（由本局填寫）

| | |
|---|---|
| 承辦人代碼： | A6<br>B6 |
| 大　　類： | |
| ＩＰＣ分類： | |

本案已向：

| 國（地區） | 申請專利，申請日期： | 案號： | ，□有　□無主張優先權 |
|---|---|---|---|
| 日本 | 2000 年 10 月 27 日 | 2000-328539 | ☑有主張優先權 |
| 日本 | 2001 年 4 月 16 日 | 2001-116710 | ☑有主張優先權 |

有關微生物已寄存於：　　，寄存日期：　　，寄存號碼：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝　訂　線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

## 五、發明說明（1）

〔發明所屬之技術領域〕

本發明爲關於增強蛋白質合成抑制基因表現之新穎用劑，詳言之，爲關於含有人類干擾素α中之亞型α2及亞型α8（以下，將干擾素簡稱爲「ＩＦＮ」、干擾素α簡稱爲「ＩＦＮ－α」、人類干擾素α中之亞型α2及亞型α8分別簡稱爲「ＩＦＮ－α2」及「ＩＦＮ－α8）做爲有效成分之增強蛋白質合成抑制基因表現之用劑。

〔先前之技術〕

ＩＦＮ爲脊椎動物細胞受到病毒感染和抗原刺激等外部刺激時分泌至細胞外之具有抗病毒活性之一群蛋白質的總稱，根據其抗原專一性可大致分成ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ三種類型。ＩＦＮ除了抗病毒活性以外，已知具有細胞增殖抑制活性、抗腫瘤活性等多樣之生理活性。關於ＩＦＮ之受體亦進行單離、鑑定，例如，Robin Carad等人，「The Cytokine Fox Book」(1994年,Academic Press公司發行），１４８至１６２頁所記載般，已知ＩＦＮ－α及ＩＦＮ－β爲共有相通之受體，另一方面，對於ＩＦＮ－γ則存在與彼等不同的受體。與其他細胞激動素之情況相同，以ＩＦＮ所造成之生理活性之表現爲經由ＩＦＮ造成感受性細胞之刺激，即，ＩＦＮ對於細胞表面所表現之ＩＦＮ受體之結合爲發端，其接著令細胞內資訊傳達系運作，並回應此資訊，於細胞內引起特定之基因表現等之於細胞引起各種變化則可達成表現。關於此細胞

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（2）

內資訊傳達系分子之單離，鑑定亦於近年急速地發展。

回應ＩＦＮ所造成之細胞刺激且誘導表現之基因有各種物質。其可列舉例如 Angus Tomson 編，「The Cytokine Handbook 第三版」（１９９８年，Academic Press 公司發行），第１８章，表２中，經由ＩＦＮ－α及ＩＦＮ－β刺激誘導表現之基因產物（蛋白質）爲２´，５´－寡腺苷酸合成酶（以下，將「２´，５´－寡腺苷酸」簡稱爲「２－５Ａ」），雙股ＲＮＡ依賴性蛋白酶（以下，簡稱爲「ＰＫＲ」），Ｍｘ蛋白質，第Ｉ類及第 II 類之ＭＨＣ分子，β－２微球蛋白，鳥苷酸結合蛋白質，金屬硫蛋白等。其於許多情況爲亦經由ＩＦＮ－γ所誘導。於ＩＦＮ所誘導之此些基因產物中，抑制蛋白質合成之酵素２－５Ａ合成酶與ＰＫＲ，和Ｍｘ蛋白質爲於細胞腫瘤化和對於細胞發生病毒感染等異常之細胞中，擔任直接抑制此類異常的職務。另一方面，ＭＨＣ分子和β－２微球蛋白爲於生體中關連於免疫系機能之蛋白質，其透過生體免疫系之運作，間接參與由生體中除去腫瘤和病毒。又，關於鳥苷酸結合蛋白質和金屬硫蛋白，與ＩＦＮ所造成之生理活性表現之關連則到現在並未詳細闡明。

ＩＦＮ於發現當初乃被稱爲「夢之新藥」等而被大爲期待做爲醫藥。但是與此期待相反，對於某種疾病並無法取得所期待的治療效果。其原因之一爲ＩＦＮ對於各種類型和亞型，根據其作用條件，例如，做爲對象之細胞，此細胞所感染之病毒種類，和所用ＩＦＮ之組合等而令所發

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（3）

揮之作用種類和強弱具有特生，相對地，對於各個狀況下充分發揮目的作用之最適條件並未完全闡明。

關於ＩＦＮ－α、β、γ間之增強基因表現作用之比較例有如 P.L.Triosui 等人，「Journal of Biological Response Modifies」第５卷，第６號，５６２至５７０頁（１９８６年），I.M.Cosia 等人，「Journal of Interferon Research」，第８卷，第１號，１１３至１２７頁（１９８８年）等所見般，ＩＦＮ－α爲比ＩＦＮ－α及ＩＦＮ－β顯示出之２－５Ａ合成酶基因和ＰＫＲ基因之表現誘導能力較差之報告例。相對地，不同於ＩＦＮ－β和ＩＦＮ－γ，於ＩＦＮ－α中存在至少十數種以上之亞型，令ＩＦＮ所造成之誘導基因表現作顯著發揮之ＩＦＮ－α的作用條件，特別，爲此令ＩＦＮ－α中之亞型組合最適化的目標性研究例則至目前一切未察見。

〔發明所欲解決之課題〕

於此類狀況下，本發明者等人爲著眼於經由ＩＦＮ表現所誘導之蛋白質合成抑制基因產物，其爲直接參與ＩＦＮ所發揮之某種作用，及，令該基因之表現誘導中ＩＦＮ－α亞型組合之最適化的目標性研究仍未實行，且認爲若可發現令該基因表現顯著增強之ＩＦＮ－α中之亞型組合，則可達成ＩＦＮ做爲醫藥的更有效利用。

即，本發明之課題爲在於提供特定出蛋白質合成抑制基因表現顯著增強之ＩＦＮ－α中之亞型組合，並且含有

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（4）

此類組合之亞型做爲有效成分之增強基因表現之用劑及其用途。

〔用以解決課題之手段〕

爲了解決上述課題，本發明者等人爲使用人類ＩＦＮ－α中之各種亞型的單離樣品，並且於各別單獨之情況，和適當組合之情況廣泛調查各個樣品對於細胞所顯示之作用，並將此結果相互比較。其結果，發現若令人類ＩＦＮ－α中之亞型ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８組合且對細胞作用，則此細胞內之２－５Ａ合成酶基因等之蛋白質合成抑制基因之表現量爲相乘性提高之完全新穎的現象。此現象爲經由以２－５Ａ合成酶基因所直接參與之抗病毒活性做爲指標調查時，亦被確認其以相乘作用之事實而被證實。本發明爲根據本發明者等人此些完全新穎的發現。

即，本發明爲經由提供含有人類ＩＦＮ－α中之亞型ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８做爲有效成分之增強蛋白質合成抑制基因表現之用劑，該增強劑之醫藥品爲首之用途而解決上述之課題。

〔發明之實施型態〕

本發明爲關於含有人類ＩＦＮ－α中之亞型（以下，將人類ＩＦＮ－α中之亞型單稱爲「亞型」ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８做爲有效成分之增強蛋白質合成抑制基因表現之用劑（以下，稱爲「本發明之表現增強劑」或「該

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（5）

增強劑」）。本發明所謂之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８爲意指與 Amos Bairoch（瑞士）於蛋白質數據庫「Swiss Prot」以 Access Code「P01563」及「P32881」所收錄之兩亞型胺基酸序列（均含有Ｎ終端部之訊號序列。分別於本案說明書中於序列表以序列編號１及２表示）具有實質上同等序列，且於如下述詳述之適當測定系中被確認抗病毒活性之蛋白質，不管其高級構造和胺基酸序列以外之糖鏈等之構造。此處所謂之「實質上同等序列」爲意指所用之亞型的胺基酸序列爲被分類於人類ＩＦＮ－α，且與公知之ＩＦＮ－α中亞型之胺基酸序列相比較時，與序列表中之序列編號１或２之胺基酸序列顯示最高之相同性者。公知之人類ＩＦＮ－α中之亞型胺基酸序列爲例如於 G.Arene 等人「Journal of Interferon and Cytokine Research」第１６卷，１８１至１８４頁（１９９６年）中，將報告各個胺基酸序列之原報整理示出。因此於 G.Arene 等人之文獻中，於ＩＦＮ－α２中包含序列表中具有序列編號１之胺基酸序列之蛋白質，及與此胺基酸序列具有１處胺基酸爲不同序列之其他二種蛋白質，又，於ＩＦＮ－α８中包含序列表中具有序列編號２之胺基酸序列之蛋白質，及與此胺基酸序列具有４或６處胺基酸爲不同序列之其他二種蛋白質。本發明所謂之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８亦不限定於序列編號１或２所示之胺基酸序列，且於序列表之序列編號１或２所示之胺基酸序列中，通常，具有１０處以下，較佳爲８處以下，更佳爲６處以下之胺基酸爲不同

