

附件 2. 第 86110174 號專利申請案
中文說明書(含申請專利範圍)修正本 民國 88 年 12 月修正

申請日期	86 年 7 月 17 日	88.12.14 修正補充(本)	A4 C4
案 號	86110174		
類 別	C12N9/48, C07K14/474/57		

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書 480285		
一、發明 名稱	中 文	用於將多肽前驅物身轉化為誘導 IFN- γ 生產之活化型式的酵素，其製法及其用途
	英 文	Enzyme for converting a precursor of a polypeptide into the active form that induces IFN-r production, the process therefor, and the uses thereof
二、發明 人	姓 名	(1) 谷本忠雄 (2) 栗本雅司
	國 籍	(1) 日本 (2) 日本 (1) 日本國岡山縣岡山市山崎三一二番地の八八
	住、居所	(2) 日本國岡山縣岡山市学南町二丁目七番二五號
	三、申請人	姓 名 (名稱)
三、申請人	國 籍	(1) 日本 (1) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	(1) 林原健

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國 (地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐有 ☐無主張優先權

日本	1996 年 7 月 19 日	8-207691	☒ 有主張優先權
日本	1997 年 5 月 30 日	9-156062	☒ 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)

發明領域

本發明係關於一種處理多肽所用的酵素，更詳言之，係關於一種將誘使在免疫力充份的細胞裡產生干擾素- γ (以下縮寫成 "I F N - γ ")之多肽前驅物轉化成活性形式的酵素。

先前技藝的描述

本發明人成功地單離在免疫力充份的細胞裡產生 I F N - γ 之多肽和編碼多肽的 cDNA，並且將其揭示在日本專利公開案第 27, 189/96 號和第 193,098/96 號。

多肽的特徵在於致使當做生物活性有用物質的製造，藉由殺手細胞增強細胞毒性，和致使殺手細胞形成；可以預期當做抗病毒劑、防腐劑、抗腫瘤劑和抗免疫劑使用。

據說，在人類的細胞裡，由基因表現而形成的多肽可能被細胞內的 酵素處理而部份地消化和將糖鏈加入其中。

要滿意地併入製藥內的多肽可能要像人類細胞裡一般地處理；如此的細胞具有較少目前製得多肽的缺點，如日本專利申請案第 269,105/96 所揭示。本發明人致力地研究，發現目前的多肽通常以前驅物形式存在於人類細胞裡，分子量通常大約 24,000 道耳頓而且沒有生物活性。雖然不限於目前的多肽，但一般知道大多數的組織介素通常以不具生物活性的前驅物製得，然後藉由細胞之內的酵素處理轉化成其活性形式。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明（ 2 ）

發明概述

以上述觀點觀之，本發明之第一目的係提供一種酵素，該酵素對多肽的前驅物作用，誘使在免疫力充份的細胞裡產生 I F N - γ ，以將前驅物轉化成誘使在免疫力充份的細胞裡產生 I F N - γ 之活性形式。

本發明之第二目的係提供一種製造酵素的方法。

本發明之第三目的係提供一種將前驅物轉化成誘使在免疫力充份的細胞裡產生 I F N - γ 之活性形式的方法。

本發明人致力於研究達成目的並且發現一種從類細胞株單離的酵素，該酵素對多肽的前驅物作用，將前驅物轉化成誘使在免疫力充份的細胞裡產生 I F N - γ 之活性形式。他們確定酵素可以從人工增殖的細胞，尤其是人類紅細胞生成素細胞製得，而且完成本發明。

本發明之第一目的係藉由一種將前驅物轉化成誘使在免疫力充份的細胞裡產生 I F N - γ 之活性形式的酵素而達成。

本發明之第二目的係製造酵素的方法而達成，該方法包括培養在營養培養培養基中產生酵素之細胞，以及從所得的培養物收集製得的酵素。

本發明之第三目的係藉由多肽轉化方法而達成，該方法包括使酵素與前驅物接觸以將前驅物轉化成活性形式的步驟。

所附圖式的簡單說明

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂
線

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (3)

圖 1 係為包含編碼本發明多肽前驅物之 cDNA 的重組 DNA pRCHuGF 結構。

圖 2 係為一種顯示在螢幕上並為 Western Blotting 看得見之凝膠電泳圖型的中間圖式，其顯示在本發明多肽前驅物轉化成活性形式期間隨時間的變化。

在圖式裡，"PCMV"係表示細胞巨化病毒促進劑；而"HUIGIF"係表示編碼本發明多肽前驅物的 cDNA。

發明內容的詳細描述

如上所述，本發明係以發現將多肽前驅物轉化成誘使在免疫力充份的細胞裡產生 I F N - γ 之活性形式的酵素而完成。本發明所稱的前驅物具有分子量大約 24,000 道耳頓(以 SDS-聚丙稀醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)在還原劑存在下分析而得)，而且以例如能夠產生多肽和藉由導入 DNA，例如具 SEQ ID:5 號之核苷酸序列包含編碼多肽的 DNA 轉化成哺乳動物宿主細胞的形式存在。如此的前驅物在 N 終端區域裡包含部份或全部 SEQ ID:1 號胺基酸序列，以及全部包含所有 SEQ ID:2 號胺基酸序列（其中符號 "Xaa"係為"異亮胺酸"或"蘇胺酸"）而且具有分子量 18,000 - 19,500 道耳頓(以 SDS-PAGE'在還原劑存在下分析而得)。

本發明所稱的酵素包括天然和人工製造的酵素，只要其製得誘使 I F N - γ 在免疫力充份的細胞裡產生的活性形式而不限制特定起源和來源。可得自人類造血紅細胞生成素細胞的本發明酵素通常具有下列物化性質：

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (4)

(1)分子 量

顯示以 SDS-PAGE 分析的分子量約為 25,000 和約 10,000 道耳頓；

(2)部分胺基酸序列

具有一選自一群包括 SEQ ID:4 號的胺基酸序列(其中符號 "Xaa"係為 "異亮胺酸" 或 "蘇胺酸")和 SEQ ID:5 號；及

(3)抑制劑

由乙醯基-L-門冬氨醯-L-谷醯基-L-二乙基戊醯胺-L-天冬-1-酸(以下簡稱為"Ac-YVAD-CHO")及碘乙醯胺進行抑制。

酵素可以利用本發明方法使用細胞當做來源而製得。任何天然細胞和人工所得的細胞株及來自天然細胞的轉形細胞(transformant)可以當做來源。這些細胞株及轉形細胞係特別有用於實施本發明。前者可以藉由從例如淋巴母細胞、淋巴瘤、單核母細胞、單核細胞、骨髓母細胞、骨髓細胞、顆粒性白細胞、巨噬細胞等人類造血細胞；包括例如頷下腺癌、肺癌、巨大腸癌和結腸癌等腫瘤的表皮細胞；神經胚細胞和間質細胞建立而得。每個細胞株的例子為 HBL-38 細胞、HL-60 細胞(ATCC CCL240)、K-562 細胞(ATCC CCL243)、KG-1 細胞(ATCC CCL246)、Mo 細胞(ATCC CRL8066)、THP-1 細胞(ATCC TIB202)和 U-937 細胞(ATCC CRL1593.2)，如 Jun MINOWADA 在“癌症評論”第 10 冊第 1 - 18 頁(1988)，從包括骨髓白血病、前骨髓細胞白

