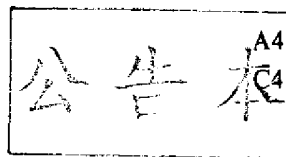


申請日期	PV 7.10
案 號	84107101
類 別	Int. 16 C. 7 K 14 / 21 A 61 K 38 / 20



(以上各欄由本局填註)

(84107101)

發 明 專 利 說 明 書 458984

一、發明 新 型	中 文	做為人類間白素-4之拮抗劑或部份促動劑的新穎突變型hIL-4蛋白質
	英 文	Novel mutant hIL-4 proteins as antagonists or partial agonists of human interleukin 4
二、發明 人 創 作	姓 名	1. 魏安諾 (Hanno Wild) 2. 克羅夫 (Rudolf Hanko) 3. 謝麥可 (Michael Dörschug) 4. 洪漢德 (Hans-Dietrich Hörlein)
	國 籍	5. 白傑健 (Jürgen Beunink) 6. 艾安諾 (Heiner Apeler) 7. 魏河曼 (Hermann Wehlmann)
三、申請人	住、居所	8. 史瓦特 (Walter Sebald) 1.-8. 皆德國籍 1. 美國康乃狄克州長河路397號 397 Longmeadow Road, Orange, Connecticut 06477, USA 2. 德國頓夫區史特街23號 Schillerstr. 23, 40237 Düsseldorf, Germany 3. 德國漢海區柏斯街5號 Buchenstr. 5, 42579 Heiligenhaus, Germany 4. 德國伍伯區保安街20號 Paul-Ehrlich-Str. 20, 42113 Wuppertal, Germany 5. 德國伍伯區史瓦街29號 Spitzwegstr. 29, 42329 Wuppertal, Germany 6. 德國伍伯區克地街3號 Claudiusweg 3, 42115 Wuppertal, Germany 7. 德國伍伯區馬斯街3a號 Mastweg 3a, 42349 Wuppertal, Germany 8. 德國瓦伯區梅歐街7號 Meyer-Olbersleben-Str. 7, 97074 Würzburg, Germany
	代 表 人 姓 名	

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6

B6

本案已向：

德國 國(地區) 申請專利，申請日期：1994, 7.1. 案號： ， ☐有 ☒無主張優先權
P 4423131.8

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

~2-2~

五、發明說明(1)

本發明關於新穎之突變型 hIL-4蛋白質，其製備方法，以及其作為醫藥品，尤其用於超常，錯誤引導之免疫反應與自體免疫疾病之用途。

其為或其包含 hIL-4之拮抗劑或部份促動劑，及此等拮抗劑或部份促動劑係突變型 hIL-4蛋白質，之治療組合物，業經由PCTW093/10235揭示。

人類間白素-4(hIL-4)為許多細胞激活素中的一種，其誘發並協調淋巴細胞與髓細胞之增殖，成熟，存活及分化。hIL-4尤其涉及IgE-參與之免疫反應，且直接增加胸腺細胞之增值速率並活化T細胞。以可確定一種具分子量(Mr)為140,000之高親和性IL-4受體蛋白質，其(根據其cDNA序列)由800個胺基酸殘基所組成。此蛋白質屬於最近經描述定義為血生成素受體超家族之受體組群中之成員。

根據其所選殖之cDNA，成熟IL-4之胺基酸序列由129個殘基組成。該cDNA已可於大腸桿菌與酵母菌中表現。具高生物活性之重組型IL-4可由此等來源獲得。

最近，已知有一種表現對人類間白素4具拮抗特性之單株抗體。此抗體含有一Fab片段，且係由人類/人類融合瘤細胞株製得。一種經由免疫對抗(未-)糖苷化人類IL-4之老鼠之脾臟細胞獲得之融合瘤細胞株，亦生產對抗hIL-4之單株抗體。

間白素4於過敏過程之角色，給予尋求一種抑制間白素-參與之過程，或與hIL-4競爭，而可阻斷引起疾病反應鏈之物質之希望。

五、發明說明 (2)

DE4137333A1描述其中出現於野生型之天然胺基酸於位置120,121,122,123,124,125,126,127或128其中之一或多處，被一或多種不同胺基酸取代之突變型hIL-4蛋白質。此等突變型hIL-4蛋白質為人類IL-4之拮抗劑或部份促動劑。

本發明係關於其為人類間白素4之拮抗劑或部份促動劑之新穎突變型hIL-4，且其中除了於位置121,124或125之置換外，已完成對hIL-4蛋白質之進一步修飾。此等修飾係用以增進突變型hIL-4之安定性，延長其生物半衰期或對製備與純化程序有所幫助。

為此，將天然存在野生型之胺基酸於一或多個位置上刪除或以其它胺基酸置換，或於C末端或N末端插入額外之胺基酸，以及或將一或多個胺基酸經不同的非-蛋白質聚合物（例如，聚乙二醇及其衍生物）或經糖苷基取代。

通常，於本發明之範圍內，胺基酸係表示如下：

Ala	L-丙胺酸
Arg	L-精胺酸
Asn	L-天冬醯胺
Asp	L-天冬胺酸
Cys	L-半胱胺酸
Gln	L-麩氨醯胺
Glu	L-麩胺酸
Gly	L-甘胺酸
His	L-組胺酸

五、發明說明 (3)