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（7）

，由該亞型之來源單離出對應之ｃＤＮＡ，且由其鹼基序列之解讀結果所推測之胺基酸序列，調查與序列表之序列編號１或２之胺基酸序列之該部分之相同性，則可進行確認。

ＩＦＮ－α活性（力價，titer)通常爲根據抗病毒活性，經由與ＩＦＮ－α之國際標準試料之比較，以國際單位（以下，記載爲「ＩＵ」）表示。人類ＩＦＮ－α之國際標準試料爲由美國國立衛生研究所附以編號「Ｇａ２３－９０１－５３２」且以每１安瓿封入２５，０００ＩＵ之狀態提供。抗病毒活性可根據各種方法予以確認。例如，若利用J.Imanishi等人「Biken Journal」，第２４卷，１０８至１０９頁（１９８１年）所記載之色素攝入法，則可由ＩＦＮ－α對於病毒造成細胞之細胞變性效果（Cytopathic Effect。以下，簡稱爲「ＣＰＥ」）所顯示之抑制活性，定量性地確認其抗病毒活性。本說明書中之ＩＦＮ－α活性爲根據本法，以新培斯病毒(Sindbis virus)做爲病毒，並使用來自人類羊膜之樹立細胞株ＦＬ細胞（ATCC CCL-62)做爲細胞所測定之ＩＵ予以表示。若描述其原理，則首先，求出上述國際標準試料抑制新培斯病毒對於ＦＬ細胞５０％ＣＰＥ之濃度Ｘ（ＩＵ／ｍｌ），其次，於相同條件下，求出被驗試料（含有目的ＩＦＮ－α之試料）抑制５０％ＣＰＥ之濃度Ｙ（ｍｇ／ｍｌ），並根據所得之結果，以數式Ｚ＝Ｘ／Ｙ算出被驗試料每１毫克之活性Ｚ（ＩＵ／ｍｇ）。又，若將根據此方法所求出之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（8）

活性和蛋白質定量之組合予以組合，則可求出比活性（ＩＵ／ｍｇ蛋白質）。

本發明所謂之蛋白質合成抑制基因，係意指具有抑制或阻礙細胞中之蛋白質合成過程，即，具有抑制或阻礙由ＤＮＡ至ｍＲＮＡ之轉錄或由ｍＲＮＡ至蛋白質之轉譯之任一種工程中所屬之細胞內之反應機能之蛋白質的編碼基因，通常，經由ＩＦＮ之刺激而誘導其表現。此處所謂之轉錄工程爲包含由ＤＮＡ生成一次轉錄產物ＲＮＡ、ＲＮＡ之剪接，對ＲＮＡ加成帽（ｃａｐ）構造或聚腺苷酸等之生成對應模板ＤＮＡ序列之機能性ｍＲＮＡ的所有細胞內反應。又，上述所謂之轉譯工程爲包含核糖體對於ｍＲＮＡ結合做爲契機之所謂的「蛋白質生物合成之開始」，根據ｍＲＮＡ上之遺傳暗號連結胺基酸之所謂的「多肽鏈之伸長」，ｍＲＮＡ上之終止密碼子之所謂的「蛋白質生物合成之終止」等之生成對應ｍＲＮＡ序列之多肽的所有細胞內反應。本發明對象之蛋白質合成抑制基因之具體例可列舉例如２－５Ａ合成酶基因和ＰＫＲ基因。此類基因產物之２－５Ａ合成酶爲以ＡＴＰ做爲受質並於細胞於生成２－５Ａ，２－５Ａ於細胞內爲將惰性型存在之核糖核酸酶Ｌ變換成活性型，且活性型之核糖核酸酶Ｌ爲經由分解ＲＮＡ而阻礙蛋白質之合成。另一方面，ＰＫＲ爲經由將上述所謂之關於蛋白質生物合成開始之ｅＩＦ－２的α亞型予以雙股ＲＮＡ依賴性磷酸化且惰性化，則可阻礙蛋白質之合成。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（9）

本發明所謂之「經由ＩＦＮ之刺激造成基因表現之誘導」爲意指回應ＩＦＮ所造成之細胞刺激且此細胞內之基因表現程度爲由基因轉錄量和／或ｍＲＮＡ轉譯量上升而被確認。雖然亦根據基因種類和具有該基因之細胞種類而異，但本發明對象之蛋白質合成抑制基因，經由ＩＦＮ之刺激，其表現程度通常爲１．５倍以上，較佳之情形爲２倍以上，更佳之情況爲上升至２．５倍以上，將基因之表現程度以轉錄量予以比較上，例如，若利用通常之定量的ＲＴ－ＰＣＲ和 Northern 印跡法等即可。因此，上述例之基因的鹼基序列爲於 National Center for Biotechnology Information（美國）之核酸數據庫「Gene Bank」中，分別以下述表１所示之 Access Code 予以註冊，故若使用根據此資料所謂製之引子和探針並且實施此些方法，則可令目的基因之轉錄量以良好感度，且定量性檢測出。另一方面，將基因之表現程度之轉譯量予以比較上，若利用可將其基因表現產物之蛋白質予以專一性定量之方法即可，例如，於可取得對於對象基因之表現產物之專一性抗體之情形中，可根據免疫等手法（免疫分析等），於對象基因之表現產物爲具有酵素活性之情形中，可根據指定之酵素活性測定法，又，於對象基因之表現產物爲具有生理活性之情形中，可根據指定之生物分析予以定量性檢測。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 10 ）

〔表１〕

| 基因產物 | 鹼基序列之 Access Code |
| --- | --- |
| 2-5A 合成酶 | NM_016817, NM_002534, NM_016816, NM_006187, NM_002535 |
| PKR | AH008429 |

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（11）

本發明之表現增強劑爲含有ＩＦＮ－α２或ＩＦＮ－α８做爲有效成分，且以各個亞型爲單獨顯示之對於蛋白質合成抑制基因之表現誘導作用之和，或、此些和及所預想之作用明顯上升之作用，即，於蛋白質合成抑制基因之表現誘導中發揮相乘作用爲其特徵。此相乘作用可根據如上述所求出之轉錄量和轉譯量予以確認。又，本發明所謂之蛋白質合成抑制基因之表現產物，通常因爲ＩＦＮ－α爲對於感受性細胞顯示生理活性的主要機能分子，故該增強劑所造成之相乘作用可由該增強劑對感受性細胞作用時之該感受性細胞中之ＩＦＮ－α的生理活性表現，例如，於抗病毒活性，細胞增殖抑制活性，細胞自滅誘導活性等表現中之相乘作用予以確認。例如，細胞自滅誘導活性爲令該增強劑對肝臟癌細胞等之癌細胞作用，並且經由定量性觀察細胞自滅之特徵性現象之細胞內ＤＮＡ之斷片化，和 Fas 等之細胞自滅關連分子表現之慣用方法則亦可確認。又，該增強劑亦因令ＩＦＮ－γ所造成之蛋白質合成抑制基因的表現誘導作用相乘地，顯著地增強，故亦可利用做爲ＩＦＮ－γ所造成之該基因表現誘導作用的增強劑。

如上述處理所確認之該增強劑所造成的相乘作用，若以ＩＦＮ－α２或ＩＦＮ－α８分別單獨所造成之表現誘導作用之和，或此些和及所預想之值以數值１表示，則該增強劑通常以１．２以上，較佳之情況爲以１．５以上發揮表現誘導作用。又，此相乘作用例如可根據 T.C.Cho.「Synergism and Antagonism in Chemotherapy」（1991 年

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（12）

,Academic Press 公司發行），６１至１０２頁所記載之多變量解析則可確認。若根據此方法，則如下述表２所示般，將不同二種藥劑所造成之相乘作用之有無及強弱以聯合指數(CombinationIndex,CI)予以數值化則可評價。根據此方法時，該增強劑之ＣＩ雖亦根據對象基因而異，但通常爲未滿０．９，且較佳之情況爲顯示未滿０．８５。

〔表２〕

| CI | 評價 | 符號 |
|---|---|---|
| 0.1-0.3 | 強的相乘作用 | ＋＋＋＋ |
| 0.3-0.7 | 相乘作用 | ＋＋＋ |
| 0.7-0.85 | 溫和的相乘作用 | ＋＋ |
| 0.85-0.90 | 少許的相乘作用 | ＋ |
| 0.90-1.10 | 大約相加的 | ± |
| 1.10-1.20 | 少許負的相乘作用 | - |
| 1.20-1.45 | 溫和負的相乘作用 | -- |
| 1.45-3.3 | 負的相乘作用 | --- |

本發明之表現增強劑中之ＩＦＮ－α２或ＩＦＮ－α８之活性比，只要對於蛋白質合成抑制基因之至少一個可發揮此類相乘作用，則無特別限制。雖亦根據對象基因之種類和細胞之種類而異，但兩者之活性比以國際單位換算爲１：０．２５以上且未滿１．５時，可特別顯著發揮所期之相乘作用爲其特徵。因此，顯著發揮所期之相乘作

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（13）

用之本發明表現增強劑中之ＩＦＮ－α２或ＩＦＮ－α８之較佳的存在比，若以兩者之重量比表示，雖亦根據所用亞型之精製度和調製方法等而異，但通常爲１：０．０５以上且未滿０．５，較佳爲１：０．０６以上且未滿０．４。尙，本發明所謂之亞型重量，爲意指目的亞型，以單離狀態下，並以實質上不含有糖鏈之單純蛋白質對照標準試料，且供於 Lowry 法和紫外線吸收法等慣用之蛋白質定量法所求出之重量（相當於多肽鏈部分之重量）。

於本發明之表現增強劑中，於不會消失ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８相乘作用之範圍下，亦可含有其他以外之亞型。例如，ＩＦＮ－α１和ＩＦＮ－α７等在其含量爲較低之情形中，通常，對於ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８之相乘作用不會造成影響，故可令該增強劑中含有此些亞型。雖亦根據對象基因之種類和細胞之種類而異，但相對於ＩＦＮ－α之總量，ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８合計量之百分率以國際單位換算通常爲９０％以上，較佳爲９５％以上，更佳爲９８％以上之該增強劑，不論ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８以外所含有之亞型種類，於基因表現之誘導中具有可發揮比較顯著之相乘作用爲其特徵。

本發明表現增強劑中之ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８之比活性，及ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８之和相對於ＩＦＮ－α總量之百分比爲如下求出。即，首先，將該增強劑，利用抗人類ＩＦＮ－α抗體柱等，將含有之蛋白質精製至實質上僅由ＩＦＮ－α中之亞型所構成之狀態爲止