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (5)

血病、單核細胞、成人 T - 細胞白血病、頭髮細胞白血病及其突變體等白血病和淋巴瘤衍生。因為所有的這些細胞株容易增殖並且高產率地產生本發明的多肽，所以其可以有利地用於本發明。尤其，例如 HBL-38 細胞、HL-60 細胞、KG-1 細胞、THP-1 細胞和 U-937 細胞等人類骨髓單核細胞株係產率極高地產生本發明多肽。因此，其可以有利地用於本發明。

上述的細胞株轉形細胞可以藉由將改由上述細胞株所得編碼本發明多肽的 DNA 導入適當的哺乳動物宿主細胞。如此宿主細胞的例子是表皮菌細胞株、間質細胞株、神經母細胞株、造血細胞株，其係源自人、猴子、老鼠和倉鼠而且照慣例當做宿主，例如包括 3T3-細胞 (ATCC CCL92)，C127L 細胞 (ATCC CRL 1616)，CHO-K1 細胞 (ATCC CCL 61)，CV-1 細胞 (ATCC CCL 70)，COS-1 細胞 (ATCC CRL 1650)，海拉氏細胞 (ATCC CCL 2)，MOP-8 細胞 (ATCC CRL 1709)及其變體細胞。將改酵素為密碼的 DNA 導入宿主細胞內的方法包括傳統的 DEAE-聚葡萄糖方法，磷酸鈣方法，電穿孔法，電感法 (lipofection)，微生物注射和使用逆錄病毒，腺病毒，疱疹病毒和牛痘病毒之病毒感染方法。在該情況裡，可以使用例如 pCD，pcDL-SR α ，pKY4，pCDM8，pCEV4，pME18S 和 pSV2-gpt，包括適當促進劑、增強劑、複製源、終端位置、接合序列、聚腺苷酸作用序列及選擇記號物的載體。被觀察產生活性形式的純系係藉由應用菌落雜交方法或在營養培養培

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (6)

養基裡培養之後從轉形細胞挑選所要的純系來選擇。使用哺乳動物宿主細胞的重組 DNA 技術係詳細地揭示在 "Jikken-Igaku-Bessatsu-Salbo-KogakuHandbook" Toshio KUROKI, Masaru TANIGUCHI 和 Mitsuo OSHIMURA (1992)編輯和在 "Jikken-Igaku-Bessatsu-Biomaterial Series 3, Genetic Cloning Experimental Method", Takashi YOKOTA 和 Kenichi ARAI 編輯, Yodo 出版者編輯, 日本東京 (1993)。

本發明的方法包括使製造酵素的細胞增殖和從已增殖的細胞收集所製得的酵素。至於增殖細胞株的方法, 不特別地限制而且包括通常用於該領域裡的活體內及活體外增殖方法。活體內方法係指在營養的培養培養基內增殖細胞的方法, 例如傳統用來培養哺乳動物細胞的方法。通常, 培養基包括緩衝水當做底質而例如鈉、鉀、鈣、磷和氯離子等無機離子以及其它例如痕量元素、碳源、氮源、胺基酸和維生素視細胞的新陳代謝性而需的物質。必要時, 可以將血清、激素、細胞生長因子、和細胞附著因子併入培養基裡。如此培養基的例子包括 199, DMEM, 漢氏 F12, IMDM 培養基, MCDB104, MCDB153, MEM, RD, RITC80-7, RPMI 1630, RPMI 1640 和 WAJC404 培養基。將細胞濃度約 1×10^4 - 1×10^7 細胞/毫升, 較佳為約 1×10^5 - 1×10^6 細胞/毫升的細胞株移植至這些培養基裡, 在約 37℃ 懸浮液或單層培養基裡培養 1 - 7 天, 較佳 2 - 4 天, 然而必要時用新鮮的培養基更換。

使用非人類溫血動物的活體內方法包括將通常取自兔

(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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

線

五、發明說明 (7)

子的抗胸抗體注入新生齧齒類(例如老鼠、裸鼠、大鼠、大裸鼠、天竺鼠和朝鮮鼠)以降低其免疫反應，然後皮下或腹膜內注入每支隻動物約 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^8$ 細胞可以產生本發明酵素的培養基，或將人類細胞置入埋在動物裡動物營養體液可以循環的擴散室內，然後依傳統方式餵食動物 2 - 10 星期。在餵食期間內，移植的細胞增殖，然而收集動物體液。其後，收集腫瘤塊、腹水或體液或培養基內之懸浮液形式的增殖細胞，而且必要時，收集到的細胞係分散在適當的培養基內並用適當的培養基沖洗，接著回收所要的酵素。相對於活體外增殖方法，活體內方法以較低成本、勞力及時間提供所需數量的細胞為其優點。舉例來說，日本專利申請案第 54, 158/81 號詳細地揭示活體內增殖方法。

酵素可以從增殖的細胞收集得到，其係藉由用超聲波處理已從培養基或整體培養基分離之細胞，或藉由將細胞浸漬在細胞分裂所用的低滲培養基裡，然後利用該領域裡純化酵素的傳統技術，例如透析、過濾、濃縮、分離沈澱、離子交換色層分離法、凝膠過濾色層分離法、吸附色層分離法、等電點性色層分離法、疏水性色層分離法、逆相色層分離法、親和性色層分離法、凝膠電泳和等電點聚焦法處理所得的細胞碎片或此等細胞碎片和培養基上層清液的混合物。這些純化方法其中二種或更多種可以組合使用。定言之，使用對本發明酵素有效之單株抗體的免疫親和性色層分離法以最低成本和勞力產生相當高純度的酵素。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(8)

視細胞種類和培養條件而定，當所得的酵素在細胞增殖期間內細胞外分泌時酵素可以從培養基上層清液獲得。

在本發明裡，本發明酵素的活性係依下列單位測試：根據 Douglas K. Miller 等人在 "生物化學期刊" 第 268 冊第 24 號第 18,062-18,069 頁 (1993)；將 395 微升包含 10 重量／體積 % 蔗糖、2mM 二硫蘇糖醇和 0.1 重量／體積 % 3 - [(3-氯胺基丙基)二甲基四氫]-1-丙磺酸 (以下簡稱 "CHAPS") 的 25 mM Hepes 緩衝液 (酸鹼值 7.5) 置入容器內，與 100 微升測試的酵素溶液和 5 微升 10 mM N-(N-乙醯基-酪氨醯基)-2-氨基異戊酸-丙胺醯-天冬胺酸-7-胺基-4-甲基香豆素醯胺溶液混合，接著在 30 °C 下培育一個小時。在反應期間裡，以澄清器偵測由激發波長 355 毫微米光而發出的 460 毫微米之螢光強度來偵測反應進行時所釋出的 7-胺基 4-甲基香豆素含量。酵素的單位活性係定義為每分鐘在這些反應條件下一微微莫耳 (pmol) 7-胺基-4-甲基香豆素。

