

公告本

申請日期	82 年 10 月 18 日
案 號	89102648(由82108)07分第14
類 別	C12N15/50, C07K14/55, C12P21/08

(以上各欄由本局填註)

585911

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	牛及羊干擾素 TAU, 其組成物及其醫藥用途
	英 文	Ovine and bovine interferon TAU, compositions thereof and pharmaceutical uses thereof
二、發明 創作人	姓 名	(1) 富勒·巴瑟 Bazer, Fuller Warren (2) 霍華·強生 Johnson, Howard Marcellus (3) 卡洛·龐瑟 Pontzer, Carol Hanlon
	國 籍	(1) 美國 (2) 美國 (3) 美國
	住、居所	(1) 美國德州大學站克瑞科維廣場八六〇〇號 8600 Creekview Court, College Station, TX 77845, U. S. A. (2) 美國佛羅里達州蓋恩維爾西北第七十五街四四〇四號 4404 N.W. 75th Street, Gainesville, FL 32606, U. S. A. (3) 美國馬里蘭州銀泉市風管岩石路二一五號 215 Piping Rock Drive, Silver Spring, Maryland 20905, U. S. A.
	三、申請人	姓 名 (名稱) (1) 佛羅里達州大學 University of Florida (2) 婦女研究組織 The Women's Research Institute 國 籍 (1) 美國 (2) 美國 住、居所 (事務所) (1) 美國佛羅里達蓋恩維爾·格林特大廳一八六號 186 Grinter Hall, University of Florida, Gainesville, Florida 32611, U. S. A. (2) 美國堪薩斯州威奇塔東中心二九〇三號 2903 East Central, Wichita, Kansas 67214, U. S. A. 代 表 人 姓 名 (1) 凱倫·霍布魯克 Holbrook, Karen A. (2) 布魯克·基爾 Keel, Brooks A.

裝

訂

線

申請日期	82 年 10 月 18 日
案 號	89102648
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明人 創作	姓 名	(4) 特洛伊·奧特 Ott, Troy Lee (5) 吉諾·希基 Heeke, Gino Van (6) 今川和彦 Imakawa, Kazuhiko
	國 籍	(4) 美國 (5) 美國 (6) 日本 (4) 美國德州布萊恩米其街八〇三號 803 Mitchell Street, Bryan, TX 77842, U. S. A.
	住、居所	(5) 瑞士舒布奇四一二四貝斯街十二號 Baselstrasse 12, CH-4124 Schoenebuch, Switzerland (6) 美國堪薩斯州德比# 1 〇南石路一〇一號 101 South Rock Road, #10, Derby, Kansas 67037, U. S. A.
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國 (地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐有 ☐無主張優先權

美國 1992 年 10 月 30 日 06/969,890 ☒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

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

發明範疇

本發明係關於牛及羊干擾素 - τ , 其組成物及其醫藥用途。

參考文獻

Ausubel, F.M., et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., Media, PA.

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

Bazer, F.W., et al., J. Reproduction and Fertility 76:841 (1986).

Bazer F.W., et al., Biology of Reproduction, vol.40; (Supplement 1):63, (Abstract) (1987).

Beames, et al., Biotechniques 11:378 (1991).

Benoit, P., et al., J. Immunol. 150(3):707 (1993).

Bonnem, E.M., et al., J. Bio. Response Modifiers 3:580 (1984).

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

Chan, et al., DNA 4:156 (1985).

Crea, R., U. S. Patent No. 4,888,286, issued December 19, 1989.

Crowe, S. M., et al., AIDS Res. Hum. Retrovir-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明(2)

uses 3(2):135 (1987).

Davis, G.L., et al., N. England J. Med. 321:
1501 (1989).

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

DeMaeyer, E., et al., Interferons and Other
Regulatory Cytokines, John Wiley and Sons, New Yo-
rk (1988).

Dianzani, F., J. Interferon Res., Special Iss-
ue, 5/92:109 (1992),

Dusheiko, G.M., et al., J. Hematology 3 (Supl.
2):S199 (1986).

Eaton, M. A. W., et al., U. S. Patent No.
4,719,180, issued Jan. 12, 1988.

Ecker, D.J., et al., J. Biol. Chem. 264:7715-
7719 (1989).

Familetti, P.C., et al., Meth. Enzymol. 78:387
(1981).

Finter, N.B., et al., Drugs 42(5):749 (1991).

Foa, P., et al., Cell Tissue Kinet. 15(4):399-
404 (1982).

Francis, M.L., et al., AIDS Res. and Human Re-
troviruses 8(2):199 (1992).

Frangioni, J.V., et al., Anal. Biochem. 210(1)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

編

五、發明說明(3)

:179-187 (1993).

Godkin, J.D., et al., J. Reprod. Fert. 65:141
(1982).

Griggs, N.D., et al., J. Immunol. 149:517
(1992).

Guan, K.L., et al., Anal. Biochem. 192(2):262-
267 (1991).

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

Hansen, P.J., et al., U. S. Patent No.
4,997,646, issued 5 March 1991.

Harlow, E., et al., Antibodies: A Laboratory
Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Har-
bor, NY (1988).

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

Hitzeman, R.A., et al., US Patent No.
4,775,622, issued Oct. 4, 1988.

Hoffman, A.E., et al., Virology 147:326 (1985)

Howatson, et al., J. Endocrinol. 119:531 (1988
).

Imakawa, K., et al., Nature 330:377 (1987).

Imakawa, K., et al., Mol. Endocrinol. 3:127-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明(4)

139 (1989).

Innis, M., U.S. Patent No. 4,975,276, issued Dec. 4, 1990.

Johnson, W.C., Jr., Methods in Enzymology, Vol. 210, pp. 426-447 (1992).

Kashima, H., et al., 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., et al., J. Mol. Biol. 157:105 (1982)

Langford, M.P., et al., Meth. Enzymol. 78:339 (1981).

Lawrence, et al., Nucl. Acids. Res. 13:1777 (1985).

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

Maniatis, T., et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

Martin, E.W., "In: Dispensing of Medication: a practical manual on the formulation and dispensing of pharmaceutical products", (Hoover, J.E. ed.),

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

編

五、發明說明(5)

8th edition, Mack Publishing Co., Easton, PA.,
(1976).

Meyer, F., et al., U.S. Patent No. 4,885,166,
issued Dec. 5, 1989.

McInnes, B., et al., J. Interferon Res. 9(3),
pp. 305-314, (1989).

Mullis, K.B., U. S. Patent No. 4,683,202, iss-
ued 28 July 1987.

Mullis, K.B., et al., U. S. Patent No.
4,683,195, issued 28 July 1987.

Miyoshi, E., et al., Int. J. Cancer 52(1):137-
140 (1992).

Oeda, K., et al., U.S. Patent No. 4,766,068,
issued Aug. 23, 1988.

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

Paulesu, et al., J. Biol. Regul. Homeost. Age-
nts 5:81 (1991).

Pederson, et al., Science 235:790 (1987).

Perczel, A., et al., Protein Engineering, Vol.
4, (Supp. 6), pp. 669-679, (1991).

Pontzer, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm.
152:801 (1988).

Pontzer, C.H., et al., Cancer Res. 51:5304 (
1991).

(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)

Poste, G., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., USA, Vol. 78:6226 (1981).

Quesada, J.R., et al., N. England J. Med. 310: 15 (1984).

Reilly, P.R., et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual (1992).

Roberts, R.M., et al., Endocrine Reviews 13: 432 (1992).

Rothstein, R., DNA Cloning: A Practical Approach, vol. II (Glover, D.M., Ed.) Oxford: IRL Press, pp. 46-66 (1986).

Rutter, W.J., et al., U.S. Patent No. 4,769,238, issued Sept. 6, 1988.

Sabin, E., et al., Bio/Technology 7:705-709 (1989).

Sambrook, J., et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) (1989).

Sanger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 (1977).

Senda, T., et al., EMBO J., Vol. 11, Supp. 9, pp. 3193-3201, (1992).

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

編

五、發明說明(7)

Smith, D.B., et al., Gene 67:31 (1988).

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

Stewart, H.J., et al., J. Endocrinol. 115:R13 (1987).

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

Vallet, J.L., et al., Biol. Reprod, 37:1307 (1987).

Vallet, J.L., et al., J. Endocrinology 117:R5-R8 (1988).

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

Wang, C. Y., et al., U.S. Patent No. 4,879,212, issued 7 Nov. 1989.

Wang, C. Y., et al., U.S. Patent No. 4,735,896, issue 5 April 1988.

Wilson, et al., Biology of Reproduction 20 (Supp. 1):101A, Abstract (1979).

Yoshio, T., et al., U. S. Patent No. 4,849,350, issued July 18, 1989.

Young, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1194 (1983).

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

結

五、發明說明(8)

發明背景

許多哺乳動物之胚膜(或滋養外胚層)會產生生化訊號以穩固並維持懷孕(Bazer, et al., 1983)。此類蛋白質之一,羊滋養層蛋白質1(oTP-1),被確認為低分子量的蛋白質,其係由懷孕第10至21日之間的綿羊胎體所分泌者(Wilson, et al., 1979; Bazer, et al., 1986)。蛋白質oTP-1顯示能抑制子宮分泌前列腺素 $F_2 - \alpha$,其能引起未懷孕綿羊之卵巢黃體進行生理上及內分泌學上的轉變(Bazer, et al., 1986)。因此, oTP-1具有抗黃體溶解之生物活性。推測oTP-1之主要功能與懷孕之穩固有關。

隨後發現oTP-1(i)呈現與多種生物之干擾素 α (IFN α)之間有限的同質性(50-70%)(Imakawa, et al., 1987),以及(ii)其會結合至I型干擾素受體(Stewart, et al., 1987)。除了與IFN α 之間有部份相似之外,oTP-1有數種特性是以與IFN α 區別,這些特性包括:oTP-1於繁殖生化學上之功能(其它干擾素並不知道有繁殖週期之生化調節上的任何功能),oTP-1之細胞來源……即滋養層細胞(IFN α 乃源自淋巴細胞),oTP-1之分子大小……即172個胺基酸(IFN α 通常約為166個胺基酸),及oTP-1甚難被病毒誘生(IFN α 可被病毒大量誘生)。國際干擾素學會承認oTP-1屬於一類全新的干擾素,其已命名為干擾素-tau(IFN τ)。希

(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)

臘字母 τ 表示滋養層。

干擾素被區分為兩個不同組：I 型干擾素，包括 I F N α ，I F N β ，及 I F N ω （亦即 I F N α II）；以及 II 型干擾素，以 I F N γ 為代表（根據 DeMaeyer, et al. 評論）。於人類，已鑑定出至少 17 種 I F N α 之非對偶基因，至少約 2 或 3 種的 I F N β 之非對偶基因，及單一種的 I F N γ 基因。

I F N α 顯示能抑制多種型式的細胞增殖。I F N α 拮抗如毛狀細胞白血病之類的血液學上惡性病尤其有效（Quesada, et al., 1984）。此外這些蛋白質亦顯示有拮抗下列腫瘤之活性，例如多重骨髓瘤，Kaposi's 肉瘤，慢性源自骨髓之白血病，腎細胞肉瘤，膀胱腫瘤及卵巢癌（Bonnem, et al., 1984; Oldham, 1985）。干擾素與干擾素受體在某些自體免疫及炎症性疾病上扮演的角色亦已被研究（Benoit, et al., 1993）。

I F N α 拮抗多種類型之病毒感染亦有效（Finter, et al., 1991）。 α - 干擾素顯示有拮抗人類乳突瘤病毒感染，B 型肝炎，及 C 型肝炎感染之活性（Finter et al., 1991; Kashima, et al., 1988; Dusheiko, et al., 1986; Davis, et al., 1989）。然而，I F N α 之有效性顯然被其毒性限制：使用干擾素於腫瘤及病毒感染症之治療上已導致嚴重的副作用，例如發燒，發冷，厭食，失重及疲倦（Pontzer, et al., 1991; Oldham, 1985）。這些副作用通常需要（i）干擾素劑量減少至會限制治療

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (10)

有效性之水平，或 (ii) 終止病患接受治療。這種毒性降低了這些強力抗病毒及抗增殖蛋白質於衰弱性人類及動物疾病之治療有效性。

發明簡述

本發明一方面包括抑制腫瘤細胞生長之方法。該方法中，令細胞與濃度為能有效抑制腫瘤生長之干擾素 - τ (I F N τ) 接觸。I F N τ 可得自多種來源，包括馬，牛，豬，綿羊，大白鼠，小白鼠，兔子及人類。兩個具體實例包括如 S E Q I D N O : 2 或 S E Q I D N O : 4 所示之 I F N τ 。許多腫瘤細胞可作為 I F N τ 抑制生長的標的，包括如下細胞但不受限於此：人類癌細胞及受類固醇影響的腫瘤細胞（例如，乳房腫瘤細胞）。

本發明亦涵括抑制細胞內病毒複製之方法。此方法中，令經病毒感染的細胞與濃度為能有效抑制細胞內病毒複製之干擾素 τ 接觸。上述 I F N τ 分子亦可用於本發明之這類方法中。許多病毒於細胞內的複製可被抑制，這些病毒包括 R N A 病毒（例如貓白血病毒，人類免疫不全病毒，或 C 型肝炎病毒）及 D N A 病毒（例如 B 型肝炎病毒）。

本發明之人類 I F N τ 分子亦可用於促進雌性哺乳動物受孕之方法中。此方法中，投服劑量為能有效促進雌性哺乳動物受孕之人類 I F N τ ，通常其置於藥學上可接受之載劑中。這類人類 I F N τ 分子之範例有如

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

S E Q I D N O : 4 及 S E Q I D N O : 1 2 所示之蛋白質序列。

本發明亦涵括一種經單離的核酸，其編碼人類干擾素- τ 。這類核酸分子之範例有 S E Q I D N O : 3 及 S E Q I D N O : 1 1。此外，本發明涵括表現人類 I F N τ 之表現載體。通常此表現載體包括 (a) 令有編碼人類干擾素- τ 之開放讀譯架構 (open reading frame) 的核酸；及 (b) 可令該開放讀譯架構於宿主細胞內表現之調節序列。此調節序列可包括用於主導或令 I F N τ 多肽分泌的序列：此種序列可為內源的 (例如正常發現的 I F N τ 引導序列，參見 S E Q I D N O : 1 1) 或外源的 (例如酵母菌或細菌表現系統所辨識之分泌訊號)。表現載體中，調節序列亦可包括位於該核酸序列 5' 端之啟動子區及與干擾素- τ 編碼序列同一架構內的 A T G 起始密碼，以及位於該編碼序列 3' 端之轉譯終止訊號與其後之轉錄終止訊號。此表現載體中的核酸可選自，舉例而言，S E Q I D N O : 1，S E Q I D N O : 3 及 S E Q I D N O : 1 1。

另一具體實例中，本發明涵括經重組製備的人類干擾素- τ 蛋白質。這種蛋白質之代表性序列之一示於

S E Q I D N O : 4。人類 I F N τ 亦可含有羧基端之延長 (如 S E Q I D N O : 1 2 所示之序列)。

本發明涵括重組產製干擾素- τ 之方法。此方法中，將重組表現系統導入適當宿主細胞內，該表現系統含有一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

個具有編碼人類干擾素 - τ 多肽之多核苷酸序列的開放讀譯架構 (O R F)，其中載體經設計以令該 O R F 於該宿主內表現。再於可造成 O R F 序列表現之條件下，培養該宿主。上述人類 I F N τ 序列為適當人類 I F N τ 多肽之範例。代表性之多核苷酸編碼序列有 S E Q I D N O : 3 及 S E Q I D N O : 1 1。許多載體與其對應宿主可用於操作本發明之這類方法，包括， λ g t 1 1 噬菌體載體與大腸桿菌細胞。其它宿主細胞包括酵母菌及昆蟲細胞表現系統。

本發明另涵括用於表現干擾素 - τ 多肽的表現系統。通常這些系統包括能提供開放讀譯架構於經選定之表現載體中表現的宿主，以及含有開放讀譯架構 (O R F) 之經選定的表現載體，該 O R F 具有編碼人類干擾素 - τ 多肽之多核苷酸序列。可用於這類表現系統的代表性序列有 S E Q I D N O : 4，S E Q I D N O : 1 5，S E Q I D N O : 1 6，S E Q I D N O : 1 7，S E Q I D N O : 1 8，S E Q I D N O : 1 9 及 S E Q I D N O : 2 0。

本發明亦涵括經單離的干擾素 - τ 多肽。這類多肽乃衍自干擾素 - τ 胺基酸編碼序列且長度介於約 1 5 個至 1 7 2 個胺基酸之間。舉例而言，這類多肽可選自如 S E Q I D N O : 2 及 S E Q I D N O : 4 所示之序列。代表性由 I F N τ 衍生之多肽包括如下序列，但不受限於此：S E Q I D N O : 5，S E Q I D

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

N O : 7 , S E Q I D N O : 1 0 , S E Q I D
N O : 1 5 , S E Q I D N O : 1 7 及 S E Q I D
N O : 2 0 。

另一具體實例中，本發明涵括阻斷 α - 干擾素結合至具有 α - 干擾素受體之細胞的方法。此方法中，令該細胞與濃度為能夠有效使得干擾素 - τ 結合至每一個 α - 干擾素受體的干擾素 - τ 多肽接觸。再將具有結合在受體上之 I F N τ 多肽的細胞與 α - 干擾素 (I F N α) 接觸。上述 I F N τ 多肽與由 I F N τ 衍生之多肽為可用於此方法之 I F N τ 多肽的範例。

此外，本發明涵括阻斷干擾素 - τ 結合至具有干擾素 - τ 受體之細胞的方法。此方法中，令該細胞與由干擾素 - τ 衍生的多肽 (例如 S E Q I D N O : 5 , S E Q I D N O : 7 , S E Q I D N O : 1 0 , S E Q I D N O : 1 5 , S E Q I D N O : 1 7 或 S E Q I D N O : 2 0) 接觸，其中多肽之濃度能有效使得該多肽結合至每一個干擾素 - τ - 受體。再將該細胞與干擾素 - τ 接觸。

本發明亦涵括經純化的抗體，其可與人類干擾素 - τ 免疫反應。此抗體可為多株抗體或單株抗體。代表性的 I F N τ 多肽抗原包括下列序列，但不受限於此：

S E Q I D N O : 4 , S E Q I D N O : 1 5 ,
S E Q I D N O : 1 7 及 S E Q I D N O : 2 0
。

(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)

本發明亦涵括下列物質：具有抗腫瘤（亦即抗增殖）活性之由干擾素- τ 衍生的多肽；具有抗病毒活性之由干擾素- τ 衍生的多肽；混合型 α -干擾素分子，其中天然IFN α 之毒性部份被源自IFN τ 之相似序列置換。

當研讀下文之本發明的詳細說明並佐以圖示之後，本發明之上述及其它目的與特徵當能更充分理解。

圖式概述

圖 1 表示 OvIFN τ 之合成型基因的核酸編碼序列，該基因經設計以包含平均分佈在整個編碼序列的 19 個不同的限制酶位置。

圖 2 表示用於製造編碼 OvIFN τ 之合成型基因的選殖策略。

圖 3 表示人類干擾素- τ 基因與綿羊干擾素- τ 基因之經推測的蛋白質序列之比較。有差異的胺基酸在核酸序列下方之線上，擇一有改變的胺基酸標示。

圖 4 表示證實 OvIFN τ 及 IFN α 兩者皆能顯著降低 HL-60 細胞生長之數據。

圖 5 表示證實 γ HuIFN τ 對細胞有毒性而

OvIFN τ 卻不然的數據。此圖中，三次重複試驗的結果以存活 % 平均值 $\pm$ SD 表示。

圖 6 表示衍自 IFN τ 序列之多肽序列。

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 用於處理周邊血液單核細胞時，相對

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (15)

於 I F N α 為無細胞毒性之支持數據。

圖 9 表示利用 I F N τ 處理人類皮膚之 T 細胞淋巴瘤細胞株，H U T 7 8，之結果。

圖 1 0 表示利用 I F N τ 處理人類 T 細胞淋巴瘤細胞株，H 9，之結果。

圖 1 1 A 表示使用衍自 O v I F N τ 之多肽與完整

O v I F N τ 對於與 F I V (貓免疫不全病毒) 複製有關之肽抑制作用的數據。

圖 1 1 B 表示使用衍自 O v I F N τ 之多肽與完整

O v I F N τ 對於與 H I V (人類免疫不全病毒) 複製有關之肽抑制作用的數據。

圖 1 2 表示證實利用衍自 I F N τ 肽抑制 I F N τ 之抗病毒活性的數據。

圖 1 3 表示證實利用衍自 I F N τ 肽抑制 O v I F N τ 之抗病毒活性的數據。

圖 1 4 表示證實利用衍自 I F N τ 肽抑制牛 I F N α 之抗病毒活性的數據。

圖 1 5 表示證實利用衍自 I F N τ 多肽抑制人類 I F N α 之抗病毒活性的數據。

圖 1 6 表示評估利用衍自 I F N τ 肽對牛 I F N γ 之抗病毒活性缺乏抑制作用的數據。

圖 1 7 表示證實利用抗一衍自 I F N τ 肽之抗血清抑制 I F N τ 之抗病毒活性的數據。

圖 1 8 表示證實利用抗一衍自 I F N τ 肽之抗血清抑制經

(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)

放射標記之 I F N τ 結合至細胞的數據。

序列之概述

SEQ ID NO : 1 為編碼綿羊干擾素 - τ (O v I F N τ) 之合成型基因的核苷酸序列。

亦不經編碼之胺基酸序列。

SEQ ID NO : 2 為成熟之 O v I F N τ 蛋白質之胺基酸序列。

SEQ ID NO : 3 為編碼成熟人類干擾素 - τ (H u I F N τ) 蛋白質之合成型核苷酸序列。

SEQ ID NO : 4 為成熟 H u I F N τ 蛋白質之胺基酸序列。

SEQ ID NO : 5 為 SEQ ID NO : 2 之片段 1 - 3 7 的胺基酸序列。

SEQ ID NO : 6 為 SEQ ID NO : 2 之片段 3 4 - 6 4 的胺基酸序列。

SEQ ID NO : 7 為 SEQ ID NO : 2 之片段 6 2 - 9 2 的胺基酸序列。

SEQ ID NO : 8 為 SEQ ID NO : 2 之片段 9 0 - 1 2 2 的胺基酸序列。

SEQ ID NO : 9 為 SEQ ID NO : 2 之片段 1 1 9 - 1 5 0 的胺基酸序列。

SEQ ID NO : 1 0 為 SEQ ID NO : 2 之片段 1 3 9 - 1 7 2 的胺基酸序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (17)

SEQ ID NO : 11 為具有引導序列之天然 Hu IFN τ 基因之核苷酸序列。

SEQ ID NO : 12 為 SEQ ID NO : 11 之經推測的胺基酸編碼序列。

SEQ ID NO : 13 為根據本發明之 25 個核苷酸的合成型寡核苷酸。

SEQ ID NO : 14 為根據本發明之 25 個核苷酸的合成型寡核苷酸。

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

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

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

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

SEQ ID NO : 19 為 SEQ ID NO : 4 之片段 119 - 150 的胺基酸序列。

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

本發明之詳細說明

I . 定義

干擾素 - τ 表示干擾素蛋白質一族，其具有如下特徵

(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)

： (i) 抗黃體溶解特性； (ii) 抗病毒特性； (iii) 抗細胞增殖特性； (iv) 與 α - 干擾素有 45 - 68 % 之胺基酸同質性及相對於如 SEQ ID NO : 2 所示序列有大於 70 % 之胺基酸同質性。干擾素 - τ 可自多種如下所述之哺乳動物來源分離而得。

干擾素 - τ 多肽為衍自干擾素 - τ 胺基酸編碼序列之具有約 15 至 172 個胺基酸的多肽，其中該 15 至 172 個胺基酸在天然干擾素 - τ 中是連續的。

II . 干擾素 - τ 之單離與鑑定

A . 綿羊及牛之干擾素 - τ

1 . 干擾素 - τ 之編碼序列

綿羊干擾素 - τ (O v I F N τ) 乃主要的胎體分泌性蛋白質，係由綿羊母體接納之嚴格期間的胚胎之胚膜製造出來。成熟 O v I F N τ 之單離物為長度為 172 個胺基酸者 (SEQ ID NO : 2)。c D N A 編碼序列含有成熟蛋白質氨基端之額外的 23 個胺基酸 (Imakwa, et al., 1987)。此 O v I F N τ 單離物之編碼序列示於圖 7。

爲了要單離 O v I F N τ 蛋白質，收集來自懷孕綿羊的胎體並於活體外培養在如先前所述之改良型最低必須培養基中 (Godkin, et al., 1982)。胎體係收集自懷孕期之不同日，配種之第一天記錄為第 0 日。基本上如 Vallet, et al., (1987) 及 Godkin, et al., (1982) 所述，自

(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)

胎體培養基純化 I F N τ 。

I F N τ 之同源性乃藉由硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳法評估 (SDS-PAGE; Maniatis, et al.; Ausubel, et al.) 。經純化之 I F N τ 試樣中蛋白質濃度的測定係採用雙率可寧分析法 (bicinchoninic (BCA) assay) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Smith, et al., 1985) 。

自牛單離出 O v I F N τ 的同源蛋白質 (b I F N τ ; Helmer, et al., 1987; Imakawa, et al., 1989) 。 O v I F N τ 與 B o I F N τ (i) 於懷孕期之母體接納過程中有相似作用，及 (ii) 成熟蛋白質之間有高度之胺基酸及核苷酸序列之同源性。介於 O v I F N τ 與 B o I F N τ 之間的核酸同源性為，5' 非編碼區有 76.3%，編碼區有 89.7%，及 3' 非編碼區有 91.9%。胺基酸序列之同源性為 80.4%。

實例 1 說明 O v I F N τ 在繁殖上的作用。將不同濃度的 O v I F N τ 及重組型人類 $\alpha - 2 -$ 干擾素 (r H u I F N α_2) 灌入綿羊的子宮腔。評估子宮腔的生命期乃檢測發情期之間的時間，黃體酮 (progesterone) 分泌之維持，及前列腺素分泌之抑制情形 (Hanson, et al.) 。這些檢測所得結果之比較證實，當施用 100 微克 / 天之 I F N τ 時，動情期之間的時間可被顯著延長，而當施用 r H u I F N α 時，無明顯作用。這些數據支持一結論，即 I F N τ 能顯著影響動情週期之生化結果。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (20)

亦檢測干擾素 - τ 於繁殖週期之不同階段的抗病毒特性 (實例 2) 。利用得自綿羊動情週期第 1 2 日至第 1 6 日之胎體建立胎體培養物。評估每份胎體培養物上清液的抗病毒活性。隨著胎體發育之進展，培養物上清液有逐漸增加的抗病毒活性。

2 . I F N τ 之重組製備

利用細菌及酵母菌細胞製備重組 I F N τ 。利用 O v I F N τ 之胺基酸編碼序列來生成對應之 D N A 編碼序列，其具有可在大腸桿菌中充分表現之密碼用法 (codon usage) (實例 3) 。利用依序添加寡核苷酸而將 D N A 編碼序列合成式地構築起來。利用如圖 2 所示之限制酶水解及接合，將經選殖之寡核苷酸融合為單一的多核苷酸。多核苷酸之編碼序列具有如 S E Q I D N O : 1 所示之序列。