Ile	L-異白胺酸
Leu	L-白胺酸
Lys	L-離胺酸
Met	L-甲硫胺酸
Pro	L-脯胺酸
Phe	L-苯丙胺酸
Ser	L-絲胺酸
Thr	L-羥丁胺酸
Trp	L-色胺酸
Tyr	L-酪胺酸
Val	L-纈胺酸

為求簡便，可將表示組態之指標省略。

非-蛋白質聚合物意指，例如，聚乙二醇，聚丙二醇或聚氧基烯類，如揭示於美國專利第4,640,835，4,496,689，4,301,144，4,670,417，4,791,192或4,179,337號者。

糖苷化作用經了解係指將碳水化合物骨架聯結至天冬醯胺之側鏈("N-糖苷化作用")或指將糖類(較佳為N-乙醯基半乳糖，半乳糖或木糖)偶合至絲胺酸，羥丁胺酸，4-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸(O-糖苷化作用)。

較佳之突變型hIL-4蛋白質為其中胺基酸124(酪胺酸)，與胺基酸121(精胺酸)及胺基酸125(絲胺酸)以任何所希望組合形式，被可能之天然胺基酸置換，且其中該分子之N-末端及/或C-末端又被修飾，並且/或有一或多個聚乙二

五、發明說明 (4)

醇分子共價結合至該分子，且/或某些或全部存在該分子中之糖苷化作用部位已經缺失者。

此類中特別較佳之突變型hIL-4蛋白質為其，中胺基酸124(酪胺酸)，胺基酸121(精胺酸)與胺基酸125(絲胺酸)以任何所希望組合形式，被天冬胺酸或麩胺酸置換，且其中該分子之N-末端及/或C-末端又被修飾，並且/或有一或多個聚乙二醇分子共價結合至該分子，且/或某些或全部存在該分子中之糖苷化作用部位已經缺失之突變蛋白質。

其它較佳之替代形式為，胺基酸121(精胺酸)與胺基酸125(絲胺酸)被天然胺基酸(較佳為天冬胺酸或麩胺酸)置換，且其中該分子之N-末端及/或C-末端又被修飾，並且/或有一或多個聚乙二醇分子共價結合至該分子，且/或某些或全部存在該分子中之糖苷化作用部位已經缺失者。

特別較佳之突變型hIL-4蛋白質，亦為該等其中胺基酸124(酪胺酸)被天然胺基酸置換，而0-1個另外位於位置121與/或125之胺基酸被其它可能之胺基酸置換，且其中該分子之N-末端及/或C-末端又被修飾，並且/或有一或多個聚乙二醇分子共價結合至該分子，且/或某些或全部存在該分子中之糖苷化作用部位已經缺失者。

此類中特別較佳之突變型hIL-4蛋白質為其中胺基酸124(酪胺酸)，被天冬胺酸或麩胺酸置換，而位置121係被其它可能胺基酸(較佳為天冬胺酸或麩胺酸)置換，且其中該分子之N-末端及/或C-末端又被修飾，並且/或有一或多個聚乙二醇分子共價結合至該分子，且/或某些或全部

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (5)

存在該分子中之糖苷化作用部位已經缺失之突變蛋白質。

上述實例中之較佳N-末端修飾形式為，將一胺基酸（較佳係Ala, Gly, Pro, Ser, Thr, Val, 且以Ala為最佳）插入N-末端之甲硫胺酸與突變型IL-4蛋白質之天然N-末端之間。

此類經表現製造之實施例為：

Ala(-1)-Tyr(124)Asp

Ala(-1)-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp

Ala(-1)-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp

Ala(-1)-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp

Ala(-1)-Arg(121)Asp-Ser(125)Asp。

上述變異體中糖苷化作用部位缺失之較佳型式為，於位置38之天冬醯胺酸，被其它天然胺基酸（較佳為天冬胺酸）置換，及/或位置105之天冬醯胺，被其它胺基酸置換（較佳為天冬胺酸）置換。

此類經表現製造之實施例為：

Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Tyr(124)Asp

Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp

Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Arg(121)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp

Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Tyr(124)Asp-Ser(125)Asp

Asn(38)Asp-Asn(105)Asp-Arg(121)Asp-Ser(125)Asp

hIL-4可藉由重組DNA之技術（如於大腸桿菌中），製造成重組型蛋白質（rhIL-4）。於此等情況下形成之蛋白質，可經溶解化復原及分離。然後該rhIL-4具高專一性之生物活性，其可藉由，例如，測量被活化細胞之DNA合成/增殖

五、發明說明 (6)

，或由被活化B細胞所表現之CD23而測定得〔參照，克魯斯(Kruse), N.等人(1991)FEBS Lett. 286, 58-60；柯古塔尼(Kikutani), H.等人(1986)細胞 47, 657-665〕。

關於包含編碼hIL-4成熟區域之DNA區域，或編碼hIL-4成熟區域之cDNA之獲得，則參考橫田, T.，雄田, T.，摩斯曼(Mosmann), T.，邦吉勞(Banchereau), J.，迪法蘭斯(De France), T.，伯蘭恰得(Blanchard), D.，迪佛利斯(De Vries), J.E.，李, F.與艾利(Arai). K. I. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 5894-5898及其中所引用之文獻。於本文中，"編碼hIL-4成熟區域之cDNA"意指，表現經該項技藝所特定之確實cDNA之突變型（然而具有大約相同數目之鹼基對）之cDNA，其包含於提供作為拮抗劑或部份促動劑之hIL-4突變蛋白質之範圍中。