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（14）

。其次，將此精製樣品，以離子交換層析和逆相層析等之分離ＩＦＮ－α亞型所慣用之方法予以分級，單離出各個亞型。視需要，根據Ｎ終端胺基酸序列分析等，則可確認所單離之亞型爲人類ＩＦＮ－α中之任一種亞型。其後，根據本發明所定出之方法，求出被單離之各個亞型的比活性（ＩＵ／ｍｇ蛋白質）。另外，將上述之ＩＦＮ－α精製樣品，以分離ＩＦＮ－α中亞型之高速液體層析等予以分析，並且根據此結果所得之層析中的波峰面積比，求出ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８相對於令ＩＦＮ－α量之存在比（重量比）。若使用上述結果所得之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８之比活性及存在比，則可以國際單位換算算出目的之比活性。

本發明之表現增強劑可經由各種方法予以調製。天然型之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８爲於人類細胞中產生ＩＦＮ－α，並由此產物中採集ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８，且使用此採集物則可調製該增強劑。此處所用之人類細胞若爲經由適當之誘導劑刺激產生ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８任一者或兩者之細胞即可，且亦可根據其產生能力而適當組合利用二種以上之細胞。具體而言，可列舉由人類生體所單離出的淋巴球，單核細胞等之白血球、和巨噬細胞，擬人類淋巴芽球細胞等之起源於人類之樹立細胞株等。因爲 S.Hira 等人「Journal of National Caner Institute」，第５９卷，９３頁（１９７７年）所記載之擬人類淋巴芽球細胞之一種之ＢＡＬＬ－１細胞爲可良好產

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（15）

生兩亞型，故特別可用於實施本發明。於人類細胞中產生ＩＦＮ－α上，首先，令該細胞於生體外或人類以外之溫血動物之生體內增殖。生體外之增殖若爲使用培養器和醱酵器等之動物細胞培養用之慣用方法即可，又，生體內之培養爲例如根據特公昭５６－５４１５８號公報所記載之方法，利用食鼠，正常鼠、裸鼠、大鼠、土撥鼠、兔、馬、豬、山羊、猿、狗、貓等之哺乳類、和鷄、鴿等之鳥類生體並根據慣用之方法即可。其後，於生體外或生體內之細胞增殖途中或其前後之適當時期令該細胞以ＩＦＮ誘導劑作用，則可產生ＩＦＮ－α　ＩＦＮ誘導劑例如除了病毒、雙股ＲＮＡ、細菌、內毒素以外，可誘導ＩＦＮ－α，本身和ＩＬ－１、ＴＮＦ等之ＩＦＮ－α表現的細胞激動素。

繼續，由產生ＩＦＮ－α之如上述工程之產物，採集ＩＦＮ－α或其亞型之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８之一者或兩者。ＩＦＮ－α之採集若根據慣用之方法即可，例如，將鹽析、透析、過濾、離心、濃縮、冷凍乾燥、膠過濾層析、離子交換層析、親和性層析、逆相層析、等電點分級、電泳等適當組合，並由所分級之餾分中採集所欲之餾分，例如，顯示所欲抗病毒活性之餾分則可取得精製至所欲程度爲止之ＩＦＮ－α樣品。更具體而言，首先，將如上述處理產生ＩＦＮ－α工程產物，以抗ＩＦＮ－α抗體做爲載體之親和性層析等之層析予以分級，取得實質上不含有ＩＦＮ－α以外夾雜蛋白質之精製樣品，其次，將

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝　訂　線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（16）

此精製樣品以離子交換層析和逆相層析等予以分級並且分離出各個亞型，則可取得電泳上實質上單一的ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８精製樣品。將此精製亞型，視需要，再加以濃縮、乾燥等處理後以所欲之活性比配合，或，視需要，與後述重組型亞型和以水溶性高分子做爲修飾物之亞型中選出一種或二種以上組合，且令ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８之活性比爲以所欲之比予以配合，則可取得該增強劑之有效成分。於採集ＩＦＮ－α之過程中，若ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８之活性比爲在所期之範圍。且，不妨礙達成本發明之目的且達到精製程度之樣品，則其亦可利用做爲該增強劑之有效成分。更且，由ＩＦＮ－α樣品之市售品（Cosmo Bio股份有限公司販售之研究用試藥等），如上述處理所單離之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８樣品使用做爲有效成分，且於ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８之活性比及其精製程度爲達到所欲程度之情形中，由此類市售品所精製之含有兩亞型之樣品亦可就其原樣做爲該增強劑之有效成分。

另一方面，利用重組ＤＮＡ技術調製該增強劑上，首先，參照公知之資料，取得編碼目的亞型之ＤＮＡ。例如，於 M.O.Diase 等人「Journal of Interferon and Cytokine Research」，第１６卷，１７９至１８０頁（１９９６年）中，將報告編碼人類ＩＦＮ－α各種亞型之ＤＮＡ之論文整理示出。又，慣用之核酸數據庫亦爲有用，例如，於 National Center for Biotechnology Information（美國）之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（17）

核酸數據庫「Gene Bank」中以 ACCess Code」J00207」及「Xo3125」註冊之序列分別爲編碼ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８之ＤＮＡ序列（分別於本案說明書之序列表中以序列編號３及４示出）。以此些資料爲基礎，使用由適當來源所得之ＲＮＡ或ＤＮＡ並應用ＰＣＲ等之ＤＮＡ克隆化所用之慣用方法，則可取得目的之ＤＮＡ。其次，將所得之ＤＮＡ插入所欲之表現載體。本發明中可利用之表現載體可列舉例如 pET、pKK223-3、pcDNAI/Amp、BCMGS Neo、pcDL-SRα、pKY4、pSV2-neo、pSV-2gpt、pCDM8、pCEV4、pME185、pEF-BOS 等之質體載體。可複製之載體通常含有啓動子、增強子、複製起點、轉錄終止部位、剪接序列和／或選擇序列等之本發明ＤＮＡ於各個宿主中表現用之適當的鹼基序列。尙，使用啓動子例如爲熱衝擊蛋白質啓動子、或，相同專利申請人於特開平７－１６３３６８號公報所揭示之啓動子時，則該ＤＮＡ於轉形體中之表現可經由外部刺激予以人爲控制。

將此類重組ＤＮＡ其次導入適當之宿主中。宿主可使用此業界所慣用之含有適當原核細胞及真核細胞之微生物、和來自包含植物、脊椎動物及無脊椎動物之動物細胞、及動植物體等。來自動物之宿主細胞的具體例可列舉例如 3T3-Swiss albino 細胞(ATCC CCL-92)，Ｃ１２７Ｉ細胞(ATCC CRL-1616)、CHO-K1 細胞(ATCC CRL-61)、ＣＶ－１細胞(ATCC CCRL-70)、ＣＯＳ－１細胞(ATCC CRL-1650)，HeLa 細胞(ATCC CCL-2)、MOP-8 細胞(ATCC CRL-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（20）

α 8 反應即可。

於經由胜肽法取得修飾物上，例如，將本來具有羧基之水溶性高分子或導入羧基之水溶性高分子根據常法作成醯基疊氮、醯基氯、碳化二亞胺、異氰酸酯等之羧酸衍生物、或、令本來具有羧基之水溶性高分子以氰脲醯鹵化物反應作成氰脲醯鹵化物活性化水溶性高分子等，使得水溶性高分子活化，且令此類活化水溶性高分子與ＩＦＮ－α 2和／或ＩＦＮ－α 8反應即可。

於經由烷基化法取得修飾物上，例如，對適當之水溶性高分子，將氯乙醯基、溴乙醯基、碘乙醯基、鹵化三吡基等根據常法導入所得之水溶性高分子之鹵化熔基衍生物、與ＩＦＮ－α 2和／或ＩＦＮ－α 8反應即可。

於經由交聯法取得修飾物上，令ＩＦＮ－α 2和／或ＩＦＮ－α 8與水溶性高分子，例如於戊二醛、乙二醛、丁二醛、二異氰酸乙二酯、2，4－二異氰酸甲苯酯、雙偶氮聯苯胺、Ｎ，Ｎ´－伸乙基雙馬來醯亞胺等之交聯試藥存在下反應即可。

於經由醯胺結合法取得修飾物上，例如，令本來具有胺基之水溶性高分子或導入胺基之水溶性高分子，例如，將溴乙醯溴、氯丁醯氯、氟丙醯氟、碘戊醯碘等之鹵醯基鹵反應所得之活化水溶性高分子，與ＩＦＮ－α 2和／或ＩＦＮ－α 8反應即可。

於經由轉麩胺酸酶（ＥＣ２．３．２．１３）之作用取得修飾物上，例如，令本來具有胺基之水溶性高分子或

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（21）

導入胺基之水溶性高分子，與ＩＦＮ－α２和／或ＩＦＮ－α８於所欲來源之轉麩胺酸酶之存在下反應即可。反應條件若爲不妨礙經由轉麩胺酸酶所催化之蛋白質中之麩胺醯胺殘基的γ－羧醯胺基與一級胺之間的醯基轉移反應即可。微生物來源，尤其是放射菌來源之該酵素於熱和ｐＨ安定性爲較其他來源高，故於調製實施本發明之修飾物上爲特別有用。

取得如上述修飾物之反應中的ＩＦＮ－α２或ＩＦＮ－α８與水溶性高分子之比例雖在根據反應方法而異，但以重量比通常爲１：０．００１至１，０００，較佳爲１：０．０１至１００之範圍中選出即可。

視反應方法，若大爲低於此範圍則有時顯著引起ＩＦＮ－α２或ＩＦＮ－α８彼此間的結合，另一方面，若大爲高於此範圍則有時引起水溶性高分子彼此間的結合，故爲不佳。反應之溫度，ｐＨ及時間若爲不令ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８失活、分解，且，可儘量抑制副反應進行即可，且溫度通常爲０℃至１００℃，ｐＨ約１至１２，反應時間爲０．１小時至５０小時爲較佳。又，例如，根據ＩＦＮ－α２和／或ＩＦＮ－α８修飾物之利用目的等，必須於平均分子量和分子量分布方面顯示特定特性之水溶性高分子修飾物之情形中，於調製此類修飾物時，期望使用具有配合目的特性之水溶性高分子做爲材料。市售之水溶性高分子調製品爲以特定之平均分子量和分子量分布所提供，故可於此類市售調製品中選擇配合目的之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（22）