為使重組 I F N τ 表現，可將合成之編碼序列置入多種細菌表現載體，例如， λ g t 1 1 (Promega, Madison WI) ; p G E X (Smith, et al.) ; p N H 載體 (Stratagene, La Jolla CA) 。將 I F N τ 合成多核苷酸殖入經修飾的 p I N III o m p - A 表現載體，記載於實例 3 。I F N τ 蛋白質之產製由添加 I P T G 誘導。利用超音波震盪或滲透分級分離，將可溶之重組 I F N τ 自細胞釋出。

此蛋白質可用標準法進一步純化，包括分子大小分級

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (21)

分離法 (管柱層析或操作前之凝膠電泳) 或親和性層析法 (例如使用抗 - I F N τ 抗體 (固相支持物可購自 Pharmacia 廠, Piscataway NJ)) 。蛋白質製劑亦可濃縮, 例如使用過濾法 (Amicon, Danvers, Mass) 。

合成之 I F N τ 基因亦殖入酵母菌選殖載體 p B S 2 4 u p (實例 4 ; Sabin, et al., ; Ecker, et al.) 。構築合成連接子以令 I F N τ 編碼序列與泛醌素 (ubiquitin) 編碼序列於載體內進行同一架構 (in-frame) 之融合。形成的連接情形允許泛醌素序列於活體內自 I F N τ 序列切除。

令重組質體 p B S 2 4 u b - I F N τ 轉形酵母菌 - 啤酒釀母菌 (*S. cerevisiae*) 。培養經轉形的酵母菌細胞, 將其溶解且自細胞溶解物單離重組 I F N τ (r - I F N τ) 蛋白質。

利用放射免疫法將 r - I F N τ 定量。進行經純化之 r - I F N τ 的微定序。結果證實與天然 I F N τ 之前 1 5 個胺基酸序列一致。此結果亦證實泛醌素 / I F N τ 融合蛋白質於活體內可被正確處理。

藉此方法製得之重組 I F N τ 具有抗病毒活性, 此活性與純化自適用胎體之培養基的 I F N τ 之抗病毒活性類似。

操作本發明亦可使用其它酵母菌載體, 包括具可調節表現之載體, 但不受限於此 (Hitzeman, et al., ; Rutter, et al., ; Oeda, et al.) 。代表性之酵母菌轉形作

(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)

用之宿主為啤酒釀母菌，然其它適用於轉形之酵母菌亦可使用（例如（*Schizosaccharomyces pombe*））。

編碼 I F N τ 多肽之 D N A 可被殖入任何商品化的載體，以令該多肽於適合宿主系統內表現。這些系統包括上述的細菌及酵母菌表現系統，以及如下：杆狀病毒表現系（Reilly, et al.; Beames, et al.; Clontech, Palo Alto CA）；及哺乳動物細胞表現系（Clontech, Palo Alto CA; Gibco-BRL, Gaithersburg MD）。這些重組多肽可以融合蛋白質或以天然蛋白質型式表現出現。多種特性可被安排在表現載體內，例如促使經表現序列分泌至培養基之引導序列。

通常經重組製備之多肽是由經溶解的細胞或培養基分離而得。可利用此技藝之習知方法進行純化，包括鹽類分級分離，離子交換層析，及親和性層析。如前所述，亦可採用免疫親和力層析，其使用基於 I F N τ 多肽所產製的抗體。

B . 人類干擾素 - τ

1 . 編碼干擾素 - τ 蛋白質之人類基因組序列的鑑定及選殖

篩選 D N A 以尋找同源於干擾素 - τ 的序列（實例 5）。鑑定出與 O v I F N τ c D N A 探針雜交的數種序列。隨後分離出含有人類干擾素 - τ 之部份序列的數個純系（實例 6）。合成對應於 O v I F N τ c D N A 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 (23)

之 2 個合成的 2 5 個核苷酸之寡核苷酸 (Imakawa, et al., 1987) 。 這些引子用於擴大反應，此反應使用衍自下列 2 個 c D N A 庫的 D N A : 人類足孕之胎盤及人類足孕之滋養葉胞層 (cytotrophoblast) 。 產生之經擴大 D N A 片段以電泳分開且單離含有 I F N τ 擴大產物之帶 (band) 。 令產物再次選殖且利用二去氧終止法定序經嵌入的擴大產物。

得自三個此類純系之序列比較顯示，單離物之間有高度的序列同源性，但此序列並非完全相同。此結果推測有人類干擾素 - τ 基因之多種變種的存在。

實例 7 說明全長之人類 I F N τ 基因之單離。自週邊血液之單核細胞 (P B M C s) 單離高分子量的 D N A ，並進行分子大小之分級分離。測試流份有無 I F N τ 序列的存在，採用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction) : 來自經測試有擴大反應之流份的 D N A 分子可用來形成 λ g t 1 1 中之次基因組庫。

塗佈該次基因組庫並與 O v I F N τ c D N A 探針雜交 (實例 7 A) 。 鑑定出雜交至探針的近 2 0 個純系。繼代相常於正反應純系之噬菌斑，藉使用 O v I F N τ 引子之擴大反應來單離及分析 D N A 。 這 2 0 個噬菌斑中有 6 個噬菌斑產生正反應之 P C R 訊號。純化源自這 6 個純系之噬菌斑並將嵌入 D N A 定序。這 6 個純系中之一的嵌入物被用來作為隨後篩檢步驟之雜交探針。

利用上述之雜交探針篩檢源自 λ g t 1 1 次基因組庫

(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)

之重組噬菌體 (實例 7 B) 。單離出 3 個顯示正雜交訊號的純系並將嵌入物定序。獲得的核酸序列資料如

SEQ ID NO : 1 1 所示，而推測之蛋白質編碼序列如 SEQ ID NO : 1 2 所示。推測之成熟蛋白質之編碼序列如 SEQ ID NO : 4 所示。

人類干擾素 - τ 基因 (SEQ ID NO : 4) 與綿羊干擾素 - τ 基因之推測的蛋白質序列的比較 (圖 3) 胺基酸層次上之序列同源性及差異性。

如 SEQ ID NO : 1 2 及 SEQ ID NO : 1 1 所示之人類 IFN τ 序列及自其衍生之引子與探針，可用來作為探針以測定其它含有人類 IFN τ 編碼序列及偽基因 (pseudogenes) 之單離物。此外，同一生物種，可能有至少一種 IFN τ 蛋白質之異型 (isolate) 及至少一種編碼序列。根據本發明揭示方法，可令操作本發明之特定核酸探針和能與本案 IFN τ 多肽反應的抗體用於單離哺乳動物中未經鑑定的干擾素 - τ 之變種，這些哺乳動物包括山羊，馬，乳牛，閩牛，綿羊，大白鼠，小白鼠，兔子，猴子及人類，但不受限於此。

2 . 利用人類組織中干擾素 - τ 表現情形的鑑定

利用對 O v IFN τ c D N A 探針之雜交反應，分析人類胎盤 c D N A 庫及綿羊 c D N A 庫 (實例 8) 。此 D N A 雜交分析結果顯示人類 c D N A 庫所得之 IFN τ - 訊號約為綿羊 c D N A 庫所得訊號之 1 / 1 0 0 。

(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)

O v I F N τ c D N A 佔有約 0 . 4 % 之綿羊 c D N A 庫。因此，對 O v I F N τ 探針呈反應的人類 c D N A 的量顯然是低的，至少在足孕之胎盤中是如此，因該 c D N A 庫是由胎盤生成的。

亦分析人類足孕胎盤及羊膜細胞中 H u I F N τ m R N A 之存在情形。結果顯示人類 I F N τ m R N A 存在於胎兒與胎盤之間的合併處。羊膜細胞亦表現相當於 O v I F N τ 引子及人類探針的訊信，可推知 I F N τ m R N A 之表現不受足孕胎盤之限制。

此外，將 R T - R C R 分析法應用在單離自成人淋巴細胞之總細胞 R N A，以偵測 H u I F N τ 之存在情形：結果顯示 I F N τ m R N A 存在淋巴細胞中。

亦使用定位雜交法 (in situ hybridization) 檢測人類組織中干擾素 - τ 之表現情形 (實例 9)。檢測得自 4 個健康，不同足孕期及首三個月之人類胎盤的組織切片。此分析法使用了衍自 O v I F N τ c D N A 序列之 c D N A 探針 (實例 9 B)。定位雜交法乃使用反意 (anti-sense) R N A 探針進行。三項個別實驗中，所有足孕及首三個月之胎盤組織皆可見特異的雜交反應。

首三個月之胎盤絨毛 (由外層的融合細胞滋養層，底層之滋養葉胞層及具有多種類型間葉細胞之中心基質區所組成) 之滋養葉胞層細胞中呈現 I F N τ 之最高轉錄水平。較不強但可測得的轉錄水平見於融合細胞滋養層與間葉細胞。類似的轉錄表現之結果亦於足孕組織之胎盤絨毛中

(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)

被證實，但訊號偵測水平較低。首三個月之絨毛外滋養層呈現最高訊號量且當其位於母體血液間隔處時染色呈正反應。

Howatson, et al., (1988)註明 I F N α 於首三個月及足孕組織之絨色膜絨毛的融合細胞滋養層中產製。Paullesu, et al., (1991)亦觀察到絨毛外滋養層與融合細胞滋養層之 I F N α ，於首三個月胎盤組織中之反應性比源自足孕組織者更強且更廣泛。這些研究員使用拮抗人類 I F N τ 亞型所誘生的抗體，但無任何人發現絨毛之滋養葉胞層有任何 I F N α 。

目前結果證實人類 I F N τ 基因在被絨毛外滋養層細胞佔據之早期胎盤組織中大量表現，且在絨毛之融合細胞滋養層，滋養層及多種間質細胞中亦有表現。這些結果證明可測出人類懷孕期組織有 I F N τ 轉錄，且首三個月胎盤之絨毛的融合細胞滋養層及絨毛外滋養層有 I F N τ 表現。

C . 干擾素 - τ 之抗病毒特性

已評估 I F N τ 拮抗多種病毒之抗病毒特性，包括 R N A 及 D N A 病毒。經純化至均質之 O v I F N τ 的相對特異活性於抗病毒分析法中評估（實例 10）。

I F N τ 具有比 r B o I F N α 或 r B o I F N γ 更高之特異抗病毒活性（實例 10，表 3）。

本發明優點之一乃 I F N τ 具有強的抗病毒活性，伴

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (27)

隨有限的細胞毒性作用。測試高度純化之 O v I F N τ 對於接觸過 A I D S 及人類 A I D S 之逆轉錄病毒之週邊血液淋巴細胞的抗逆轉錄病毒作用及細胞毒性作用 (Bazer, F.W., et al (1987)。此豆狀病毒 (lentivirus) 對貓造成慢性似 A I D S 的症狀，故為研究人類 A I D S 之模型 (Pederson, et al., 1987)。檢視兩種病毒之任一者於週邊血液淋巴細胞 (P B L) 之複製情形，係根據經過一段時間之培養物上清液中的逆轉錄酶 (R T) 活性。

欲測定 I F N τ 拮抗 F I V 及 H I V 之抗病毒活性，可測定經 I F N τ 處理之經 F I V - 及 H I V - 感染之貓及人類 P B L 培養物中的依賴 R N A 之 D N A 聚合酶的 R T 活性 (實例 1 1)。當細胞培養時有 I F N τ 的存在，F I V 之複製情形會降低至約為對照數值的 1 / 3。O v I F N τ 的添加會產生逆轉錄酶 (R T) 活性之快速且由劑量決定之降低情形 (實例 1 1，表 4)。I F N τ 之濃度低至 0 . 6 2 n g / m l 時仍可抑制病毒複製，而對於 R T - 活性有較大作用之更高濃度 (4 0 n g / m l)，對細胞無毒性作用。此結果顯示，當細胞培養時有 O v I F N τ 的存在，與對照數值比較之貓免疫不全病毒之複製情形顯著降低了。

I F N τ 顯然對逆轉錄病毒之宿主細胞無細胞毒性作用。當 I F N τ 以每毫升 4 0 微毫克之濃度存在培養基中時，上述結論亦為真。此濃度之 I F N τ 相當於約 8 , 0 0 0 抗病毒單位之 α - 干擾素，當根據 Pontzer,

(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)

et al. (1988) 所述測定 I F N τ 對於保護 Madin-Darby 牛腎細胞免於被水泡口炎病毒 (vesicular stomatitis virus) 溶解之活性。

亦測試 I F N τ 拮抗 H I V 於人類細胞內複製之活性。令經過 H I V 感染之人類週邊淋巴細胞以不同濃度的 I F N τ 處理 (實例 1 2)。評估周邊血液淋巴細胞中 H I V 之複製情形係根據一段時間內之培養上清液的逆轉錄酶活性。一個濃度範圍內之 I F N τ 能產生顯著的抗 - H I V 作用 (實例 1 2 , 表 5)。僅培養 6 日, 1 0 n g / m l 濃度就能造成 R T 活性降低 5 0 %。5 0 0 n g / m l 濃度造成 1 0 日內之 R T 活性降低 9 0 %。此外, 無任何細胞毒性作用之證據顯示與 I F N τ 之施用有關 (實例 1 2 , 表 5)。

此外, 評估 I F N τ 拮抗 H I V 之抗病毒作用, 係在 H I V 感染之際, 以不同量的重組 I F N τ 或重組人類 I F N α_2 處理人類 P B M C 細胞 (實例 1 8)。此測試所得數據 (實例 1 8 , 表 1 2) 支持一結論, 即相近濃度時, I F N α 與 I F N τ 皆能有效降低 H I V 於人類淋巴細胞內複製。然而, 以 I F N α_2 處理的細胞會造成細胞毒性, 而未見這類細胞毒性出現在使用 I F N τ 處理者, 即使使用濃度高出許多之 I F N τ 。

沒有 P B L 時, F I V 及 H I V 逆轉錄酶本身皆不受 I F N τ 之影響。故抗病毒活性並非針對病毒之 R T 直接作用所造成的。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (29)

干擾素 - τ 亦發現可抑制肝細胞中之 B 型肝炎病毒 D N A 複製 (實例 1 8) 。利用被 B 型肝炎病毒 (H B V) 轉感的衍自肝細胞之人類細胞，以測試 I F N τ 之抗病毒作用。令細胞以一濃度範圍內的 I F N α 及 I F N τ 處理。與無干擾素之對照組比較，I F N α 與 I F N τ 皆減少近 2 倍之 D N A 複製。

爲了要證明干擾素之作用是特異針對感染性病毒而非作用在一般細胞代謝所致的結果，測定肝細胞中 I F N α 與 I F N τ 對肝特異之 m R N A 產製的影響 (實例 1 8) 。藉雜交分析測定兩種肝細胞特異之蛋白質，A p o E 與 A p o A 1 。當 I F N α 或 I F N τ 濃度高至 4 0 , 0 0 0 單位 / 毫升時，兩種肝特異之 m R N A 無任一者出現 m R N A 產製的減少。此外，此分析中未見使用 I F N τ 者有肝細胞毒性之證據。

這些結果顯示 I F N τ 是有效拮抗種類廣泛之病毒的抗病毒劑，這些病毒包括 R N A 及 D N A 病毒。I F N τ 超過其它如 I F N α 之干擾素的一項優點爲，使用 I F N τ 療法不會與任何細胞毒性有關。

D . I F N τ 之抗增殖特性

I F N τ 對細胞生長之作用亦予測定。一分析法中，利用集落抑制法 (colong inhibition assay) 測定抗一細胞生長之活性 (實例 1 3) 。以低細胞密度塗佈人類羊膜 (W I S H) 或 M D B K 細胞於培養皿上，以形成源自

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (30)

單一細胞之集落。令干擾素稀釋物加至三個重複的孔洞 (well) 並培養培養盤以令集落形成。這些測定可見

I F N τ 抑制集落的大小與數目。I F N τ 抑制人類細胞株 (W I S H) 之細胞增殖，比人類 I F N α 有效。

I F N τ 之抗增殖活性是由劑量決定的。高濃度的 I F N τ 會終斷增殖，但細胞存活情形未受損害。根據使用流動式細胞計數法之細胞週期分析，可知 I F N τ 顯然會抑制細胞，發展至 S 期。這些結果證明 I F N τ 具抗增殖活性，且強調出其具有低細胞毒性。

亦研究 I F N τ 對大白鼠及牛細胞株之抗增殖作用 (實例 1 4) 。利用 ^3H - 胸腺嘧啶攝入之速率來評估細胞增殖之速率。所得數據證明 I F N τ 顯示降低每一測試細胞株之細胞增殖的速率 (實例 1 4 ，表 7) 。

進一步以一系列人類腫瘤細胞株測試 I F N τ 之增殖活性與缺乏細胞毒性 (實例 1 5) 。多種人類腫瘤細胞株乃選自用於測試抗腫瘤劑之 N I H 篩檢法的標準細胞株 (Pontzer, C.H., et al., (1991)) 。至少測試一種選自每一個主要腫瘤類別的細胞株。

下列細胞株係得自美國菌種保持中心 (12301 Parklawn Dr., Rockville MD 20852) :

N C I - H 4 6 0	人類肝大細胞癌；
D L D - 1	人類結腸腺癌；
S K - M E L - 2 8	人類惡性黑色素瘤；
A C H N	人類腎腺癌；

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (31)

H L - 6 0	人類前骨髓細胞性白血病；
H 9	人類 T 細胞淋巴瘤；
H U T 7 8	人類皮膚 T 細胞淋巴瘤；及
M C F 7	人類乳腺癌。

如上所述，評估抗增殖活性乃藉由測定 ^3H - 胸腺嘧啶被攝入經過 I F N τ 處理之細胞的速率。處理組間之顯著差異性乃根據 Scheffe's F - 測試的誤差分析而予評估。藉流動式細胞計數法進行細胞週期之分析。

I F N τ 對 M C F 7 (乳腺癌) 增殖之抑制結果的測試，證明 I F N τ 以劑量決定之方式降低 M F C 7 之增殖。使用 1 0 , 0 0 0 單位 / 毫升 I F N τ 者發現 ^3H - 胸腺嘧啶減少 5 0 % (實例 1 5 , 表 8) 。該細胞先前曾發現對抗一動情素處理不具反應。

使用 H L - 9 0 (人類前骨髓細胞血白病) 細胞經營 I F N τ 與 I F N α 之抗增殖作用的比較。使用前骨髓細胞白血病 H L - 6 0 之結果為這類 I F N τ 與人類 I F N α 比較所得結果的代表性 (實例 1 5) 。兩種 I F N 之濃度低至 1 0 0 單位 / 毫升仍可產生顯著的 (> 6 0 %) 之生長抑制作用。I F N 的量增加更可降低腫瘤細胞的增殖 (圖 4) 。高劑量的 I F N α , 而非 I F N τ , 有細胞毒性 (圖 5) 。細胞存活情形被 I F N α 降低約 8 0 % 。相反地，當 I F N τ 使用 1 0 , 0 0 0 單位 / 毫升時，近 1 0 0 % 經 I F N τ 處理的細胞仍然存活。因此，雖然兩種干擾素皆可抑制增殖，

(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)

但是只有 I F N τ 無細胞毒性。無毒性提供用於活體治療之 I F N τ 有此優點。

以 I F N τ 處理人類皮膚 T 細胞淋巴瘤，H U T 7 8，呈現與 H L - 6 0 類似的反應（實例 1 5，圖 9）。O v I F N τ 與 r H u I F N τ 皆降低 H U T 7 8 細胞之生長，而 I F N α 則被證實對細胞存活有不利的影響。

T 細胞淋巴瘤 H 9 比上述腫瘤細胞株對 I F N α 之抗增殖作用不敏感。雖然 I F N α 對 H 9 細胞無毒性，但所測試之任何濃度下的 I F N α 皆無法明顯抑制細胞分裂（實例 1 5，圖 1 0）。相反地，可見 I F N τ 減少約 6 0 % 之 H 9 生長。因此，只有 o I F N τ 是此類 T 細胞淋巴瘤之有效生長抑制劑。

對於其它三種腫瘤細胞株（N C I - H 4 6 0，D L D - 1 及 S K - M E L - 2 8），I F N τ 及 I F N α 同樣是有效的抗腫瘤劑。對於黑色素瘤，S K - M E L - 2 8，I F N α 造成的增殖抑制情形附帶 1 3 % 存活率的減少，然而 I F N τ 不具毒性。絕大多數被測試的腫瘤中，I F N τ 作為拮抗人類腫瘤之抗腫瘤劑的功效與 I F N α 相等或更佳。

I F N τ 具有拮抗人類腫瘤之抗增殖活性且無細胞毒性，其作用如人類 I F N α 一般強或更強。臨床試驗

I F N α 2 s 顯示其為有效之抗腫瘤劑（Dianzani, F., 1992; Krown, 1987）。I F N τ 作為治療物之一項治療

（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)

優點為其排除了使用高劑量 I F N α s 所發現的毒性作用。

I F N τ 之其他應用有拮抗如 Kaposi's 癌之類的腫瘤 (該癌與 H I V 感染有關)，其中 I F N τ 之抗腫瘤作用與 I F N τ 可抑制逆轉錄病毒生長之作用加在一起。

干擾素 - τ 療法之活動功效於小白鼠系統進行測試 (實例 16)。B 16 - F 10 是小白鼠可移植之先天腫瘤，選用此腫瘤是因為其具有肺部轉移之高度跡象 (Poste, et al., 1981)。導入此腫瘤細胞後 3 天，開始干擾素治療。活體投服 I F N τ 顯著降低 B 16 - F 10 肺部腫瘤。因此，I F N τ 顯然在活體外及活體內皆可作為有效的抗腫瘤劑。

III. 干擾素 - τ 多肽片段，蛋白質模型及蛋白質修飾

如本說明書教示之 I F N τ 活性的變化，其強度及缺令細胞毒性，顯示對此新穎的干擾素有結構／功能分析之重要性。負毒 O I F N τ 功能之結構基礎已被檢測，其係使用對應至完整 O v I F N τ 序列之 6 個重疊的合成肽 (圖 6)。衍自綿羊 I F N τ 序列之對應多肽如 S E Q I D N O : 15 至 S E Q I D N O : 20 所示。代表胺基酸 1 - 37，62 - 92 及 139 - 172 的 3 個肽已發現可抑制 I F N τ 之抗病毒活性 (實例 17)。該肽濃度為 300 μ m 及更高時，是有效的競爭者。

I F N τ 之 C - 終端肽，O v I F N τ (139 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (34)

1 7 2) , 及內部肽 O v I F N τ (6 2 - 9 2) , 能抑制 I F N τ 及 r B o I F N τ 之抗病毒活性至相同程度, 但是 N - 終端肽 O v I F N τ (1 - 3 7) 在抑制 O v I F N τ 之抗病毒活性上更有效。劑量 - 反應數據顯示 I F N τ (6 2 - 9 2) 及 I F N τ (1 3 9 - 1 7 2) 抑制 I F N τ 之抗病毒活性至相同程度。阻斷 I F N τ 抗病毒活性的上述肽亦可阻斷重組牛 I F N α (r B o I F N τ) 之抗病毒活性; 重組牛 I F N γ 不受此類肽的影響。這兩種 I F N τ 肽可代表 I F N τ 與多種 I F N α s 之共同受體結合區。

兩個合成肽 o I F N τ (1 - 3 7) 及 o I F N τ (1 3 9 - 1 7 2) 亦能阻斷 o I F N τ 之抗 - F I V 與抗 - H I V 活性 (實例 1 7 ; 圖 1 1 A 及 1 1 B) 。雖然這兩種肽皆阻斷 F I V 之 R T 活性, 但顯然只有 C - 終端肽, o I F N τ (1 3 9 - 1 7 2) , 可作為貓細胞株 (F c 9) 之水疱口炎病毒活性的有效抑制劑。

集合上述數據可知, I 型干擾素之 C - 終端區可結合至 I 型干擾素受體之共同位置, 而 N - 終端區可能涉及獨特功能之誘發。此結果顯示 I F N τ 干擾素分子之不同區可用於取代干擾素 α 分子之不同區。例如, 干擾素 α 分子中負責增強細胞毒性之區域, 相對於 I F N τ 處理, 可被鑑定, 其係藉由衍自 I F N τ 之多肽區取代干擾素 α 分子之區域。進行這類取代反應可利用合成基因 (見下文) 之操作, 該基因編碼經選定的 I F N τ 及干擾素 α 分子, 加

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (35)

上本文說明的功能性分析法 (例如 , 抗病毒 , 抗增殖及細胞毒性分析法) 。

拮抗 I F N τ 肽之多株抗 - 肽抗血清 , 亦得到如前所述之多肽抑制研究的類似結果。直接對抗相同三區域 (O v I F N τ (1 - 3 7) , I F N τ (6 2 - 9 2) 及 I F N τ (1 3 9 - 1 7 2)) 的抗體會阻斷 o I F N τ 之功能 , 證實了這三個區域在抗病活性上的重要性 (實例 1 7) 。雖然這些肽顯然可結合至干擾素受體 , 但其本身不會引起或參與細胞內之似干擾素作用。

I F N τ 之抗增殖活性 (實例 1 7 , 表 1 1) 包括此分子之另一區域 , 因為 I F N τ (1 1 9 - 1 5 0) 是 o I F N τ - 誘發之細胞增殖降低作用的最有效抑制劑。此結果顯示主要負責細胞生長抑制作用的分子區是 I F N τ (1 1 9 - 1 5 0) 區。I F N τ 分子之此區可單獨或融合至其它蛋白質 (例如干擾素 α) , 以作為抗腫瘤劑。

最後 , ^{125}I - O v I F N τ 對於 M D B K 細胞上其受體的結合情形可被阻斷 , 其利用拮抗 6 種肽中 4 種肽之抗血清 ; 此 4 個多肽代表 O v I F N τ 之胺基酸 1 - 3 7 , 6 2 - 9 2 , 1 1 9 - 1 5 0 及 1 3 9 - 1 7 2 。此結果反映出這些區域的多重結合區以及這些區域的功能性特徵。由於 I F N τ 之不同區域引發不同功能 , 選定胺基酸之修飾作用可能可產生具選擇性之生物活性的類 I F N τ 干擾素。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (36)

上述數據證明合成肽之鑑定，此合成肽具有

o I F N τ 蛋白質上四個不連續的位置，其涉及受體交互作用及生物活性。爲了要說明區域的結構上關連性，進行 I F N τ 之三度空間結構之模型構築。三度空間模型將可用於闡明現有數據及設計未來之結構／功能之研究。

將全長重組 O v I F N τ 之圓二色性 (circular dichroism, C D) 組合至 I F N β (已知三度空間構造之蛋白質 (Senda, et al., 1992))，則構築了 O v I F N τ 之模型。此模型最引人注意的特徵是，I F N τ 自然分類至具 4 個螺旋狀之束狀小區的一類蛋白質。I F N τ 之 C D 光譜獲自 A V I V 60 S 極光分光計 (spectropolarimeter)。使用 2 種不同方法進行三級構造之判斷，Perczel, et al., (1991) 之冰點測定法 (algorithm) 及 W.C. Johnson, Jr. (1992) 之可變選擇法。