關於連續定數編碼hIL-4成熟區域之DNA區域，則依照加耳(Garr), C.等人，生物化學 1991, 30, 1515-1523所公開者。

編碼hIL-4成熟區域之cDNA，可藉由將EcoRV/BamHI片段從以重組製備得之cDNA(例如購置英國生物-科技股份有限公司，牛津，英格蘭)切除而獲得。該DNA片段係藉添加合成寡核苷酸(如5'-CATGCACAAGTGCGAT與5'-ATCGCACTTGTG，其含有間白素之前4個胺基酸密碼，及起始甲硫胺酸之密碼)整合入一表現載體中，例如併入表現載體pRTSpRC109之NcoI與BamHI切割部位之間〔參照：威格(Weigel), U.，麥耳(Meyer), M.與錫巴得(Sebald), W. (1989) Eur.

五、發明說明 (7)

J. Biochem. 180, 295-300]。

IL-4之胺基酸序列變異體，係藉由將適當，經改變之核苷酸插入編碼IL-4 DNA中，或藉由於活體外合成所希望形式之IL-4而製得。具此特性之變異體之實例，係IL-4胺基酸序列中之殘基之缺失或插入或取代。本發明中，允許任何缺失，插入與取代之組合形式，以達成提供表現所希望特性之最後構築結構。該等胺基酸之改變亦可能改變IL-4之轉譯後處理，例如，IL-4之糖苷化作用部位之數目或位置，膜上固定特性及 / 或於細胞內之定位，可能因對天然IL-4之引導序列進行插入，缺失或某些其它影響作用而改變。

當在構築IL-4之胺基酸序列變異體時，突變部位之定位及突變作用之本質，取決於欲被改變之IL-4之特性。突變作用部位可個別地或連續地改變，例如藉由(1)首先以保守選擇之胺基酸取代，然後依所達成之結果以較徹底之選擇進行取代，(2)將標的殘基缺失或(3)於所定位部位之左右插入殘基。

用以確定作為較佳突變生成部位之特定IL-4殘基，或區域之適宜方法為，由康寧漢(Cunningham)與威爾斯(Wells)(科學，244：1081-1085，1989)所述之“丙胺酸-掃描式突變生成”。於此方法中，一個或一組標的殘基被確定出(例如帶電荷之殘基如Arg, Asp, His, Lys與Glu)，並以中性或代負電荷之胺基酸(較佳為丙胺酸或苯丙胺酸)置換，以此方式，係為影響胺基酸與細胞中，或細胞外鄰近

五、發明說明 (8)

含水環境之交互作用。然後再經由與取代部位引入另外或不同之變異體，處理以官能基敏感性方式，對取代作用反應之區域。此意為：雖然改造作用本身之性質並未被事先決定，然而用以引入胺基酸序列改造之位置可被事先決定出來。

因此，為使於特定位置之突變技巧達到完善，丙胺酸掃描方法，或隨機突變產生方法，可於具表現業經篩選，以達成所希望特性的 IL-4 變異體，之最佳組合形式之標的密碼或標的區域處完成。

因而當在構築該等胺基酸序列變異體時，有兩種主要變數，即，突變作用之部位與突變作用之本質。

通常，於具有約 1 至 30 個殘基（較佳地約 1 至 10 個殘基）之胺基酸序列中進行缺失作用，係一個一個地進行。一般，此等缺失作用直接影響並排之胺基酸殘基。

連續缺失之數目取決於 IL-4 中被影響區域之三級結構，例如所保持之半胱胺酸交聯，貝他平板結構或阿爾伐螺旋結構。

於胺基酸序列中之插入作用，包括具有長度從 1 個單一殘基多至含 100 或更多個殘基之多肽類，之胺基-末端及/或羧基-末端融合，以及位於一序列（具一或多個胺基酸）中之插入作用。於序列中特定位置之插入作用（即 IL-4 序列內之插入作用），一般可包含大約 1 至 10 個殘基，較佳為 1 至 5，且最好為 1 至 3 個殘基。末端插入作用之實例為，具有 N-末端甲硫胺鹽基殘基之 IL-4（此為於重組型細菌細胞

五、發明說明 (9)

培養中，直接表現I-4之人為結果)，介於甲硫胺酸與天然N端間之一或多個額外胺基酸插入，以增進甲硫胺酸之去除(例如藉由內生性細菌蛋白酶)，及將異源性N-末端信號序列，接至IL-4分子N-末端之融合作用，以促使成熟IL-4從重組型宿主細胞中分泌出來，或聚胺基酸(如聚組胺酸)之融合作用，以助於將IL-4分離。通常，此等訊號序列係選自所預定之宿主細胞型，且因而與該等細胞型同源。適宜之序列實例為，用於大腸桿菌細胞之ompA, ompT, phoA, molE, amp或pelB，用於酵母菌細胞之阿爾伐因子，澱粉酶，轉化酶，殺手毒素與米里素(Millitin)前原肽，及用於哺乳動物細胞之病毒信號，如疱疹gD。

其它較佳之訊號序列為間白素-4之天然訊號序列。

特別較之訊號序列，為該等由確實表現生物體自己切除者，以使突變型間白素-4蛋白質含有天然之N-末端。於訊號序列已被切除後之較佳表現產物為：

Tyr (124) Asp

Arg (121) Asp-Tyr (124) Asp

Arg (121) Asp-Tyr (124) Asp-Ser (125) Asp

Tyr (124) Asp-Ser (125) Asp

Arg (121) Asp-Ser (125) Asp。

另外之IL-4插入變異體，包括融合至IL-4 N末端或C末端之免疫生成多肽，例如細菌多肽類如貝他-內醯胺酶，或由大腸桿菌 trp區域編碼之酵素，或是一種酵母菌蛋白質，以及使蛋白質具有長半衰期之C-末端融合，例如，免