本發明係提供一種將藉由將前驅物與酵素接觸而使前驅物轉化成活性形式的方法；舉例來說，將已由上述方法單離的本發明酵素與前驅物接觸或將編碼酵素的 DNA 和包含編碼前驅物之核苷酸區域的 DNA 兩者導入適當的哺乳動物宿主細胞內以表現兩者 DNA。前者方式裡，產生多肽前驅物的細胞或那些需要而且能夠藉由轉化而產生前驅物的細胞係在營養的培養培養基裡栽培。上述方法獲得的酵素係與所得的培養基接觸，或加入自培養基分離或未分離的細胞，或必要時在如此條件下分裂細胞之後加入所得之細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明（ 9 ）

胞碎片或混合物。共存或加入之酵素的充份數量係為前驅物的等莫耳數或更低數量的，而且混合物在允許酵素作用於前驅物的溫度和酸鹼值下培育，直到轉化成活性形式。特別地，在溫度大約 4 °C -40 °C 較佳為約 37 °C，而酸鹼值大約 6-9，較佳為 7 - 8 之下進行。在後者方式裡，改酵素為密碼的 DNA 和改多肽前驅物為密碼的 DNA 兩者皆導入適當的哺乳動物宿主細胞內轉化；所得轉化的細胞係產生所需前驅物及酵素二者而不必要本發明酵素。對於如此經轉化細胞而言，其可以僅整體地在使本發明酵素作用於前驅物使其轉化成活性形式的溫度下培育，或必要時在均質化成細胞碎片之後培育。

包含活性形式的所得培養基可以使用整體當做 I F N - γ 誘導物，而且通常培養基裡的細胞被超聲波、細胞溶解酵素及/或表面活性劑分裂，接著藉由過濾，離心沉澱法等從那些所得的細胞和細胞碎片分離出多肽並純化已分離的多肽。在純化時，沒有細胞或細胞碎片培養基係藉由該領域裡傳統用來純化生物活性物質的純化方法，例如鹽析、透析、過濾，濃縮、分離沈澱、離子交換色層分離法、凝膠過濾色層分離法、吸附色層分離法、等電點性色層分離法、疏水性色層分離法、逆相色層分離法、親和性色層分離法、凝膠電泳和等電點聚焦法。必要時，這些純化方法其中二種或多種方法可以組合使用。所得的純化多肽可以濃縮和親液化成液體或固體產物。單株抗體，如日本專利公開案第 231,598/96 號（本發明之相同申請人）所揭示，

（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

五、發明說明 (10)

可以有利地用來純化多肽：舉例來說，使用單株抗體的親和性色層分離法可以利用最低成本和勞力產生相當純的所需多肽。

如上所述，本發明方法獲得的活性形式誘使 I F N - γ 產生為有用生物活性物質的活性，增強殺手細胞的細胞毒性而且誘使殺手細胞產生。因此，多肽在處理及/或避免 I F N - γ 及/或殺手細胞感受性疾病時發揮強大的活性。因為本發明方法獲得的活性形式具有強大的 I F N - γ 誘導力，所以通常僅用相當小的數量就可以誘使所需量的 I F N - γ 產生。即使當高劑量服入體內，活性形式也幾乎完全不導致嚴重的副作用，因為其毒性極低，而且具有實際使用時該多肽緩和地誘使所需量的 I F N - γ 產生而不用嚴格控制劑量的功效。日本專利申請案第 28,722/96 號(本發明相同的申請人)係詳細地揭示活性形式當做感受性疾病試劑的用途。

下列各項實施例係解釋本發明：

實施例 1

將新生大鼠腹膜內注入兔子抗胸抗血清以降低其免疫反應，然後注射其背側皮下組織每隻大鼠約 5×10^5 細胞 THP-1 細胞(ATCC TIB202)，依傳統方式餵食動物 3 個星期。取出在大鼠裡皮下形成每個約 15 克重的腫瘤塊，然後依傳統方式懸浮在 RPMI 1640 培養基(酸鹼值 7.4)裡並沖洗，得到已增殖的細胞。

五、發明說明 (11)

用 10 倍體積包含 10 mM 氯化鉀、1.5 mM 氯化鎂和 0.1 mM 乙二胺-N, N, N', N'-四乙酸二鈉的冰驟冷 20 mM Hepes 緩衝液 (酸鹼值 7.4) 沖洗，並在 3 倍體積相同緩衝液的新鮮緩衝液裡冰驟冷條件下靜置 20 分鐘，並在 -20 °C 冷凍。將經冷凍的小腫瘤塊融解，與 1mM 苯基甲基磺基氯化物、1 微克/毫升甲—亮—亮—精三肽和 10 微克/毫升胃蛋白抑制素 A 混合，然後藉由鐵弗龍均質器均質化。經分裂的細胞係以 2,000 x 克離心 10 分鐘以獲得上層清液，再次以上述類似方式處理並離心以得到一之後與上述上層清液 pooled 的上層清液。經 pooled 的上層清液係與乙二胺-N, N, N', N'-四乙酸二鈉鹽混合，得到濃度 6 mM，經 24,000 x 克離心 20 分鐘去除細胞碎片及進一步地以 100,000 x 克離心 60 分鐘形成微粒體和細胞溶質溶離份，接著收集後者的溶離份。

將硫酸銨加入所收集的溶離份，得到冰驟冷條件下飽和程度 40%，並攪拌及離心混合物以得到一上層清液。進一步地將硫酸銨加入上層清液中，獲的飽和程度 80%，攪拌並離心以收集之後溶解在包含 10 體積/體積%甘油、0.1 重量/體積%CHAPS 和 2 mM 二硫蘇糖醇的三-HCl 緩衝液(酸鹼值 7.8)的沉澱物。將溶液注入滲析袋並在 4 °C 下以相同且新鮮的緩衝液滲析 16 個小時。將滲析袋的內溶液離心，獲得之後飼進填充“DEAE 5PW”(一種由日本東京 Tosoh 公司市售離子交換色層分析法所用的樹脂)已用相同且新鮮緩衝液平衡之管柱內的上層清液，接著飼進從 0 M 增加到 0.5M

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (12)

的線性梯度氯化鈉緩衝液，接著收集以氯化鈉濃度大約 0.04-0.09M 沖提的溶離份。

收集到的溶離份係用包含 5 體積/體積 % 甘油、 0.1 重量 / 體積 % CHAPS 和 2mM 二硫蘇糖醇的 Hepes 緩衝液 (酸鹼值

7.4) 稀釋 1.5 倍體積，將稀釋液藉由加入稀釋氫氯酸調至酸鹼值 7.4，然後飼進填充“S-SEPHAROSE”(一種由瑞典阿薩拉 Pharmacia LKB 生物技術公司市售離子交換色層分析法所用的凝膠)已用相同且新鮮緩衝液平衡之管柱內，接著將從 0 M 增加到 0.5M 的線性梯度氯化鉀緩衝液飼進管柱中，接著收集以氯化鉀濃度大約 0.04 - 0.09M 沖提的溶離份。