物質做爲材料。又，於相同專利申請人之特開平６－６５３０２號公報，和專利第８６６８８９號公報中，揭示控制具有支鏈澱粉產生能力之微生物的培養條件，並且產生具有所欲之平均分子量和分子量分布之支鏈澱粉之方法。此些方法可用於調製本發明所用之修飾物材料。於如上述之ＩＦＮ－α２和／或ＩＦＮ－α８之修飾物中，本質上以麥芽糖三糖做爲回復單位之支鏈澱粉和 Erucinan 等之多醣類，較佳爲分子量爲１０，０００至１，０００，０００範圍之該多糖的修飾物，於人類生體內之安定性高度和對於人類生體之抗原性低度方面爲較優良，爲於本發明中可特別有利利用之物質之一。

將經由如上述反應所修飾之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８，供於天然型或重組型ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８精製方法之精製手段，則可取得精製互所欲程度爲止之樣品。其後，將如上述處理所得之經修飾ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８以所欲之活性比配合，或，視需要，與上述天然型或重組型亞型中選出一種或二種以上予以組合，且令ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８之活性比爲以所欲之比予以配合即可。

含有如此處理所得之ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８之組成物爲此其本身、或，視目的，配合載體、緩衝劑、安定劑、溶劑、稀釋劑等適當之其他成分，則可以蛋白質合成抑制基因之表現增強劑型式於各種領域中利用。例如，該增強劑爲於人類生體中，經由蛋白質合成抑制基因之表

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（23）

現而顯著發揮抑制細胞異常之效果，且該增強劑中所含之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８均於人類做爲對象之醫藥用途中被廣泛利用，故該增強劑有利於做爲醫藥用組成物之有效成分。本發明之醫藥用組成物爲以含有做爲有效成分之該增強劑，及通常生理學上所容許，即，醫藥品領域所通常使用之載體、賦形劑、安定劑、溶劑、緩衝劑、及視需要、其他生理活性物質之一或數種之組成物型式，並以液狀、固體狀、半固體狀等視適應症和適用方法之適當型態提供。此處可利用之安定劑具體可列舉血清白蛋白和明膠等之蛋白質、葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露糖、海藻糖、山梨糖、麥芽三糖、甘露糖醇、乳糖醇等之糖質、緩衝劑可列舉檸檬酸或磷酸鹽做爲之體之緩衝劑等，又，可併用之其他生理活性物質爲除了例如鹽酸氧氮芥－Ｎ－氧化物（Hydrochloride Nitrogen Mustard-N-Oxide）、氫硫嘌呤、依托泊苷(Etoposide)、放線菌素Ｄ、鹽酸米托蒽醌（Mitoxantrone Hydrochloride）、Ｌ－天冬醯胺酶、香菇多糖(Lentinan)、無環鳥苷(Aciclovir)等以外，可列舉ＩＬ－１、ＴＮＦ、ＩＦＮ－γ等之細胞激動素。

如上述所構成之本發明的醫藥用組成物可利用做爲蛋白質抑制基因之表現所直接或間接性參與之症狀被治療、緩和或預防疾病，即，於該基因之表現上顯示感受性之例如免疫系、造血組織、循環器、皮膚組織、消化器、神經系、肌肉、眼等中之各疾病，更詳言之，過敏、風濕病、愛滋病、白血病、惡性黑色瘤、肉瘤、結膜炎、肝炎、腸

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（24）

炎等所用之治療藥、緩和藥、預防藥。投與途徑爲根據對象疾病，由靜脈內、肌肉內、皮下、皮內、腹腔內、經皮、經口等中適當選出。投與量雖根據對象旨之年齡、疾病種類、症狀、投與途徑而異，但該醫藥用組成物於經由肌肉內注射投與時，成人１人、每１日，有效成分之總量以國際單位換算通常１Ｕ／１００萬至１Ｕ／１０００萬，較佳爲以１Ｕ／３００萬至１Ｕ／６００萬之用量，連日或一邊觀察症狀一邊以１日或２日以上之間隔投與。又，於經口投與之情形中，成人１人、每１日，通常以１Ｕ／１０至１Ｕ／２０００，較佳爲１Ｕ／２０至１Ｕ／８００，更佳爲１Ｕ／４０至１Ｕ／４００之用量，連日或一邊觀察症狀一邊以１日或２日以上之間隔投與。

該增強劑比ＩＦＮ－α２或ＩＦＮ－α８單獨之情況，令蛋白質合成抑制基因之表現更顯著誘導爲意指該增強劑對ＩＦＮ－α感受性細胞作用時之細胞內反應可更加明確觀察。因此，該增強劑爲有效利用於ＩＦＮ－α作用於其感受性細胞並且誘導蛋白質合成抑制基因表現時之細胞內的分子機構，例如，將細胞內資料傳達系以分子程度解析所用的研究用試藥。

該增強劑所造成之相乘作用爲依賴於該增強劑做爲對象之基因的轉錄調節區域構造，與基因之表現產物本身通常無關。因此，若將該增強劑做爲對象之基因的轉錄調節區域予以單離，並且準備於其控制下配置有編碼所欲蛋白

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（25）

質之基因（構造基因）的重組ＤＮＡ，且將此重組ＤＮＡ導入ＩＦＮ－α感受性細胞後，以該增強劑刺激此細胞，則此細胞可顯著表現目的蛋白質。ＩＦＮ－α感染性細胞除了本來於細胞表面表現ＩＦＮ－α受體之人類細胞以外，亦可利用經由重組ＤＮＡ技術，作成欲於細胞表面表現出人類ＩＦＮ－α受體之人類或人類以外之脊椎動物細胞。又，此處做爲生產對象之蛋白質只要可取得編碼其之ＤＮＡ，則即使爲人類來源，或爲其以外來源，例如，人類以外之脊椎動物、無脊椎動物、植物或微生物來源者均可。因此，該增強劑亦可有利於利用做爲重組蛋白質生產中的誘導劑。

如上述所說明般，ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８爲於蛋白質合成抑制基因之表現誘導中顯示相乘作用，故將ＩＦＮ－α２利用於使用ＩＦＮ－α８誘導蛋白質合成抑制基因表現時之增強此類誘導作用之用途中，又，反之，將ＩＦＮ－α８利用於使用ＩＦＮ－α２誘導蛋白質合成抑制基因表現時之增強此類誘導作用之用途中。基於此事實，本發明爲亦提供以ＩＦＮ－α２或ＩＦＮ－α８做爲有效成分之基因表現之增強劑，及使用其一者或兩者亞型增強該基因表現之方法。根據本發明之此等增強劑及增強方法可有利用於可利用該增強劑之醫藥品、研究用試藥、蛋白質製造等之各種領域中。

另外，本發明所揭示之表現增強劑之構成，亦可應用於基因療法。即，根據通常的基因療法，將編碼ＩＦＮ－

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（26）

α２及ＩＦＮ－α８之ＤＮＡ，例如，插入來自逆轉錄病毒、腺苷病毒、腺苷伴隨病毒等病毒之載體中，或將該ＤＮＡ視需要與其他鹼基序列連結後，包埋至陽離子性聚合物和膜融合型核糖體等之核糖體中，並以此狀態下，對罹患蛋白質合成抑制基因表現顯示感受性之患者直接注入。或者，將上述ＤＮＡ重組至適當之載體後，對該患者所採集之淋巴球以生體外導入，並且將其自我移植至患者。尙，將編碼各亞型之ＤＮＡ，經由於轉錄活性不同之轉錄調節區域之控制下配置之操作，則亦有利於實施加減各亞型之表現量之比。於接受此類基因療法之患者生體內，因爲存在ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８，故可達成如上述例示疾病之治療、緩和。尙，實施此些基因療法之一般性手續爲例如於島因隆、齋藤泉、小澤敏也編集、「實驗醫學別冊生物操作ＵＰ系列基因治療之基礎技術」（１９９６年，羊土社發行）等中詳述。

以下，根據實驗及實施例更詳細說明本發明。

〔實驗１〕

（於蛋白質合成抑制基因之表現誘導中ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８所造成之相乘作用）

〔實驗１－１〕

（ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８之調製）

〔實驗１－１（ａ）〕

＜產生ＩＦＮ－α亞型之轉形體的調製＞

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（27）

由核酸數據庫「 Gene Bank」，取得關於以 Access Code J00207 註冊之ＩＦＮ－α２基因之鹼基序列的資料。此序列爲於序列表中以序列編號３表示。使用根據此資料所設計調製之引子，和做爲模板之人類染色體ＤＮＡ，並根據通常之ＰＣＲ，令含有對應於５´終端以開始密碼子所加成之成熟型ＩＦＮ－α２鹼基序列（序列表之序列編號３中之鹼基序列５８０至１０７７）的ＤＮＡ斷片予以放大。將放大之ＤＮＡ斷片依據常法插入大腸桿菌用之表現載體（東洋紡績股份有限公司販售，「ｐＥＴ－３ａ」）之啓動子下游。如此處理調製ＩＦＮ－α２表現質體。將此質體依據常法導入大腸桿菌受容細胞（東洋紡織股份有限公司販售，「ＢＬ２１（ＤＥ３）」），取得產生ＩＦＮ－α８之轉形體。

由核酸數據庫「Gene Bank」，取得關於以 Access Code X03125 註冊之ＩＦＮ－α８基因之鹼基序列的資料。此序列爲於序列表中以序列編號４表示。使用根據此資料所設計調製之引子，和做爲模板之人類染色體ＤＮＡ，並根據通常之ＰＣＲ，令含有對應於５´終端以開始密碼子所加成之成熟型ＩＦＮ－α８鹼基序列（序列表之序列編號４中之鹼基序列１１７至６１４）的ＤＮＡ斷片予以放大。將放大之ＤＮＡ斷片依據常法插入大腸桿菌用之表現載體（東洋紡績股份有限公司販售，「ｐＥＴ－３ａ」）之啓動子下游。如此處理調製ＩＦＮ－α８表現質體。將此質體依據常法導入大腸桿菌受容細胞（東洋紡織股份有