光譜之二次結構判斷指出 70 - 75 % 之 α 螺旋 (以波長最小在 222 及 208 nm 及最大在 190 nm 鑑定)。可變選擇之冰點測定法判斷此分子的剩下部份是 20 % β 層及 10 % 轉折。Chang 法判斷剩下部份是 30 % 隨意的圈捲。I F N τ 及 I F N β 序列之點測定法呈現兩分子間之同源性，尤其是在 I F N β 之已知螺旋結構的區域。I F N τ 之序列分析亦發現推測螺旋區具有無極性之週期性，由四個螺旋之束狀小區表示。

做模型的最後步驟是將 I F N β 碳骨架之 I F N β

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (37)

x - 射線結晶像相等物應用在 I F N τ 序列。如上鑑定之 I F N τ 的官能活性區位在分子的一側且發現呈緊密的空間緊臨性。此結果與 I F N τ 之多重結合位置吻合，其與 I 型 I F N 受體同時交互反應。

三度空間模型化資料加上前述之功能資料，提供將序列變化導入 I F N τ 特定區之能力，以生成選定功能之增進（例如，抗病毒或抗細胞增殖）或將具選定功能之區域取代入其它干擾素分子（例如，抗病毒，抗腫瘤或降低細胞毒性）。

表現 O v I F N τ 之合成基因的構築記載於實例 3。簡言之，利用大腸桿菌之最佳密碼用法而反向轉譯保留的胺基酸序列。設計此序列以包含分佈構築體全長之 20 個不同的限制酶位置。此 540 個鹼基對之合成基因序列可分成 11 個寡核苷酸片段。合成各別片段，並將其單股或雙股殖入 p T Z 19 R，p T Z 18 R，或 P Bluescript，擴大及融合之。再將合成的 o I F N τ 構築體殖入經修飾之 p I N - III - o m p A 表現載體以於細菌內表現，亦殖入酵母菌表現載體。已設計出類似經構築的人類 I F N τ 合成基因（S E Q I D N O : 3），並已於酵母菌細胞內表現。

O v I F N τ 合成基因於酵母菌中表現（實例 4）可令重組 I F N τ 於啤酒釀母菌中過度生產：大量（100 毫克／公升）之重組 I F N τ 可自溶解之酵母菌萃取物純化，利用連續離子交換及分子篩濾層析。以此方式純化的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (38)

重組 I F N τ 具有類似天然 O v I F N τ 之強抗病毒活性 (2 至 3×10^8 單位 / 毫克) 。

合成之基因構築體有利於導入突變，以可能促進抗腫瘤 (抗細胞增殖) 及抗病毒活性。此外，負責不同功能之分子個別區域可進行不同功能之分別構作。舉例而言，已構築 2 種缺失突變種，O v I F N τ (1 - 1 5 5) 及 O v I F N τ (1 - 1 6 6)，以檢測 I F N τ 分子中羧基端序列的功用。

其它突變型 I F N τ 分子已被構築以鑑定嚴格負責抗增殖活性的殘基。舉例而言，特別殘基，T y r 1 2 3 在 I F N α 之抗細胞增殖活性上有關連 (McInnes, et al., 1989) 。

I F N τ 中，T y r 1 2 3 之相等物包含在肽 O v I F N τ (1 1 9 - 1 5 0)：此多肽抑制 O v I F N τ 與人類 I F N α 之抗增殖活性。將 T y r 1 2 3 轉換成保留取代 (T r p) 及非保留取代 (A s p) 的突變作用已產生，亦產生具有此殘基缺失之突變序列。編碼 T y r 1 2 3 之密碼位在 S s p I 位置內；此位置之剔除可用於篩檢。如本文所載，評估這些突變型 I F N τ 之抗增殖活性。

可製造合成肽，其相當於本發明之 I F N τ 多肽。合成肽可被商業合成或使用此技藝中的標準方法及儀器 (Applied Biosystems, Foster City CA) 製備。

易言之，編碼肽之寡核苷酸序列可利用寡核苷酸合成

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (39)

之標準方法直接合成，或者，若為大編碼序列時，利用一系列的選殖步驟合成，包括相當於編碼序列之多重寡核苷酸片酸的前後排列 (Crea; Yoshio et al.; Eaton et al.)。藉標準重組步驟可表現寡核苷酸之編碼序列 (Maniatis et al., Ausubel et al.)。

IV . 與干擾素 - τ 反應的抗體

含有被融合至穀胱甘肽 - S - 轉移酶 (Sj26) 蛋白質之本發明多肽抗原的融合蛋白質，利用 pGEX - GLI 載體系統，可於大腸桿菌 JM101 細胞中表現。此融合 Sj26 蛋白質可十分輕易地利用穀胱甘肽受質之親和性層析法單離出來 (Smith)。IFN τ 蛋白質之表現與部份純化描述於實例 20，且可應用在任何其它可溶性物質，包括由本發明所示序列編碼的多肽。

不溶性 GST (Sj26) 融合蛋白質可利用製備式凝膠電泳法純化。

或者，IFN τ - β - 半乳糖苷酶融合蛋白質可如實例 19 所載而予單離。

本發明亦包括表現載體，例如上述之 λ gt11 或 pGEX 載體，其含有 IFN τ 編碼序列及可令編碼區於適當宿主內表現之表現控制元件。此控制元件通常包括啓動子，轉譯起始密碼，轉譯及轉錄終止序列，及用於將嵌入物導入載體之嵌入位置。

編碼所欲多肽之 DNA 可被殖入任何載體 (如上所述

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (40)

), 以造成多肽於適當宿主系統中表現。這些重組多肽可被表現為融合蛋白質或天然蛋白質。許多特性可被安排在表現載體內, 例如, 引導序列, 其促使經表現序列被分泌至培養基中。重組製備的 I F N τ 及自其衍生的多肽通常是由經溶解的細胞或培養基單離而得。可利用此技藝習知之方法進行純化, 包括鹽類分級分離, 離子交換層析及親和性層析。亦可使用免疫親和性層析法, 其利用拮抗選定 I F N τ 抗原而生成的抗體。

本發明另一方面包括拮抗本發明多肽之特異抗體。通常欲製備抗體, 宿主動物, 例如兔子, 以經純化之抗原或融合蛋白質抗原免疫。混合型或融合型蛋白質可利用許多衍自其它蛋白質之編碼序列產製, 例如 β - 半乳糖苷酶或穀胱甘肽 - S - 轉移酶。於適當時間間隔後, 收集宿血清或血漿, 測試此血清之特異拮抗該抗原的抗體。實例 20 說明兔子血清抗體之製備, 該抗體能特異地拮抗 S j 26 / I F N τ 混合型蛋白質中之 I F N τ 抗原。這些技術可應用在所有的 I F N τ 分子及自其衍生之多肽。

可獲得經免疫動物之 γ - 球蛋白流份或 I g G 抗體, 舉例而言, 係利用飽合的硫酸銨或 DEAE Sephadex, 或習於此藝之士所知之製造多株抗體之技術。

純化蛋白質或融合蛋白質可用來產製單株抗體。由經選定多肽抗原免疫之動物取出胰臟或淋巴細胞, 並令其無限增殖 (immortalized), 或利用熟悉此藝之士習知的方法製備融合瘤 (Harlow, et al.)。可自周邊血液試樣單

(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)

離淋巴細胞。伊斯汀－巴爾病毒 (Epstein-Barr virus, E B V) 可用來使得人類淋巴細胞無限繁殖，或可使用融合參與者以製造融合瘤。

篩選由無限繁殖化細胞分泌的抗體，以測定分泌所欲特異性之抗體的純系，例如利用 E L I S A 或西方吸漬法 (Ausubel et al.) 。

多肽之抗原區通常相當小，傳統上是 7 至 10 個胺基酸之長度。更小片段已鑑定為抗原區。如上所載鑑定干擾素－ τ 之多肽抗原。製成之 D N A 編碼區域可被重組表現為融合蛋白質或單離的多肽。

此外，部份胺基酸序列可被便利地化學合成 (Applied Biosystems, Foster City CA)。由這些方法中任一者獲得的抗原可直接用於產製抗體或被偶合在適合載劑分子之上。許多這類載劑是此技藝中習知的且已被商品化 (例如，Pierce, Rockford IL) 。

與 I F N τ 反應的抗體是有用的，例如，用於分析結構／功能之關連性。

V . 用途

A . 繁殖方面

雖然根據結構及其有效抗病毒性特性，I F N τ 具有 I F N α 一族的某些相似性，但是 I F N α s 不具有 I F N τ 相關之繁殖上的特性。同樣地，重組牛 I F N γ 與 I F N τ 比較時，對於發情間期具極少或無作用 (Dav-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (42)

is, et al., 1992)。

因此，雖然 I F N τ 相對於其它干擾素有某些結構上的相似性，其具有本身之獨特性質：例如顯著影響動情週期之生化趨勢的能力。

本發明之人類 I F N τ 可用於助孕及延長雌性哺乳動物黃體生命期之方法中，如 Hansen et al 之總論，在此併予參考。人類 I F N τ 對於人類治療特別有用，因為使用如此一個相同物種的蛋白質較不可能有潛在之抗原反應。

B . 抗病毒特性

I F N τ 之抗病毒特性有廣泛的治療性應用，然無常與 I F N τ s 有關之毒性作用。雖然培養基有 I F N τ 的存在會抑制貓免疫不全病毒之逆轉錄酶活性（實例 11），此並非由於 I F N τ 對 F I V 的直接作用。更精確地說，I F N τ 顯然誘使宿主細胞產生對病毒之逆轉錄酶有抑制的因子。

發現 I F N τ 具有其抗病毒活性對細胞無不利作用：無發現細胞毒性作用是由於服用 I F N τ 之證據。

I F N τ 缺乏細胞毒性使得 I F N τ 作為活體治療劑極具價值。缺乏細胞毒性使得 I F N τ 可與絕大多數其它習知抗病毒劑及所有其它習知的干擾素區隔出來。

含有本發明 I F N τ 化合物之配方可用來抑制病毒複製。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (43)

C . 抗細胞增殖特性

I F N τ 呈現有效的抗細胞活性。I F N τ 亦可用於抑制細胞生長且無目前已知之其它干擾素相關的不良副作用。含有本發明之 I F N τ 化合物之配方可用來抑制，預防或減緩腫瘤的生長。

某些腫瘤的發育決定於動情素的調節。用於支持本發明之實驗顯示 I F N τ 可抑制動情素結合至其受體。因此，I F N τ 可用來治療或預防依賴動情素的腫瘤。

D . 干擾素結合至受體的干擾

I F N τ 顯示與受體分子上的數個位置有交互反應，且這些區域單獨或組合會對 I F N τ 之個別功能有不同的影響。

本發明多肽對於干擾素結合至干擾素受體之選擇性抑制作用有效。詳言之，如本文所載，某些揭示之多肽會選擇性地抑制 I F N τ 之抗病毒活性，而其它多肽抑制抗增殖活性。這些肽的組合可用來抑制兩種活性。除了結合至干擾素受體及阻斷 I F N τ 活性的益處之外，這些肽本身不引起抗病毒或抗增殖活性。

因此，這類多肽可用來作為免疫調節分子，當需要預防由干擾素分子引發之免疫反應時。這些肽可用來作為免疫抑制劑，舉例而言，用於預防對抗組織移植物之干擾素調節的免疫反應。其它由干擾素調節的免疫反應亦可被阻斷，例如 α 干擾素之細胞毒性作用。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (44)

E . 藥學組成物

根據習知方法，I F N τ 蛋白質可被調配以製備藥學上有效的組成物。含有干擾素或類干擾素之化合物的配方早有記載（例如，Martin, 1976）。大致上，本發明之組成物將調配為有效劑量的 I F N τ 與合適劑結合，以利於該組成物之有效服用。

用於這些療法的組成物亦可呈現多種型式。舉例而言，包括錠片，藥丸，藥粉，液態溶液或懸浮液，脂性小體，栓劑，注射用及灌流用之溶液。較佳形式決定於意欲的投服及治療應用的方式。此組成物較好亦包括習知之藥學上可接受的載劑及佐劑，其為熟悉此藝之士所習知的。較好，本發明的組成物為單位劑量形式且可經常施用至病患，每日一次或一次以上。

I F N τ 或相關多肽可以任何藥學上可接受之劑型施用至病患，包括靜脈內，肌內，病變處內，或皮下注射。更精確的說，用於其它干擾素化合物之組成物及方法可用來輸送這些化合物。

本發明化合物之一項主要優點是 I F N τ 蛋白質之極低細胞毒性。因為這種低細胞毒性，I F N τ 有可能以大於其它干擾素化合物（例如，I F N α ）一般使用的濃度來施用。因此，施用 I F N τ 之速率可自約 5×10^4 至 20×10^6 單位／日提高至 500×10^6 單位／日或更高。於一較佳的具體實例，劑量約為 10^6 單位／日。高劑量較好用於全身注射。當然，應體認本發明組成物及

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

五、發明說明 (45)

方法可與其它療法組合使用。

一旦發生病患情況有改善，若有必要，施用維持劑量。然後，用藥劑量或頻率或兩者可減低至經改善狀況可被維持的水平，以症狀為參數。當症狀已減輕至所欲水平時，應終止治療。然而病患可能需要基於任何病症復發之間歇性治療。

本發明組成物可經由標準步驟施用，以治療多種癌症及病毒性疾病，包括先前其它干擾素已顯示具有活性的疾病。舉例而言，參見 Finter et al. (1991); Dianzani, et al. (1992); Francis, et al. (1992) 及美國專利案第 4,885,166 及 4,975,276 號。然而如上所述，本發明組成物具有獨特性質及優點，包括其治療這些病症且不具毒性之能力。

F . 皮膚失調之治療

皮膚失調可於病變處內使用 IFN τ 處理，其中配方及劑量將根據施用方法及欲治療之病變處的範圍大小及嚴重性。較佳方法包括皮內及皮下注射。可多次注射至大病變區，單一病患皮膚上的數個病變處可同時處理。施藥計劃可由熟悉此藝之士決定。設計為維持性釋放的配方可減少施藥的頻率。

G . 全身性治療

全身性療法基本上與所有應用一致。可多次靜脈內或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (46)

皮下施藥，且於治療用之可植入的方法中，設計為維持釋放的配方特別有用。亦可使用植入式皮下輸藥器，貯藥器，或幫浦來處理病患。

H . 局部治療

使用本發明 I F N τ 多肽之局部療法對於治療特定器官內的腫瘤有效。治療可併用動脈內輸液。導管可被手術式或血管式植入，以直接治療受害器官。皮下輸液器連接至導管可用於慢性治療，或者可植入式，可再充填式的幫浦亦可使用。

本發明其它具體實例乃 I F N τ 蛋白質作為天然殺手 (N K) 細胞之活化劑的用途。

下列實例係用於說明本發明，絕非用來限定本發明。

材料和方法

限制核酸內切酶，T 4 D N A 接合酶，T 4 多核苷酸激酶，T a q D N A 聚合酶，及小牛腸磷酸酶乃購自 New England Biolabs (Beverly, MA) Promega Biotech (Madison, WI) : 這些試劑根據製造廠商之指示使用。進行定序反應，使用 "SEQUENASE D N A II" 定序套組 (United States Biochemical Corporation, Cleveland OH) 。免疫吸漬法及其它試劑購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) 或 Fisher Scientific (Needham, MA) 。硝化纖維濾紙購自 Schleicher and Schuell (Keene, NH)

(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)

。

合成之寡核苷酸連接子與引子係使用商品化之自動式寡核苷酸合成儀製備 (例如, ABI 380B-02 型之 DNA 合成儀 (Applied Biosystems, Foster City, CA))。或者, 可購買由客戶設計的合成型寡核苷酸, 例如, 購自 Synthetic Genetics 廠 (San Diego, CA)。

c DNA 合成試劑與隨意引導之標記套組可購自 Boehringer-Mannheim Biochemical (BMB, Indianapolis, IN)。

。

編碼多肽之寡核苷酸可利用寡核苷酸合成標準法直接合成, 或者, 當其為大的編碼序列時, 藉由一系列選殖步驟來合成, 包括相對於編碼序列之多重寡核苷酸片段的前後排列 (Crea; Yoshio et al.; Eaton et al.)。寡核苷酸編碼序列可根據標準重組步驟而予表現 (Maniatis et al.; Ausubel et al.)。

或者, 根據活體外技術直接合成肽 (Applied Biosystems, Foster City CA)。

根據標準法進行涉及多株及單株抗體操作之一般運作, 包括自血清純化抗體 (Harlow et al.)。Pierce 廠 (Rockford, IL) 是許多抗體試劑之供應處。

重組人類 IFN α (rHuIFN τ) 及 rBoIFN τ 購自 Genentech Inc. (South San Francisco, CA)。重組人類 IFN α 之參考製劑 (rHuIFN τ) 得自國家衛生處 (NIH)：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (48)

r H u I F N τ 可自 Lee Biomolecular 購得 (San Diego, CA)。

所有組織培養基，血清及用於本發明之 I F N s 不含內毒素，係根據使用敏感量為 0 . 0 7 n g / m l 之 Limulus 阿米巴樣細胞溶解物 (洽詢 Cape Cod, Woods Hole, MA) 之分析法測定。

用於測定抗體之一段 E L I S A 步驟

令聚苯乙烯 9 6 孔洞測試盤 Immulor II (P G C) 塗覆含有 5 微克 / 毫升抗原 (每孔洞 1 0 0 微升) 之 0 . 1 M 的碳酸鹽 / 重碳酸鹽緩衝液，p H 9 . 5 。以保鮮膜封盤並置於 4 °C 一夜。

抽取盤內液並使用 3 0 0 微升之 1 0 % N G S 阻斷 (block)，且於 3 7 °C 靜置 1 小時。

以 P B S 0 . 5 % " T W E E N - 2 0 " 洗滌試盤 5 次。

抗血清稀釋於 0 . 1 M P B S，p H 7 . 2 。將抗血清 (0 . 1 毫升) 之所欲稀釋液加入每一孔洞，並靜置試盤於 3 7 °C，1 小時。再以 P B S 0 . 5 % " T W E E N - 2 0 " 洗滌試盤 5 次。

將經辣菜過氧化酶 (H R P) 共軛之山羊抗人類血清 (Cappel) 稀釋 1 / 5 0 0 0 於 P B S 。令 0 . 1 毫升該溶液加至每一孔洞。靜置試盤於 3 7 °C，歷 3 0 分鐘，再以 P B S 洗滌 5 次。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (49)

添加至試盤前才製備 Sigma ABTS (受質) 。

此試劑由 50 毫升之 0.05 M 檸檬酸，pH 4.2，0.078 毫升之 30% 過氧化氫溶液及 15 毫克 ABTS 組成。將 0.1 毫升受質加入每一孔洞，再靜置 30 分鐘於室溫中，以添加 0.05 毫升之 5% SDS (w / v) 終止反應。測定 410 nm 之相對吸光度。

實例 1

IFN τ 之繁殖上功用及抗病毒活性

測定干擾素 - τ 對於黃體生命期之作用。

以表 1 所示濃度的 IFN τ 灌注入綿羊黃體。以相似濃度灌注重組人類 IFN α (rHuIFN τ)。此外，亦包括未受處理的對照組動物。評估黃體之生命期係根據發情間期之測定，黃體酮分泌之維持，及前列腺素分泌之抑制 (Hanson, et al.)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (50)

表 1

干擾素對繁殖生理之作用

干 擾 素	處 理	發 情 間 期 (天 數)
對 照 組	—	17.3
r H u I F N τ	100 微 克 / 天	16.0
	200 微 克 / 天	16.0
	2000 微 克 / 天	19.0
O v I F N τ	100 微 克 / 天	27.2

對照組動物與接受 O v I F N τ 之動物的發期間期比較，證明當 I F N τ 投用 1 0 0 微克 / 天時，間期有顯著延長。另一方面，對照組動物與接受重組人類 I F N α 之動物的發情間期比較，證明 r H u I F N τ 具無意義的作用。

這些結果顯示干擾素 - τ 具有顯著影響動情週期之生化趨勢的能力。

實 例 2

干擾素 - τ 在繁殖週期不同階段上的抗病毒特性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (51)

建立胚體培養物，其利用得自動情週期第 1 2 至 1 6 日之綿羊。使用細胞病變作用分析法評估得自每一胚體培養物上清液之抗病毒活性 (Familett, et al., 1981) 。簡言之，將 I F N τ 或其它 I F N s 之稀釋物與 Madin-Darby 牛腎細胞 (M D B K) 培養 1 6 - 1 8 小時於 3 7 $^{\circ}$ C 。培養後，於細胞病變作用分析法中測定病毒複製之抑制情形，其使用水疱性口炎病毒 (V S V) 作為攻毒病毒。

相對於被 V S V 感染之未治療的 M D B K 細胞 (對照組試盤) ，一個抗病毒單位造成單層細胞之破壞 5 0 % 進一步評估特異活性，其使用正常綿羊之纖維母細胞 (Shnf) 於斑抑制法 (Langford, et al., 1981) 。測定每一時間點上之三組試樣的最低值，每一試樣重複三次分析。示於表 2 的結果以平均值單位 / 毫升表示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (52)

表 2

胚體培養物，尿酸液及羊膜腔液之 I F N τ 抗病毒活性

	日 數	試 樣	單 位 / 毫 升
胚 體 培 養 物	10	9	<3
	12	5	34
	13	6	4.5×10^3
	14	3	7.7×10^3
	16	12	2.0×10^6
尿 酸 液	60	3	1.4×10^3
	100	4	11
	140	3	<3
羊 膜 腔 液	60	3	22
	100	4	<3

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 (53)

培養上清液有逐漸增加的抗病毒活性，其與胚體之發育漸進有關（表 2）。

實例 3

I F N τ 於細菌內表現

將 O v I F N τ 之胺基酸編碼序列（Imakawa, et al., 1987）用來生成具有於大腸桿菌可達最佳表現之密碼用法的對應 D N A 編碼序列。將連接子序列加至 5' 及 3' 端，以刊於細菌表現載體之選殖。設計此核苷酸序列以包含分佈整個編碼序列之 19 個不同的限制酶位置（圖 1）。

將此核苷酸序列分子大小範圍在 33 至 75 個鹼基對的 11 個寡核苷酸片段。11 個寡核苷酸片段皆由 280-B 雙管柱之 D N A 合成儀（Applied Biosystems）合成，且將其單股或雙股殖入下列載體之一：pBLUESCRIPT⁺（KS）[™]（Stratagene, LaJolla, CA），pTZ18R（Pharmacia, Piscataway, NJ），或 pTZ19R（Pharmacia, Piscataway, NJ）選殖載體。

令載體轉形大腸桿菌 K 株 "X L 1 - B L U E"（
r e c A 1 e n d A 1 g y r A 9 6 t h i
h s d R 1 7（r_K⁻，m_K⁺）s u p E 4 4 r e l A 1
 λ -（l a c），{ F'，p r o A B，
l a c^qZ Δ M 1 5，T n 1 0（t e t^R）}），其係購自
Stratagene 廠（LaJolla, CA）。令經轉形細胞生長在添

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (54)

加安比西林 (Ampicillin) (150 微克 / 毫升) 之 L 肉汁。寡核苷酸之選殖及融合係利用標準重組 DNA 技術進行。

以適當限制酶切割選殖載體以利嵌入合成之寡核苷酸。以小牛腸鹼性磷酸酶 (CIP) 處理載體以除去終端之磷酸根。磷酸化寡核苷酸且以單股或雙股分子型式殖入適合載體，其利用 T4 DNA 接合酶。當單股型式被殖入選殖載體時，使用 DNA 聚合酶及所有 4 種去氧核糖核苷酸來完成第二股。

爲了要進行雙股選殖，首先將寡核苷酸與其合成之互補股黏合，然後接合至選殖載體。再將大腸桿菌 K12 之 SB221 株或 NM522 株轉形，並利用接合反應。當涉及甲基化反應敏感之 StuI 及 ClaI 限制酶位置時，使用大腸桿菌 GM119 株進行選殖。選殖過程的每一階段，進行經單離 DNA 之限制酶分析。

將經選殖之寡核苷酸融入單一多核苷酸，係利用圖 2 標明之限制酶水解及接合。含有寡核苷酸的片段通常在低熔點瓊脂糖凝膠上進行電泳式分子大小分級分離之後被單離出來 (Maniatis, et al.; Sambrook, et al.; Ausubel, et al.)。製得的 IFN τ 多核苷酸編碼序列分佈在位置 16 至 531：具 172 個胺基酸之編碼序列。

最後的多核苷酸之核苷酸序列係根據 DNA 定序予以證實，其使用二去氧鏈終止法。

將全長的 StuI / SstI 片段 (540 個鹼基對

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (55)

；圖 2) 殖入經修飾的 p I N III o m p - A 表現載體且將其轉形至大腸桿菌之勝任 S B 2 2 1 株。為達 I F N τ 蛋白質表現之目的，令具有表現載體的細胞生長在含安比西林之 L - 肉汁中，達 O D (5 5 0 n m) 為 0 . 1 至 1，使用 I P T G 誘發 3 小時且藉離心法收集產物。可溶性重組 I F N τ 自細胞釋出，係使用超音波或滲透式分級分離。

實例 4

I F N τ 於酵母菌中表現

實例 3 合成之合成型 I F N τ 基因在其 5 ' 端緊接 S t u I 限制酶位置且在 3 ' 端緊接 S a c I 限制酶位置。

A . 合成型 I F N τ 基因之單離

2 個寡核苷酸引子 (S E Q I D N O : 1 3 及 S E Q I D N O : 1 4) 被用來將連接子附著至合成型 I F N τ 基因，其使用聚合酶連錄反應。位在 5 ' 端之連接子使得合成型 I F N τ 基因之安置呈現酵母菌選殖載體 p B S 2 4 U b 內存在的冷醯素編碼序列之正確譯讀。此連接子亦構築泛醯素 - I F N τ 連接區，其於活體內可使得泛醯素序列與 I F N τ 序列分離。5 ' 寡核苷酸亦編碼 S a c II 限制核酸內切酶切割位置。3 ' 寡核苷酸含有 S t u I 切割位置。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (56)

根據鹼水解法，自大楊桿菌“X L I - B L U E”株單離具有合成 I F N τ 基因之載體（實例 3）。經單離的載體稀釋 500 倍於 10 mM T r i s，p H 8.0 / 1 mM E D T A / 10 mM N a C l。P C R 反應於 100 微升體積中進行，其使用 T a q D N A 聚合酶及引子 S E Q I D N O : 12 / S E Q I D N O : 13。經擴大產物以 S t u I 及 S a c II 水解。將這些經水解的片段接合至“pBLUESCRIPT⁺ (KS)”之 S a c II 與 S m a I 位置。

產生的質體命名為 p B S Y - I F N τ 。此 D N A 序列利用雙股 D N A 作為模板而被確認。

B. 表現質體之構築

使用 S a c II 及 E c o R V 水解質體 p B S Y - I F N τ ，並單離含有合成 I F N τ 基因之片段。以 S a l I 水解酵母菌表現載體 p B S 24 U b (Sabin, et al.; Ecker, et al.)。使 T4 D N A 聚合酶以生成鈍端。使用酚萃取載體 D N A 並以乙醇沈澱 (Sambrook, et al., 1989)。經回收之直線狀質體以 S a c III 水解，藉瓊脂糖凝膠電泳純化並將其接合至由 p B S Y - I F N τ 單離的 S a c II - E c o R V 片段上。所生成的重組質體命名為 p B S 24 U b - I F N τ 。