將溶離份以包含 5 體積/體積 % 甘油、 0.1 重量 / 體積 % CHAPS 和 2 mM 二硫蘇糖醇的 Hepes 緩衝液 (酸鹼值 7.4) pooled 並滲析 16 個小時，然後飼進填充“MONO S”(一種由瑞典阿薩拉 Pharmacia LKB 生物技術公司市售離子交換色層分析法所用的管柱)已用相同且新鮮緩衝液平衡之管柱內，接著將包含 0.5M 氯化鉀的相同且新鮮緩衝液飼進管柱中。

收集、 pooled 並濃縮從“MONO S”管柱沖提並具有本發明酵素活性的溶離份。將濃縮物飼進“SUPERDEX 200”(一種由瑞典阿薩拉 Pharmacia LKB 生物技術公司市售凝膠色層分析法所用的管柱)，已經用包含 5 體積/體積 % 甘油、 0.1 重量 / 體積 % CHAPS 和 2 mM 二硫蘇糖醇的 Hepes 緩衝液 (酸鹼值 7.4) 平衡)，接著將相同且新鮮緩衝液飼進管柱中。收集具有本發明酵素活性的溶離份， pooled 溶離份並濃縮混合物，得到 1 毫升含有 9,000 單位/毫升酵素的溶液，每隻大鼠

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (13)

的產率約 45 個單位。

實施例 2

酵素的分子量

填充 24 毫升“SUPERDEX 75HR”(一種由瑞典阿薩拉 Pharmacia LKB 生物技術公司市售凝膠過濾色層分析法所用的凝膠)的管柱係用經磷酸鹽緩衝的生理食鹽水(以下簡稱“PBS”)，然後飼進 200 微升實施例 1-1 的酵素溶液，並在監視沖提物裡的酵素活性時以 0.5 毫升/分鐘的速度飼進新鮮的 PBS。在 PBS 裡溶解適量當做凝膠過濾色層分析法所用分子計號物之具有分子量 67,000 道耳頓的小牛血清清蛋白、分子量 43,000 道耳頓的卵蛋白、分子量 25,000 道耳頓的胰凝乳蛋白原 A 和分子量 13,700 道耳頓的核糖核酸 A，而且溶液係以類似酵素溶液所用的方式處理，不同的是沖提物裡的白質濃度係藉由相對波長 280 毫微米卻沒有測得酵素的吸收程度來監測。以酵素的色層方析圖和分子記號物的沖提位置為基礎計算，結果本發明酵素具有約 30,000 道耳頓的分子量(以凝膠過濾色層分析法測得)。

將來自“SUPERDEX 75HP”含有本發明酵素的沖提物濃縮，並且根據 U. 'K. Lemuli 在"自然"第 227 冊第 680-685 頁 (1970)裡所報告的方法，在當做還原劑的 2 重量/體積二硫蘇糖醇存在下於 SDS-聚丙烯醯胺凝膠裡電泳分析。使用由美國加洲 Santa Cruz 生物技術公司市售的抗人類 ICE-p20 抗體和抗人類 ICE-p10 抗體，凝膠以一般方式免疫著色並用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明 (14)

“ELC KIT”(一種美國阿靈頓 Amersham 國際集團分公司的產物)，以偵測對應分子量大約 25,000 和約 10,000 道耳頓位置的二個單獨蛋白質帶。本實驗所用的分子記號物係為具有分子量 67,000 道耳頓的小牛血清清蛋白，分子量 45,000 道耳頓的卵蛋白，分子量 30,000 道耳頓的碳酸脫水酶，分子量 20,100 道耳頓的大豆胰蛋白抑制劑和分子量 14,400 道耳頓的 α -乳白蛋白。

實施例 3

酵素的部分胺基酸序列

將含有實施例 1 所得之本發明酵素的酵素溶液以包含 5 體積/體積 % 甘油、0.1 重量/體積 % CHAPS 和 2 mM 二硫蘇糖醇的 Hepes 緩衝液 (酸鹼值 7.4) 滲析，並藉由離心冷凝器濃縮。將濃縮物依傳統方式以 SDS-PAGE 使用 15 重量/體積 % 和 2 重量/體積 % 二硫蘇糖醇當做還原劑的凝膠濃度分離，將經分離的蛋白質轉化成聚二氟乙烯膜並用 Coomassie Brilliant Blue 著色，接著剪下對應分子量約 25,000 和約 10,000 道耳頓的著色帶。

蛋白質組份分別依傳統方式從 cut 凝膠取出，並以 “MODEL 473A” (一種美國福斯特城市應用生物系統所售的蛋白質序列器) 分析胺基酸序列，顯示從具分子量約 25,000 道耳頓之著色帶取出的組份具有 SEQ ID:4 號胺基酸序列作為部分胺基酸序列，其中記號 “Xaa”(一種胺基酸) 係為 “異亮胺酸” 或 “蘇胺酸”，而從具分子量約 10,000 道耳頓之著

訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (15)

色帶取出的組份在 N-終端區域裡具有 SEQ ID:5 胺基酸序列。那些數據顯示本發明的酵素包含 2 個不同分子量副單位 (subunit) 。

實施例 4-1

前驅物的製備

在 0.5 毫升反應管裡放置 10 微升 10 x PCR 緩衝液、 1 微升 2.5 mM dNTP、 0.5 微升 5 單位/微升 Taq DNA 聚合溶液和 1 毫微克日本專利 Kokai 第 193, 098/96 號(本發明相同的申請人)揭示的重組 DNA pHIGIF。將具 5'-AAGGCCAGTGTGCGTGGCCTGGACAGTCAGCAAGG-3'和 5'-ACAGCCAGTGTGATGGCTAGTCTTCGTTTTGAACAG-3'之核苷酸序列的寡核苷酸加入混合物，其係以編碼多肽前驅物之 cDNA 的 SEQ ID:7 序列為基礎，每個數量為 20 微微莫耳並用殺菌蒸餾水加體積至 100 微升而化學合成。所得的混合物係以傳統的方式在 94 °C 裡連續培育 30 個循環一分鐘， 60 °C 培育一分鐘和 72 °C 培育一分鐘，以使 PCR 反應。使用日本 Takara Shuzo 公司市售的 "TAKARA PCR AMPLIFICATION KIT" 當做 PCR 反應所用的試劑。

反應產物以傳統的方式用限制酵素 (Bst XI) 切開並將 0.1 微克具約 800 基對 (base pair) 之所得的 DNA 碎片置入容器內，溶入所需量的殺菌蒸餾水，與 10 毫微克 "pRc/CMV" (一種 Invitrogen BV, NV Leek Netherlands 市售的質粒載體，其已經用限制酵素 Bst XI 切開並具有適量的 10 x 連接緩

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (16)

衝液和 T4 連接)混合，與 10 mM ATP 混合直到最後濃度為 1mM，接著在 16 °C 培育混合物 18 個小時以將 DNA 碎片導入質粒載體 pRC/CMV。將如此獲得的重組 DNA 導入大腸桿菌 JM109 菌株內而獲得轉形細胞，該轉形細胞然後培育成包含 50 微克/毫升安匹西林的 L-broth (酸鹼值 7.2)並在 37 °C 培育 18 個小時。其後，那些增殖的細胞係從培養基裡收集並且用鹼性 SDS 方法處理以萃取出重組 DNA。重組 DNA 命名為 "pRCHuGF"並使用雙脫氧方法分析核苷酸序列，顯示其具有圖 1 所示的結構。如圖 1 所示，重組 DNA pRCHuGF 具有 cDNA HuIGIF，其包含編碼多肽前驅物之 SEQ ID:7 的核苷酸序列，連接到細胞巨大病毒促進劑 PCMV 之啟動子下游處。

