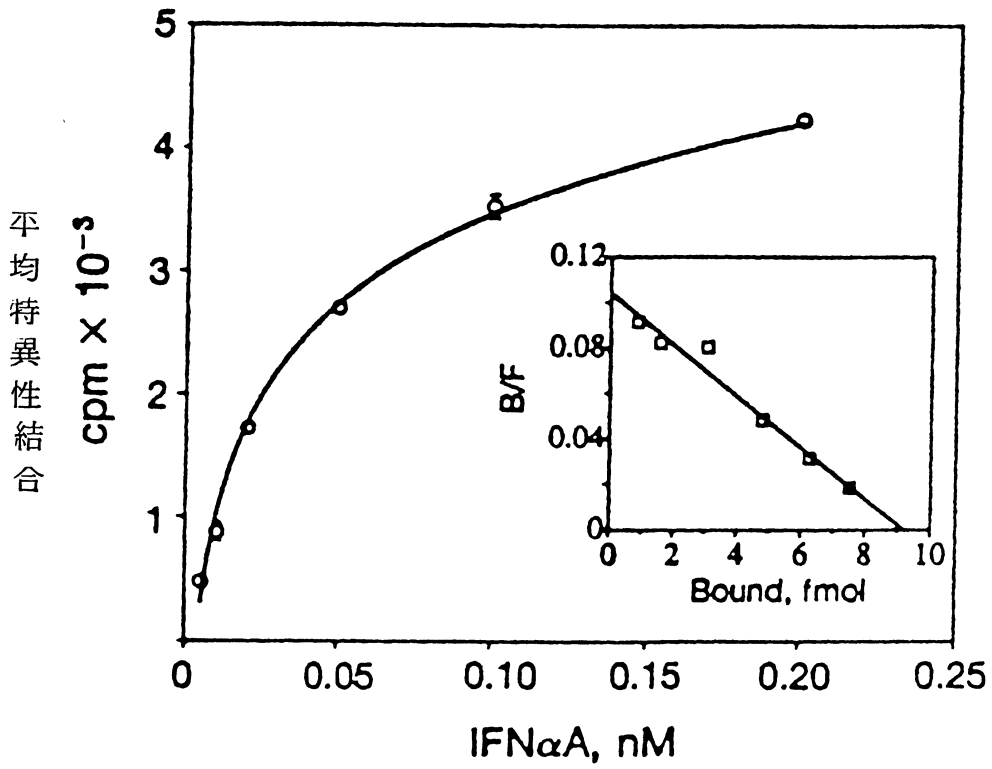


圖 24B

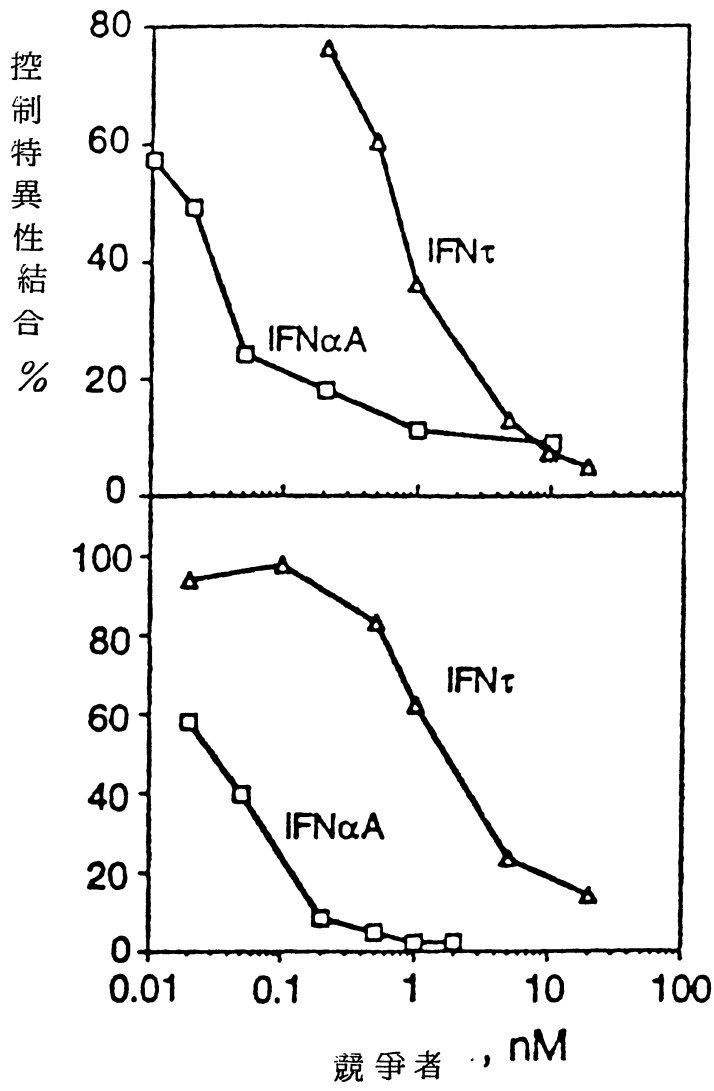


圖 25A

圖 25B

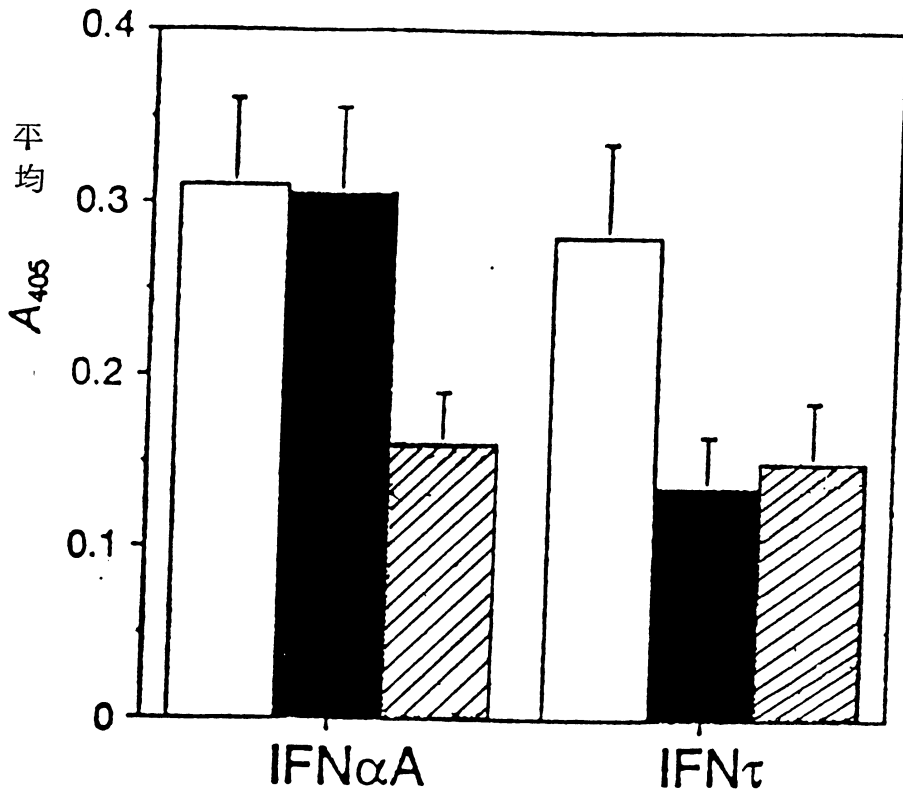


圖 26

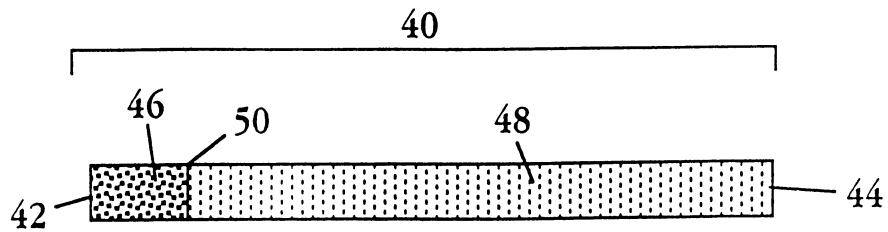


圖 28

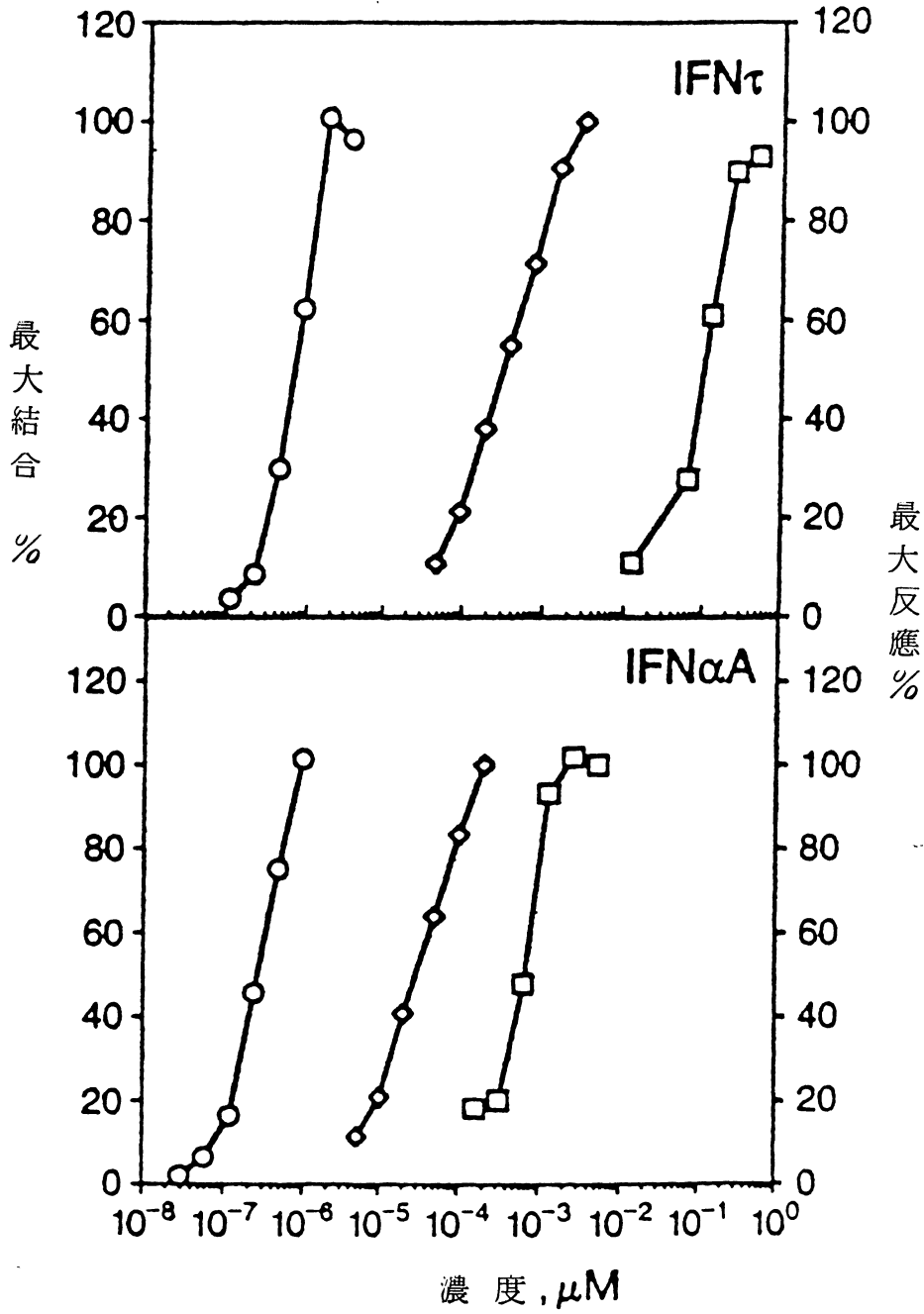


圖 27A

圖 27B

六、申請專利範圍

1. 一種雜合性 (hybrid) 干擾素融合多肽，其由第一個片段部份 (segment) 及第二個片段部份 (segment) 組成，第一個片段部份 (segment) 相對應於干擾素- τ 多肽之 N-端胺基酸序列，且第二個片段部份 (segment) 相對應於一種非- τ 干擾素第 I 型多肽之 C-端胺基酸序列，其中該第一個片段部份具有延伸自成熟的干擾素- τ 多肽之約胺基酸 1 至胺基酸殘基 8 至 37 之胺基酸序列且該第二個片段部份具有延伸自成熟的非- τ 干擾素第 I 型多肽之按照數字順序之胺基酸殘基 9 至 39 到 C-端殘基之胺基酸序列。

2. 如申請專利範圍第 1 項之干擾素融合多肽，其中第一個片段部份 (segment) 具有被包含於選自下列一群組的序列者之序列： SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, 及 SEQ ID NO:53。

3. 如申請專利範圍第 2 項之干擾素融合多肽，其中第一個片段部份 (segment) 具有被包含於 SEQ ID NO.5 之序列。

4. 如申請專利範圍第 2 項之干擾素融合多肽，其中第一個片段部份 (segment) 具有被包含於 SEQ ID NO.45 之序