令重組質體 p B S 24 U b - I F N τ 轉形大腸桿菌。單離含有 I F N τ 嵌入物之重組純系並藉由限制酶分析

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (57)

法鑑定之。源自含有 I F N τ 編碼序列之純化系的質體 D N A 係用於啤酒釀母菌之轉形作用 (Rothstein, 1986)。將轉形混合物塗佈在不含尿嘧啶之培養基上且於 30 °C 培養 3 - 5 天。再將菌落劃痕且維持在無尿嘧啶及白氨酸之培養基 (Rothstein, 1986)。

C . 表現試驗

爲了進行小規模的表現，自不含尿嘧啶及白氨酸之培養盤，挑出含有 p B S 2 4 U b - I F N τ 之啤酒釀母菌 A B 1 1 6 的單一個菌落，且令其生長於 30 °C 之 Y E P 培養基中 (1 % 酵母菌萃取物，2 % 朊)，誘發狀態時，其含有 1 % 葡萄糖，或者在非誘發狀態時，其含有 8 % 葡萄糖。回收細胞溶解物並用於 S D S - P A G E，凝膠含 15 % 聚丙烯醯胺，0.4 % 雙聚聚丙烯醯胺 (Sambrook, et al., 1989)。經分級分離的蛋白質藉考馬斯藍染色法顯現爲可見的。

藉使用拮抗綿羊 I F N τ 之多株抗血清之免疫吸漬法，將重組 I F N τ 特異地顯見在經分級分離之細胞萃取物電轉移的 "NYTRAN" 紙上 (Rothstein, 1986)。

爲了進行大規模的表現，令 p B S 2 4 U b - I F N τ 生長 24 小時於 30 °C，含 8 % 葡萄糖之 5 X 尿嘧啶及不含白氨酸之培養基中。再將此培養物稀釋 100 倍於含 8 % 葡萄糖之 Y E P 培養基中。再將此培養物稀釋 100 倍於含 1 % 葡萄糖之 Y E P 培養基中，再培養 24

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (58)

— 3 6 小時。

藉離心集細胞，於 5 0 m M T r i s , p H 7 . 6 / 1 m M E D T A 中洗滌且懸浮在含 1 m M P M S F 之洗滌緩衝液中。利用珠子撞擊器 (Biospec Products, Bartlesville, OK) 溶解細胞。令溶解物旋轉離心 4 3 , 0 0 0 × g , 歷 2 0 分鐘。回收懸浮液部份且用於進行如下所述之純化過程。

D . 源自酵母菌細胞溶解物之 r - I F N τ 的純化

將懸浮液饋至 1 × 1 0 公分之 D E A E 管柱上，以 1 0 m M T r i s , p H 8 . 0 清洗。停駐的蛋白質以 3 0 0 毫升，0 至 0 . 5 M N a C l 梯度之 1 0 m M T r i s , p H 8 . 0 溶離。收集 3 毫升流份。令含有重組體 (r - I F N τ) 之流份 1 7 - 2 6 的 1 0 微升試樣，進行於 1 5 % S D S - 聚丙烯醯胺凝膠上之電泳分離並以考馬氏藍染色法顯見蛋白質。

混合含 r - I F N τ 之純純化的流份且藉放射免疫法定量 r - I F N (Vallet, et al., 1988)。利用 Lowry 蛋白質法測定總蛋白質濃度 (Lowry, et al., 1951)。

經純化之 r - I F N τ 的微量定序證明首 1 5 個胺基酸與天然 I F N τ 相同，證實泛醯素 / r - I F N τ 融合蛋白質在活體內被正確地處理。

經純化之 r - I F N τ 呈現每毫克蛋白質具有 2 至 3 × 1 0 ⁸ 個單位之抗病毒活性 (n = 3 次重複試盤)，此

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (59)

類似於由適用胚體之培養基純化之 I F N τ 的抗病毒活性 (2×10^8 單位 / 毫克) 。

實例 5

人類高分子量 D N A 之南方吸漬分析

收集源自健康捐血者之人類靜脈血試樣於經肝素處理的試管中並單離周邊血液淋巴球，其藉使用 Ficoll-Isopaque 梯度 (1.077 毫克 / 毫升) (Sigma Chemical Co.) 之密度梯度離心法。高分子量 (H M W) 之 D N A 單離自這些細胞 (Sambrook, et al., 1989) 。

使用限制核酸內切酶 H i n d III P s t I (Promega) 水解 2 份 10 微克之 H M W D N A 試樣，於 37°C 歷 2 小時，再令 D N A 片段電泳分離於 0.8% 瓊脂糖凝膠 (Bio-Rad, Richmond, CA)，於 75 伏特歷 8 小時。令 D N A 片段轉移至尼龍膜上 (IBI-International Biotechnologies, Inc., New Haven, CT)。烘烤膜於 80°C 歷 2 小時且靜置於 42°C 之如下預雜交溶液中，歷 4 小時： $5 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$ 為 0.15M N a C l 及 0.15M 檸檬酸鈉)， 50% 體積 / 體積之甲醯胺， 0.6% (重量 / 體積) S D S， 0.5% (重量 / 體積) 脫脂奶粉， 20mM T r i s - H C l (p H 7.5)， 4mM E D T A，及 0.5 毫克 / 毫升單股之鯊精子 D N A (Promega)。

再將濾紙靜置於雜交溶液中，於 42°C 歷 18 小時，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (60)

雜交溶液包括：5 × S S C (1 × S S C 是 0 . 1 5 M N a C l 及 0 . 1 5 M 檸檬酸鈉)，2 0 % 體積 / 體積甲醯胺，0 . 6 % (重量 / 體積) S D S，0 . 5 % (重量 / 體積) 脫脂奶粉，2 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 5)，4 m M E D T A，及 2×10^8 c p m / 毫升 ^{32}P - 標記之 O v I F N τ c D N A (Imakawa, et al., 1987)。洗滌濾紙於 4 2 °C 歷 1 5 分鐘，使用 2 × S S C 及 0 . 1 % (重量 / 體積) S D S，並將濾紙置於 X - 射線底片上 (X A R，Eastman Kodak, Rochester, NY)，於 - 8 0 °C 曝光 4 8 小時，併用增強感光幕。

自動放射顯影結果顯示一雜交訊號，其位於經 P s t I 水解之 D N A 的 3 . 4 鹼基對處及經 H i n d III 水解之 D N A 的較小片段 ($\approx 3 . 0$ 鹼基對)。這些結果顯示有互補 O v I F N τ c D N A 探針之人類序列的存在。

實例 6

利用 P C R 單離人類 I F N τ c D N A 之部份序列

合成 2 個合成寡核苷酸 (每一個具 2 5 個核苷酸)，其分別對應至 O v I F N τ c D N A 之序列 2 3 1 至 2 5 5 (包含在 S E Q I D N O : 1 3) 及序列 5 6 6 至 5 9 0 (包含在 S E Q I D N O : 1 4) (相對於 c a p 位置之編號，Imakawa, et al., 1987)。這些引子分別含有限制核酸內切酶 P s t I 及 E c o R I

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (61)

之切割位置。S E Q I D N O : 1 4 被修飾以含有 E c o R I 位置，其由位置 5 6 9 開始。

自下列兩種近 1×10^5 個斑形成單位 (p f u) 之 c D N A 庫單離 D N A : 人類足孕胎盤 (Clontech, Inc., Palo Alto, CA) 及人類足孕滋養葉胚層 (Dr. J.F. Strauss, 賓州大學, Philadelphia PA) 。將該 D N A 用於聚合酶鏈鎖反應 (P C R) 擴大法 (Mullis; Mullis, et al.; Pekin Elmer Cetus Corp. Norwalk CT) 。擴大反應進行 3 0 次循環 (4 5 °C , 1 分鐘 ; 7 2 °C , 2 分鐘 ; 9 4 °C , 1 分鐘) (溫度循環器及試劑, Perkin Elmer Cetus) , 其使用引子 S E Q I D N O : 1 2 / S E Q I D N O : 1 3 。

令擴大產物以電泳分離 (1 0 0 伏特, 於 1 . 5 % 瓊脂糖凝膠 (B i o - R a d) 且將其轉移至尼龍膜上 (I B I)) 。令該膜於 8 0 °C 烘烤 2 小時如上所述與 ^{32}P - 標記之 O v I F N τ c D N A 預雜交及雜交。於 $5 \times$ S C C / 0 . 1 % (重量 / 體積) S D S 中洗滌該膜 5 分鐘, 於 4 2 °C , 及以 $2 \times$ S S C / 0 . 1 % (重量 / 體積) S D S 洗滌 2 分鐘, 於 4 2 °C 。再於 - 8 0 °C 曝光至 " X A R " (Eastman Kodak) 之 X - 射線底片, 歷 2 4 小時, 併用增強感光幕。測定雜交至經標記之探針 D N A 的擴大產物。

如上所述再次進行 P C R 。以限制核酸內切酶 E c o R I 及 P s t I (Promega) 水解經擴大的產物,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (62)

於 37 °C 歷 90 分鐘。如上所述將生成的 DNA 片段電泳分離且將含有 IFN τ 擴大產物之帶自凝膠切出。利用電離法回收 DNA 片段，將其再次選殖至經 EcoRI / PstI 水解之去磷酸化的質體 pUC19 中並藉氯化鈣法 (Sambrook, et al., 1989) 轉形至大腸桿菌

JM101 株 (Promega)。單離質體且使用二去氧終止法將經嵌入之擴大產物定序 (Sanger, et al., 1977;

"SEQUENASE" 反應劑, United States Biochemical, Cleveland, OH)。測定核苷酸序列且這些序列及推定的胺基酸序列與其它 IFN 序列之比較係利用 DNA Star 軟體 (Madison, WI)。

這些純系之序列比較顯示有三種不同純系：源自人類胎盤庫，即純系 15 (306 個鹼基對) 及純系 21 (315 個鹼基對)，這 2 個純系嵌入物之核苷酸序列有 95% 同源性；或源自滋養葉胞層庫純系 CTB 35 (301 個鹼基對)，此純系相對於純系 15 及純系 21 分別有 95% 及 98% 之同源性。

實例 7

全長人類 IFN τ 基因之單離

以限制核酸內切酶 EcoRI 水解 10 毫克之 PBMC HMW DNA 且令其進行於 0.8% 瓊脂糖凝膠上之電泳分離。將含有分子大小介於 1.5 至 10 仟鹼基對之間的 DNA 片段之一系列試樣 (例如 1.5 至

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (63)

2 . 5 仟 鹼 基 對 , 2 . 5 至 3 鹼 基 對) , 自 凝 膠 切 出 。 將 這些 D N A 電 溶 離 及 純 化 。 如 上 所 述 , 使 用 O v I F N τ 引 子 擴 大 每 一 個 D N A 試 樣 。 將 產 生 正 P C R 訊 號 之 任 何 試 樣 的 D N A 分 子 殖 入 λ g t 1 1 (次 基 因 組 λ g t 1 1 庫) 。

A . 含有互補於 O v I F N τ 之序列之純系的 P C R 鑑定

再 將 λ g t 1 1 塗 覆 以 形 成 噬 菌 斑 , 並 使 用 ^{32} P - 標 記 之 O v I F N τ c D N A 探 針 進 行 噬 菌 斑 掀 起 雜 交 法 。 近 2 0 個 雜 交 至 探 針 的 純 系 被 鑑 定 。

雜 交 至 探 針 的 噬 菌 斑 進 一 步 以 P C R 分 析 , 其 使 用 如 上 所 述 之 O v I F N τ 引 子 。 將 產 生 P C R 訊 號 的 6 個 噬 菌 斑 純 化 。 單 離 源 自 這 些 純 系 之 噬 菌 體 D N A 並 以 E c o R I 限 制 核 酸 內 切 酶 水 解 之 。 將 D N A 嵌 入 物 再 次 選 殖 至 p U C 1 9 載 體 中 且 根 據 二 去 氧 核 苷 酸 定 序 法 測 定 其 核 苷 酸 序 列 。

B . 含有互補至 P C R - 正反應之噬菌斑的純系之雜交鑑定法

令 源 自 λ g t 1 1 次 基 因 組 庫 之 重 組 噬 菌 體 增 殖 於 大 腸 桿 菌 Y 1 0 8 0 , 並 以 約 2 0 , 0 0 0 噬 菌 斑 / 1 5 0 毫 米 培 養 皿 之 密 度 塗 覆 大 腸 桿 菌 Y 1 0 9 0 。 於 培 養 皿 上 方 置 放 複 印 用 之 硝 化 纖 維 膜 , 其 再 與 ^{32} P - 標 記 之 探 針 雜 交 , 該 探 針 係 源 自 上 述 單 離 之 6 個 人 類 I F N τ

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (64)

c D N A 純系。產生正雜交訊號之三個純系進一步篩選及純化。單離噬菌體 D N A，以 E c o R I 水解，再次選殖至 p U C 1 9 載體中且定序之。這三個純系得到相對至 c a p 位置之超過 8 0 0 個鹼基的序列資料（純系以正反兩方向序列）。核苷酸序列資料如 S E Q I D N O : 1 1 所示且推測之蛋白質編碼序列如 S E Q I D N O : 1 2 所示。此基因之推測成熟蛋白質序列（S E Q I D N O : 1 2）相對於 O v I F N τ 之推測蛋白質序列的比較示於圖 3。

實例 8

藉 R T - P C R 分析 H u I F N τ m R N A 之存在

利用如上所述之 O v I F N τ c D N A 探針的雜交法，分析由第 1 5 - 1 6 天胚體所構築的人類胎盤 c D N A 庫及綿羊 c D N A 庫。令 c D N A 於瓊脂糖凝膠上進行分子大小之分級分離且將其轉移至濾紙（Maniatis, et al.; Sambrook, et al.）。使用 O v I F N τ 探針之南方吸漬分析顯示源自人類 c D N A 庫之自動放射顯影的訊號是利用 O v I F N τ 。c D N A 庫所得訊號的約 1 / 1 0 0。

分析人類是孕胎盤及羊膜細胞（2 6 週，2 百萬個細胞）之 H u I F N τ m R N A 的存在，其利用逆轉錄酶 - P C R（R T - P C R）法（Clontech Laboratories, Palo Alto CA）。將單離自人類胎盤，羊膜細胞及綿羊胚

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (65)

體單離之總細胞 R N A (t c R N A) 反式轉錄，其使用引子 S E Q I D N O : 1 3 。再將引子 S E Q I D N O : 1 2 加入反應物且進行聚合酶鏈鎖反應達 4 0 次循環。令 P C R 產物於瓊脂糖凝膠上進行分子大小分級分離並將其轉移至濾紙上。使用 ^{32}P - 標記之 O v I F N τ 及 H u I F N τ c D N A s 雜交濾紙上的 D N A 。這些分析的結果證明人類 I F N τ m R N A 存在於胚期胎盤之附屬部份。羊膜細胞亦表現對應至 O v I F N τ 引子及人類引子的訊號。

此外，爲了偵測 H u I F N τ 之存在，應用 R T - P C R 分析法至由成人淋巴細胞單離之 t c R N A 。光密度分析結果顯示，I F N τ m R N A 顯然存在淋巴細胞中。

實例 9

定位雜交法 (In Situ Hybridization)

A . 組織

檢測半連續 5 - μ 厚之經石蠟包埋之切片的玻璃片，其得自 4 組健康，不同之足孕及首三個月之人類胎盤。

B . c R N A 探針之製備

由單離自 O v I F N τ 擴大庫的 c D N A 純系中，再次選殖對應至 O v I F N τ c D N A 鹼基 # 7 7 - 7 3 6 的片段至轉錄載體，p B S (New England Biola-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (66)

bs) (鹼基 # 1 是 c a p 位置 ; O v I F N τ c D N A 之間放讀譯架構是鹼基 # 8 1 - 6 6 5 ; 圖 7) 。單離得數個 p B S 純系 , 再次選殖 , 且定序其核苷酸。由此純系 , 使用限制核酸內切酶 N λ a IV 及 E c o R I 切出 3 ' 片段 (鹼基 # 4 2 5 - 7 3 6) 且將其再次殖入轉錄載體 p B S 。此載體命名為 p B S / O v I F N τ 。

將 p B S / O v I F N τ 質體直線化後 , 藉活體外轉錄法合成反意 (Antisense) c R N A 探針 (Sambrook, et al., 1989) , 其使用 T γ R N A 聚合酶 (stratagene) 。將微量 ^3H - C T P (N E N - Dupont, Cambridge, MA) 用於轉錄反應。使用 digoxigenin 標記之 d U T P (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) 被攝入 c R N A 且經由 T C A 沈澱法及閃爍計數法測定產物量。

C . 雜交反應

根據 Lawrence, et al. (1985) 所載 , 進行使用反意 R N A 探針之定位雜交法 , 其中有如下的更改處。令經去石蠟及含水之切片於室溫下預先水合化 1 0 分鐘 , 於含有 5 m M M g C l $_2$ 之經磷酸鹽緩衝之生理食鹽水 (P B S) 。令切片中的核酸於 6 5 $^{\circ}\text{C}$ 變性 1 0 分鐘 , 於 5 0 % 甲醯胺 / 2 $\times$ S S C (1 $\times$ S S C 是 0 . 1 5 M N a C ℓ 及 0 . 0 1 5 M 檸檬酸鈉) 。靜置切片於 3 7 $^{\circ}\text{C}$ 一夜 , 使用含 0 . 3 微克 / 毫升經 digoxigenin 標記之 c R N A 探針的雜交混合液 (3 0 微升 / 玻璃片) , 再洗

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (67)

滌 3 0 分鐘，於 3 7 °C 之 5 0 甲醯胺 / 1 × S S C 中。最後一次洗滌進行 3 0 分鐘，於室溫下，1 × S S C 及 0 . 1 × S S C 中。阻斷切片 3 0 分鐘，其使用 0 . 5 % Triton X - 1 0 0 (Sigma) 及 0 . 5 % 脫脂奶粉。

測定雜交訊號，其使用共軛至鹼性磷酸酶之經純化的綿羊抗 dioxigenin Fab 片段 (Boehringer-Mannheim)。除去未結合的抗體後，加入硝基藍四唑 (nitroblue tetrazolium) / 5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吡啶基 - 磷酸鹽受質 (Promega) 及雷瓦米若 (levamisole (Becton Laboratories, Burlingame, CA)，經由比色性受質的生成，進行訊號測定。該組織於甲基綠 (Sigma) 中對比染色，脫水，及包埋。

作為對照組，部份組織切片以 1 0 0 微克 / 毫升之胰 R N a s e A (Sigma) 預處理 3 0 分鐘於 3 7 °C。R N a s e 在玻璃片上被鈍化，其使用 4 0 0 單位之 R N a s e 抑制劑 (Promega)。再令玻璃片於含有 6 . 4 μ / m l P B S / M g C l ₂ 的 2 5 0 毫升 P B S / 5 m M M g C l ₂ 中洗滌兩次。於另一對照試驗中，用 t R N A (Sigma) 代 digoxigenin 探針。

觀察三組個別實驗中所有足孕及首三個月胎盤組織之特異雜交情形，其使用不同的 O v I F N τ c R N A 探針濃度及阻斷試劑。

首三個月之胎盤絨毛係由外層的融合細胞滋養層，底層之滋養葉胞層，及具多種型式間細胞的中心間質區所組

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (68)

成，其呈現 I F N τ 之最高轉錄水平於滋養葉胞層細胞中。較不強但可測得之水平呈現在融合細胞滋養層及間質細胞。相似的轉錄表現情形亦顯示在足孕組織之胎盤絨毛中，但訊號測定水平低。首三個月之絨毛外滋養層呈現訊號最高量且可被染色，其出現在母體血液交換處。

實例 1 0

I F N τ 之抗病毒活性

於抗病毒分析法中評估純化至均質之 O v I F N τ 的相對特異活性。基本上如上述實例 2 所述，進行抗病毒分析。抗病毒分析法所得之特異活性係以抗病毒單位／毫克蛋白質來表示，其使用 Madin-Darby 牛腎 (M D B K) 細胞或綿羊正常纖維母細胞 (Shnf)。同時分析所有試樣以排除各分析組間的差異。結果示於表 3，其為 4 組測定之平均，其中標準誤差低於平均值之 1 0 %。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (69)

表 3

I F N τ 及習知 I F N s 之抗病毒活性

特異活性	M D B K	S h n f
O v I F N τ	2×10^8	3×10^8
r B o I F N α	6×10^7	1×10^7
r B o I F N γ	4.5×10^6	3×10^6
N I H r H u I F N α	2.2×10^8	2.2×10^8
r H u I F N α	2.9×10^5	4.3×10^5

I F N τ 比 r B o I F N α 或 r B o I F N γ 之特異活性高 (表 3) 。 r H u I F N α 之 N I H 標準製劑有類似的特異活性，然而 r H u I F N τ 之商品化製劑呈現低的特異抗病毒活性。使用牛或綿羊細胞皆證實可比較之相對抗病毒活性。

實例 1 1

I F N τ 之抗逆轉錄病毒活性及細胞毒性作用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (70)

對於暴露至貓免疫不全逆轉錄病毒之貓週邊血液淋巴細胞，測試高度純化之 O v I F N τ 的抗逆轉錄病毒及細胞毒性作用。此豆狀病毒 (lentivirus) 產生貓的慢性類 A I D S 的症狀，是研究人類 A I D S 的模型 (Pederson, et al., 1987)。週邊血液淋巴細胞內病毒的複製情形，係根據一段時間內培養上清液中的逆轉錄酶活性予以檢視。這些方法所得數據示於表 4。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明（ 71 ）

表 4
O v I F N τ 對於 F I V 複製之作用

I F N τ 濃度 (微毫克／毫升)	R T（活性）				
試驗 1	取樣日				
	第 2 日	第 5 日	第 8 日	第12日	第15日
0.0	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
試驗 2	取樣日				
	第 2 日	第 5 日	第 8 日	第13日	第17日
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
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

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (72)

O v I F N τ 的添加，產生快速，劑量決定性增加之逆轉錄酶 (R T) 活性 (表 4) 。濃度如 0 . 6 2 微毫克 / 毫升一般低之 I F N τ 可抑制病毒複製，而對 R T 活性有更大作用之較高濃度 (4 0 微毫克 / 毫升) 對細胞卻無毒性作用。此結果顯示當細胞與 O v I F N τ 一起培養時，貓免疫不全病毒之複製與對照組數值比較，顯著地被降低了。

I F N τ 顯然對於有逆轉錄病毒駐留的細胞不具有細胞毒性。甚至當 I F N τ 以每毫升培養基含 4 0 微克的濃度存在時，此亦為真確的。

實例 1 2

I F N τ 對於經 H I V 感染之人類周邊淋巴細胞的作用

亦測試 I F N τ 對於拮抗人類細胞中 H I V 感染的活性。令業經 H I V (Crow, et al.) 感染的人類周邊血液淋巴細胞，以不同濃度的 O v I F N τ 處理。檢視周邊血液淋巴細胞內 H I V 之複製情形係根據一段時間內培養上清液中的逆轉錄酶活性。測定逆轉錄酶活性基本上係根據 Hoffman, et al 之方法。這些方法測得的數據示於表 5。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (73)

表 5

O v I F N τ 對於人類周邊血液淋巴細胞中 H I V
複製之作用

I F N τ 濃 度 (毫 微 克 ／ 毫 升)	R T 活 性			
	第 6 日		第 10 日	
	cpm/ml	% 降 低	cpm/ml	% 降 低
0	4,214	--	25,994	--
10	2,046	51	9,883	62
50	1,794	57	4,962	81
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，O v I F N τ 之濃度產生顯著的抗病毒

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 (74)

作用。只有 10 微毫克／毫升的濃度，即能造成 R T 活性超過 50 % 之降低，其僅處理 6 日。濃度為 500 微毫克／毫升造成處理 10 日內之 R T 活性有 90 % 降低。

經一範圍之 I F N τ 處理 3 至 13 日後的周邊血液淋巴細胞之存活率，係根據錐藍質 (trypan blue) 排出情形而予評估。存活率分析之結果示於表 6 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (75)

表 6

O v I F N τ 對於經 H I V 感染之人類周邊淋巴細胞存活率的作用

I F N τ 濃 度 (毫微克 / 毫升)	存活細胞 / 毫升 $\times 10^5$		
	第 3 日	第 6 日	第 13 日
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	9.5	8.5

示於表 6 之數據顯示，無任何細胞毒性作用是由於 I F N τ 之施用所造成的跡象。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (76)

實例 1 3

細胞生長之抑制作用

亦測定 I F N τ 對於細胞生長之作用。使用集落抑制法測定抗細胞生長活性。將低密度的人類羊膜 (W I S H) 或 M D B K 細胞塗覆於培養皿，以形成源自單一細胞之集落。令細胞以 2 0 0 或 4 0 0 個細胞 / 孔洞之濃度，培養在 2 4 孔洞試盤中，於補充 2 % 胎牛血清 (F B S) 及必須與非必須胺基酸的 H M E M 中。加入不同稀釋度之干擾素至重複三次的孔洞中，且令試盤培養 8 小時以使集落形成。集落係經結晶紫染色後而為可見的，並計數之。細胞週期分析係使用含 0 . 5 % “耗竭 (spent)” 培養基之 H M E M 進行額外的 7 天。不經周期化，即使用 W I S H 細胞。

為了檢測 I F N τ 活性，令細胞再平置於 6 孔洞培養盤，其濃度為 $2 . 5 \times 10^5$ 細胞 / 孔洞，於含 1 0 % F B S 之 H M E M 中。加入不同稀釋度之 I F N τ ，單獨或與其它肽組合，以達終體積為 1 毫升。培養盤於 3 7 °C，5 % C O₂ 中培養 1 2，1 5，1 8，2 4 或 4 8 小時。以胰蛋白酶處理細胞，低速離心收集細胞及洗滌之。令細胞團塊吸漬至乾，且將核染色液加入每一試管，該核染色液含有 5 毫克丙錠碘 (propidium iodide)，0 . 3 毫升 N P 4 0 及 0 . 1 克檸檬酸鈉，於 1 0 0 毫升蒸餾水中。試管靜置於室溫中。1 0 分鐘後，每管加入 2 5 0 微升之 R N a s e (5 0 0 單位 / 毫升，於 1 . 1 2 % 檸檬酸鈉

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (77)

中)，再靜置 20 分鐘。經過 44 微米篩孔過濾細胞核，於 FACStar (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 上分析，其使用 DNA Star 2.0 軟體。

細胞生長法中利用牛上皮細胞株，MDBK，及人類羊膜細胞株，WISH，之集落形成，可知 O v I F N τ 抑制集落的大小及數目。綿羊 O v I F N τ 比人類 I F N α 對人類細胞株有效；因此，其在物種間活性十分強。其活性係由劑量決定，增殖之抑制情形可見於低至 1 單位／毫升之濃度。高達 50,000 單位／毫升之濃度（抗病毒活性單位／毫升）會終止增殖，然細胞存活率不受損。