將取自中國倉鼠之 CHO-K1 細胞 (ATCC CCL 61)的種子培養基移植進入用 10 體積/體積%初生小牛血清補充的漢氏 F12 培養基(酸鹼值 7.2)裡，並培育增殖。其後，收集那些增殖的細胞，用磷酸鹽生理緩衝液(以下簡稱 "PBS")沖洗並懸浮在 PBS 裡，得到細胞密度 1×10^7 細胞/毫升。將 0.8 毫升的懸浮液和 10 微克重組 DNA pRCHuGF 放置在然後冰驟冷 10 分鐘的小池裡，置入 "GENE PULSERTM"(一種日本東京日本 Bio-Rad 實驗室所售的 electroporation 裝置)，並用排放脈沖管一次倒入，接著迅速地拿出小池並且冰驟冷 10 分鐘。其後，將細胞懸浮液從小池回收，放入用 10 體積/體積%初生小牛血清補充的漢式 F12 培養基(酸鹼值 7.2)內培育，在 37 °C 5 體積/體積%CO2 的保溫箱裡培育 3 天，然後

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (17)

在相同條件下與 G418 混合，得到 400 微克/毫升的最後濃度並在上述條件下培育 3 天。從大約 100 個菌落選擇四十八個菌落，將選擇的菌落其中一些放入散佈用 10 體積/體積 % 初生小牛血清補充之漢氏 F12 培養基 (酸鹼值 7.2) 培養盤中培育，並且如上所述的類似方式栽培一星期。其後，那些盤中每個井裡的細胞係藉由每個井裡加入包含 5.1 mM 氯化鎂、0.5 重量/體積 % 脫氧膽酸鈉 (sodium deoxycholate)、1 重量/體積 % “NONIDET P-40” (一種表面活性劑)、10 微克/毫升抗蛋白酶酸和 0.1 重量/體積 % SDS 的 10mM 三 HCl 緩衝液 (酸鹼值 8.5)。

將 50 微升整份之所得的細胞溶解物放入容器，接著將 50 微升甘油和得到最後濃度 2 重量/體積 % 之數量的二硫蘇糖醇加入容器裡，並將容器保持在 37 °C 一小時。其後，細胞溶解物裡的多肽係藉由 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳法分離，而以傳統的方式將在凝膠裡分離的多肽轉移到硝化纖維膜，在先前所得雜種瘤 H-1 菌株 (如日本專利 Kokai 第 231, 598/96 (本發明相同的申請人) 所揭示對多肽產生單株抗體) 的培養基上層清液裡浸漬一個小時，而且用包含 0.05 重量/體積 % tween 20 的 20 mM 三-HCl 緩衝液 (酸鹼值 7.5) 沖洗，除去過量的單株抗體。硝化纖維膜係浸在含有兔子抗鼠免疫球蛋白抗體貼上山葵過氧化物標籤的 PBS 裡一個小時，用包含 0.05 重量/體積 % Tween 20 的 20 mM 三-HCl 緩衝液 (酸鹼值 7.5) 沖洗 50 mM 三-HCl 緩衝液 (酸鹼值 7.5)，並浸在包含 0.005 重量/體積 % 過氧化氫和 0.3 毫克/毫升

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (18)

二胺基聯苯胺的 50mM 三 -HCl 緩衝液 (酸鹼值 7.5)裡染色。基於染色的程度，選擇更製得多肽前驅物的轉形細胞純系而且命名其為 "RCHuGF"。

將轉形細胞 RCHuGF 置入正方形培養瓶內培育，該正方形培養瓶裡分佈漢氏 F12 培養基 (酸鹼值 7.2)與 400 微克/毫升 G418 和 10 體積/體積 %初生小牛血清並在 37 °C 5 體積/體積 %CO2 保溫箱裡培育一星期，然而依要求更換新鮮的培養基。其後，以適量的 "TRYPSIN-EDTA" (一種胰蛋白，由生命技術領域的美國紐約 GIBCO 實驗室公司市售) 分離那些附著在瓶壁上的細胞，並用 PBS 沖洗已分離的細胞，此外用包含 10 mM 氯化鉀、1.5 mM 氯化鎂和 0.1 mM 乙二胺 -N, N, N', N'-四乙酸二鈉的冰驟冷 20 mM Hepes 緩衝液 (酸鹼值 7.4)沖洗，並在 3 倍體積相同緩衝液的新鮮緩衝液裡靜置 20 分鐘。然後用傳統的方式，以 10,000 x 克離心 30 分鐘分裂那些細胞，獲得一包含多肽前驅物的上層清液。前驅物得到分子量大約 24,000 道耳頓 (以 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳分析)並在 N-終端區域裡具有 SEQ ID:1 胺基酸序列。

實施例 4-2

前驅物的轉化

基質溶液係藉由將實施例 4-1 的多肽前驅物溶解在 100 mM 包含 10 體積/體積 %甘油、0.1 重量/體積 %CHAPS 和 2mM 二硫蘇糖醇的 Hepes 緩衝液 (酸鹼值 7.4)以得到濃度 500nM

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (19)

，並與 350 單位/毫升實施例 1 的酵素溶液混合，接著在 37℃ 下培育而製得。在開始培育後 0 分鐘，10 分鐘，30 分鐘，一小時，3 小時，6 小時和 18 小時時，每次的取樣時間去出一部分反應混合物樣品並與碘乙醯胺混合，得到最後濃度 200 微克/毫升以使反應暫時中止。使用單株抗體的 Western Blotting 方法，如日本專利 Kokai 第 231, 098/96 號所揭示(本發明相同的申請人)，係應用在反應混合物以研究前驅物轉化成活性形式期間隨時間的變化。

每次取樣時間所收集每個樣品裡的活性形式含量係藉由使用來自人類急性骨髓性白血病的單核細胞株當做夠用的細胞(KG-1 細胞 (ATCC CCL 246))的生物測試法來估計。生物測試法敘述如下：KG-1 細胞懸浮在用 10 體積/體積 %初生小牛血清補充的 RPMI 1640 培養基(酸鹼值 7.4)，得到細胞密度 1.5×10^6 細胞/毫升，並且將細胞懸浮液以 0.1 毫升/井的數量分佈在 96 個井的微孔板裡。將上述反應混合物在用 10 體積/體積 %初生小牛血清補充的 RPMI 1640 培養基(酸鹼值 7.4)稀釋之後以 0.1 毫升/井的體積加入微孔板裡，接著在 37℃ 5 體積/體積 %CO₂ 保溫箱裡培育 24 小時。在培育完成之後，取出微孔板之井裡 0.1 毫升整份上層清液並使用傳統酵素免疫測試法作 IFN- γ 的定量分析。結果示於表 1。表 1 裡 IFN- γ 的含量係在轉換成有關美國國家健康協會(NIH)獲得之 IFN- γ 標準(Gg23-901-530)的國際單位之後表示。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (20)