五、發明說明 (10)

疫球蛋白固定之區域(或其它免疫球蛋白區域)，白蛋白或鐵蛋白—參照：於W0 89/029225中之敘述(公告於 1989年4月6日)。另一組變異體為，具有胺基酸取代作用者。此等變異體中，至少有一個IL-4分子之胺基酸殘基被不同殘基置換。

一般天然之殘基依其支鏈特徵可分類為：

- (1) 厭水性：Met, Ala, Val, Leu與Ile；
- (2) 中性親水性：Cys, Ser與Thr；
- (3) 酸性：Asp與Glu；
- (4) 鹼性：Asn, Gln, His, Lys與Arg；
- (5) 影響鏈位向之殘基：Gly與Pro；及
- (6) 芳香族：Trp, Tyr與Phe。

非保守性取代作用意指其中胺基酸被其它類胺基酸置換。

胺基酸取代作用之一項用途，為改變多肽之天然糖苷化作用形式。

“改變”意指造成天然IL-4中一或多個碳水化合物骨架之缺失，及/或於天然IL-4中添加一或多個，原先不存在之糖苷化作用部位。通常係以N-連結或以O-連結之方式，將多肽糖苷化作用。“N-連結”意指將碳水化合物骨架，偶合至天冬醯胺殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸，與天冬醯胺-X-羥丁胺酸(其中X可為除了脯胺酸外之其它胺基酸)，為酵素性催化碳水化合物，偶合至天冬醯胺側鏈之辨識序列。有此等三肽序列存在多肽中，則產生一

五、發明說明 (11)

可能之糖苷化作用部位。"O-連結"意指，將糖類N-乙醯基半乳糖，半乳糖或木糖，偶合至羥基胺基酸（通常為絲胺酸或羥丁胺酸，而亦可使用4-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸）。

藉由改變胺基酸序列，使其含有一或多個上述三肽序列（用於N-連結糖苷化部位）之方式，而在IL-4添加糖苷化作用部位，並不困難。該項改變，同樣可藉將絲胺酸或羥丁胺酸殘基，添加或取代至天然IL-4序列來達成（用於O-連結糖苷化作用部位）。為使該方法更簡便，較佳地於DNA層次上，改變IL-4胺基酸序列，尤其藉由將編碼IL-4之DNA，於預先選定之鹼基上突變，以使所製出之密碼，經轉譯成為所希望之胺基酸。以相同方式，為完成所希望碳水化合物骨架之缺失作用，藉由將該三肽之全部或部份取代或刪除，而改變已存在之一或多個三肽序列（用於N-連結糖苷化作用）。於O-糖苷化作用部位之情況中，碳水化合物骨架，可藉由將相對應之胺基酸，取代或刪除而被去除。

另一項用以增加IL-4中碳水化合物骨架數目之選擇，為將糖苷化學或酵素偶合至該多肽上。這些方法之優點在於，其不需要於宿主細胞中，製備可提供N-連結或O-連結糖苷化作用之多肽。視所使用之偶合機制而定，可將糖類連結至(a)精胺酸與組胺酸；(b)游離羧基 (c)如胱胺酸之游離氫硫基，(d)如絲胺酸，羥丁胺酸，羥基脯胺酸之游離羥基，(e)如苯甲胺酸，酪胺酸或色胺酸之芳香殘基；或(f)麩氨醯胺之胺基。此等方法揭示於W0 87/05330（公

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 (12)

告於1987年9月11日)，及艾普林(Aplin)與威斯頓(Wriston)之CRC Crit. Rev. Biochem., pp.259-306 (1981)中。

除了上述方法外，化學或酵素方法亦可用於，將存在天然IL-4中之碳水化合物骨架去除。於化學去糖苷化作用中，需要將該多肽暴露於化合物，三氟甲磺酸或相當化合物中。此處理造成除連結糖(N-乙醯基葡萄糖或N-乙醯基半乳糖)外，大部分或全部糖基之去除，然該多肽仍維持完整。化學去糖苷化作用，係揭示於哈奇慕汀(Hakkimuddin)等人，Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987)，及亞吉(Edge)等人，Anal. Biochem., 118: 131 (1981)。多肽中碳水化合物骨架之酵素去除法，可藉使用一系列由托塔庫拉(Thotakura)等人(Meth. Enzymol., 138: 350 (1987)，所述之內糖苷酶及外糖苷酶來達成。

可藉使用衣纖維素，來防止於可能糖苷化作用部位之糖苷化作用，其經揭示於杜斯金(Duskin)等人之〔J. Biol. Chem., 257: 3105 (1982)〕。衣纖維素阻斷蛋白質-N-糖苷連結之形成。

另一型IL-4之供價修飾，包括將IL-4與不同非-蛋白質聚合物，如聚乙二醇，聚丙二醇或聚氧基烯類，以美國專利4,640,835;4,496,689; 4,301,144;4,670,417; 4,791,192或4,179,337號中所述之方法連結。