細胞週期分析係藉由測定經丙錠碘染色之 WISH 細胞之流動式細胞計數器，結果顯示 O v I F N τ 處理後 48 小時，於 G2 / M 期有細胞之增加比例。故 I F N τ 顯然可抑制細胞發展至 S 期。綿羊 I F N τ 抗增殖作用可見於培養開始後 12 小時之早，且維持 6 日。

上述結果證明 I F N τ 具有抗增殖作用以及低細胞毒性。

實例 14

I F N τ 之其它抗增殖作用

研究 O v I F N τ 對於大白鼠細胞株及牛細胞株之抗增殖作用。³H - 胸腺嘧啶之攝入速率被用來評估細胞增殖的速率。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (78)

將大白鼠 (M t B r 7 . c 5) 或牛腎 (M D B K) 細胞種於不含酚紅之 D M E - F 1 2 培養基中，此培養基另添加 3 % 經葡聚糖塗覆之煤處理的控制處理血清替代品 2 (C P S R 2 , Sigma)，及經葡聚糖塗覆之煤處理的胎牛血清 (F B S)。接觸約 1 5 - 1 8 小時後，以不含血清之 D M E - F 1 2 培養基洗滌細胞一次。該培養基置換為不含酚紅的 D M E - F 1 2 培養基，其另添加 3 % 經處理之 C P S R 2，1 % 經處理之 F B S (" 3 / 1 " 培養基) 或，置換為含不同抗病毒活性單位之 O v I F N τ 的 3 / 1 培養基 (實例 2)，該單位之測定係如干擾素對水疱性口炎病毒之攻毒法測定者。

含有類似稀釋度之緩衝液 (未稀釋之培養基 = 1 0 m M T r i s , 3 3 0 m M N a C l , [T S]) 的培養基用於對照組，其中 O v I F N τ 溶於該緩衝液中。

於處理後約 4 8 小時，令細胞脈衝標記 ^3H - 胸腺嘧啶歷 2 小時，藉閃爍記數器測定可被三氯乙酸 (T C A) 沈澱之被攝入的記數物。每組處理包括三次重複。

O v I F N τ 處理之平均值與含有可比較稀釋度之載劑 T S 緩衝液的試樣比較。這些試驗的結果示於表 7。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (79)

表 7

³H - 胸腺嘧啶之攝入情形

處 理	³ H - 胸 嘧 啶 攝 入 情 形 之 降 低 百 分 比
試 驗 1 : M t B r 7 . c 5 (大 白 鼠)	
3 / 1	—
10 ³ u O v I F N τ / m l	0 (+ 1 2)
1 : 5 0 0 0 T S	—
10 ⁴ u O v I F N τ / m l	2 4
1 : 5 0 0 T S	—
10 ⁵ u O v I F N τ / m l	8 7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 訂 線

五、發明說明 (80)

試驗 2 : M D B K	
3 / 1	—
10 ³ u O v I F N τ / m l	7 4
1 : 5 0 0 0 T S	—
10 ⁴ u O v I F N τ / m l	8 3
1 : 5 0 0 T S	—
10 ⁵ u O v I F N τ / m l	8 3

由表 7 可知，O v I F N τ 每一種測試的細胞株顯著地降低細胞增殖的速率（根據胸嘧啶攝入情形）。

實例 1 5

I F N τ 對於人類腫瘤細胞株之抗增殖作用

評估 O v I F N τ 對人類腫瘤細胞株之抗增殖活性，其係根據測定 ³H - 胸腺嘧啶攝入經 O v I F N τ 處理之細胞的速率。

（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 (81)

爲了試驗生長於懸浮液的腫瘤細胞株，將 1 毫升細胞靜置於 24 孔洞之培養盤中，濃度爲 $2.5 - 5 \times 10^5$ 細胞／孔洞。三次重複的孔洞接受適合培養基，100，1,000 或 10,000 單位／毫升之 $OVIFN\tau$ 或相等抗病毒濃度之 $rHuIFN\alpha 2A$ (Lee Biomolecular)。培養 48 小時後，計算細胞器且根據錐藍排出情形評估存活率。

將 1 毫升附著性腫瘤細胞株置於 6 孔洞培養盤，其濃度爲 2.5×10^5 細胞／孔洞。其接受如上所述之干擾素處理，但於計數前，以胰蛋白酶處理。

藉誤差分析及接著 Scheffe's F - 測試，評估處理組之間的有意義差異。藉使用丙錠碘之流動式細胞計數器進行細胞週期之分析。

A. 乳腺癌細胞

得自對數生長期培養物之人類 MCF7 乳腺癌細胞種入無酚紅之 DME - F12 培養基中，其中添加有經 3% 葡聚糖塗覆之煤處理的 CP SR 及經 5% 葡聚糖塗覆之 FBS。接觸約 15 - 18 小時後，以不含血清之 DME - F12 培養基洗滌細胞一次。令培養基置換爲不含酚紅之 DME - F12 培養基，其添加有 3% 經處理之 CP SR 2, 1% 經處理之 FBS ("3 / 1" 培養基) 或添加抗病毒活性單位指定數目之 $OVIFN\tau$ 的 3 / 1 培養基，該單位係如測定干擾素之水疱性口炎病毒攻毒法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (82)

所測定者。含有類似之緩衝液稀釋度被用來作對照 (未稀釋緩衝液 = 1 0 m M T r i s , 3 0 m M N a C l [T S]) 。於處理後約 4 8 小時，以 ^3H - 胸腺嘧啶脈衝標記細胞歷 2 小時。

藉閃爍記數法測定三氯乙酸 (T C A) 沈澱之經攝入的記數。每處理處包括 3 次重複。令 O v I F N τ 之平均值與含有可比較稀釋度之載劑 T S 緩衝液的試樣比較。這些分析結果示於表 8 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (83)

表 8

³H - 胸腺嘧啶之攝入情形

處 理	³ H - 胸 腺 嘧 啶 攝 入 情 形 之 降 低 百 分 比
人 類 M C F 7	
3 / 1	—
10 ³ u O v I F N τ / ml	3 5
1 : 5 0 0 0 T S	—
10 ⁴ u O v I F N τ / ml	5 3
1 : 5 0 0 T S	—
10 ⁵ u O v I F N τ / ml	7 0

由表 2 所示結果而知，O v I F N τ 實質上可降低
³H - 胸腺嘧啶於人類癌細胞株內之攝入速率。此證明
O v I F N τ 於抑制腫瘤細胞增殖的效力，特別是乳癌細

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 (84)

胞增殖。

B . 人類前骨髓細胞白血病

O v I F N τ 及 I F N α 之抗增殖作用的比較，係利用 H L - 6 0 (人類白血病) 細胞進行 (Foa, et al.; Todd, et al.)，此基本上與上述用於 M D B K 細胞者相似。o I F N τ 與 r H u I F N α 皆抑制 H L - 6 0 細胞增殖。三組重複試驗任一者之結果以生長降低百分比之平均值 $\pm$ S D 表示於圖 4。圖 4 表示，O v I F N τ 及 I F N α 皆能夠顯著地降低 H L - 6 0 細胞之生長。每一化合物之生長降低情形超過每一測試濃度之 6 0 %。於 1 0，0 0 0 單位 / 毫升時，I F N α 之毒性造成低於 2 5 % 之細胞依然存活。相反地，當 O v I F N τ 使用 1 0，0 0 0 單位 / 毫升時，近 1 0 0 % 細胞依然存活。

圖 5 所示數據證明 r H u I F N α 有細胞毒性。圖中，三組重複試驗任一者之結果以存活百分比平均值 $\pm$ S D 表示。

C . 人類皮膚 T 細胞淋巴瘤

當以 I F N τ 處理皮膚 T 細胞淋巴瘤時，H U T 7 8，反應類似 H L - 6 0 (圖 9)。O v I F N τ 與 r H u I F N α 皆降低 H U T 細胞之生長，但 1 0，0 0 0 單位 / 毫升之 r H u I F N α 減少細胞數低於原先置放者 (5×10^5)。此顯示細胞存活率降低至

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (85)

約 6 0 % 。

細胞週期分析 (藉細胞流動式細胞計數器進行) 顯示以兩種干擾素處理 4 8 小時之細胞週期中 G 2 / M 期的細胞有被增加比例 (表 1 0) 。表 1 0 中，三組重複試驗之任一者的結果以細胞週期之任一期的細胞百分比來表示。分析每一試樣處理 1 0 , 0 0 0 單位者。

此結果似乎是由於細胞週期中細胞的較慢進展。以 1 0 , 0 0 0 單位 / 毫升 r H u I F N α 處理之試樣中，出現高百分比之具低進展及由死細胞鑑定之高側散佈的現象。此與增殖試驗所得數據一致，其中只有 o I F N τ 抑制 H U T 7 8 增殖且無毒性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (86)

表 1 0 . H U T 7 8 細胞週期之分析

處 理	G 0 / G 1	S	G 2 / M
培 養 基	44.43	49.94	5.61
100 oIFN τ	44.35	47.45	8.20
100 rHuIFN α	40.01	57.53	2.45
1,000 oIFN τ	41.29	50.50	8.21
1,000 rHuIFN α	41.73	44.91	13.36
10,000 oIFN τ	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 細胞淋巴瘤細胞株 H 9 對於 I F N s 之抗增殖作用的敏感度僅輕微略低於上述腫瘤細胞株。三組重複試驗任一者之結果以圖 1 0 之生長降低百分之平均值 $\pm$ S D 來表

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 (87)

示。r H u I F N α 對 H 9 細胞無毒性時，無法顯著抑制任何測定濃度之細胞分裂。相反地，可見 o I F N τ 抑制 H 9 之生長達約 6 0 % (圖 1 0)。因此，只有 o I F N τ 是 T 細胞淋巴瘤之有效生長抑制劑。

上述結果證明 I F N τ 之抗增殖作用以及其低細胞毒性。

實例 1 6

利用 O v I F N τ 之初步活體內治療

將三組 C 5 7 B 1 / 6 小白鼠，每組 4 隻，經尾靜脈提供 2.5×10^4 的 B 1 6 - F 1 0 細胞：B 1 6 - F 1 0 是周期化之小白鼠可移植之腫瘤，其係因為其有肺轉移之高度跡象而被選用 (Poste, et al., 1981)。干擾素治療在導入腫瘤細胞 3 日後開始。每一隻小白鼠接受 1 0 0 微升之 P B S，含 1×10^5 單位之 O v I F N τ 的 P B S，或含 1×10^5 單位之重組鼠類 I F N α (M u I F N α)，每日經靜脈內注射，連續三日。

在第 2 1 日犧牲小白鼠且將肺保存在 1 0 % 經緩衝的福馬林中。在對照組小白鼠 (P B S)，經 O v I F N τ 處理之小白鼠，及經 M u I F N α 處理之小白鼠之間比較肺轉移之頻率。這些活體內施用之結果證實，o I F N τ 顯著地 B 1 6 - F 1 0 肺部腫瘤。這些結果支持 I F N τ 作為活體內有效抗腫瘤劑的用途。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (88)

實例 1 7

I F N τ 肽片段之競爭性結合A . 基於 I F N τ 之肽類阻斷 I F N τ 及 I F N - α 抗病
毒活性的能力

合成對應至完整 I F N τ 序列 (圖 6) 之重疊的合成肽。計算平均水合值 (hydropathicity value) , 係藉由將每一個胺基酸之水合值總值除以每一序列中胺基酸之總數。水合值係根據 Kyte, et al (1982) 計算。

這些肽有幾乎相同的分子量, 但整體親水性則有輕微差異。除了此項差異之外, 所有肽皆為抗原, 其係由具有大於 1 : 3 , 0 0 0 E L I S A 評估之力價的兔子抗血清的生成而被證實 (Harlow, et al) 。

肽乃用於抑制 O v I F N τ 及 r B o I F N α 之抗病毒活性 (實例 2) 。此分析之結果示於圖 1 2 : 1 m M 之 N - 及 C - 端肽皆能有效阻斷 O v I F N τ 之抗病毒活性, 其使用 M D B K 細胞。代表胺基酸 6 2 - 9 2 之第三肽亦降低 I F N τ 之抗病毒活性 (7 0 % 抑制作用) 。肽 O v I F N τ (1 1 9 - 1 5 0) 顯示最低之抑制活性。O v I F N τ (3 6 - 6 4) 及 (9 0 - 1 2 2) 肽不具抑制活性。

O v I F N τ 抗病毒活性之肽抑制作用亦如下述所示檢測。令單層 Madin-Darby 牛腎細胞與 4 0 單位 / 毫升之 O v I F N τ 培養, 有或無不同濃度之 O v I F N τ 肽 (參見圖 1 3) 。圖 1 3 中之結果以對照組抗病毒活性之百

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (89)

分比表示：亦即，不含有任何競爭肽。數據表示為 6 組重複試驗之平均值。此數據證明 O v I F N τ (1 - 3 7)，(6 2 - 9 2)，(1 1 9 - 1 5 0)，及 (1 3 9 - 1 7 2) 之抑制作用與 $10^{-3}M$ 及 $3 \times 10^{-3}M$ 之 O v I F N τ (3 4 - 6 4) 及 (9 0 - 1 2 2) 有顯著不同。於 $10^{-3}M$ 時，O v I F N τ (1 3 9 - 1 7 2) 與所有其它肽有顯著不同。顯著性之評估係根據誤差之分析及接著使用 Scheffe's F 測試， $p < 0.05$ 。因此，O v I F N τ (1 - 3 7)，(6 2 - 9 2)，(1 1 9 - 1 5 0)，及 (1 3 9 - 1 7 2) 可代表 I F N τ 之受體結合區，特別是 (1 3 9 - 1 7 2)。

O v I F N τ 肽對於抑制牛 I F N α (B o I F N α) 抗病毒活性的能力乃根據如下所示測定。令單層 Madin-Darby 牛腎細胞與 40 單位／毫升之牛 I F N α 培養，有或無不同濃度之 O v I F N τ 肽。結果示於圖 1 4 且以不含 O v I F N τ 肽之對照組抗病毒活性的百分比表示。所示數據為 4 組重複試驗之平均值。此結果顯示

O v I F N τ (6 2 - 9 2)，(1 1 9 - 1 5 0)，及 (1 3 9 - 1 7 2) 所造成的抑制作用與 $10^{-3}M$ 之 O v I F N τ (1 - 3 7)，(3 4 - 6 4) 及 (9 0 - 1 2 2) 有顯著差異。於 $3 \times 10^{-3}M$ 時，O v I F N τ (1 3 9 - 1 7 2) 與 O v I F N τ (1 - 3 7)，(3 4 - 6 4) 及 (9 0 - 1 2 2) 有顯著不同。顯著性之評估係根據誤差分析及後續之 Scheffe's F 測試，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (90)

$p < 0.05$ 。因此，O v I F N τ (6 2 - 9 2)，(1 1 9 - 1 5 0)，及 (1 3 9 - 1 7 2) 可代表 I F N τ 及牛 I F N α 之共同受體結合區，特別是 (1 3 9 - 1 7 2)。

亦測定 O v I F N τ 肽對人類 I F N α 抗病毒活性的肽抑制作用。令單層的 Madin Darby 牛腎細胞與 40 單位／毫升人類 I F N α 培養，有或無不同濃度的

O v I F N τ 肽。結果以不含 O v I F N τ 肽之對照組抗病毒活性之百分比表示。數據示於圖 1 5，其為 3 組重複試驗之平均值。於 $10^{-3}M$ 時，O v I F N τ (1 3 9 - 1 7 2) 與所有其它肽有顯著不同。顯著性之評估係根據誤差分析及後續之 Scheffe's F 測試， $p < 0.05$ 。因此，O v I F N τ (1 3 9 - 1 7 2) 可代表 I F N τ 及不同 I F N α (s) 之共同受體結合區。

上述 O v I F N τ 肽顯示對於 I F N γ 之抗病毒活性無作用。牛 I F N γ 抗病毒活性之肽抑制作用評估如下。令單層 Madin Darby 牛腎細胞與 40 單位／毫升牛 I F N - γ 培養，有或無不同濃度之 O v I F N τ 肽。結果以不含 O v I F N τ 肽之對照組抗病毒活性之百分比表示。數據示於圖 1 6，其為 3 組重複試驗之平均。當根據誤差分析及後續 $p < 0.05$ 之 Scheffe's F 測試之評估可知，肽間無顯著差異。

2 個合成肽 O v I F N τ (1 - 3 7) 及 O v I F N τ (1 3 9 - 1 7 2) 亦能阻斷 O v I F N τ

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (91)

之抗 - F I V 及抗 - H I V 之活性。檢視歷經 1 4 天期之經 F I V 感染之 F E T - 1 細胞 (1×10^6 / 毫升) 及經 H I V 感染之 H P B L (1×10^6 / 毫升) 中的逆轉錄酶 (R T) 活性 (實例 1 2 及 1 3)。對照組培養物不接受 O v I F N τ 。O v I F N τ 之濃度用 1 0 0 微毫克 / 毫升，肽濃度用 2 0 0 μ M。代表性試驗所得數據以 c p m / 毫升培養上清液表示且圖 1 1 A，代表經 F I V 感染之細胞，圖 1 1 B，代表經 H I V 感染之細胞。

O v I F N τ 之 N - 及 C - 端皆顯示涉及其抗 - 逆轉錄病毒之活性。雖然兩種肽皆阻斷 F I V 之 R T 活性，但只有 C 端肽，O v I F N τ (1 3 9 - 1 7 2)，是作用在貓細胞株，F c 9，的水疱性口炎病毒活性之有效抑制劑。故 I 型 I F N s 之 C - 端區可結合至 I 型 I F N 受體上之共同位置，然 C - 端區可涉入獨特功能的激發。

B . 抗 - 肽之血清

亦測定抗肽之抗血清抑制 O v I F N τ 抗病毒活性的能力。O v I F N τ 抗病毒活性之抗肽之抗血清的抑制作用評估如下。令單層 M D B K 細胞與 2 0 單位 / 毫升之 O v I F N τ 培養，其中含有 1 : 3 0 稀釋之免疫前血清或拮抗如上所述任一 O v I F N τ 肽之抗血清。圖 1 7 中，重複試驗所得數據，係以相對於適合之免疫前血清之抗肽抗血清所產生之 O v I F N τ 抗病毒活性之抑制百分比的平均值 $\pm$ 標準誤差表示。顯著差異性係根據誤差分析及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (92)

後續 $p < 0.05$ 之 Scheffe's F 測試予以評估。與抗病毒活性之肽抑制作用一致，含有對 O v I F N τ (1 - 3 7)，O v I F N τ (6 2 - 9 2)，及 O v I F N τ (1 3 9 - 1 7 2) 免疫反應之抗體的血清，亦為 O v I F N τ 抗病毒活性之最有效的抑制劑，其含有直接拮抗 N - 端及 C - 端肽之抗體者最為有效。

相同血清亦用於測試此抗體對於 I F N τ 結合至其受體的作用。

I F N τ 結合分析法進行如下。令 5 微克 I F N τ 碘化 2 分鐘，其使用含 $500 \mu\text{Ci}$ 之 Na^{125}I (1 5 mCi / 微克；Amersham Corporation, Arlington Heights, IL) 之 2 5 微升的 0.5 M 磷酸鉀緩衝液，pH 7.4，以及 1 0 微升之氯氨 - T (chloramine-T) (5 毫克 / 毫升) (Griggs, et al., 1992)。經碘化蛋白質之特異活性為 $137 \mu\text{Ci} / \text{微克}$ 。為了進行結合分析，令單層 M D B K 細胞以副甲醛固定並以 5 % 脫脂奶粉阻斷。令細胞與含有 ^{125}I - I F N τ 之磷酸鹽緩衝之生理食鹽水，其中含 1 % B S A，共置於 4°C 歷 2 小時，有或無 1 : 3 0 稀釋度之血清，其含有拮抗 I F N τ 肽之抗體，或為合適之免疫前抗體。評估特異結合，係藉由與 1 0 0 倍莫耳數之未標記 I F N τ 的共置培養。3 6 % 之特異結合係根據與 5 0 0 nM 未標記之 I F N τ 的競爭情形予以測定。舉例而言，總結合計數為 6850 ± 133 ，1 0 0 倍莫耳量之 O v I F N τ 產生 4398 ± 158

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (93)

計數每分鐘。培養液，清洗單層細胞三次，以 1 % 硫酸十二酯鈉溶解並計算放射活性。三組重複試驗所得數據示於圖 1 8，其為相對於合適免疫前血清之抗肽抗血清所產生之 O v I F N τ 特異結合情形之抑制百分比的平均值 $\pm$ 標準誤差。顯著差異性係根據誤差分析及後續之 Scheffe's F 測試予以評估。

相同血清（含有對 O v I F N τ (1 - 3 7)，O v I F N τ (6 2 - 9 2)，及 O v I F N τ (1 3 9 - 1 7 2) 免疫反應之抗體）最 ^{125} I - I F N τ 結合至 M D B K 細胞上其受體之最有效抑制劑。缺乏與其它衍自 I F N τ 肽免疫反應之血清的作用，與抗 O v I F N τ 之力價無關，因為每一血清具相對於三組抑制血清之拮抗其預期肽之相等力價或更高力價：常使用 E L I S A 對每一血清評估拮抗完整 O v I F N τ 分子之血清反應性時，得到類似結果。

這些肽雖然似乎結合至干擾素受體，其本身並不引起及參與細胞內之類干擾素作用。

C . 抗增殖活性

I F N τ 之抗增殖活性的功能重要位置亦予測定，其使用合成肽（表 1 1）。如上所述測定細胞之增殖，其使用 M D B K 細胞。試驗 1 及 2 中培養 5×10^5 細胞 / 孔洞之 M D B K 細胞及試驗 3 中培養 10×10^5 細胞 / 孔洞，並處理僅培養基，濃度為 3 0 0 單位 / 毫升之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (94)

I F N τ 及 1 m M 之肽類，歷 4 8 小時。計算三組重複試驗中任一者之重複孔洞。爲了統計分析，根據只處理培養基者正規化數據且根據誤差分析及後續最小顯著差異性多重比較測試 ($p > 0.05$) 予以評估。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (95)

表 11
IFN τ 抗增殖活性之肽抑制情形

處理	試驗 1		試驗 2		試驗 3	
	細胞計數	存活率	細胞計數	存活率	細胞計數	存活率
只有培養基	9.8×10^5	99%	13.0×10^5	96%	27.3×10^5	97%
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 (96)

當 M D B K 細胞之增殖情形評估歷經 2 日期，細胞數大致增加 2 倍且有大於 95 % 之存活率。添加 300 單位 / 毫升之 O v I F N τ 完全排除細胞增殖，但不減少細胞存活率。綿羊 I F N τ (119 - 150) 是 I F N τ 抗增殖活性之最有效抑制劑。

抗 I F N τ (119 - 150) 之抗血清可抑制 O v I F N τ 結合至受體，其亦顯示 O v I F N τ 之抗增殖作用。數種其它肽，尤其是 I F N τ (139 - 172)，亦顯示 O v I F N τ 之抗增殖作用，但作用較小。

實例 18

I F N τ 之細胞及抗病毒作用的其它分析

A . H I V 之抗病毒作用

評估 I F N τ 拮抗 H I V 之抗病毒作用，係藉由人類 P B M C 細胞以不同量之重組綿羊 I F N τ (r - O v I F N τ) 或重組人類 I F N α_2 處理，於使用 H I V 感染之際。試驗過程中皆有藥物存在。於第 7 日及第 14 日，測定 p 24 之產製 (利用 E L I S A (Wang, et al., 1988, 1989) 且將其比較無藥之對照組。分析結果示於表 12 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (97)

表 1 2

藥物單位量 / 孔洞		第 7 日之 抑制百分比	第 4 日之 抑制百分比
I F N α	I F N τ		
10	26	58%, 48% 48%, 45%	91%, 91% 88%, 59%
100	260	68%, 74% 58%, 51%	94%, 91% 82%, 70%
1,000	2,600	89%, 86% 65%, 68%	97%, 93% 87%, 79%
10,000		90%, 86%	99%, 99%
	26,000	77%, 85%	77%, 96%
	260,000	85%, 84%	96%, 86%
	2,600,000	74%, 77%	89%, 88%

這些試驗之數據支持一結論，亦即，於相當低濃度時，I F N α 及 I F N τ 可有效降低 H I V 於人類淋巴細胞內之增殖——於相近濃度。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (98)

B . 於 P B M C ' s 之活體外細胞毒性試驗

將人類 P B M C ' s 以 5×10^5 細胞 / 毫升濃度種殖。於第 0 時，以 3 微克 / 毫升 P H A 刺激細胞。處理細胞，其使用 200 微升 / 孔洞之重組人類 I F N α 2 A (濃度為 10, 100, 1,000 及 10,000 單位 / 毫升) 及 I F N τ (濃度為 2.6, 26, 260, 2,600, 26,000, 260,000, 及 2,600,000 單位 / 毫升) (每一濃度有 4 組重複，其使用 96 孔洞平底試盤)。對照組培養物不接受干擾素。接種 4 日後，令細胞脈衝標記 9 小時之 ^3H - 胸腺嘧啶， $1 \mu\text{Ci}$ / 孔洞。回收細胞且測定經標記胸腺嘧啶攝入 D N A 之情形 (圖 8)。

測定任何濃度 I F N τ 之胸腺嘧啶攝入情形，未見任何細胞毒性。然而，r H u I F N α 2 在 10,000 單位 / 毫升濃度時，對細胞有毒性。

C . 肝細胞內 B 型肝炎病毒 D N A 複製之抑制

所用細胞株，H e p G 2 - T 1 4，為人類細胞，其係衍自經 B 型肝炎病毒 (H B V) 轉感之肝細胞。此細胞株半穩定地產製 H B V 病毒：一段時間後，細胞株產製 H B V 細胞內 D N A 及分泌病毒皆減少。為了使 H B V D N A 及病毒之生長最大化，令細胞預處理 d E A Z A - C (5 - 氮雜胞嘧啶核苷；Miyoshi, et al.) 以誘發病毒的生成。處理持續 2 - 3 日且誘發量是兩個比較因子之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (99)

一。

再令細胞以 I F N α 及 I F N τ 處理，濃度為 0，5，000，10，000，20，000 及 40，000 單位／毫升。

所有不同量之 I F N α 或 I F N τ 皆減少 D N A 產製，其根據對無藥對照組比較之 2 個因子之一。

D . 肝細胞內肝特定之訊號 D N A 產製的抑制

測定肝細胞株 H e p G 2 - T 1 4 (如上所述) 中 I F N α 及 I F N τ 對於肝特異之 m R N A 產製的作用。令細胞與濃度為每毫升 0，5，000，10，000，20，000 及 40，000 單位之 I F N α 及 I F N τ 共置培養。利用雜交分析法測定轉譯肝細胞特定蛋白質 A p o E 及 A p o A 1 的訊號 R N A s (Sambrook, et al.; Maniatis, et al.)，其使用對此兩種 m R N A 特異的探針 (Shoulders, et al., 及 Wallis, et al.)。

對於使用高達 40，000 單位之 I F N α 或 I F N τ 之 A p o E 或 A p o A 1 的 m R N A 產製，未見 m R N A 製備有減少。此結果顯示，前述試驗中病毒 D N A 複製之減少不是由於 I F N s 對於細胞家管活性上之作用；反倒是，此減少情形似乎是由於病毒於宿主細胞內複製之特異抑制作用。

實例 1 9

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (100)