表 1

反應時間 (分鐘)	I F N - γ 含量 (IU/毫升)
0 分鐘	280
10 分鐘	750
30 分鐘	1,000
1 小時	1,800
3 小時	3,100
6 小時	3,900
18 小時	4,200

如圖 2 的 Western Blotting 方法所示，在該反應條件下，具有分子量大約 24,000 道耳頓的蛋白質帶(相當於前驅物)在反應開始之後逐漸地消失高達 3 個小時，然而具有分子量大約 18,200 道耳頓的蛋白質帶出現。表 1 所示的 I F N - γ 含量非常符合該結果；作為反應產物的 I F N - γ 生產力因為具有分子量大約 18,200 道耳頓的蛋白質帶(相當於前驅物)而逐漸地增加。這些結果係顯示酵素作用於多肽前驅物，形成一誘使免疫力充份的細胞裡產生 I F N - γ 的活性形式。

實施例 4-3

活性多肽的物化性質

實施例 4-3(a)

活性多肽的純化

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (21)

將在實施例 4-2 裡培育 18 小時之後的反應混合物以 10 mM 磷酸鹽緩衝劑 (酸鹼值 6.8) 滲析，飼進 "DEAE 5PW" 柱 (一種日本東京 Tosoh 公司市售之離子交換色層分離法所用的凝膠，已經用 10 mM 磷酸鹽緩衝劑 (酸鹼值 6.8) 平衡)，並且飼進 10 mM 磷酸鹽緩衝液 (酸鹼值 6.8) 裡從 0 M 增加到 0.5M 的線性梯度氯化鈉緩衝液，接著收集以氯化鈉濃度大約 0.2-0.3 M 沖提的溶離份。

將那些溶離份放入並以 PBS 滲析，而且飼進已經藉由使用單株抗體根據日本專利 Kokai 第 231,598/96 號 (本發明的相同申請人) 之方法提供一免疫親和性色層分離法所用的凝膠而製得的柱裡，將凝膠注入塑膠圓筒形柱內，並用 PBS 沖洗該柱。將 100 mM 甘胺酸-HCl 緩衝液 (酸鹼值 2.5) 飼進該柱裡以收集含有誘使免疫勝任細胞裡產生 I F N - γ 之活性形式溶離份。那些溶離放入並以殺菌蒸餾水滲析，利用膜濾器濃縮並且親液化，獲得固體形式之經純化的多肽。

實施例 4-3(b)

多肽的分子量

根據 U. K. Lemuli 在 "自然" 第 227 冊第 680-685 頁 (1970) 裡所報告的方法，將實施例 4-1 裡經純化的多肽在當做還原劑的 2 重量/體積二硫蘇糖醇存在下於聚丙烯醯胺凝膠裡電泳分析，以顯示符合大約 18,000-19,500 道耳頓位置裡的主要帶。那些數據係顯示酵素作用於具有分子量 24,000 道

(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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (22)

耳頓的多肽前驅物，將其轉化成分子量比前驅物低的活性形式。本實驗所用的分子記號物係為具有分子量 67,000 道耳頓的小牛血清清蛋白，分子量 45,000 道耳頓的卵蛋白，分子量 30,000 道耳頓的碳酸脫水酶，分子量 20,100 道耳頓的大豆胰蛋白抑制劑和分子量 14,400 道耳頓的 α -乳白蛋白。

實施例 4-3(c)

在 N-終端區域裡多肽的胺基酸序列

使用 "MODEL 473 A"(一種美國福斯特城市應用生物系統所售的蛋白質序列器)的傳統分析顯示實施例 4-1 裡經純化的多肽在 N-終端區域裡具有 SEQ ID:3 的胺基酸序列。那些數據顯示酵素作用於多肽前驅物，將在天冬胺酸 36 和酪胺酸 37 之間的多肽鍵切開。

實施例 5

抑制劑對酵素的活性

在實施例 4-2 前驅物所用的傳統方法裡，實施例 1 的本發明酵素係與 5 μ M Ac-YVAD-CHO 或 650 μ M 碘乙醯胺混合並在 37 $^{\circ}$ C 下反應 3 個小時。每個反應混合物係以 SDS-PAGE 使用 15 重量/體積 %凝膠在 2 重量/體積 %二硫蘇糖醇存在下分離，並以如日本專利 Kokai 第 231, 098/96 號所揭示(本發明相同的申請人)使用單株抗體的 Western Blotting 方法分析，結果顯示每個凝膠未測得對應活性形式的帶。這表示

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (23)

Ac-YVAD-CHO 和碘乙醯胺當做活性抑制劑作用於本發明的酵素。

實施例 6

將 U-937 細胞(ATCC CRL1593.2)(一種來自人類組織細胞淋巴瘤的骨髓單核細胞株)懸浮在含於約 10 毫升設有具孔徑 0.5 微米之薄膜過濾器的塑膠圓筒擴散室內的 RPMI 1640 培養基裡。擴散室係埋入然後依傳統方式餵食 4 個星期的成兔體內，再將擴散室從兔子體內取出。從擴散室收集經增殖的細胞，用 PBS 沖洗並以類似實施例 1 的方式分裂，接著純化混合物以獲得產率約每隻兔子 5 個單位的本發明酵素。

實施例 7

酵素的製備

將 HL-60 細胞(ATCC CCL240)(一種來自人類前骨髓細胞白血病的骨髓單核細胞株)懸浮在用 10 體積/體積%初生小牛血清補充的 RPMI 1640 培養基(酸鹼值 7.2)，得到細胞密度 3×10^5 細胞/毫升，並且在 37 °C 5 體積/體積%CO₂保溫箱裡培育 3 個星期，然而要用相同且新鮮的培養基更換。從培養基收集已增殖的細胞，用 PBS 沖洗並依類似實施例 1 的方式均質化，接著純化所得的產物以獲得產率約每升培養基 30 個單位的本發明酵素。

由實施例 2-5 方法所得之酵素物化性質的分析結果顯示

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (24)

， 酵素展現與實施例 1 相同的酵素活性、分子量和部分胺基酸序列，而酵素活性被 Ac-YVAD-CHO 和碘乙醯胺抑制。

如上所述，本發明係以酵素作用於誘使在免疫力充份的細胞裡產生 I F N - γ 之多肽前驅物而形成活性形式的最初發現為基礎而完成。本發明使用如此的酵素活性並且能夠製造當做在人體內也得到類似處理之有用製藥的多肽，藉由(i)將酵素與本質上產生多肽的細胞或與從哺乳動物宿主細胞產生的多肽前驅物接觸，該哺乳動物宿主細胞已藉由含改多肽為密碼之區域的 DNA 導入而轉化，或(ii)將改酵素為密碼的 DNA 或含改多肽為密碼之區域的 DNA 兩者導入哺乳動物宿主細胞內。該酵素可以藉由本發明方法使用細胞當做來源製造所需要的數量。