用於交聯作用之試劑，取代作用之程度及反應條件，係依使用個別與不同側鏈反應，之雙官能試劑（較佳使用一系列試劑），之實驗來做選擇。

五、發明說明 (13)

較佳地，使用一項用以增進蛋白質於活體內循環之半衰期之選擇，其係將此類蛋白質，共軛至一種可使其具較長半衰期之聚合物。因此，例如，聚乙二醇(PEG)與Cl-NH之共軛作用，已經證實為一項用以延長半衰期之優良選擇。PEG為一種非免疫性，直鏈，未帶電荷之聚合物，其每分子環氧乙烷含有三個水分子，因此可顯著改變被共軛分子之流體動力特性(馬克斯佛得(Maxfield)等人，聚合物，16：505-509；拜利(Bailey), F. E.等人於：非離子性界面活性劑〔希克, M.J., 編著〕pp. 794-821, 1967)。已有許多具醫療用途之酵素與PEG結合，以助於達成增進其活體內半衰期之功效(阿布考斯基(Abuchowski), A.等人，J. Biol. Chem. 252: 3582-3586, 1977；阿布考斯基, A.等人，癌症生化.生物物理，7: 175-186, 1984)。曾指出：將IL-2(間白素-2)與PEG連結，不僅延長其餘循環中之存活週期，亦增加其效價(卡瑞(Katre), N. V.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:1 487-1491 (1987)；古德森(Goodson), R. 等人，生物/科技，8: 343-346, 1990)。業經報導，將PEG與其它分子連結，可減低此等分子之免疫性與毒性(阿布考斯基, A. 等人，J. Biol. Chem. 252: 3578-3581, 1977)。

IL-4亦可被包圍於微膠囊〔其係以(例如)膠粒堆積技術或以“界面聚合作用”(例如，羥甲基纖維素微膠囊，或明膠微膠囊與聚〔甲基丙烯酸甲酯〕微膠囊)製備得〕中，形成膠體藥物釋放系統(如微脂粒，白蛋白微球，微乳膠

五、發明說明 (14)

，毫微粒子與毫微膠囊)或形成巨乳膠液。此等技術揭示於雷明頓藥物科學(Remington's Pharmaceutical Science, 第16版, 歐索(Osol), A.等人編著(1980))。

IL-4製劑亦通用於抗體分離中, 作為IL-4分析之標準物(例如藉由標定 IL-4, 以用於放射性免疫分析, 用於酵素-偶合免疫分析, 或用於放射受體分析中作為標準物), 藉使用放射性碘, 酵素, 熒光團, 旋轉標定等, 標定IL-4, 使之用於親和性純化技術, 及受體結合分析(具競爭型式者)中。

因為難以預測IL-4變異體之性質, 故可理解地需要對所獲得之變異體, 進行篩檢以尋得最佳之變異體。因此, 例如, 藉由競爭性免疫分析, 來測定IL-4分子在免疫學特性上之變化(例如其對一特定抗體之親和性)。篩選具改變之變異體, 包括將其活性與天然IL-4, 於相同分析中所觀察得之活性比較, 以決定其係增加或減少。其它於蛋白質或多肽特性中之潛在改變—例如, 氧化還原安定性或熱安定性, 嫌水性, 對蛋白分解作用之敏感性, 於重組型細胞培養或血漿中之安定性, 或與載體聚集或形成多重物(multimer)—則使用該技藝所指定之方法來測定。

IL-4之治療配方與施藥形式

本發明新穎化合物, 抑制間白素-參與之程序或與hIL-4競爭。因此他們應適用於治療超常, 或錯誤引導之免疫反應或自體免疫疾病。此亦包括, 初級與次級之免疫缺陷。關於此點, 拮抗劑可用於移植與腫瘤疾病之緩和治療上。此等

五、發明說明 (15)

包括，例如：

—過敏症

(阻斷初級反應IgE-參與之反應；已知過敏症之脫敏；特應性疾病；減輕氣喘發作；高IgE徵候群)

—移植

(減低HLA-DR於器官移植中之表現，壓制GVHD，用於淨化骨髓)

—白血病貧血與固態IL-4受體-表現腫瘤

(減輕超常之自泌性IL-4製造；抑制腫瘤生長)

—對抗調節血小板之過度產生

—治療血液凝結障礙

(藉由單核白血球阻礙)

—用於脂肪代謝作用之障礙

—矯正碳水化合物平衡之障礙

—增進受感染時之免疫狀態(敗血病)。

由於其良好之水可溶度，可系統性或區域性(即局部地，包括噴霧式吸入)使用該突變體IL-4蛋白質，亦可能將其調配成延遲釋放製劑，所有治療形式，可依短期治療或持續性治療來做考量。

IL-4拮抗劑之治療配方，係為IL-4拮抗劑之儲存而製備，一旦其已達到所希望之純度，即與生理上所接受之載體，輔助物質或安定劑(雷明頓藥物科學，前所引用)混合，形成冷凍乾燥劑或水溶液之形式。可接受載體，輔助物質或安定劑，於劑量及所使用之濃度下，對接受者不具毒性

五、發明說明 (16)

；其包括緩衝劑，如磷酸鹽，檸檬酸鹽及其它有機酸類；抗氧化劑，如抗壞血酸，低分子量多肽類(少於約10個殘基)，蛋白質如血清白蛋白，明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，如聚乙烯氫吡咯酮；胺基酸，如甘胺酸，麩氨醯胺，天冬醯胺，精胺酸或離胺酸；單醣，雙醣与其它醣類，如葡萄糖，甘露糖或糊精；鉗合物形成劑，如EDTA；糖醇，如甘露糖醇或葡萄糖醇；形成鹽類之相對離子，如鈉；及/或非離子性界面活性物質，如吐溫(Tween)，普羅尼克(Pluronic)或聚乙二醇(PEG)。