干擾素 - τ 融合蛋白質之單離

共軛有抗珠粒半乳糖酶之 Sepharose 4 B 珠粒，購自 Promega 廠。裝填此珠粒至 2 毫升管柱中且充分洗滌，利用含 0.02% 疊氮化鈉之經磷酸鹽緩衝的生理食鹽水及 10 毫升 TX 緩衝液 (10 mM Tris 緩衝液，pH 7.4，1% 去蛋白質素 (aprotinin))。

將 IFN τ 編碼序列 (例如，圖 7) 殖入 λ gt 11 之多連接子位置。將 IFN τ 編碼序列置於 λ gt 11 中具有 N-端 β -半乳糖酶編碼序列之同一架構內。感染有 λ gt 11 / IFN τ 之溶原素 (lysogen) 用於接種 500 毫升之 NZYDT 肉汁。令培養物培養在 32°C，至 OD 為約 0.2 至 0.4，再快速置於 43°C 之 43°C 水浴中 15 分鐘，以誘生 λ gt 11 肽之合成，且再於 37°C 培養 1 小時。藉離心使細胞呈團塊，懸浮於 10 毫升溶解緩衝液 (10 mM Tris，pH 7.4)，其含有 2% "TRITON X-100" 及使用前才加入的 1% 去蛋白質素。

令懸浮細胞於液態氮中冷凍，再將其解凍，造成實質上完全之細胞溶解。令溶解物以 DNase I 處理以水解細菌及噬菌體 DNA，此乃藉溶解物中逐漸喪失之黏度為憑。藉離心除去非可溶之物質。

將澄清化之溶解物質饋至 Sepharose 管柱上，封閉管柱末端，且將管柱置於旋轉式搖盪器，於室溫中 2 小時且於 4°C，16 小時，裝妥管柱後，以 10 毫升 TX 緩衝液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (101)

洗滌之。溶離經融合的蛋白質係使用 0.1 M 碳酸鹽 / 重碳酸鹽緩衝液，pH 10。傳統上，令 14 毫升之溶離緩衝液通過管柱，融合蛋白質在首 4 - 6 毫升之溶離物中被溶離出來。

令含有溶離蛋白質之溶離物於 "CENTRICON-30" 管 (Amicon, Danvers, Mass.) 中濃縮。令最終蛋白質濃縮物懸浮在，舉例而言，400 微升之 PBS 緩衝液中。蛋白質純度藉 SDS - PAGE 分析。

爲了製備多株抗體，將經純化之融合蛋白質於皮下注射至兔子中。於第 0 及 21 日注射近 1 毫克之融合蛋白質，且兔子血清傳統上在第 6 及 8 週時收集。

實例 20

抗 - IFN τ 抗體之製備

A. 穀胱甘肽 - S - 轉移酶融合蛋白質之表現

令 IFN τ 編碼序列 (例如，圖 7) 殖入 pGEX 載體 (Boyer, et al.; Frangioni, et al.; Guan, et al.; Hakes, et al.; Smith, et al., 1988)。修飾 pGEX 載體 (Smith, et al.)，利用嵌入與穀胱甘肽 - S - 轉移酶蛋白質 (GST - sj26 編碼序列) 同一架構之凝血素切割序列。此載體命名爲 pGEXthr。IFN τ 編碼序列置放在 sj26 - 凝血素編碼序列之同一架構 (Guan, et al.; Hakes, et al.)。IFN τ 編碼序列嵌入物可被生成，其藉由使用對嵌入物專一的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (102)

P C R 引子之聚合酶連鎖反應。

將 I F N τ 片段接合至直線化的 p G E X t h r 載體。將接合混合物轉形至大腸桿菌且篩選出對安比西林有抗性的菌落。自抗安比西林之菌落單離質體並利用限制酶水解反應分析，以鑑定含有 I F N τ 嵌入物之純系（載體命名為 p G E X t h r - I F N τ ）。

令大腸桿菌 X L - I Blue 株被 p G E X t h r - I F N τ 轉形且於 37 °C 令其生長一夜。自任意挑取的菌落製備 D N A。傳統上，嵌入之編碼序列的存在以下列方法確認：(i) 限制酶水解與圖化，(ii) 使用經標記之 I F N τ 探針雜交篩選（亦即南方吸漬分析），或 (iii) 直接 D N A 序列分析。

B . 融合蛋白質之部份純化

令 p G E X t h r - I F N τ 生長一夜。將過夜培養物以含有安比西林之 L B 培養基稀釋 1 : 10，且令其生長 1 小時於 37 °C。或者，隔夜培養物稀釋 1 : 100 且令其在添加 I P T G（異丙基硫 - β - 半乳糖苷）之前生長至 O D 為 0.5 - 1.0。加入 I P T G（GIBCO-BRL, Gaithersburg MD）至終濃度為 0.2 - 0.5 mM，以誘發蛋白質表現，共置反應傳統上持續 2 - 5 小時，較好 3.5 小時。

藉離心回收細菌細胞且懸浮在 1 / 100 培養物體積之 M T P B S（150 mM NaCl, 16 mM

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (103)

Na_2HPO_4 , 4 mM NaH_2PO_4)。以溶解酶溶解細胞，超音波震盪或法氏壓擠，並藉離心將溶解物之細胞碎屑清除。

分析一等份之懸浮物，其得自由含有 p G E X t h r - I F N τ 之細胞組成之經 I P T G 誘發的培養物，及一等份懸浮物，其得自只含 p G E X t h r - 載體之經 I P T G 誘發的培養物，其使用如前所述之 S D S - 聚丙烯醯胺凝膠電泳及後續之西方吸漬來完成。

若有必要，可使用超過濾法濃縮萃取物，舉例而言，如使用 "CENTRICON 10" 過濾器。

或者，融合蛋白質可由穀胱甘肽瓊脂糖親和性管柱上部份純化，如 Smith, et al. 詳載。此方法中，令 100 毫升培養物生長一夜。培養物稀釋至 1 公升且令細胞生長在 37 °C，再 1 小時。回收細胞並使用超音波震盪器溶解細胞。將細胞碎屑團塊化且將澄清之溶解物饋至穀胱甘肽 "SEPHAROSE" 管柱上。以數個管柱體積洗滌管柱。融合蛋白質與被還原的穀胱甘肽自親和性管柱溶離，並將融合蛋白質透析。I F N τ 可自混合型蛋白質釋出，藉凝血原之處理。混合型蛋白質之 s j 26 及 I F N τ 片段可再利用分子大小分級分離法，於管柱或於凝膠上分開。

或者，混合型蛋白質之 I F N τ 部份利用凝血素之處理自管柱釋出 (Guan, et al.; Hakes, et al.)。

C. 拮抗融合蛋白質之抗體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (104)

將經純化之 S j 2 6 / I F N τ 融合蛋白質於 Freund's 佐劑中，皮下注射至兔子。於第 0 日及第 21 日注射約 1 毫克之融合蛋白質，傳統上在第 6 及 8 週收集兔子血清。第二隻兔子以得自對照組細菌溶解物之經純化的 S j 2 6 蛋白質而予類似免疫。

製備得自下列細菌培養物之微量溶解物：(1) 被含有 I F N τ 嵌入物之 p G E X t h r 及 p G E X t h r 感染之 K M 3 9 2 細胞；及 (2) 被含有 I F N τ 嵌入物之 λ g t 1 1 感染之細胞。藉 S D S - P A G E 分級分離微量溶解物及商品化之 β - 半乳糖酶，且將帶 (bands) 轉移至硝化纖維膜以進行西方吸漬 (Sambrook, et al.; Ausubel, et al.)。

歸納預期之結果，得自對照組 (S j 2 6) 兔子之血清，與每一個 S j 2 6 及 S j 2 6 融合蛋白質抗原免疫反應。得自經 S j 2 6 / I F N τ 融合蛋白質免疫之動物血清，與所有 S j - 2 6 及含有 I F N τ 編碼序列之 β - g a l 融合蛋白質反應，顯示具有與 I F N τ 之特異免疫反應。無任一血清是預期可與 β - 半乳糖酶免疫反應者。

將抗 - I F N τ 抗體純化，其存在於以 S j 2 6 / I F N τ 免疫之動物的血清中，純化係使用親和性層析法 (使用被固定之重組製備的 I F N τ 作為配位體，基本上如實例 12 中所述用於抗 - β - 半乳糖酶抗體者)。

雖然本發明已利用針對特定方法及具體實例之參考資料予以說明，但不偏離本發明所作之不同修飾及變化將可

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (105)

接受。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

●裝

訂

●線

五、發明說明 (106)

序 列 目 錄

(1) 一 般 資 料 :

(i) 申 請 人 : Bazer, Fuller w.

Johnson, Howard M.

Pontzer, Carol H.

Ott, Troy L.

Van Heeke, Gino

Imakawa, Kazuhito

(ii) 發 明 名 稱 : 干 擾 素 T a u 組 成 物 及 其 用 途

(iii) 序 列 總 數 : 20

(iv) 負 責 地 址 :

(A) ADDRESSEE : Law Offices of Peter J.

Dehlinger

(B) STREET : 350 Cambridge Ave., Suite 300

(C) CITY : Palo Alto

(D) STATE : CA

(E) COUNTRY : USA

(F) ZIP : 94306

(v) 電 腦 可 讀 型 :

(A) MEDIUM TYPE : Floppy disk

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (107)

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) OPERATING SYSTEM: PC/DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0,

Version #1.25

(vi) 目前申請資料 :

(A) 申請案號 :

(B) 申請日 :

(C) 分類 :

(vii) 先前申請資料 :

(A) 申請案號 : US 07/318,050

(B) 申請日 : 02-MAR-1989

(vii) 先前申請資料 :

(A) 申請案號 : US 07/847,741

(B) 申請日 : 09-MAR-1992

(viii) 律師 / 代理人資料 :

(A) NAME: Fabian, Gary R.

(B) REGISTRATION NUMBER: 33,875

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 5600-0001

(ix) 電傳資料 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (108)

(A) TELEPHONE : 415-324-0880

(B) TELEFAX : 415-324-0960

(2) S E Q I D N O : 1 之 資 料 :

(i) 序 列 特 徵 :

(A) 長 度 : 518 個 鹼 基 對

(B) 種 類 : 核 酸

(C) 股 型 : 雙 股

(D) 拓 撲 學 : 環 狀

(ii) 分 子 型 : DNA

(iii) 臆 測 型 : 無

(iv) 反 意 : 無

(vi) 最 初 來 源 :

(A) 生 物 體 : 綿 羊

(B) 亞 種 : 家 畜

(D) 發 育 階 段 : 囊 胚 (胚 胞)

(F) 組 織 型 : 胚 膜

(G) 細 胞 型 : 單 核 之 胚 膜 細 胞

(vii) 立 即 來 源 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (109)

(B)單位：oTP-1a

(viii) POSITION IN GENOME :

(C)單位：鹼基對

(ix)特性：

(A)名稱／關鍵字：CDS

(B)座落：1..518

(x)發表資料：

(A)作者：Ott, Troy L

(B)文獻名稱：Cloning and Expression in
 Saccharomyces cerevisiae of
 a Synthetic Gene for the
 Type I Trophoblast Interfer-
 on Ovine Trophoblast Protein
 -1:Purification and Antivir-
 al Activity

(C)期刊：J. Interferon Res.

(D)冊：11

(F)頁：357-364

(G)日期：1991

(K)SEQ ID NO：1之相關殘基：

由1至518

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (110)

(xi) 序列說明 : S E Q I D N O : 1

TGC TAC CTG TCG CGA AAA CTG ATG CTG GAC GCT CGA GAA AAT TTA AAA Cys Tyr Leu Ser Arg Lys Leu Met Leu Asp Ala Arg Glu Asn Leu Lys 1 5 10 15	48
CTG CTG GAC CGT ATG AAT CGA TTG TCT CCG CAC AGC TGC CTG CAA GAC Leu Leu Asp Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Ser Cys Leu Gln Asp 20 25 30	96
CGG AAA GAC TTC GGT CTG CCG CAG GAA ATG GTT GAA GGT GAC CAA CTG Arg Lys Asp Phe Gly Leu Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Asp Gln Leu 35 40 45	144
CAA AAA GAC CAA GCT TTC CCG GTA CTG TAT GAA ATG CTG CAG CAG TCT Gln Lys Asp Gln Ala Phe Pro Val Leu Tyr Glu Met Leu Gln Gln Ser 50 55 60	192
TTC AAC CTG TTC TAC ACT GAA CAT TCT TCG GCC GCT TGG GAC ACT ACT Phe Asn Leu Phe Tyr Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr 65 70 75 80	240
CTT CTA GAA CAA CTG TGC ACT GGT CTG CAA CAG CAA CTG GAC CAT CTG Leu Leu Glu Gln Leu Cys Thr Gly Leu Gln Gln Gln Leu Asp His Leu 85 90 95	288
GAC ACT TGC CGT GGC CAG GTT ATG GGT GAA GAA GAC TCT GAA CTG GGT Asp Thr Cys Arg Gly Gln Val Met Gly Glu Glu Asp Ser Glu Leu Gly 100 105 110	336
AAC ATG GAT CCG ATC GTT ACT GTT AAA AAA TAT TTC CAG GGT ATC TAC Asn Met Asp Pro Ile Val Thr Val Lys Lys Tyr Phe Gln Gly Ile Tyr 115 120 125	384
GAC TAC CTG CAG GAA AAA GGT TAC TCT GAC TGC GCT TGG GAA ATC GTA Asp Tyr Leu Gln Glu Lys Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val 130 135 140	432
CGC GTT GAA ATG ATG CGG GCC CTG ACT GTG TCG ACT ACT CTG CAA AAA Arg Val Glu Met Met Arg Ala Leu Thr Val Ser Thr Thr Leu Gln Lys 145 150 155 160	480
CGG TTA ACT AAA ATG GGT GGT GAC CTG AAT TCT CCG Arg Leu Thr Lys Met Gly Gly Asp Leu Asn Ser Pro 165 170	518

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(111)

(2) S E Q I D N O : 2 之資料 :

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 172個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線型

(ii) 分子型 : 蛋白質

(xi) 序列說明 : S E Q I D N O : 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	Val
		100					105						110		

Asn	Met	Asp	Pro	Ile	Val	Thr	Val	Lys	Lys	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ile	Tyr
	115					120						125			

Asp	Tyr	Leu	Gln	Glu	Lys	Gly	Tyr	Ser	Asp	Cys	Ala	Trp	Glu	Ile	Val
	130					135						140			

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(113)

(2) S E Q I D N O : 4 之 資 料 :

(i) 序 列 特 徵 :

(A) 長 度 : 172 個 胺 基 酸

(B) 種 類 : 胺 基 酸

(C) 股 型 : 單 股

(D) 拓 撲 學 : 直 線 型

(ii) 分 子 型 : 蛋 白 質

(xi) 序 列 說 明 S E Q I D N O : 4 :

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 His 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 Pro Cys 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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (114)

Val Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Thr Val
130 135 140

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 : 直線型

(ii) 分子型 : 蛋白質

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO : 5 :

Cys Tyr Leu Ser Arg Lys Leu Met Leu Asp Ala Arg Glu Asn Leu Lys
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 : 6 之資料 :

(i) 序列特徵 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(115)

(A)長度：31個胺基酸

(B)種類：胺基酸

(D)拓撲學：直線型

(ii)分子型：蛋白質

(xi)序列說明：S E Q I D N O : 6 :

Lys Asp Phe Gly Leu Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Asp Gln Leu Gln
 5 10 15

Lys Asp Gln Ala Phe Pro Val Leu Tyr Glu Met Leu Gln Gln Ser
 20 25 30

(2) S E Q I D N O : 7 之資料：

(i)序列特徵：

(A)長度：31個胺基酸

(B)種類：胺基酸

(D)拓撲學：直線型

(ii)分子型：蛋白質

(xi)序列說明：S E Q I D N O : 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

(2) S E Q I D N O : 8 之資料：

(i)序列特徵：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (116)

(A)長度：33個胺基酸

(B)種類：胺基酸

(D)拓撲學：直線型

(ii)分子型：蛋白質

(xi)序列說明：S E Q I D N O : 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

(2) S E Q I D N O : 9 之資料：

(i)序列特徵：

(A)長度：32個胺基酸

(B)種類：胺基酸

(D)拓撲學：直線型

(ii)分子型：蛋白質

(xi)序列說明：S E Q I D N O : 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		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(117)

(2)SEQ ID NO: 10 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: 直線型

(ii)分子型: 蛋白質

(xi)序列說明: 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:

(A)長度: 588個鹼基對

(B)種類: 核酸

(C)股型: 雙股

(D)拓撲學: 直線型

(ii)分子型: DNA (基因組的)

(iii)臆測型: 無

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(118)

(iv) 最初來源：

(C) 個體單離物：人類干擾素 T a u 之編碼序列

(ix) 特性：

(A) 名稱 / 關鍵字：CDS

(B) 座落：1..585

(xi) 序列說明：S E Q I D N O : 1 1 :

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 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 CAC TTT TGT CTG CAG GAC AGA AAA GAC TTC GCT TTA CCC CAG GAA	192
Pro His 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 CCA TGC CGC ACT GGA CTC	336
Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Pro Cys Arg Thr Gly Leu	
100 105 110	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(119)

CAT CAG CAG CTG GAC AAC CTG GAT GCC TGC CTG GGG CAG GTG ATG GGA His Gln Gln Leu Asp Asn Leu Asp Ala Cys Leu Gly Gln Val Met Gly 115 120 125	384
GAG GAA GAC TCT GCC CTG GGA AGG ACG GGC CCC ACC CTG GCT CTG AAG Glu Glu Asp Ser Ala Leu Gly Arg Thr Gly Pro Thr Leu Ala Leu Lys 130 135 140	432
AGG TAC TTC CAG GGC ATC CAT GTC TAC CTG AAA GAG AAG GGA TAC AGC Arg Tyr Phe Gln Gly Ile His Val Tyr Leu Lys Glu Lys Gly Tyr Ser 145 150 155 160	480
GAC TGC GCC TGG GAA ACC GTC AGA CTG GAA ATC ATG AGA TCC TTC TCT Asp Cys Ala Trp Glu Thr Val Arg Leu Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser 165 170 175	528
TCA TTA ATC AGC TTG CAA GAA AGG TTA AGA ATG ATG GAT GGA GAC CTG Ser Leu Ile Ser Leu Gln Glu Arg Leu Arg Met Met Asp Gly Asp Leu 180 185 190	576
ATG AGC TCA CCT TGA Met Ser Ser Pro 195	591

(2) S E Q I D N O : 1 2 之資料 :

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 195個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線型

(ii) 分子型 : 蛋白質

(xi) 序列說明 : S E Q I D N O : 1 2 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(120)

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 His 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 80
 His Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe His Thr Glu His Ser
 85 90 95
 Ser Ala Ala Trp Asp Thr Thr Leu Leu Glu Pro Cys 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 Gln 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 Arg Met Met Asp Gly Asp Leu
 180 185 190
 Met Ser Ser Pro
 195

(2) SEQ ID NO: 13 之資料:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 25個鹼基對

(B) 種類: 核酸

(C) 股型: 單股

五、發明說明 (121)

(D) 拓撲學：直線型

(ii) 分子型：cDNA (合成型)

(xi) 序列說明：S E Q I D N O : 1 3 :

CGCCGCGGTG GCTGCTACCT GTCGCGAAAA CTG

33

(2) S E Q I D N O : 1 4 之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：25個鹼基對

(B) 種類：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓撲學：直線型

(ii) 分子型：DNA (合成型)

(xi) 序列說明：S E Q I D N O : 1 4 :

CGAGGCTTAC GGAGAATTTT CAGGTCACCA CC

32

(2) S E Q I D N O : 1 5 之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：37個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (122)

(D) 拓撲學：直線型

(ii) 分子型：肽

(iii) 臆測型：無

(vi) 最初來源：

(C) 個體單離物：人類 T a u - I F N ,

片段 1 - 37 之胺基酸序列

(xi) 序列說明：S E Q I D N O : 1 5 :

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	His	Phe	Cys	Leu	Gln	Asp
		20					25						30		

Arg	Lys	Asp	Phe	Ala
		35		

(2) S E Q I D N O : 1 6 之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：31個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：直線型

(ii) 分子型：肽

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (123)

(iii) 臆測型：無

(vi) 最初來源：

(C) 個體單離物：人類 T a u - I F N ,

片段 3 4 - 6 4 之胺基酸序列

(xi) 序列說明：S E Q I D N O : 1 6 :

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) S E Q I D N O : 1 7 之資料：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：31個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：直線型

(ii) 分子型：肽

(iii) 臆測型：無

(vi) 最初來源：

(C) 個體單離物：人類 T a u - I F N ,

片段 6 2 - 9 2 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 (124)

(xi) 序列說明 : S E Q I D N O : 1 7 :

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	Pro	Cys	Arg	Thr	Gly	Leu	His	Gln	Gln	
			20					25					30		

(2) S E Q I D N O : 1 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 : 直線型

(ii) 分子型 : 肽

(iii) 臆測型 : 無

(vi) 最初來源 :

(C) 個體單離物 : 人類 T a u - I F N ,

片段 9 0 - 1 2 2 之胺基酸序列

(xi) 序列說明 : S E Q I D N O : 1 8 :

His	Gln	Gln	Leu	Asp	Asn	Leu	Asp	Ala	Cys	Leu	Gly	Gln	Val	Met	Gly
1				5				10					15		
Glu	Glu	Asp	Ser	Ala	Leu	Gly	Arg	Thr	Gly	Pro	Thr	Leu	Ala	Leu	Lys
			20					25					30		

Arg

(2) S E Q I D N O : 1 9 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 (125)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：32個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：直線型

(ii) 分子型：肽

(iii) 臆測型：無

(vi) 最初來源：

(C) 個體單離物：人類 T a u - I F N ,

片段 1 1 9 - 1 5 0 之胺基酸序列

(xi) 序列說明：S E Q I D N O : 1 9 :

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) S E Q I D N O : 2 0 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：直線型

(ii) 分子型：肽

五、發明說明 (126)

(iii) 臆測型：無

(vi) 最初來源：

(C) 個體單離物：人類 T a u - I F N ,

片段 1 3 9 - 1 7 2 之胺基酸序列

(xi) 序列說明：S E Q I D N O : 2 0 :

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

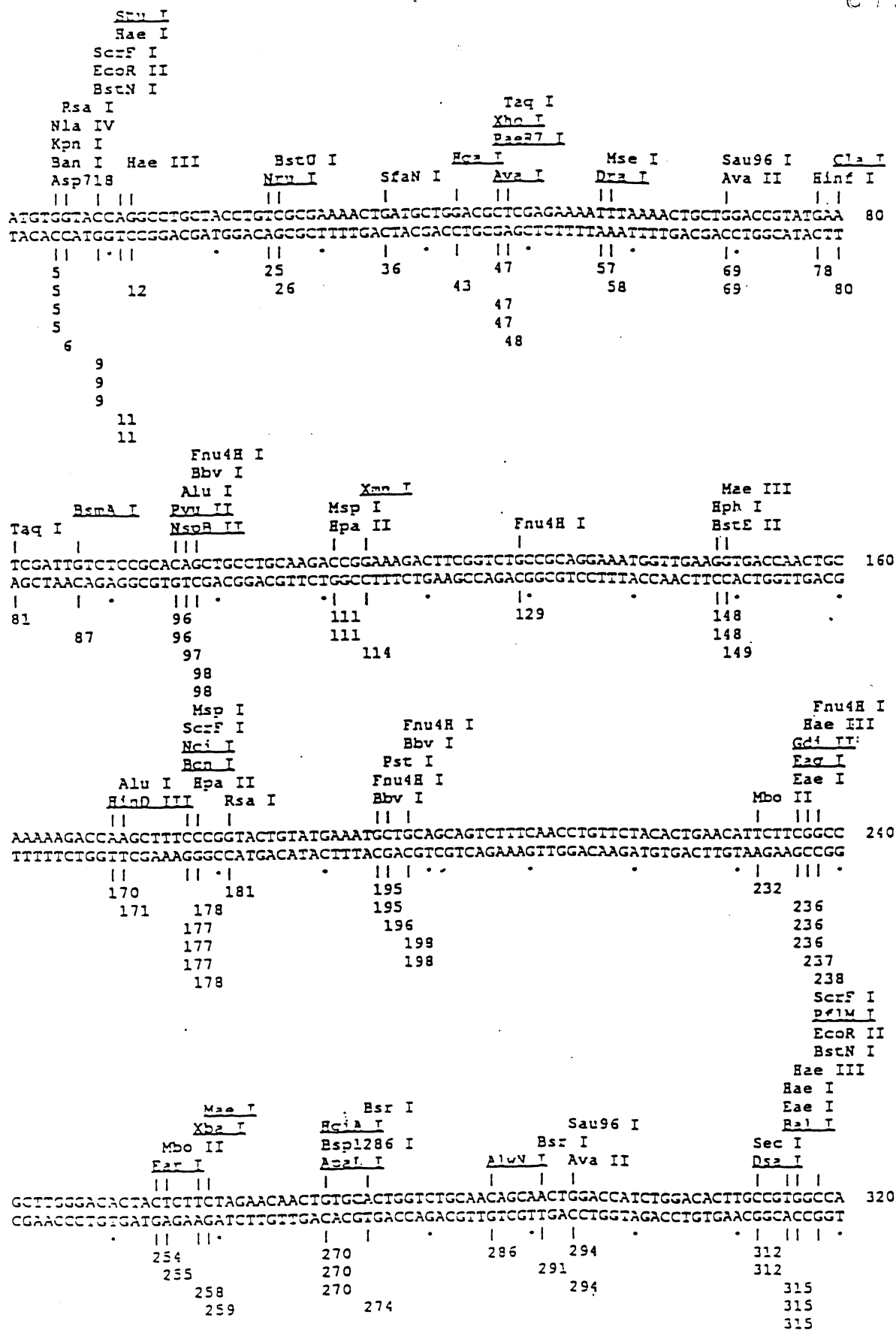
線

第 1 圖

METOTF-1.SEQ4 -> 限制酶 圖

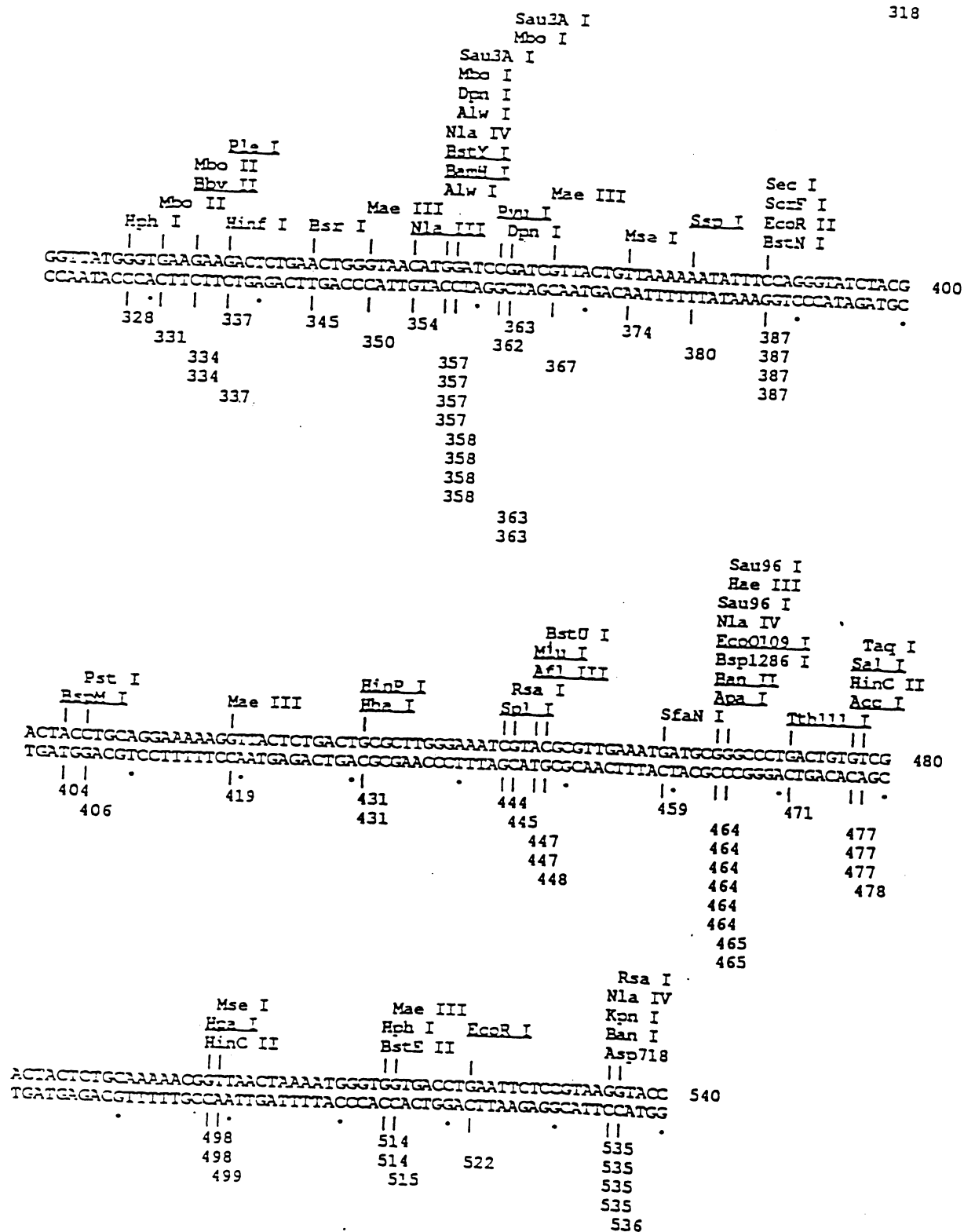
DNA 序列 540 鹼基對 ATGTGGTACCAG ... CCGTAAGGTACC 直線型