具有這些有用功能和活性的本發明將對該領域極有貢獻的重要發明。

當舉例說明且描述本發明特別具體實施例的時候，熟習此項技藝者將作各種不同的其他變化和改良卻未脫離本發明之精神範疇。因此諸如此類的變更和改良皆包涵所附的申請專利範圍裡。

(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)

序列表

(1) S E Q I D N O : 1 資料 :

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 4 1 胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓樸學 : 直線型

(ii) 分子類型 : 肽

(v) 片段類型 : N - 終端片段

(xi) S E Q I D N O : 1 序列說明 :

SEQ ID NO:1:

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

(2) S E Q I D N O : 2 資料 :

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 1 9 3 胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓樸學 : 直線型

(ii) 分子類型 : 肽

(xi) S E Q I D N O : 2 序列說明 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (26)

SEQ ID NO:2:

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

(3) S E Q I D N O : 3 資料 :

(i) 序列特徵 :

- (A) 長度 : 5 胺基酸
- (B) 種類 : 胺基酸
- (D) 拓樸學 : 直線型

(ii) 分子類型 : 肽

(v) 片段類型 : N - 終端片段

(xi) S E Q I D N O : 3 序列說明 :

SEQ ID NO:3:

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu
1				5

(4) S E Q I D N O : 4 資料 :

(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

五、發明說明 (27)

- (i) 序列特徵：
 - (A) 長度：19 胺基酸
 - (B) 種類：胺基酸
 - (D) 拓樸學：直線型
- (ii) 分子類型：肽
- (v) 片段類型：N－終端片段
- (xi) S E Q I D N O：4 序列說明：

SEQ ID NO:4:

Xaa	Pro	Ala	Met	Pro	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Gly	Asn	Val	Lys	Leu
1				5				10						15	
Cys	Ser	Leu													

- (5) S E Q I D N O：5 資料：
 - (i) 序列特徵：
 - (A) 長度：14 胺基酸
 - (B) 種類：胺基酸
 - (D) 拓樸學：直線型
 - (ii) 分子類型：肽
 - (v) 片段類型：N－終端片段
 - (xi) S E Q I D N O：5 序列說明：

SEQ ID NO:5:

Ala	Ile	Lys	Lys	Ala	His	Ile	Glu	Lys	Asp	Phe	Ile	Ala	Phe
1				5				10					

- (6) S E Q I D N O：6 資料：
 - (i) 序列特徵：
 - (A) 長度：157 胺基酸

(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

五、發明說明 (28)

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓樸學：直線型

(ii) 分子類型：肽

(xi) S E Q I D N O : 6 序列說明：

SEQ ID NO:6:

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

(7) S E Q I D N O : 7 資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：5 7 9 鹼基對

(B) 種類：核酸

(D) 拓樸學：直線型

(ii) 分子類型：c D N A 至 m R N A

(ix) 特性

(A) 名稱／關鍵字：引導肽

(B) 位置：1 . . 1 0 8

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

A7
B7

五、發明說明 (29)

- (C) 鑑定方法 : S
- (A) 名稱 / 關鍵字 : 成熟肽
- (B) 位置 : 1 0 9 . . 5 7 9
- (C) 鑑定方法 : S

(xi) S E Q I D N O : 7 序 列 說 明 :

SEQ ID NO:7:

ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA ATG	48
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met	
-35 -30 -25	
AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA GCT GAA GAT GAT GAA AAC	96
Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn	
-20 -15 -10 -5	
CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA	144
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile	
1 5 10	
AGA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT	192
Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro	
15 20 25	
CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG	240
Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg	
30 35 40	
ACC ATA TTT ATT ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG	288
Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met	
45 50 55 60	
GCT GTA ACT ATC TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA AYT CTC TCC TGT	336
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys	
65 70 75	
GAG AAC AAA ATT ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC	384
Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile	
80 85 90	
AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA	432
Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly	
95 100 105	
CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT	480
His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe	
110 115 120	
CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA	528
Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys	
125 130 135 140	
GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA	576
Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu	
145 150 155	
GAC Asp	579

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 用於將多肽前驅物身轉化為誘導 I F N - γ 生產之活化型式的酵素，其製法及其用途)

本發明係關於一種將誘使在免疫力充份的細胞裡產生 I F N - γ 之多肽前驅物轉化成活性形式的酵素，一種製造酵素的方法，該方法包括使製造酵素的細胞增殖和從已增殖的細胞收集所製得的酵素，和關於一種將前驅物轉化成活性形式的方法。

英文發明摘要 (發明之名稱： Enzyme for converting a precursor of a polypeptide into the active form that induces IFN- γ production, the process therefor, and the uses thereof)

Disclosed are an enzyme or a protein which converts a precursor of a polypeptide that induces IFN- γ production in an immunocompetent cell into the active form, a process for producing the enzyme comprising proliferating a cell which produces the enzyme and collecting the produced enzyme from the proliferated cells, and a method for converting the precursor into the active form.

(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

六、申請專利範圍

1 . 一種在免疫勝任細胞中誘使 I F N - γ 之多肽前驅物轉化成活性形式的酵素，該酵素具有下列物化性質：

(1) 分子量

SDS-PAGE 分析顯示分子量約為 25,000 和約 10,000 道耳頓；

(2) N-終端胺基酸序列

具有選自 SEQ ID:4 的胺基酸序列(其中符號 "Xaa" 係為 "異亮胺酸" 或 "蘇胺酸")或 SEQ ID:5 的胺基酸序列；及
SEQ ID:4:

Xaa	Pro	Ala	Met	Pro	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Gly	Asn	Val	Lys	Leu
1				5					10					15	
Cys	Ser	Leu													

SEQ ID:5

Ala	Ile	Lys	Lys	Ala	His	Ile	Glu	Lys	Asp	Phe	Ile	Ala	Phe.
1				5					10				

(3) 抑制劑

可被碘乙醯胺及乙醯基-L-門冬氨酸-L-谷醯基-L-二乙基戊醯胺-L-天冬-L-酸抑制。

2 . 根據申請專利範圍第 1 項之酵素，該酵素將該前驅物之 N 終端區域內 SEQ ID:1 中所含天冬氨酸 36 與酪氨酸 37 之間的肽鍵切開；

SEQ ID:1:

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

袋

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

4. 根據申請專利範圍第 1 項之酵素，其係從人類造血細胞獲得。

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

質具有下列物化性質：

(1)作用

該酵素將該前驅物 N-終端區域中完整或部分之 SEQ ID NO:1 所含之天冬胺酸 36 與和酪胺酸 37 之間的肽鍵切開；

(2)分子量

SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳分析顯示的分子量約為 25,000 和約 10,000 道耳頓；

(3)N-終端胺基酸序列

具有選自 SEQ ID:4 的胺基酸序列(其中符號 "Xaa"係為"異亮胺酸" 或 "蘇胺酸")或 SEQ ID:5 的胺基酸序列；

(4)抑制劑

可被乙醯基-L-門冬氨醯-L-谷醯基-L-二乙基戊醯胺-L-天冬-1-酸及碘乙醯胺抑制；及

(5)製造的細胞

可從人類造血細胞獲得。

6 . 一種製造如申請專利範圍第 1 項之酵素的方法，該方法包括使製造該酵素的細胞增殖及從已增殖的細胞收集所製得的酵素。

7 . 根據申請專利範圍第 6 項的方法，其中該細胞係為人類紅細胞生成素細胞。

8 . 根據申請專利範圍第 6 項的方法，其包括將該細胞移植至非人類溫血動物身上，及增殖該細胞並獲得動物體液。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