位於活性體內使用，IL-4拮抗劑必須為無菌。此可藉由在凍乾與復原之前或之後，通過無菌膜過濾器過濾而立即達成。IL-4拮抗劑一般儲存於冷凍乾燥型式或溶液中。

具有延遲釋放之製劑之適宜實例為，例如，由含有蛋白質之固體，厭水性聚合物組成之半通透性基質：此等基質為成型物品，例如薄膜錠劑或微膠囊。具有延遲釋放之基質實例為聚酯類，水凝膠〔如聚(2-羥乙基甲基丙烯酸酯)一由藍格(Langer)等人，J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981)及藍格，Chem. Tech., 12: 98-105

〔1982〕所述一或聚(乙烯醇)〕，polyactides(美國專利3,773,919號，歐洲專利58,481號)，由L-麩胺酸與L-麩胺酸加瑪-乙酯組成之共聚物(席曼等人，生物聚合物，22: 574-556〔1983〕)，不可降解性乙酸伸乙基乙烯酯(藍格等人，前所引用)，可降解性乳酸/羥基乙酸共聚物如Lupron Depot™(乳酸/羥基乙酸共聚物與白脯萊(leuprolide)

五、發明說明 (17)

乙酸酯組成)及聚-D-(-)-3-羥基丁酸(歐洲專利 133,988)。
。雖然諸如乙酸伸乙基乙烯酯與乳酸/羥基乙酸，可使分子經過一段超過100天之時間釋出，而於某些水凝膠之個案中，蛋白質經過較短之時間釋出。若經封膠之蛋白質留存於體內一段相對長之時間，他們可能於37℃下變性，或因濕氣而聚集，導致生物活性喪失，且可能改變其免疫性。視所討論的機制而定，可發展出用以穩定蛋白質之有用策略。若經發現，例如，導致導致聚集之機制係，基於因硫=硫化物交換而造成分子間S-S鍵橋之形成，則穩定作用可藉改變氫硫基，從酸溶液冷凍乾燥，控制液體含量，使用適宜之添加劑，及發展特異之聚合物/基質組合物來達成。

具有延遲釋放IL-4拮抗劑配方，亦可包括包被於微脂粒之IL-4拮抗劑。含有IL-4拮抗劑之微脂粒，係以本身已知之方法製備得：德國專利 DE 3,218,121；艾斯坦(Epstein)等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985)；黃等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980)；歐洲專利 52,322；歐洲專利 36,676；歐洲專利 88,046；歐洲專利 143,949；歐洲專利 142,641；日本專利申請案 83-118008；美國專利 4,485,045與 4,544,545號；以及歐洲專利 102,324。一般，微脂粒具有小體積(直徑大約 200-800埃)之單層型式，其具有大於約30莫耳%膽固醇脂肪含量，比例隨最佳IL-4拮抗劑而調整。具有經延長循環時間之微脂粒，揭示於美國專利 5,013,556。

五、發明說明 (18)

本發明之另一用途係關於將IL-4拮抗劑併入"成型物品"中。後者係用以緩和或預防衝擊之發生。

實施例 1

突變體hIL-4蛋白質中潛在N-糖苷化作用部位之去除
於天然hIL-4胺基酸序列中，存在兩個天冬醯胺-偶合之糖基化作用部位，胺基酸位置38與105。結構基因中之相對應密碼，可以編碼天冬胺酸之密碼置換。此防止當基因於酵母菌株中表現時，所形成突變型IL-4蛋白質之N-糖苷化作用。

突變型IL-4蛋白質結構基因中之兩個密碼置換(部位-引導之突變生成)，係依照丹格(Dang)與尼可拉夫(Nickoloff)之方法〔Anal. Biochem. 200: 81 (1992)〕使用選殖載體pUC18達成。需要用來改變結構基因之合成聚核苷酸具有下列序列：

a)用於於位置38上以天冬胺酸置換天冬醯胺：

5'-GCCTCCAAGGAC

b)用於於位置105上以天冬胺酸置換天冬醯胺：

5'-GTGAAGGAAGAC

於以上核苷酸序列中，畫底線之位置指示為天冬胺酸之密碼。

該項核苷酸中之密碼之置換係以DNA定序方法來做確定。將經改變之結構基因插入酵母菌表現載體中，於適當菌株中表現。

實施例 2

五、發明說明(19)

專利申請案第84107101號
ROC Patent Appln. No. 84107101
中文說明書修正第21及30頁 - 附件(一)
Amended Pages 21 & 33 of the Chinese Specification - Encl. I
(民國 86 年 10 月 20 日修正並送呈)
(Amended & Submitted on October 20, 1997)

於位置(+2)插入一胺基酸，以於大腸桿菌中製備缺少N-末端甲硫胺酸之IL-4突變型蛋白質。

為製備一種缺少N-末端甲硫胺酸之IL-4突變型蛋白質，遂將一胺基酸插入於位置(+2)上，其於大腸桿菌中，促使一種特定之甲硫胺酸胺基肽酶，將N-末端甲硫胺酸去除(佛林達(Flinta)等人, Eur. J. Biochem. 154 193-196, 1986)。為進行此項工作，將載體pRR9-IL4-Y124D(圖1)以限制核酸內切酶XhoI與BamHI切開。