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（28）

限公司販售，「ＢＬ２１（ＤＥ３）」），取得產生ＩＦＮ－α８之轉形體。

〔實驗１－１（ｂ）〕

＜ＩＦＮ－α亞型之產生和精製＞

將實驗１－１（ａ）所得之轉形體分別根據常法，使用L-Broth培養基做爲培養基、異丙基－β－Ｄ－硫代半乳糖吡喃苷（ＩＰＴＧ）做爲誘導劑並培養，令菌體內產生各種亞型。將培養物離心並回收菌體，於ＰＢＳ中懸浮後，予以超音波處理將菌體弄碎。將菌體破碎物離心，並採集上清液餾分。將所採集之各上清液餾分根據常法，使用斥水性層析、離子交換層析、及膠過濾層析予以分級，精製出抗病毒活性餾分。根據常法進行還原條件下之ＳＤＳ－聚丙烯醯胺膠電泳，並且確認所得之精製餾分爲於電泳上爲實質上單一的。

採集由各轉形體所得之一部分的膠過濾精製餾分，並依據常法，予以還原羧醯胺甲基化處理後，經由 Edman 分解法解讀Ｎ終端開始至３０個殘基爲止的胺基酸序列。由產生ＩＦＮ－α２轉形體所得之精製餾分其Ｎ終端爲甲硫胺酸，其以後之序列爲與序列表中序列編號１所示之ＩＦＮ－α２之胺基酸序列（數據庫「Swiss Prot」Access Code「P01563」)中除了訊號胜肽以外之Ｎ終端部之胺基酸序列（胺基酸編號２４至５２）爲完全一致。另一方面，來自產生ＩＦＮ－α８轉形體之情況爲Ｎ終端爲甲硫胺酸

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（29）

，其以後之序列爲與序列表中序列編號2所示之ＩＦＮ－α８之胺基酸序列（數據庫「Swiss Prot」 Access Code「P32881」)中除了訊號胜肽以外之Ｎ終端部之胺基酸序列（胺基酸編號２４至５２）爲完全一致。由以上之結果，確認本實驗所得之電泳上單一之二個精製樣品分別爲ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８的精製樣品。

〔實驗１－１（ｃ）〕

＜比活性＞

根據J.Imanishi等人「Biken Journal」，第２４卷，１０８至１０９頁所記載之色素攝入法，將ＩＦＮ－α試料對於新培斯病毒造成來自人類羊膜樹立細胞株ＦＵ之細胞變性效果（ＣＰＥ）的抑制作用，經由使用中性紅做爲色素，並以波長５４０ｎｍ之吸收測定正常細胞所攝入之色素量，則可定量性求出。ＩＦＮ－α試料爲使用實驗１－１（ｂ）所得之ＩＦＮ－α亞型精製樣品之每2倍的階段稀釋液。和ＩＦＮ－α之國際標準品「Ｇａ２３－９０１－５３２」（２５，０００ＩＵ／安瓿，由美國國立衛生研究所取得）之每2倍的階段稀釋液，並分別求出抑制５０％ＣＰＥ時之稀釋倍率。由所得之結果，算出實驗１－１（ｂ）之ＩＦＮ－α亞型精製樣品的抗病毒活性（ＩＵ／ｍｌ）。另一方面，另外根據 Lowry 法測定實驗１－１（ｂ）之ＩＦＮ－α亞型精製樣品的蛋白質含量。由以上之結果，可算出實驗１－１（ｂ）之ＩＦＮ－α２

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（30）

精製樣品的比活性爲７．２×１０$^{7}$ＩＵ／ｍｇ蛋白質、ＩＦＮ－α８精製樣品的比活性爲３．０×１０$^{8}$ＩＵ／ｍｇ蛋白質。

〔實驗１－２〕

＜於蛋白質合成抑制基因之表現誘導中之ＩＦＮ－α２與ＩＦＮ－α８的相乘作用＞

將來自人類肝細胞樹立細胞株Hep G2細胞（ＡＴＣＣＨＢ－８０６５），於含有１０％（ｗ／ｖ）胎牛血清之ＲＰＭＩ１６４０培養基中依據常法培養達到所欲之細胞數後，以相同培養基調製成細胞密度１×１０$^{5}$個／ｍｌ之細胞懸浮液。將此細胞懸浮液於９６孔穴平板之每１孔穴中各注入１００微升，並於５％（ｖ／ｖ）$CO_2$培養箱中，以３７℃培養４８小時。

使用實驗１－１（ｂ）所得之精製樣品，準備ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８，以國際單位換算，含有１０：０、８：２、６：４、５：５　４：６、２：８、或０：１０之比活性，且ＩＦＮ－α活性之計算上總和爲１×１０$^{4}$ＩＵ／ｍｌ之ＩＦＮ－α２／ＩＦＮ－α８混合液。各個混合液以上述之培養基以每２倍階段稀釋。尙，此處所準備之混合液中之ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８之重量比，若根據實驗１－１（ｃ）所求出之比活性予以計算，則分別爲１００：０、９４：６、８６：１４、８１：１９、７４：２６及５１：４９、及０：１００。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝　訂　線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（31）

對微平板中培養４８小時之 Hep G2 細胞的各孔穴中，將各個比活性之ＩＦＮ－α２／ＩＦＮ－α８混合液的各階段稀釋液分別各添加５０微升，且令各孔穴充分混合後，再繼續培養２４小時。

其後，由各孔穴中除去培養上清液，並對各孔穴將預先準備之病毒密度$3\times10^{5}$ｐｆｕ／ｍｌ之ＶＳＶ（水疱性口腔炎病毒）液各添加１００微升，再培養２４小時。尙，對照組爲同上述由每１孔穴之細胞數開始，且另一方面設計未施以ＩＦＮ－α處理及ＶＳＶ處理系並以相同時間培養。又，對於全部之培養系各設置３組相同之培養系。

培養後，由各孔穴中回收細胞，且根據常法計測各孔穴的生細胞數，求出各系中的平均值。根據此結果，對於各ＩＦＮ－α２／ＩＦＮ－α２混合液，作成 HepG2 細胞的生存曲線(相對於混合液之稀釋倍率繪出生細胞數）。於生存曲線中，各ＩＦＮ－α２／ＩＦＮ－α８混合液，由 HepG2 細胞之生存維持對照細胞數５０％時之稀釋倍率，算出抑制ＶＳＶ對於 HepG2 細胞之ＣＰＥ（細胞變性效果）５０％之各混合液濃度（$IC_{50}$，每１毫升於計算上之ＩＦＮ－α活性之總和，１Ｕ／ｍｌ）之平均值。又，將算出之值，根據 T.C.Chou,「Synergism and Antagohism in Chemotherapy」(1991 年 Academic Press 公司發行），６１至１０２頁所記載之多變量解析法予以解析，並將ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８所造成之相乘作用之有無及強弱以

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（32）

聯合指數（ＣＩ）予以數值化。尙，ＣＩ所示之相乘作用之強度爲整理於上述之表２中。結果示於表３。

〔表３〕

| IFN-α2/IFN-α8(活性比) | 抗病毒活性 ($IC_{50}$,IU/ml) | 相乘作用之評價 CI | 符號 |
|---|---|---|---|
| 10:0 | 512 | | |
| 8:2 | 318 | 0.99 | ± |
| 6:4 | 285 | 0.90 | + |
| 5:5 | 241 | 0.73 | ++ |
| 4:6 | 254 | 0.94 | ± |
| 2:8 | 231 | 1.06 | ± |
| 0:10 | 210 | | |

如表３所示般，於Hep G2細胞中ＶＳＶ顯示ＣＰＥ之系中，將ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８分別單獨添加之情形中，ＩＦＮ－α８爲顯示出更顯著的抗病毒活性，若以$IC_{50}$比較，則顯示出ＩＦＮ－α２之２．４倍左右的抗病毒活性（由１０：０和０：１０之結果）。由此結果，假設若將ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８混合，且ＩＦＮ－α８之比例爲依序提高，階段性改變活性比所調製之兩者混合液中，兩者爲單純以相加性地顯示出抗病毒活性，則$IC_{50}$爲依序減少並且收縮至０：１０情況之值。但是，於５：５之ＩＦＮ－α２／ＩＦＮ－α８混合液之前後中

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（33）

，實驗所求出之ＩＣ$_{50}$爲顯示出相反於此假設之值，且兩亞型爲以特定之活性比共存時，則顯示出相乘作用。其爲如表３中之右欄所示，根據ＩＣ$_{50}$之多數量解析予以證實，且判知兩亞型之活性比爲６：４至５：５時之相乘作用爲特別顯著。

如以上所示之結果，ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８爲於抗病毒活性之表現中，以指定之活性比共存時，發揮顯著的相乘作用。此事實爲意指以此類活性比令ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８共存時，直接擔任抗病毒活性之機能分子的編號基因２－５Ａ合成酶基因和ＰＫＲ基因等之於蛋白質合成抑制基因表現之誘導中，兩者爲顯示出顯著的相乘作用。

另一方面，依據以上之操作，使用另外調製之重組型ＩＦＮ－α１、ＩＦＮ－α５及ＩＦＮ－α１０，調查與ＩＦＮ－α８組合之效果時，於ＩＦＮ－α５或ＩＦＮ－α１０與ＩＦＮ－α８組合使用之情形中並未察見相乘作用，且根據兩者之活性比，亦有時察見明顯的負相乘作用。又，於ＩＦＮ－α１與ＩＦＮ－α８組合之情形中，雖察見少許的相乘作用，但比與ＩＦＮ－α２組合之情形並未如此顯著。以上之結果顯示ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８之組合爲令蛋白質合成抑制基因之表現特別顯著增強。