9 . 根據申請專利範圍第 8 項的方法，其中該動物係為齧齒類。

1 0 . 根據申請專利範圍第 6 項的方法，其中該酵素係藉由一或多種選自下列之方法收集，包括鹽析、透析、過濾，濃縮、分離沈澱、離子交換色層分離法、凝膠過濾色層分離法、吸附色層分離法、等電點性色層分離法、疏水性色層分離法、逆相色層分離法、親和性色層分離法、凝膠電泳及等電點聚焦法。

1 1 . 一種製造如申請專利範圍第 5 項之蛋白質的方法，該方法包括增殖該人類造血細胞，及自增殖和從已增殖的細胞收集所製得的酵素。

1 2 . 根據申請專利範圍第 1 1 項的方法，其中該細胞係為人類紅細胞生成素細胞。

1 3 . 根據申請專利範圍第 1 1 項的方法，其包括將該細胞移植至非人類溫血動物身上，及增殖該細胞並獲得動物體液。

1 4 . 根據申請專利範圍第 1 3 項的方法，其中該動物係為齧齒類。

1 5 . 根據申請專利範圍第 1 1 項的方法，其中該蛋白質係藉由一或多種選自下列之方法收集，包括鹽析、透析、過濾，濃縮、分離沈澱、離子交換色層分離法、凝膠過濾色層分離法、吸附色層分離法、等電點性色層分離法、疏水性色層分離法、逆相色層分離法、親和性色層分離法、凝膠電泳和等電點聚焦法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

六、申請專利範圍

1 6 . 一種轉化多肽的方法，其包括將申請專利範圍第1項的酵素與在免疫勝任細胞中誘使產生干擾素- γ 之多肽前驅物接觸，藉以將該前驅物轉化成活性形式。

1 7 . 根據申請專利範圍第16項的方法，其中該前驅物包括SEQ ID:2的胺基酸序列，其中記號" Xaa"係為"異亮胺酸"或"蘇胺酸"。

1 8 . 根據申請專利範圍第16項的方法，其中該活性形式在N-終端區域包括SEQ ID:3的胺基酸序列。

1 9 . 根據申請專利範圍第16項的方法，其中該活性形式包括SEQ ID:6的胺基酸序列，其中記號" Xaa"係為"異亮胺酸"或"蘇胺酸"；

SEQ ID:6：

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

2 0 . 一種轉化多肽的方法，其包括將申請專利範圍第6項的蛋白質與在免疫勝任細胞內誘使產生干擾素- γ 之多

(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

六、申請專利範圍

肽前驅物接觸，藉以將該前驅物轉化成活性形式。

2 1 . 根據申請專利範圍第 2 0 項的方法，其係將該前驅物 N-終端區域中完整或部份之 SEQ ID NO:1 所含之天冬胺酸 36 與酪胺酸 37 之間的肽鍵切開。

2 2 . 根據申請專利範圍第 2 0 項的方法，其中該前驅物包括 SEQ ID:2 的胺基酸序列，其中記號 " Xaa " 係為 " 異亮胺酸 " 或 " 蘇胺酸 "。

2 3 . 根據申請專利範圍第 2 0 項的方法，其中該活性形式在 N-終端區域裡具有 SEQ ID:3 的胺基酸序列。

2 4 . 根據申請專利範圍第 2 0 項的方法，其中該活性形式具有 SEQ ID:6 的胺基酸序列，其中記號 " Xaa " 係為 " 異亮胺酸 " 或 " 蘇胺酸 "。

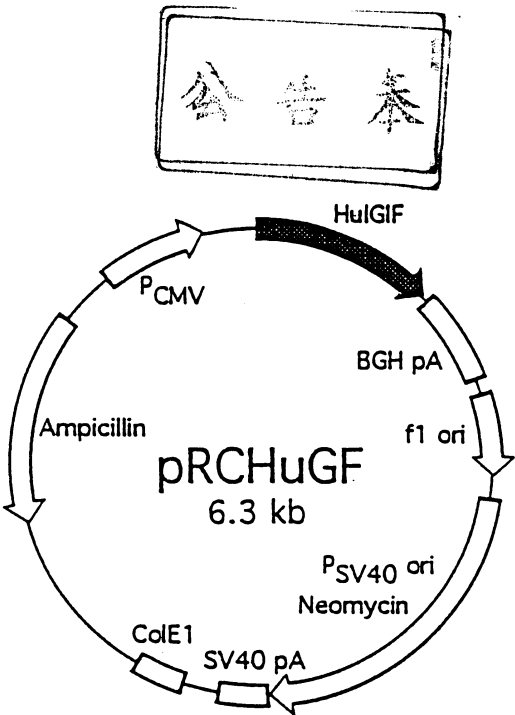
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

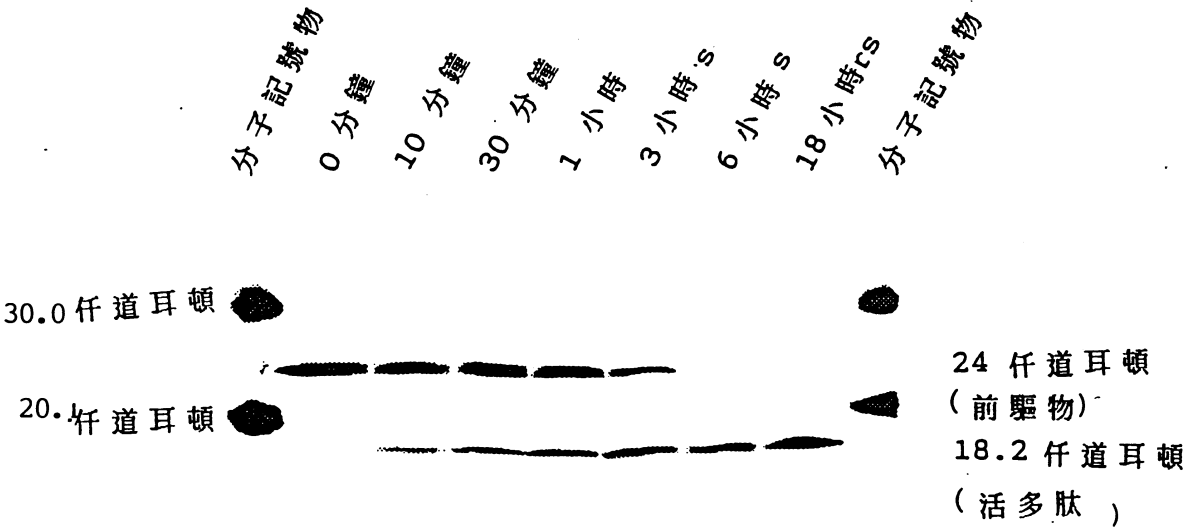
訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製



第 1 圖



第 2 圖