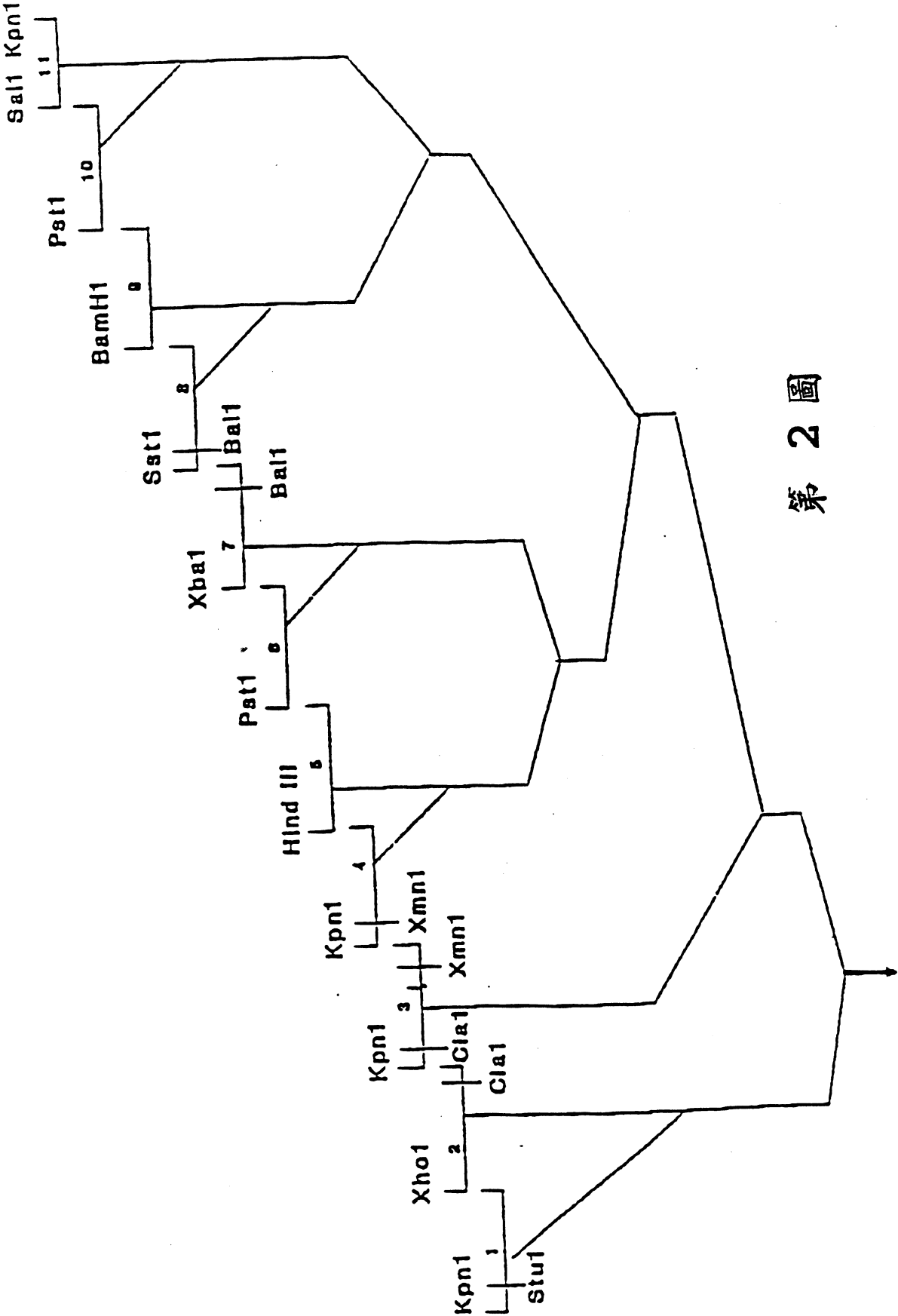
819124



第 1 圖 (續)

316
318
318
318
318





第 2 圖

```

-23
      met ala phe val leu ser leu leu met ala leu val leu val ser
oIFNr      cccc ATG GCC TTC GTG CTC TCT CTA CTG ATG GCC CTG GTG CTG GTC AGC
htIFN      cccc ATG GCC TTC GTG CTC TCT CTA CTC ATG GCC CTG GTG CTG GTC AGC

-8
      -1 +1
tyr gly pro gly gly ser leu gly cys tyr leu ser glu arg leu met leu asp ala
TAT GGC CCA GGA GGA TCT CTG GGT TGT TAC CTA TCT GAG AGA 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
arg glu asn leu lys leu leu asp arg met asn arg leu ser pro his ser cys leu
AAG GAG AAC CTC AAG CTC CTG GAC CCA ATG AAC AGA CTC TCC CCT CAT TCC TGT CTG
AAG AAG AAC CTC AAG CTC CTG GAC GAA ATG AAG AGA CTC TCC CCT CAC TTT TGT CTG
lys      arg      glu      arg

31
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
CAG GAC AGA AAA GAC TTC GCT TTA CCC CAG GAA ATG GTG GAG GGC GAC CAG CTC CAG
      ala
      gly

50
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
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 OCT GGC TOG GAC ACC ACC CTC CTG GAG CAG CTC TOC ACT
CAC ACA GAG CAC TCC TCT OCT GGC TOG GAC ACC ACC CTC CTG GAG CCA TOC COC ACT
his
      pro cys arg

88
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 TOC AAG GGT CAA GTG ATG GGA GAG
GGA CTC CAT CAG CAG CTG GAC AAC CTG GAT GGC TOC CTG GGC CAG GTG ATG GGA GAG
his      asn      ala      leu

107
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 GGC CTG GGA AAG ACC GGC CCC ACC CTG OCT CTG AAG AAG TAC TTC CAG
      ala      arg thr gly      thr leu ala leu      arg

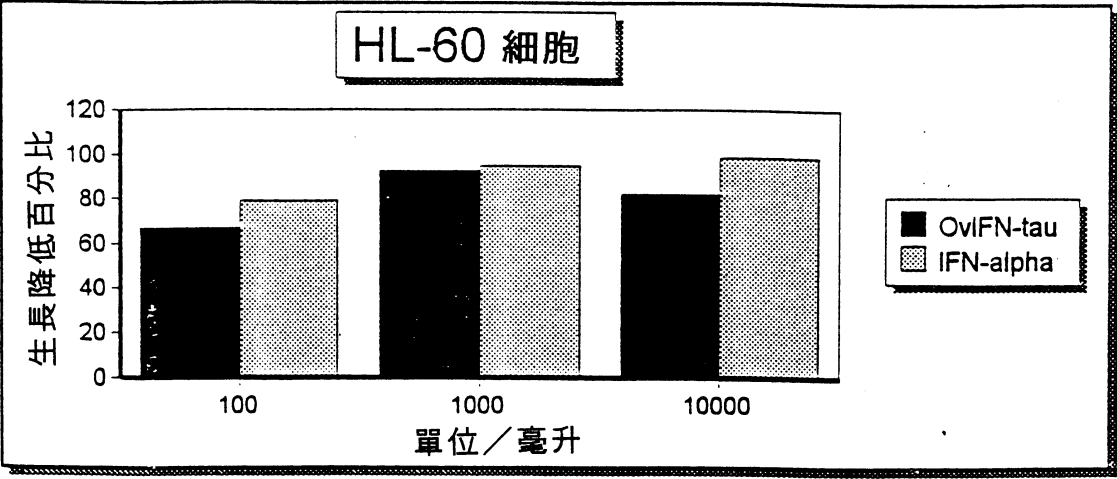
126
gly ile tyr asp tyr leu gln glu lys gly tyr ser asp cys ala trp glu ile val
GOC ATC TAT GAC TAC CTG CAA GAG AAG GGA TAC AGC GAC TOC GGC TOG GAA ATC GTC
GOC ATC CAT GTC TAC CTG AAA GAG AAG GGA TAC AGC GAC TOC GGC TOG GAA ACC GTC
his val      lys      thr

145
arg val glu met met arg ala leu met 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 AAG TTA ACA
AGA CTG GAA ATC ATG AGA TCC TTC TCT TCA TTA ATC AGC TTG CAA GAA AAG TTA AGA
leu      ile      ser phe ser ser leu ile ser      glu      arg

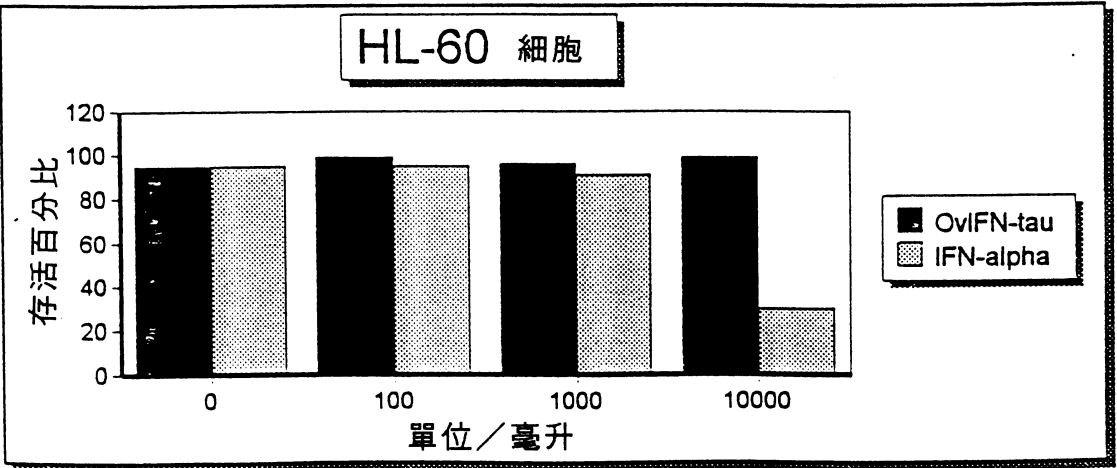
164
lys met gly gly asp leu asn ser pro end
AAG ATG GGT GGA GAT CTG AAC TCA CCT TGA
ATG ATG GAT GGA GAC CTG AGC TCA CCT TGA
met      asp      ser

```

第 4 圖



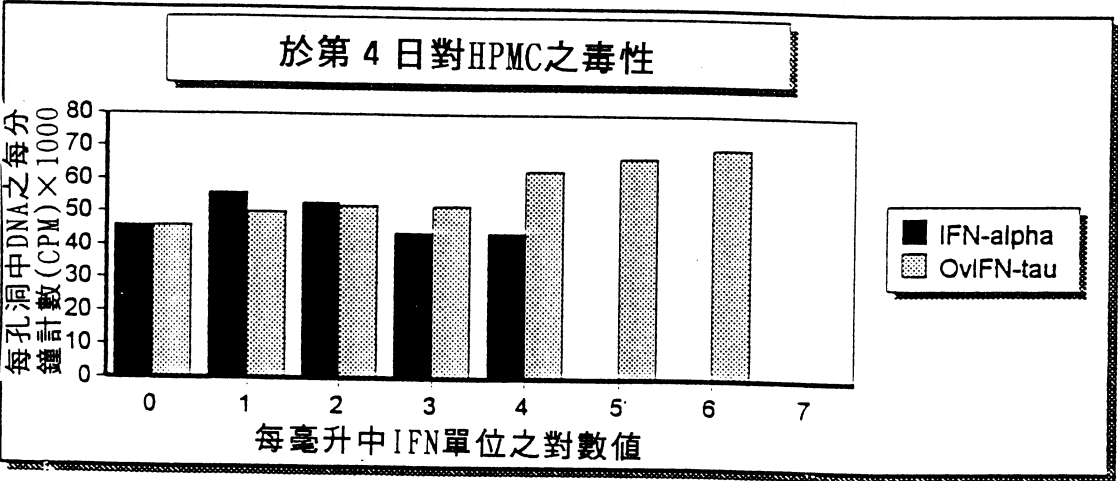
第 5 圖



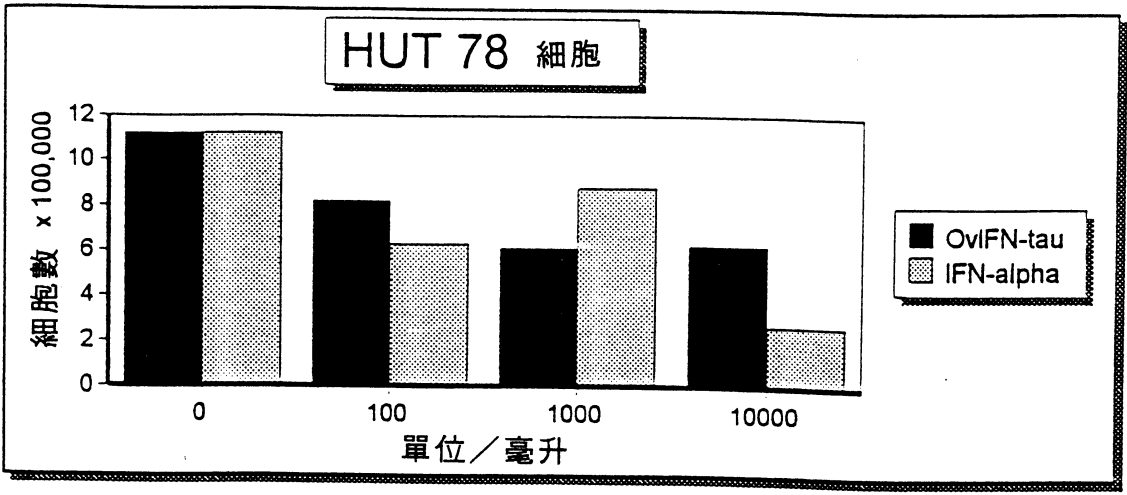
1
 CTGAGATGGGATCAGAGAACCTACCTGAAGGTTCCCCCTGACCCCATCTCAGCCAGCCAGCAGCAGCCGCATCTTCCC 30
 81
 ATG GCC TTC GTG CTC TCT CTA CTG ATG GCC CTG CTG GTG AGC TAT GGC CCA GGA GGA 140
 S1
 Met Ala Phe Val Leu Ser Leu Leu Met Ala Leu Val Leu Val Ser Tyr Gly Pro Gly Gly 140
 141
 TCT CTG GGT TGT TAC CTA TCT CGG AAA CTC ATG CTG GAT GCC AGG GAG AAC CTC AAG CTC 200
 S21
 Ser Leu Gly Cys Tyr Leu Ser Arg Lys Leu Met Leu Asp Ala Arg Glu Asn Leu Lys Leu 17
 201
 CTG GAC CGA ATG AAC AGA CTC TCC CCT CAT TCC TCT CTG CAG GAC AGA AAA GAC TTT GGT 260
 18
 Leu Asp Arg Met Asn Arg Leu Ser Pro His Ser Cys Leu Gln Asp Arg Lys Asp Phe Gly 37
 261
 CTT CCC CAG GAG ATG GTG GAG GGC GAC CAG CTC CAG AAG GAC CAG GCC TTC CCT GTG CTC 320
 38
 Leu Pro Gln Glu Met Val Glu Gly Asp Gln Leu Gln Lys Asp Gln Ala Phe Pro Val Leu 57
 321
 TAC GAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC AAC CTC TTC TCC ACA GAG CAC TCC TCT GCT GCC TGT 380
 58
 Tyr Glu Met Leu Gln Gln Ser Phe Asn Leu Phe Tyr Thr Glu His Ser Ser Ala Ala Trp 71
 381
 GAC ACC ACC CTC CTG GAG CAG CTC TGC ACT GGA CTC CAA CAG CAG CTG GAC CAC CTG GAC 440
 78
 Asp Thr Thr Leu Leu Glu Gln Leu Cys Thr Gly Leu Gln Gln Gln Leu Asp His Leu Asp 97
 441
 ACC TGC AGG GGT CAA GTG ATG GGA GAG GAA GAC TCT GAA CTG GGT AAC ATG GAC CCC ATT 500
 98
 Thr Cys Arg Gly Gln Val Met Gly Glu Glu Asp Ser Glu Leu Gly Asn Met Asp Pro Ile 117
 501
 GTG ACC GTG AAG AAG TAC TTC CAG GGC ATC TAT TCC TAC CTG CAA GAG AAG GGA TAC ACC 560
 118
 Val Thr Val Lys Lys Tyr Phe Gln Gly Ile Tyr Asp Tyr Leu Gln Glu Lys Gly Tyr Ser 137
 561
 GAC TGC GCC TGG GAA ATC GTC AGA GTC GAG ATG ATG AGA GCC CTC ACT GTA TCA ACC ACC 620
 138
 Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Met Met Arg Ala Leu Thr Val Ser Thr Thr 157
 621
 TTG CAA AAA AGG TTA ACA AAG ATG GGT GGA GAT CTG AAC TCA CCT TGA TGA CTCTTGGCGACT 666
 158
 Leu Gln Lys Arg Leu Thr Lys Met Gly Gly Asp Leu Asn Ser Pro 172
 AGATGCCACATCAGCCTCCTACACCCGCTGTGTTTCATTTGAGAACTCTGATTTCTGCTCCAGCCACCAATTCATG 754
 AATTACTTTAGCTGATACTTTGTGCTAGTAGTAAAAAGCAAGTAGATCTTAAAGTATTCAGCTGTAGGGGCATGAGTCCTGA 844
 AATGATGCCCTTCCCTGATGTTATCTGTTGCTGATTTATTTATACCCTTAGCATTTAACATACTTAAATATTAGGAAAT 924
 TTGTTAAGTTACATTTACATCTGTACATCATATTTAAATTTCTAAATCAAAAAAAAAA 972

肽	分子量	水解病變指數	序列
IFNτ(1-37) (SEQ ID NO:5)	4465	-0.78	CYSLRKMLDARENLKLLDRMNRLSPHSCLQDRKDFG
IFNτ(34-64) (SEQ ID NO:6)	3610	-0.72	KDFGLPQEMVEGDQLQKDQAFPVLYEMLQQS
IFNτ(62-92) (SEQ ID NO:7)	3586	-0.53	QQSFNLFYTEHSSAAWDTTLLEQLCTGLQQQ
IFNτ(90-122) (SEQ ID NO:8)	3712	-0.86	QQQLDHLDTCRGQVMGEEDSELGNMDPIVTVKK
IFNτ(119-150) (SEQ ID NO:9)	3948	-0.56	TVKKYFQGIYDYLQEKGYSDCAWEIVRVEMMR
IFNτ(139-172) (SEQ ID NO:10)	3818	-0.11	CAWEIVRVEMMRALTVSTTLQKRLTKMGDDLNSP