〔實驗２〕

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（34）

＜於２－５Ａ合成酶基因之表現誘導中之ＩＦＮ－α２與ＩＦＮ－α８的相乘作用＞

將來自人類肝細胞樹立細胞株 Hep G2 細胞（ＡＴＣＣＨＢ－８０６５），於含有１０％（ｖ／ｖ）胎牛血清之ＲＰＭＩ１６４０培養基中依據常法培養達到所欲之細胞數後，以相同培養基調製成細胞密度１×１０$^{5}$個／ｍｌ之細胞懸浮液。將此細胞懸浮液於９６孔穴平板之每１孔穴中各注入１００微升，並於５％（ｖ／ｖ）$CO_2$培養箱中，以３７℃培養４８小時。

使用實驗１－１（ａ）所得之精製樣品，準備ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８，以國際單位換算，含有１０：０、８：２、６：４、５：５ ４：６、２：８、或０：１０之比活性，且ＩＦＮ－α活性之計算上總和爲２００ＩＵ／ｍｌ之ＩＦＮ－α２／ＩＦＮ－α８混合液。

將此些混合液之任一種，對微平板中培養４８小時之 Hep G2 細胞的各孔穴中各添加２５微升，且將各孔穴內充分混合後，再繼續培養２４小時。對照組爲同上述每１孔穴之細胞數開始，且另一方面設計未施以ＩＦＮ－α處理系並以相同時間培養。又，對於全部之培養系各設置３組相同之培養系。

其後，由各孔穴中回收細胞，並分別懸浮於ＰＢＳ後，冷凍融解並萃取細胞，取得１００微升之細胞萃取液。於此些細胞系取液中之２－５Ａ合成酶活性，使用測定該酵素活性用之市售套件（榮研化學股份有限公司製造、商

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（35）

品名「２－５Ａ套件〝榮研〞」）求出經由該酵素作用所生成的２－５Ａ量（ｐｍｏｌ／ｄｌ），且於各系求出平均值。將ＩＦＮ－α處理系之值減去對照系之值之差值，評價爲各試料所顯示的２－５Ａ合成酶誘導活性。於１０：０（僅ＩＦＮ－α２處理）之情況爲約２００ pmol/dl，於０：１０（僅ＩＦＮ－α８處理）之情況爲約４５０ pmol/dl，於實際１－２所觀察之兩亞型之抗病毒活性之不同之間察見良好相關。

另一方面，雖省略數據，但由預先實驗之結果，得知根據實驗１－２方法之抗病毒活性（$IC_{50}$）的對數值（底１０），與根據本實驗條件下所測定之２－５Ａ合成酶誘導活性之測定值（ｐｍｏｌ／ｄｌ）爲顯示直線關係。根據此發現，對於假設ＩＦＮ－α２與ＩＦＮ－α８爲相加性作用時之２－５Ａ合成酶誘導活性（ｐｍｏｌ／ｄｌ）求出本實驗測定值之倍率，並且判定有無相乘作用。結果示於表４。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（36）

〔表４〕

| IFN-α2/IFN-α8(活性比) | 2-5A 合成酶/誘導中之相乘作用之判定* |
|---|---|
| 8:2 | + |
| 6:4 | ++ |
| 5:5 | ++ |
| 4:6 | ± |
| 2:8 | ± |

*對於假設ＩＦＮ－α２與ＩＦＮ－α８爲相加性作用時之２－５Ａ合成酶誘導活性（ｐｍｏｌ／ｄｌ）以測定值之倍率予以判定：±，０．９倍以上且未滿１．２倍；＋，１．２倍以上且未滿１．５倍；＋＋，１．５倍以上。

如表４所示般，２－５Ａ合成酶誘導活性於ＩＦＮ－α２／ＩＦＮ－α８混合液對ＨｅｐＧ２細胞作用時，於兩者之活性比爲４：６及２：８之情形中顯示出與相加性作用之假設值大約相同值，相對地，兩者之活性比爲８：２，６：４及５：５之情形中，超過各個假設值，尤其，於６：４及５：５之情況中顯示高活性。此結果具體證實根據實驗１－２所示之測定抗病毒活性之發現。

〔實施例１〕

＜醫藥品製造用原液＞

於含有１％（ｗ／ｖ）含水結晶海藻糖做爲安定劑之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（37）

生理食鹽水中，將實驗１－（１ａ）至實驗１－（ｂ）方法所得之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８之精製樣品依常法予以膜濃縮後，以國際單位換算兩者之活性比爲２：１，計算上之ＩＦＮ－α活性總和爲$1\times10^{6}$ＩＵ／ｍｌ溶解之溶液，依據常法經由精密過濾除菌取得液劑。

安定性優良之本品爲有用於做爲於蛋白質合成抑制基因之表現上顯示感受性之免疫系，造血組織、循環器、皮膚組織、消化器、神經系、肌肉等中各疾病的治療劑、緩和劑、預防劑之製造用原液。又，本品亦可利用做爲研究用試藥和重組型蛋白質製造中之誘導劑。

〔實施例２〕

＜醫藥品製造用原液＞

將來自擬人類淋巴芽球細胞之一的ＢＡＬＬ－１細胞之人類ＩＦＮ－α溶液（Cosmo Bio股份有限公司販售）供於抗人類ＩＦＮ－α單株抗體柱層析（載體：Ronsa 公司製「NK-2 Sepharose」，移動相：ＰＢＳ，溶出液：含有０．３Ｍ氯化鈉之０．１Ｍ檸檬酸水溶液（ｐＨ２．０）），除去該溶液中存在的牛血清白蛋白，取得精製人類ＩＦＮ－α樣品。依據常法分析時，此精製樣品中之人類ＩＦＮ－α亞型實質上由ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８所構成，該精製樣品中兩亞型之活性比以國際單位換算爲約１：１。

將上述精製人類ＩＦＮ－α樣品對於ＰＢＳ透析，並

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（38）

採集透析內液且依據常法濃縮後，與含有１％（Ｗ／Ｖ）含水結晶海藻糖做爲安定劑之生理食鹽水混合，並且調整至ＩＦＮ－α活性爲５×１０$^{6}$ＩＵ／ｍｌ，且依常法經由精密過濾除菌取得液劑。

安定性優良之本品爲有用於做爲於蛋白質合成抑制基因之表現上顯示感受性之免疫系，造血組織、循環器、皮膚組織、消化器、神經系、肌肉等中各疾病的治療劑、緩和劑、預防劑之製造用原液。又，本品亦可利用做爲研究用試藥和重組型蛋白質製造中之誘導劑。

〔實施例３〕

＜醫藥品製造用原液＞

將根據實驗１－１（ａ）至實驗１－１（ｂ）方法所得之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８之精製樣品依常法予以膜濃縮後，以ＰＢＳ（ｐＨ７．０）稀釋，調製各亞型之濃度２毫克／毫升溶液。

將根據相同專利申請人於特開平６－６５３０２號公報所記載之方法調製之平均分子量約２００，０００的支鏈澱粉，經由常法予以脫色、脫鹽並精製，且冷凍乾燥取得精製支鏈澱粉粉末。將此精製支鏈澱粉粉末溶解於ＰＢＳ（ｐＨ７．０）中，調製濃度２０毫克／毫升之溶液。將此支鏈澱粉溶液，與調整之濃度１％（ｗ／ｖ）之氰脲醯氯的丙酮溶液，以體積比３０：１混合，並將此混合物一邊溫和攪拌，一邊於冰冷下培養反應２小時，經由

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（39）

氰脲醯氯將支鏈澱粉活化。將此含有氰脲醯氯活化支鏈澱粉之反應混合物，與上述所得之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８之任一種溶液，以體積比１：１混合，並一邊溫和攪拌，一邊於３７℃培養６小時，使得各亞型以支鏈澱粉進行修飾反應。其後，於此反應混合物中添加濃度５％（ｗ／ｖ）之甘胺酸，並一邊溫和攪拌，一邊於４℃培養１６小時令反應停止。

將上述之反應混合物，分別經由膠過濾層析（膠過濾載體爲使用 Amersham Pharmacia Biotech 股份有限公司販售之商品名「Sephacryl S-200 柱」。移動相爲使用ＰＢＳ）予以分級。將各餾分之蛋白質量以 Blood ford 法予以分析。其結果，於各個反應混合物中察見保持時間不同的２個波峰。採集保持持間更短之波峰（相當於分子量約２００，０００以上）之餾分，做爲ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８分別之含有支鏈澱粉結合亞型之餾分。其次，將所得之含有支鏈澱粉結合亞型之餾分，分別依據常法，供於多株抗體柱層析。多株抗體柱爲使用以實施例２方法所得之精製人類ＩＦＮ－α樣品做爲抗原所得之兔抗人類ＩＦＮ－α多株抗體，並依據常法所準備之柱。採集對於此多株抗體柱的結合餾分，取得支鏈澱粉結合亞型（分別之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８）的精製樣品。兩精製樣品之ＩＦＮ－α活性依常法測定，並將支鏈澱粉結合ＩＦＮ－α２和支鏈澱粉結合ＩＦＮ－α８之活性比爲以國際單位換算爲１：１將兩者混合後，對含有１％（

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（40）

ｗ／ｖ）含水結晶海藻糖做爲安定劑之生理食鹽水進行透析。採集透析內液，並以上述含海藻糖之生理食鹽水調整至ＩＦＮ－α活性爲５×１０$^{4}$ＩＵ／ｍｌ，且經由精密過濾除菌取得液劑。

於生體內之安定性及對於生體之抗原性低度方面具有優良特性之本品，爲可用於做爲於蛋白質合成抑制基因之表面上顯示感受性之免疫系、造血組織、循環器、皮膚組織、消化器、神經系、肌肉等中各疾病的治療劑、緩和劑、預防劑之製造用原液。又，本品亦可利用做爲研究用試藥和重組型蛋白質製造中之誘導劑。