所形成(大約450bp)帶有IL4Y124D基因序列訊息之DNA片段，與較短(大約50bp)得自載體atpE區域之片段，經由瓊脂凝膠電泳術純化，並將其重新選殖至M13mp18(其已用SalI與BamHI切開)。製備單股DNA並使用下列寡核苷酸，進行活體外突變生成反應：

5'CTGGAGACTGCCATGGCCCCACAAGTGGGATATCAA3'

此項突變生成之結果，胺基酸丙胺酸(密碼GCC)係插於IL4Y124D基因之位置(+2)中。此外，將NcoI裂解部位引入於基因之5'端，以幫助後續於表現載體中之篩選與選殖。以限制分析之方法使用雙股M13 RF DNA(複製形式)來篩選溶菌斑。具正表現之選殖株，以酵素NcoI與BamHI之限制消化確定。除此之外，已定序法確認正確之序列。

使用NcoI與BamHI將一長度大約400bp之DNA片段，從選得之M13mp18選殖株中切出，以瓊脂凝膠電泳術純化，並選殖於載體pTrc99A(可由法瑪西雅)P-L生物化學品公司(Pharmacia P-L Biochemicals)購得)中，其同樣也已經以

五、發明說明 (20)

NcoI與BamHI切開。以載體，pAPH100(IL4Y125D)，其由此項選殖中獲得，轉型大腸桿菌細胞(TG1)，並於含有胺苄青黴素之營養基質上進行篩選。經蛋白質之表現與純化後，產生缺少N-末端甲硫胺酸之IL-4突變型蛋白質。

實施例 3**酵母菌細胞之發酵****營養溶液**

下列營養溶液係用於培養表現突變型hIL-4蛋白質之酵母菌細胞：

	營養溶液	
成份	SD2	SC6
Bacto 酵母菌氮源	6.7 克/升	—
Difco 酵母抽出物		20.0 克/升
葡萄糖	20.0 克/升	5.0 克/升
	6.7 克/升	1.4 克/升
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	2.0 克/升
MgSO ₄	—	0.5 克/升
消泡劑PPG200	—	0.1 克/升

各成份製備於去礦質水中，且將pH調至5.5。混合物於121℃下滅菌20分鐘。將葡萄糖溶於1/5所需要體積之去礦質水中，分開滅菌並於冷卻後，加至其餘營養溶液中。

儲存菌株

所有酵母菌轉形株之儲存菌株，係將儲存容器充入 2 毫升預先培養物，並將儲存容器保存於液態氮中而製備得。

五、發明說明 (21)

預先培養物

預先培養物之發酵，係於 1 升搖晃燒瓶(其各充以 200 毫升 SD2 營養溶液)中完成。於這些燒瓶內接種一儲存菌株，或從 SD2 瓊脂平板上取得之單一菌落。將培養物於 26-30℃ 下，伴隨連續搖晃培育 2-3 天。

主要培養物發酵

主要培養物之發酵，係於 Sc6 營養溶液中，使用 10 升攪拌槽發酵器來完成。使用 3-5 體積 % 之預先培養物(其原先之生質量經離心去除，並於接種前再懸浮於 Sc6 培養基中)，來進行接種。對於 10 升主要培養物之發酵條件如下：

溫度	26-30 %
攪拌器之旋轉速率	6000rpm
通氣速率	0.5 vvm
pH 值設定點	5.5 (使用 5N NaOH 與 5N H ₂ SO ₄ 來校正)

於發酵進行 5 小時之後，將培養基連續餵以葡萄糖與酵母抽出物。餵料速率係依培養物之呼吸商數 (RQ 值) 作調整。RQ 設定點為 1.0。餵給溶液具有下列組成物：

葡萄糖	500 克/升
Difco 酵母抽出物	75 克/升

將組成份分別溶於去礦質水中，並於 121℃ 下滅菌 20 分鐘。待冷卻後將該兩種溶液組合。

當使用受誘發性 Gal10 啟動子或 Gal10 啟動子之衍生物時，則藉由將餵給溶液中之葡萄糖 (500 克/升) 換成半乳糖

五、發明說明 (22)

(500克/升)以進行誘發作用。其後，餵料速率不再依RQ值做調整。餵料速率以手動調整，至誘發作用發生時之餵料速率之兩倍。一般，Gal 10啟動子係於大約48小時之發酵期間後被誘發。

細胞之收取

於發酵完成後(18-120小時)，將發酵器內之內容物冷卻至10-15℃，其中細胞內表現已經發生，並以標準離心技術(如吊桶離心機)收取酵母菌細胞，經離心後得到細胞之質量，藉由將其直接逐滴加入液態氮中，而直接形成極冷顆粒，並儲存於-80℃下。由以此方式處理之細胞質量做成產品。當異源蛋白質被分泌至培養液中時，則將酵母菌細胞以標準離心技術(如吊桶離心機)，或以交流微過濾方法(如Filtrom-Minisetete系統)從培養液分離出。若需要，將培養液以過濾法滅菌。進一步由不含細胞之培養液作成產品。