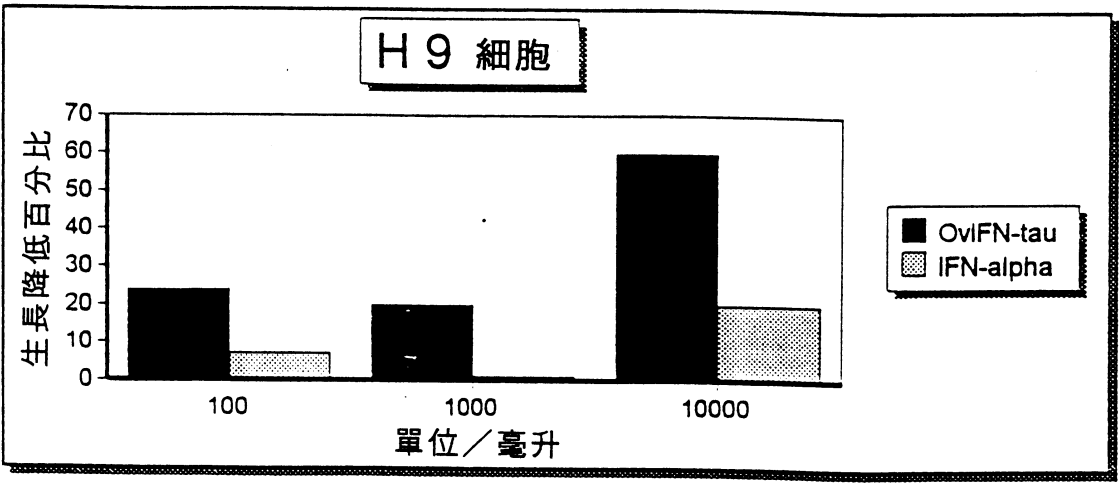
第 6 圖



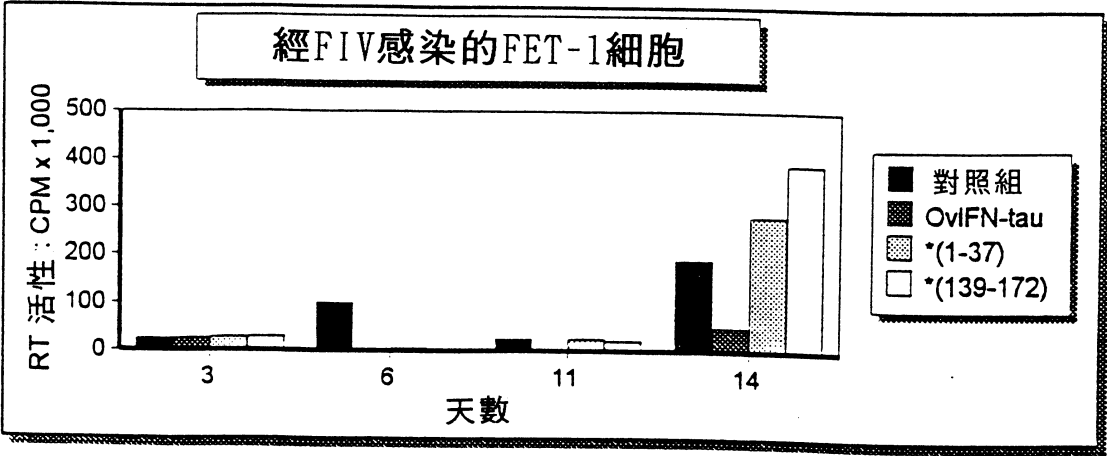
第 8 圖



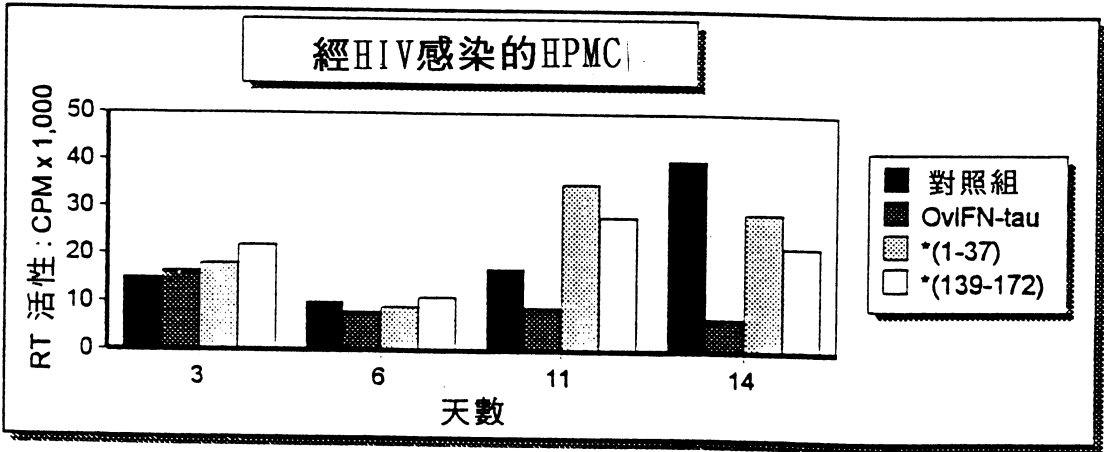
第 9 圖



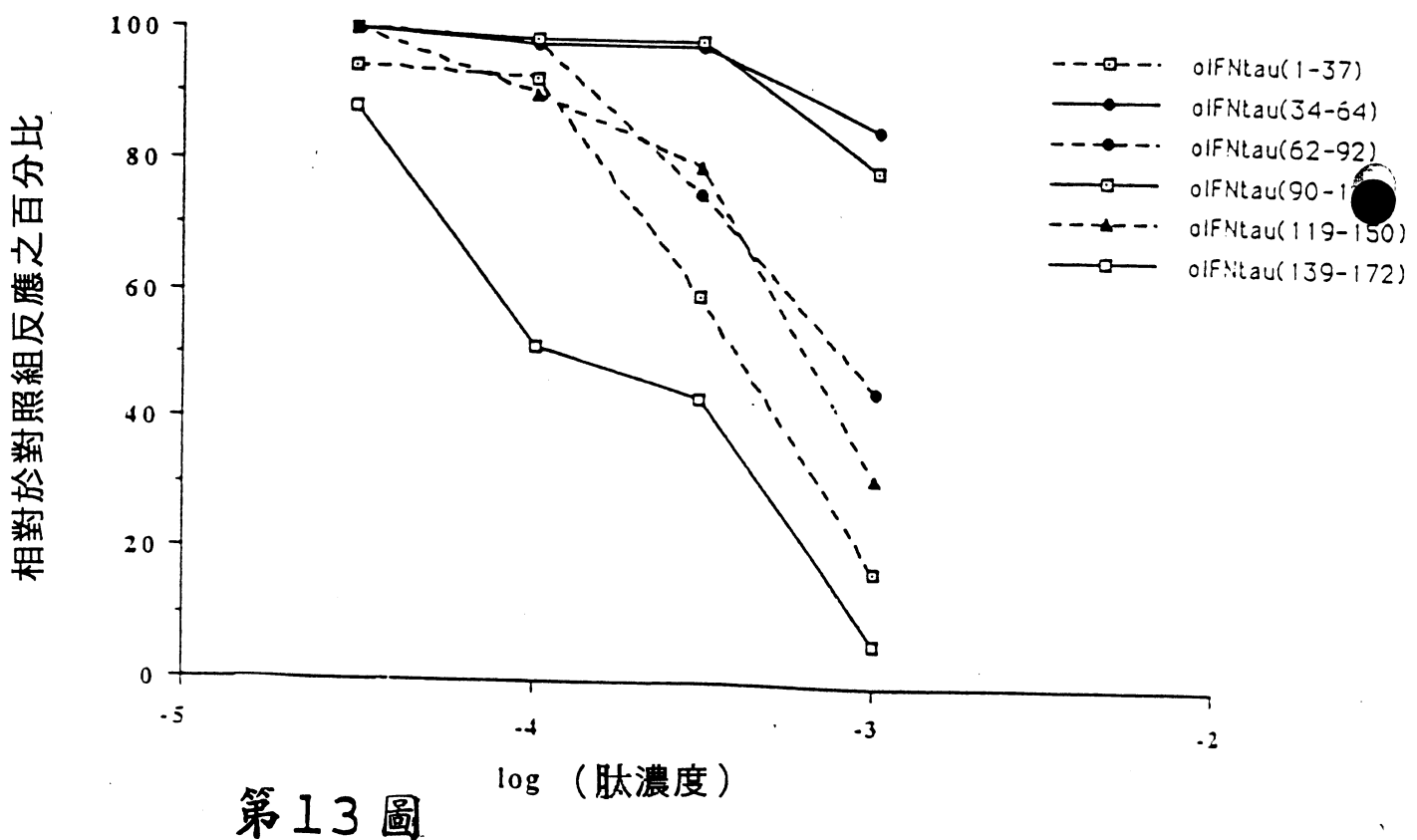
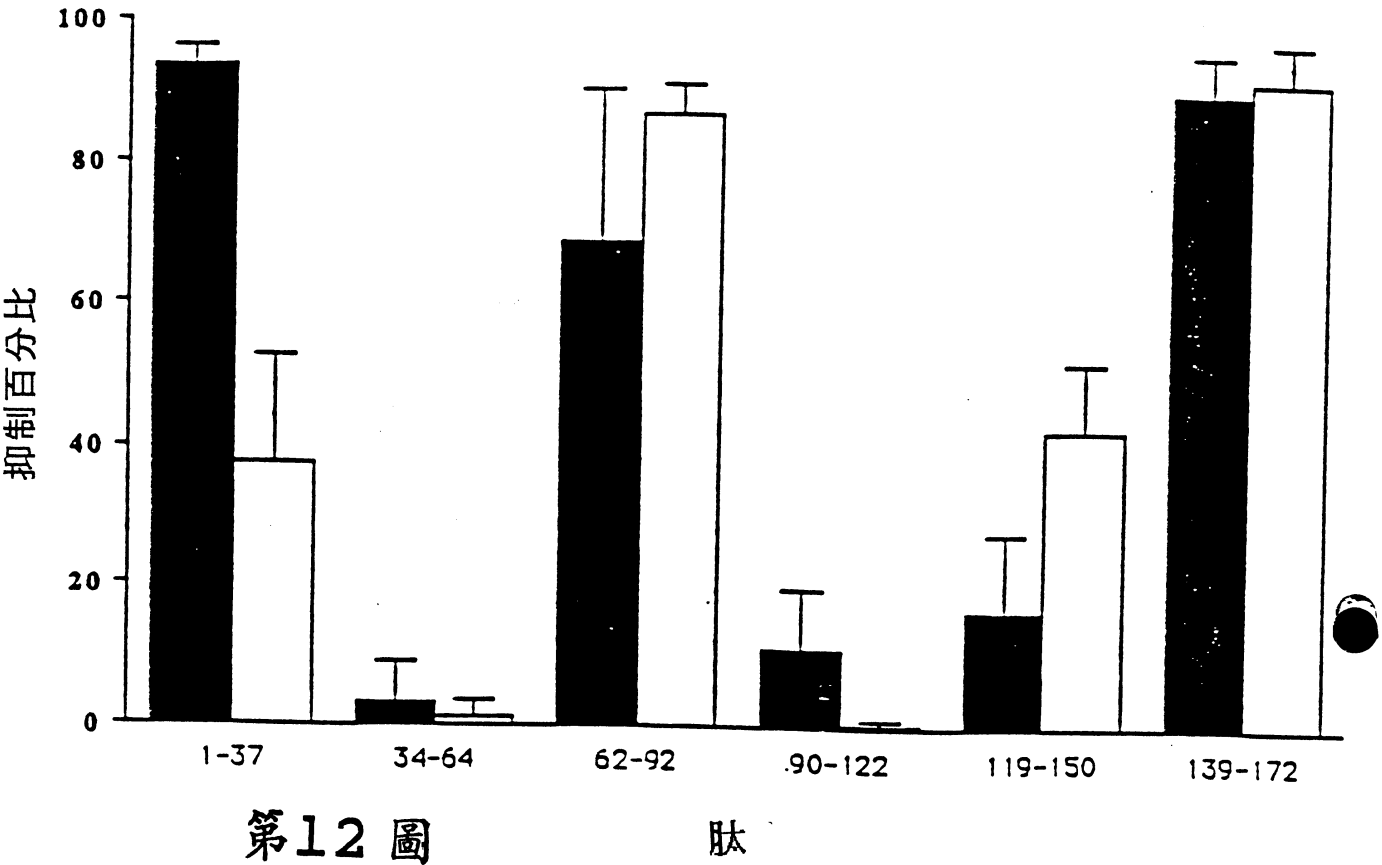
第10 圖

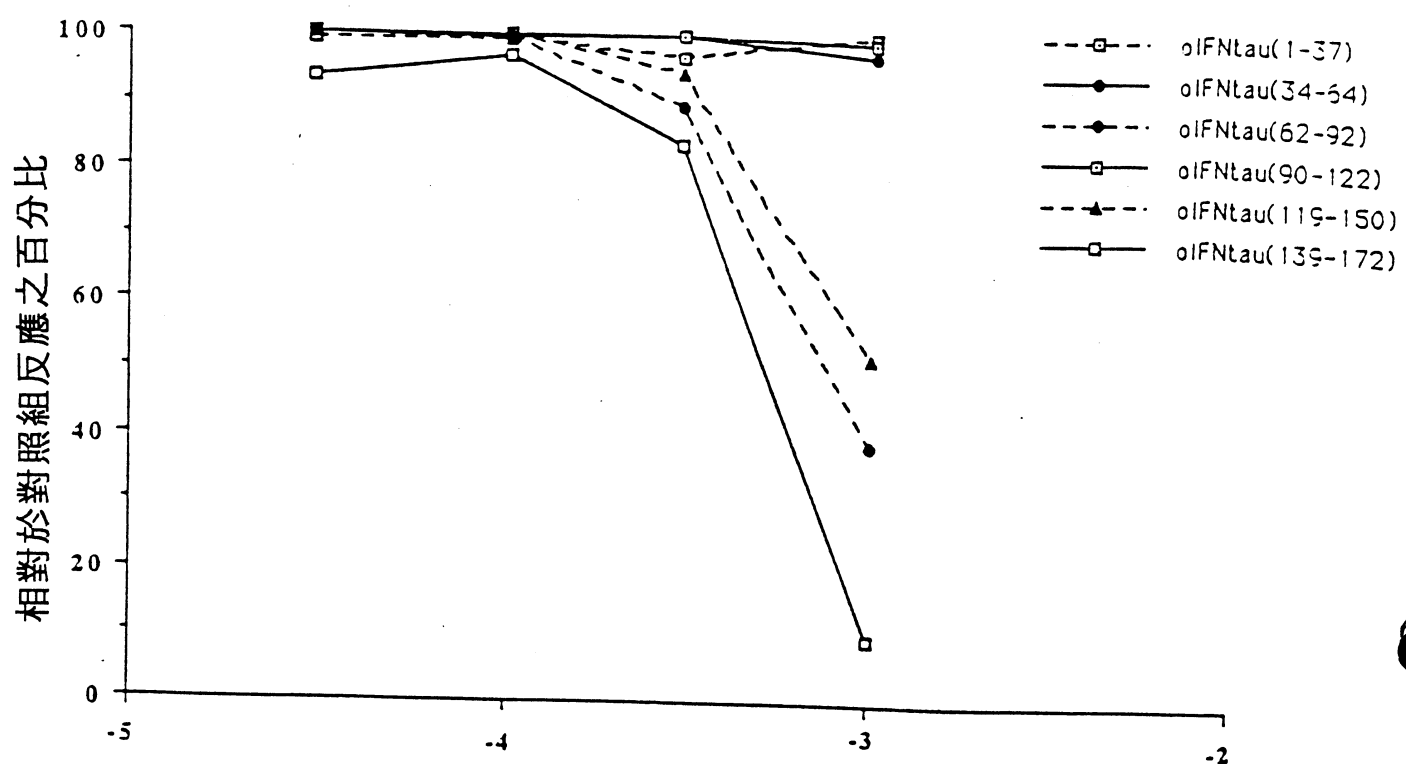


第11A圖

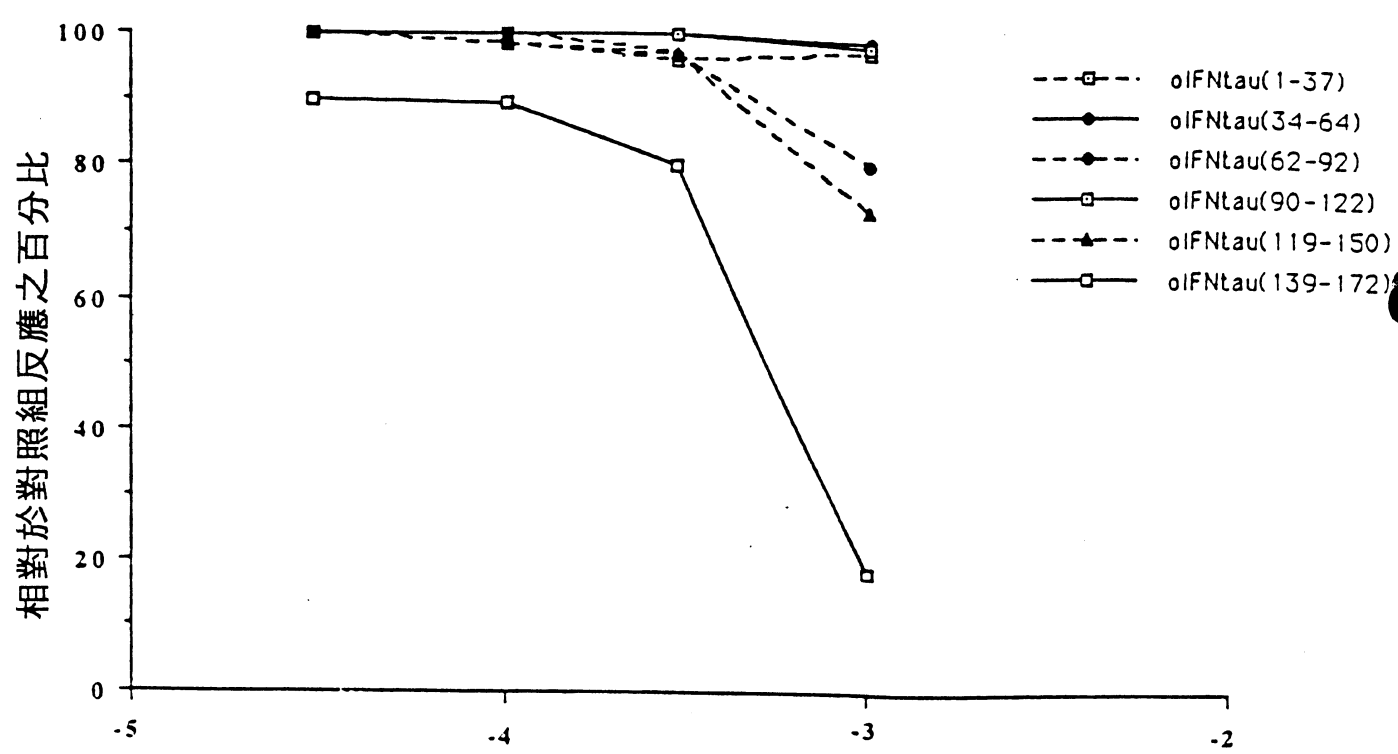


第11B圖

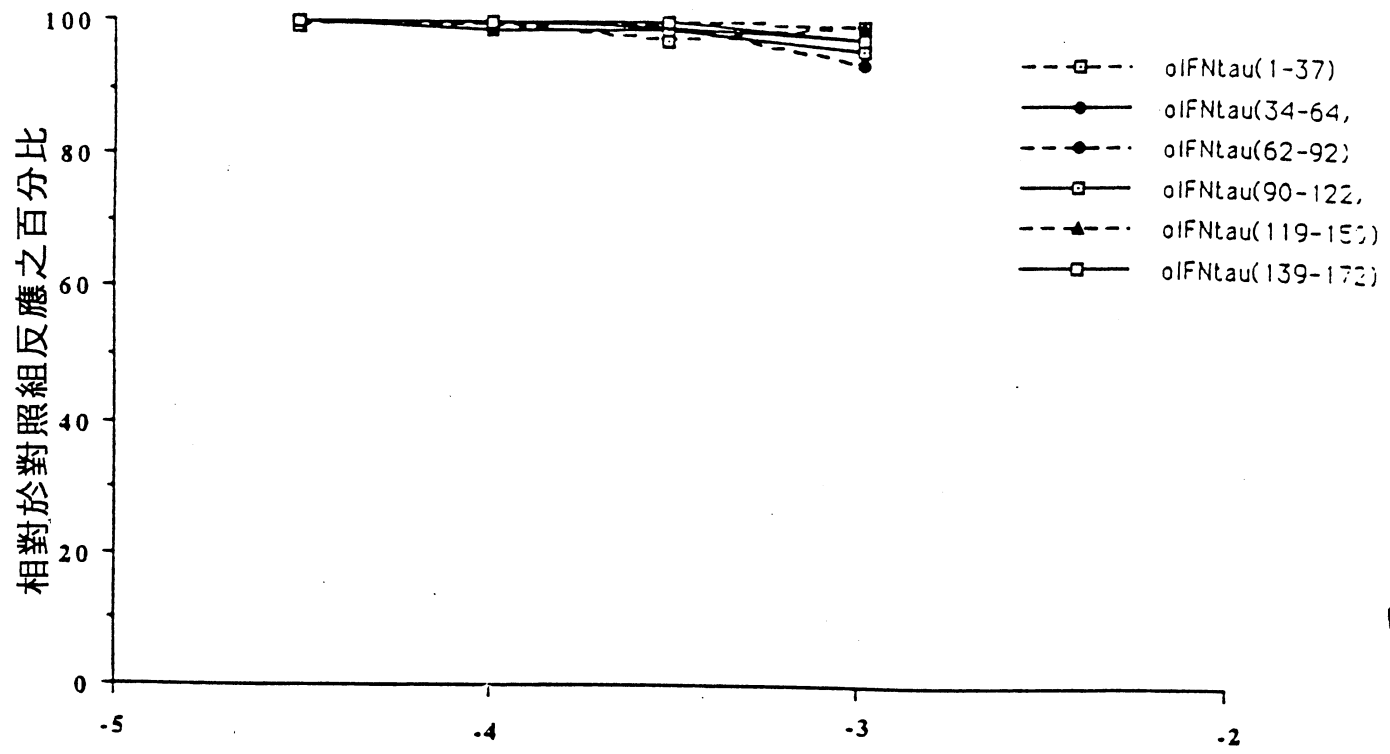




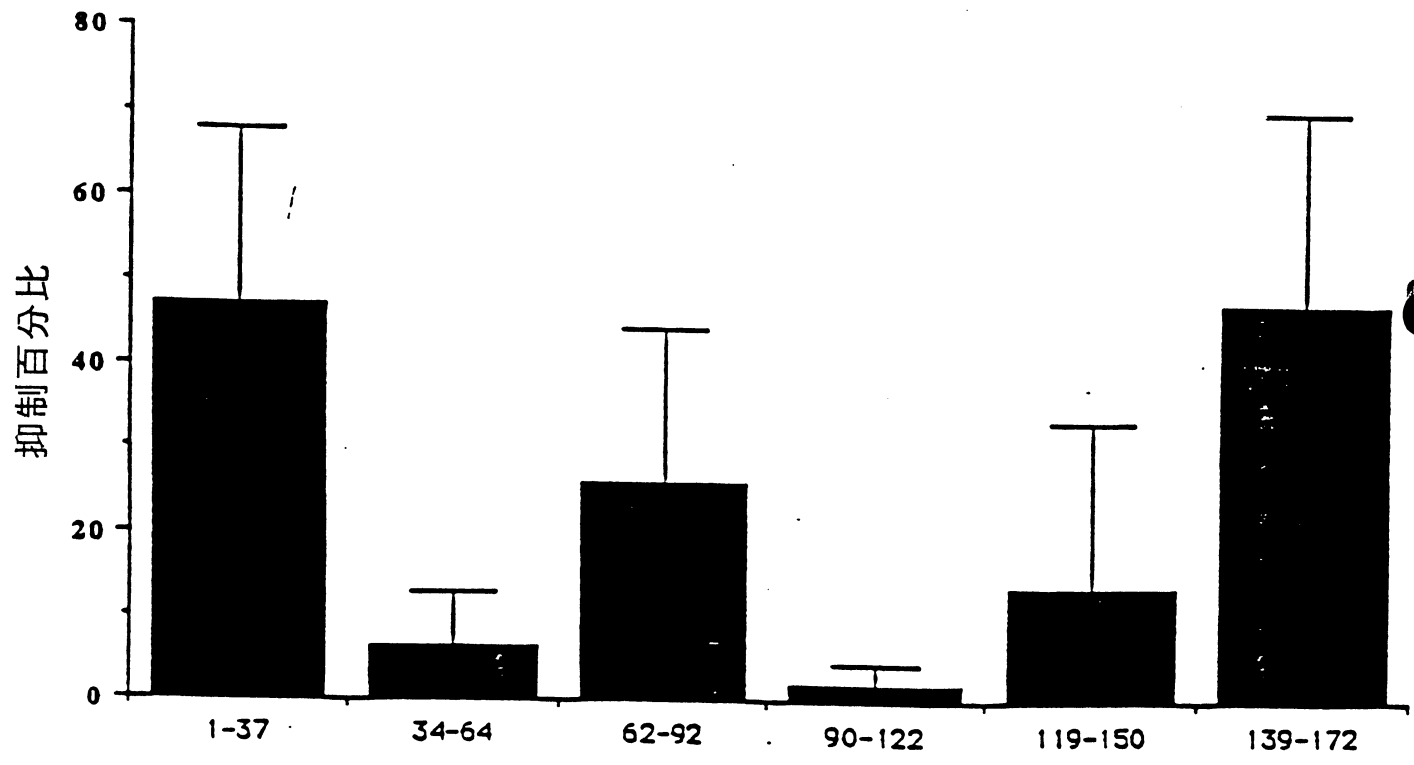
第14 圖



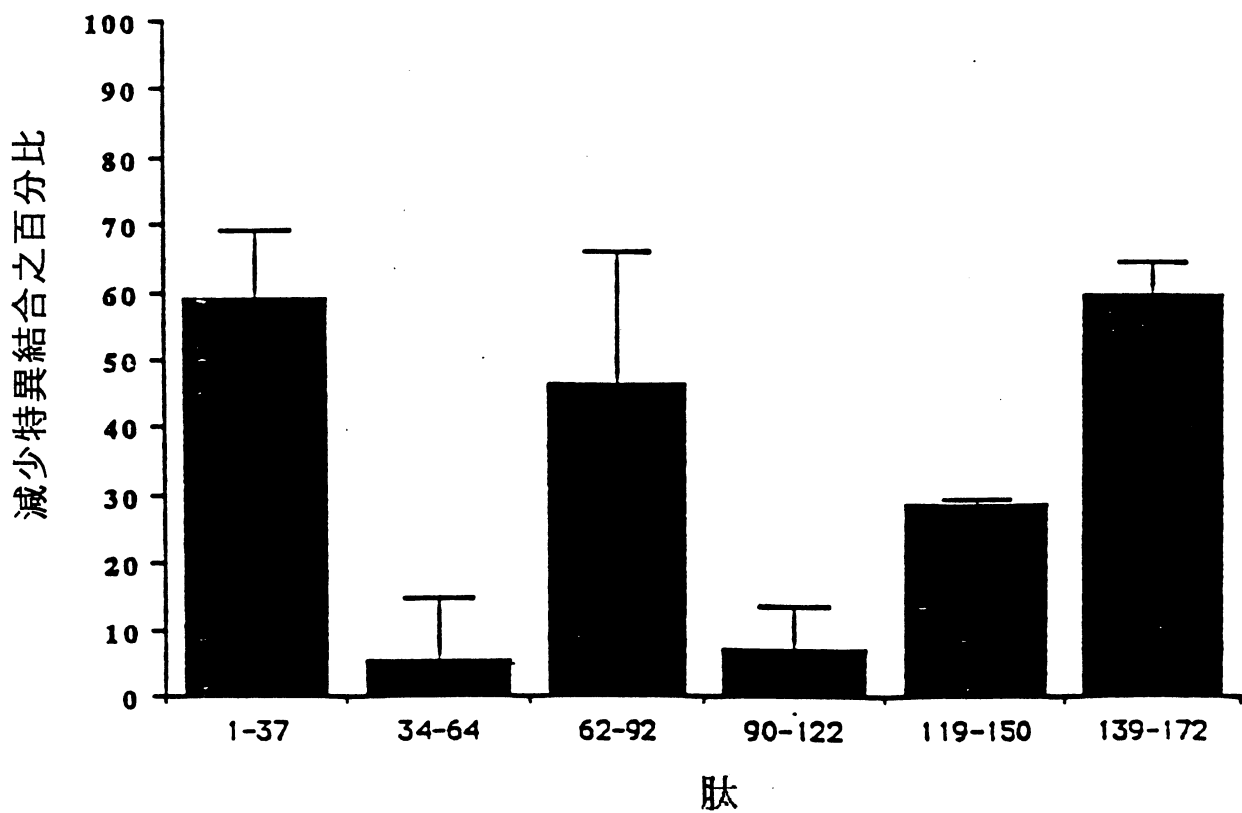
第15 圖



第16圖 log (肽濃度)



第17圖 oTP-1 肽



第 18 圖

修正
93.3.04 補充

四、中文發明摘要（發明之名稱：

牛及羊干擾素 T A U，其組成物及其醫藥用途

本發明描述牛及羊干擾素- τ 蛋白質及由其衍生之多肽的製備。並揭示這些蛋白質及多肽之抗病毒增殖及抗細胞增殖的特性。本發明蛋白質之優點之一為當這些蛋白質用來處理細胞時，不會有細胞毒性之副作用。牛及羊干擾素- τ 蛋白質之結構／功能之關係亦有描述。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

英文發明摘要（發明之名稱：

OVINE AND BOVINE INTERFERON TAU, COMPOSITIONS
THEREOF AND PHARMACEUTICAL USES THEREOF

The present invention describes the production of ovine and bovine interferon- τ proteins and polypeptides derived therefrom. The antiviral and anticellular proliferation properties of these proteins and polypeptides are disclosed. One advantage of the proteins of the present invention is that they do not have cytotoxic side-effects when used to treat cells. Structure/function relationships for the ovine and bovine interferon- τ protein are also described.

訂

線

六、申請專利範圍

附件 2A：第 89102648 號專利申請案
中文申請專利範圍替換本
民國 93 年 3 月 4 日呈

1. 一種融合多肽，包括

(a) 干擾素- τ 多肽，具有由 (i) 下示 S E Q

I D N O：1 核酸序列所編碼之胺酸酸序列

S E Q	I D	N O : 1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							</
-------	-----	---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

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 Glu 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 518
 Arg Leu Thr Lys Met Gly Gly Asp Leu Asn Ser Pro
 165 170

或是 (ii) 在嚴苛條件下與 S E Q I D N O : 1 核酸
 序列雜交且編碼具有抗病毒或抗增生活性之蛋白質的核酸
 序列所編碼之胺基酸序列；及

(b) 不為干擾素 - τ 的第二可溶性多肽，
 其中該融合多肽相較於該第二可溶性多肽本身在相同劑量
 下有較低的胞毒性。

2 . 如申請專利範圍第 1 項之融合多肽，其中該干擾
 素 - τ 具有如下 S E Q I D N O : 2 所示之胺基酸序
 列

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

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
115 120 125

Asp Tyr Leu Gln Glu Lys Gly Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val
130 135 140

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

3. 如申請專利範圍第1項之融合多肽，其中該干擾素- τ 係選自下列胺基酸序列，包括

SEQ ID NO:5:

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

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 ,
20 25 30

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 , 及
20 25 30

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

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.

4 . 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之融合多肽，其中該第二可溶性多肽是血清白蛋白。

5 . 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之融合多肽，其中該第二可溶性多肽是干擾素 - α 。

6 . 一種用於抑制細胞增生之藥學組成物，其含有融合多肽，該融合多肽包含如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之融合多肽。

7 . 一種用於抑制病毒於細胞內複製之藥學組成物，其含有融合多肽，該融合多肽包含如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之融合多肽。

8 . 如申請專利範圍第 6 或 7 項之藥學組成物，其中該融合多肽包含得自羊之干擾素 - τ 多肽。

9 . 如申請專利範圍第 6 項之藥學組成物，係用於抑制腫瘤細胞生長，其中該細胞是選自人類肉瘤細胞、人類血友病細胞、人類 T 淋巴瘤細胞、及人類黑色素瘤細胞。

10 . 如申請專利範圍第 9 項之藥學組成物，其中該細胞是對類固醇敏感之腫瘤細胞。

11 . 如申請專利範圍第 9 項之藥學組成物，其中該細胞是乳癌細胞。

12 . 如申請專利範圍第 7 項之藥學組成物，其中該

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

病毒是 R N A 病毒。

1 3 . 如申請專利範圍第 7 項之藥學組成物，其中該病毒是選自貓白血病毒，人類免疫不全病毒，及 C 型肝炎病毒。

1 4 . 如申請專利範圍第 7 項之藥學組成物，其中該病毒是 B 型肝炎病毒。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