〔實施例４〕

＜醫藥品製造用原液＞

除了使用實施例２之方法所調製之精製人類ＩＦＮ－α樣品，代替實施例３所示之氰脲醯氯活化支鏈澱粉與ＩＦＮ－α２或ＩＦＮ－α８反應中之ＩＦＮ－α２或ＩＦＮ－α８以外，根據實施例３，以支鏈澱粉實施修飾反應，繼續，根據實施例３將反應產物以膠過濾層析及抗體柱層析予以精製。根據常法分析時，此精製樣品中之人類ＩＦＮ－α亞型爲實質上由支鏈澱粉結合ＩＦＮ－α２及支鏈澱粉結合ＩＦＮ－α８所構成，該精製樣品中之兩亞型的活性比以國際單位換算爲約１：１。將此精製樣品，對含有１％（ｗ／ｖ）含水結晶海藻糖做爲安定劑之生理食鹽水進行透析。採集透析內液，並以上述含海藻糖之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（41）

生理食鹽水調整至ＩＦＮ－α活性爲１×１０$^{5}$ＩＵ／ｍｌ，且經由精密過濾除菌取得液劑。

於生體內之安定性及對於生體之抗原性低度方面具有優良特性之本品，爲可用於做爲於蛋白質合成抑制基因之表面上顯示感受性之免疫系、造血組織、循環器、皮膚組織、消化器、神經系、肌肉等中各疾病的治療劑、緩和劑、預防劑之製造用原液。又，本品亦可利用做爲研究用試藥和重組型蛋白質製造中之誘導劑。

〔實施例５〕

＜乾燥注射劑＞

將實施例１至４之醫藥品製造用原液，分別於安瓿中分注１毫升，冷凍乾燥後，予以密栓。安定性優良之本品爲有用於做爲於蛋白質合成抑制基因之表現上顯示感受性之令免疫系、造血組織、循環器、皮膚組織、消化器、神經系、肌肉等中各疾病予以治療，緩和或預防用的乾燥注射劑。

〔實施例６〕

＜軟膏劑＞

於滅菌蒸餾水中將羧乙烯聚合物（和光純藥工業股份有限公司製，商品名「Hibeads Waco 104」）和含水結晶海藻糖分別以濃度１．４％（ｗ／ｗ）及２．０％（ｗ／ｗ）溶解，再將細胞賦活劑之 Rumin 以５毫克／克混合。於

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（42）

此混合物中，將實施例2或4之醫藥品製造原液以5×$10^4$IU／g添加，混合之混合物，調整至pH7.2，取得膠狀物。

延展性和安定性優良，且具有細胞賦活作用之本品，爲有用於做爲於蛋白質合成抑制基因之表現上顯示感受性之令免疫系、皮膚組織、神經系、肌肉等中各疾病予以治療，緩和或預防用的軟膏劑。

〔實施例7〕

＜錠劑＞

於無水結晶麥芽糖（株式會社林原商事販售，商品名「Fine Tose」)中，將實施例2或4之醫藥品製造原液以1×$10^3$IU／g混合，並將其依常法予以打錠，取得每1錠約200毫克之錠劑。

攝取性，安定性優良之本品，爲有用於做爲於蛋白質合成抑制基因之表現上顯示感受性之令免疫系、造血組織、循環器、皮膚組織、消化器、神經系、肌肉等中各疾病予以治療，緩和或預防用的經口投與用錠劑。

〔發明之效果〕

如以上說明般，本發明爲根據人類IFN－α亞型之IFN－α2和IFN－α8共存時，於蛋白質合成抑制基因之表現誘導中顯示相乘作用之本發明者等人所獨自發現之事實。本發明之增強蛋白質合成抑制基因表現之用劑

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（43）

，由於將人類爲對象之以醫藥品型式於目前所廣泛利用的人類ＩＦＮ－α亞型做爲其有效成分，故有利利用於醫藥用途，尤其是，對於蛋白質合成抑制基因之表現爲直接或間接參與之症狀被治療。緩和，預防之各種疾病的醫藥用途。又，該表現增強劑亦有用於做爲闡明ＩＦＮ活性表現之分子機構所用的研究用試藥、和重組型蛋白質製造中的增強劑等。

本發明爲達成如此顯著作用效果之發明，爲對於該界貢獻上具有極大意義之發明。

〔序列表〕

序列表

＜１１０＞Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

＜１２０＞增強蛋白質合成抑制基因表現之用劑

＜１３０＞１００８６６０２

＜１６０＞４

＜２１０＞１

＜２１１＞１８８

＜２１２＞ＰＲＴ

＜２１３＞Home sapiens

＜２２０＞

＜２２１＞Signal

＜２２２＞（１）……（２３）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（44）

<220>

<221>成熟鏈

<222>（24）……（188）

<300>

<308>P01563（Swissprot）

<400>1

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
20 25 30

Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser
35 40 45

Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
50 55 60

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
65 70 75 80

Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
85 90 95

Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
100 105 110

Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
115 120 125

Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
130 135 140

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
145 150 155 160

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（45）

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
165 170 175
Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
180 185

<210> 2

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Signal

<222> （1）……（23）

<220>

<221> 成熟鏈

<222> （24）……（189）

<300>

<308> P32881（Swissprot）

<400> 2

Met Ala Leu Thr Phe Tyr Leu Leu Val Ala Leu Val Val Leu Ser Tyr
1 5 10 15
Lys Ser Phe Ser Ser Leu Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
20 25 30
Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
35 40 45

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（46）

Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu
50 55 60

Glu Phe Asp Asp Lys Gln Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu
65 70 75 80

His Glu Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser
85 90 95

Ser Ala Ala Leu Asp Glu Thr Leu Leu Asp Glu Phe Tyr Ile Glu Leu
100 105 110

Asp Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ser Cys Val Met Gln Glu Val Gly
115 120 125

Val Ile Glu Ser Pro Leu Met Tyr Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg
130 135 140

Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser
145 150 155 160

Ser Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser
165 170 175

Leu Ser Ile Asn Leu Gln Lys Arg Leu Lys Ser Lys Glu
180 185

<210> 3

<211> 1733

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（47）

<221>CDS

<222>（511）……（1077）

<220>

<221>sig_peptide

<222>（511）……（579）

<220>

<221>mat_peptide

<222>（580）……（1074）

<300>

<308>J00207（GenBank）

<400>3

gcgcctctta tgtacccaca aaaatctatt ttcaaaaaag ttgctctaag aatatagtta 60

tcaagttaag taaaatgtca atagcctttt aatttaattt ttaattgttt tatcattctt 120

tgcaataata aaacattaac tttatacttt ttaatttaat gtatagaata gagatataca 180

taggatatgt aaatagatac acagtgtata tgtgattaaa atataatggg agattcaatc 240

agaaaaaagt ttctaaaaag gctctggggt aaaagaggaa ggaaacaata atgaaaaaaa 300

tgtggtgaga aaaacagctg aaaacccatg taaagagtgt ataaagaaag caaaaagaga 360

agtagaaagt aacacagggg catttggaaa atgtaaacga gtatgttccc tatttaaggc 420

taggcacaaa gcaaggtctt cagagaacct ggagcctaag gtttaggctc acccatttca 480

accagtctag cagcatctgc aacatctaca atggccttga cctttgcttt actggtggcc 540

ctcctggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc tctgtgggct gtgatctgcc tcaaacccac 600

agcctgggta gcaggaggac cttgatgctc ctggcacaga tgaggagaat ctctctttc 660

tcctgcttga aggacagaca tgactttgga tttccccagg aggagtttgg caaccagttc 720

caaaaggctg aaaccatccc tgtcctccat gagatgatcc agcagatctt caatctcttc 780

agcacaaagg actcatctgc tgcttgggat gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa 840

ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc tgtgtgatac agggggtggg ggtgacagag 900

actcccctga tgaaggagga ctccattctg gctgtgagga aatacttcca aagaatcact 960

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（48）

ctctatctga aagagaagaa atacagccct tgtgcctggg aggttgtcag agcagaaatc 1020

atgagatctt tttctttgtc aacaaacttg caagaaagtt taagaagtaa ggaatgaaaa 1080

ctggttcaac atggaaatga ttttcattga ttcgtatgcc agctcacctt tttatgatct 1140

gccatttcaa agactcatgt ttctgctatg accatgacac gatttaaatc ttttcaaatg 1200

tttttaggag tattaatcaa cattgtattc agctcttaag gcactagtcc cttacagagg 1260

accatgctga ctgatccatt atctatttaa atatttttaa aatattattt atttaactat 1320

ttataaaaca acttattttt gttcatatta tgtcatgtgc acctttgcac agtggttaat 1380

gtaataaaat gtgttctttg tatttggtaa atttattttg tgttgttcat tgaacttttg 1440

ctatggaact tttgtacttg tttattcttt aaaatgaaat tccaagccta attgtgcaac 1500

ctgattacag aataactggt acacttcatt tgtccatcaa tattatattc aagatataag 1560

taaaaataaa ctttctgtaa accaagttgt atgttgtact caagataaca gggtgaacct 1620

aacaaataca attctgctct cttgtgtatt tgatttttgt atgaaaaaaa ctaaaaatgg 1680

taatcatact taattatcag ttatggtaaa tggtatgaag agaagaagga acg 1733

<210> 4

<211> 633

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (48)……(617)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (48)……(116)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (117)……(614)

<300>

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（49）

<308>X03125（GenBank）

<400>4

aggggtcatc catctgaacc agctcagcag catccacaac atctacaatg gccttgactt 60

tttatttact ggtggcccta gtggtgctca gctacaagtc attcagctct ctgggctgtg 120

atctgcctca gactcacagc ctgggtaaca ggagggcctt gatactcctg gcacaaatgc 180

gaagaatctc tcctttctcc tgcctgaagg acagacatga ctttgaattc ccccaggagg 240

agtttgatga taaacagttc cagaaggctc aagccatctc tgtcctccat gagatgatcc 300

agcagacctt caacctcttc agcacaaagg actcatctgc tgctttggat gagacccttc 360

tagatgaatt ctacatcgaa cttgaccagc agctgaatga cctggagtcc tgtgtgatgc 420

aggaagtggg ggtgatagag tctcccctga tgtacgagga ctccatcctg gctgtgagga 480

aatacttcca aagaatcact ctatatctga cagagaagaa atacagctct tgtgcctggg 540

aggttgtcag agcagaaatc atgagatcct tctctttatc aatcaacttg caaaaaagat 600

tgaagagtaa ggaatgagac ctggtacaac acg 633

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

96. 3月29日修(更)正本
民國 96 年 3 月 29 日 修正

公告本

I283582

| 申請日期 | 90 年 10 月 15 日 |
|---|---|
| 案號 | 90125438 |
| 類別 | A61K 38/31, A61P 43/00 |

A4
C4

（以上各欄由本局填註）

# 發明 新型 專利說明書

| | | |
|---|---|---|
| 一、發明 新型 名稱 | 中文 | 增強蛋白質合成抑制基因表現之用劑 |
| | 英文 | EXPRESSION POTENTIATOR FOR PROTEIN SYNTHESIS REGULATORY GENE |
| 二、發明 創作 人 | 姓名 | (1) 柳井嘉明<br>(2) 佐能吏<br>(3) 栗本雅司 |
| | 國籍 | (1) 日本 (2) 日本 (3) 日本 |
| | 住、居所 | (1) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號 株式会社林原生物化学研究所内<br>(2) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號 株式会社林原生物化学研究所内<br>(3) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號 株式会社林原生物化学研究所内 |
| 三、申請人 | 姓名（名稱） | (1) 林原生物化學研究所股份有限公司 株式会社林原生物化学研究所 |
| | 國籍 | (1) 日本 |
| | 住、居所（事務所） | (1) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號 |
| | 代表人 姓名 | (1) 林原健 |

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（6）

之胺基酸序列。

本發明所用之亞型只要爲如上述定義之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８，則不管其來源和調製方法。例如，除了可利用由人類細胞所得之天然型亞型，和含有人類細胞之脊椎動物細胞、無脊椎動物細胞、植物細胞、大場桿菌和枯草桿菌等之原核細胞及酵母和黴等之包含真核細胞之任一種微生物做爲宿主並以慣用之基因工程手法所產生之重組型之亞型等以外，只要可維持所欲之活性，則具有共價鍵於多肽鏈之水溶性高分子（後述）之天然物及人爲性調製物之亞型（以下，稱爲「水溶性高分子之修飾物」）等亦有利於利用做爲ＩＦＮ－α２和／或ＩＦＮ－α８。尙，水溶性高分子之修飾物之亞型可爲例如本來具有水溶性高分子之天然型的亞型，又，對預先調製之天然型或重組型亞型以人爲性共價鍵以水溶性高分子所得之物質，亦只要可維持所欲之活性，則均可有效利用，但以根據後述人爲性手法所得之水溶性高分子之修飾物亞型，於該增強劑利用於醫藥用途並對適用之患者投與時，於其生體內之安定性高度方面較爲優良爲其特徵。又，若使用天然型之亞型，則對於適用患者之抗原性低度等方面有利。另一方面，重組型之亞型爲具有較廉價且可未調製而可於市場取得之優良。因此，於本發明之實施中，爲考慮如上述各個種類亞型之性質，並視狀況，選擇利用配合利用目的之物質。

本發明所用之亞型爲ＩＦＮ－α２或ＩＦＮ－α８之確認爲將目的亞型依常法解讀所得之部分胺基酸序列，或

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（18）

1709)及其變異株爲首之來自人類、猿、鼠及含鼠之上皮系細胞、間質系細胞及造血系細胞。於此類宿主中導入本發明之ＤＮＡ上，可使用例如公知之ＤＥＡＥ葡聚糖法，磷酸鈣法、電穿孔法、脂質轉染法、微注射法、及，以逆轉錄病毒、腺病毒、疱疹病毒、痘苗病毒等之病毒感染法等即可。於如此所得之轉形體中可選出產生所欲亞型之克隆。將如此所得之克隆以適當之培養基予以培養，視需要，加入誘導劑令ＩＦＮ－α產生，並將其產物與上述所述之天然型之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８調製方法同樣地，或，根據適於所用宿主－載體系之慣用方法予以精製，則可取得重組型之ＩＦＮ－α２及ＩＦＮ－α８。以所欲之活性比配合兩亞型，或，視需要，將上述之天然型亞型，與由後述以水溶性高分子做爲修飾物之亞型中選出一種或二種以上予以組合，令ＩＦＮ－α２和ＩＦＮ－α８之活性比爲以所欲之比予以配合，則可取得該增強劑之有效成分。

於調製ＩＦＮ－α２和／或ＩＦＮ－α８之水溶性高分子修飾物上，首先，根據上述任一種方法調製天然型或重組型之目的亞型，並於所得之亞型中共價鍵以水溶性高分子且供於公知之反應即可。本發明所謂之水溶性高分子爲意指經由同一種或二種以上之單體的回復構造之本質上所構成之通常爲分子量５００以上之物質，爲對於水具有溶解性之分子，且包含天然分子、合成分子、及其部分分解物及修飾物。本發明可利用之水溶性高分子可列舉例如

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

96. 8. 29



五、發明說明（19）

可溶性澱粉、澱粉果膠、葡聚糖、聚蔗糖、支鏈澱粉、Erucinan Cadoran、阿拉伯膠、黃蓍樹膠、瓜阿樹膠、呫吨樹膠、角叉菜膠、透明質酸、肝素、葡甘露聚糖、脫乙醯殼多糖、核多糖、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮‘脫唾液酸血清類粘蛋白、脫唾液酸胎球蛋白、白蛋白、經半乳糖修飾白蛋白、聚離胺酸、經半乳糖修飾聚離胺酸等，於本發明實施中所欲之分子量雖根據所用之水溶性高分子種類而異，但其平均分子量通常爲５００至 10,000,000，更佳爲 10,000 至 1,000,000 之範圍。

令如上述之水溶性高分子共價鍵至ＩＦＮ－α２和／或ＩＦＮ－α８上，例如，可根據重氮法、胜肽法、烷基化法、交聯法、醯胺結合法等公知之方法即可。例如，於相同專利申請人之特開平３－９３７３０號公報，和相同專利申請人之專利第１１６２７７８號公報中詳述其代表性之方法，於本發明中亦可有效利用。又，利用轉麩胺酸酶之作用令所欲蛋白質共價鍵以水溶性高分子之慣用方法亦可有效利用。例如，於國際專利申請公開公報ＷＯ９６／１００８９中揭示利用轉麩胺酸酶作用之方法。

於經由重氮法取得修飾物上，對於視目的所選出之水溶性高分子，例如，將對－胺基苄基、對－胺基苯甲醯基、間－胺基茴香醚基、間－胺基苄氧甲基、３－（對－胺基苯氧基）－２－羥基丙醯基、３－（對－胺基－間－甲基苯胺基）－５－氯基三咔基等之芳香族胺基根據公知方法導入所得之衍生物，與ＩＦＮ－α２和／或ＩＦＮ－

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

96.3.29 替換頁

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：　增強蛋白質合成抑制基因表現之用劑）

〔課題〕提供特定出蛋白質合成抑制基因表現顯著增強之人類干擾素α中之亞型組合，並且含有此類組合之亞型做爲有效成分之增強該基因表現之用劑及其用途。

〔解決手段〕經由提供含有人類干擾素α中之亞型α2及亞型α8做爲有效成分之增強蛋白質合成抑制基因表現之用劑，和含有該增強劑之醫藥品之用途則可解決。

英文發明摘要（發明之名稱：EXPRESSION POTENTIATOR FOR PROTEIN SYNTHESIS) REGULATORY GENE

The objects of the present invention are to reveal a specific combination of human interferon-alpha subtypes that remarkably enhances the expression of protein synthesis inhibitory genes, and to provide an expression enhancer comprising as effective ingredients interferon-alpha subtypes in such a combination and uses thereof. The above objects are solved by providing an expression enhancer for protein synthesis inhibitory genes which comprises as effective ingredients interferon-alpha2 and interferon-alpha8 subtypes of human interferon-alpha, and uses thereof including pharmaceuticals.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

年 月 日修(更)正 96.3.29

A8
B8
C8
D8

公告本

## 六、申請專利範圍 1

第90125438號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國96年3月29日修正

1．一種使用於增強蛋白質合成抑制基因表現之組成物，其特徵爲含有以人類干擾素α中具有序列號表中序列號碼1所示的胺基酸序列之亞型α2、及具有序列號表中序列號碼2所示的胺基酸序列之亞型α8做爲有效成分者，其中含有活性比以國際單位換算爲1：0．25以上，未達1．5之比率的亞型α所成。

2．如申請專利範圍第1項之使用於增強蛋白質合成抑制基因表現之組成物，其爲做爲蛋白質合成基因之2´，5´－寡腺苷酸合成酶基因及／或雙股RNA依賴性蛋白質激酶基因的表現增強劑。

3．如申請專利範圍第1項之使用於增強蛋白質合成抑制基因表現之組成物，其中該表現增強劑中做爲有效成分之亞型α2及亞型α8爲具有共價鍵於其多肽鏈的水溶性高分子。

4．一種增強劑，其含有以人類干擾素α中，具有序列號表中序列號碼1所示的胺基酸序列之亞型α2做爲有效成分所成，藉由人類干擾素α中具有序列號表中序列號碼2所示的胺基酸序列之亞型α8的蛋白質合成抑制基因之基因表現誘導作用者。

5．一種增強劑，其含有以人類干擾素α中，具有序列號表中序列號碼2所示的胺基酸序列之亞型α8做爲有

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍 2

效成分所成，藉由人類干擾素α中具有序列號表中序列號碼1所示的胺基酸序列之亞型α2的蛋白質合成抑制基因之基因表現誘導作用者。

6．如申請專利範圍第4或5項之增強劑，其中蛋白質合成抑制基因爲2´，5´－寡核苷酸合成酶基因和／或雙股ＲＮＡ依賴性蛋白質激酶基因。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）