實施例 4大腸桿菌之發酵營養溶液

表現突變型hIL-4蛋白質之大腸桿菌(E. Coli)轉形株，係培養於含有下組成物之LB營養溶液中：

Bactotryptone	10 克/升
Bacto 酵母抽出物	5 克/升
NaCl	10 克/升

將組成物溶解於去離子水中，並於121℃下滅菌20分鐘

。於接種之前，將適合用來篩選轉形株之抗生素(例如100毫克/升胺苄青黴素鈉，或50毫克/升卡那黴素硫酸鹽，視載體中所使用之選擇記號(selection marker)而定)於無菌狀況下加入營養溶液中。

所有大腸桿菌轉形株之儲存菌株，係將儲存容器充入 2 毫升預先培養物，並將儲存容器保存於液態氮中而製備得。

預先培養物之發酵係於 1 升搖晃燒瓶(其各充以 200 毫升 LB 營養溶液)中完成。使用一儲存菌株，或使用得自 LB 瓊脂平板之單一菌落進行接種。將培養物於 30℃ 下伴隨連續搖晃培育 12-18 小時。

主要培養物之發酵，係於LB營養溶液中，使用10升攪拌槽發酵器來完成。使用1-5體積%之預先培養物（其原先之生質量從預先培養物中離心出，並於接種前再懸浮於新鮮LB培養基中）來進行接種。對於10升主要培養物之發酵條件如下：

起始溫度 30 °C (當使用溫度-可誘發型
啟動子時)

37 °C (當使用IPTG-可誘發型載體時)

攪拌器之旋轉速率 500 rpm

~25~

(請先閱讀背面之注意事項，再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (24)

通氣速率 0.5 vvm

為偵查生質量之成長，每經過大約1小時，從培養液取出無菌樣本，並且於600nm下測定其光學密度(OD 600)。一旦OD 600達到0.8到1.2，及誘發培養物。視所選用之啟動子而定，誘發作用之發生如下：

溫度誘發作用： 將發酵溫度從30℃增加至42℃

IPTG誘發作用： 無菌添加異丙基-β-D半乳糖
喃糖苷至最終濃度為0.4mM

代表性地，誘發期為4-8小時。

細胞之收取

於發酵完成後(6-14小時)，將發酵器內之內容物冷卻至10-15℃，並以標準離心技術(如吊桶離心機)收取細菌細胞，於離心之後獲得之細胞質量(若適當)暫時保存於冷凍狀態。由以此獲得細胞質量做成產品。

實施例 5

突變型間白素4蛋白質於使用基本啟動子

(constitutive promoter)之酵母菌細胞中之表現

將帶有一包含編碼突變型hIL-4蛋白質之基因，及基本啟動子(如阿伐交配因子啟動子，GAPDH啟動子或TPI啟動子)之表現載體之酵母菌轉形株，以10升之規模於28℃下培養。於發酵期間，使用SDS PAGE定量測試突變型hIL-4蛋白質之表現。發酵進行時間為96小時。於發酵結束時生質量之濃度已達 27克/升乾重。於以離心(15分鐘，6500xg，4℃)將細胞分離出，並經過過濾滅菌之後，由無細胞之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (25)

培養液製成產品。

實施例 6

突變型間白素4蛋白質於使用可誘發性啟動子之酵母菌細胞中之表現

將帶有一包含編碼突變型hIL-4蛋白質之基因，及可誘發性啟動子(如Gal10啟動子或Gal10啟動子之衍生物)之表現載體之酵母菌轉形株，以10升之規模於28℃下培養。於發酵期48小時之後，藉由將用於餵給溶液中之碳水化合物，從葡萄糖改變為半乳糖，來進行誘發作用。發酵期間，使用SDS PAGE定量測試突變型hIL-4蛋白質之表現。發酵進行時間為96小時。於發酵結束時生質量之濃度已達到24克/升乾重。於將細胞分離出，並經過濾滅菌之後，由無-細胞之培養液製成產品。

其它適用於表現突變型hIL-4蛋白質之可誘發性啟動子，亦可以此相同之方法使用。必須視所選擇之啟動子之本質，而決定使用適宜之誘發技術。

實施例 7

突變型間白素4蛋白質於使用可誘發性啟動子之大腸桿菌中之表現

將帶有一包含編碼突變型hIL-4蛋白質之基因，及溫度-可誘發性啟動子(如 λ pL啟動子或 λ pL啟動子之衍生物)之表現載體之大腸桿菌轉形株，以10升之規模於LB營養溶液中。帶有載體之細胞，以於LB營養溶液中添加100毫克/升胺苄青黴素鈉(=LB+Amp營養溶液)進行篩選。於主要培養混合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (26)

物中，接種 5 體積 % 培養於 LB+Amp 營養溶液之 14 小時久前培養物。於發酵開始時，發酵溫度為 30℃ 且，在到達 0.8-1.2 之 OD 600 值之後，將此溫度調升至 42℃，以誘發溫度敏感性啟動子。於發酵期間，使用 SDS PAGE 定量測試突變型 hIL-4 蛋白質之表現。誘發時間 4-6 小時之後，藉由將培養液冷卻至 10-15℃，來終止發酵。於發酵結束時生質量之濃度已到達 5 克/升濕重。以於吊桶離心機中離心 (15 分鐘，6500xg，4℃) 收取大腸桿菌細胞，將細胞質量，藉由將其直接逐滴加入液態氮中，而形成極冷顆粒。接著將以此方法快速冷凍之生質量，儲存於 -80℃ 下。由已經此方法處理之生質量製成產品。

其它適用於大腸桿菌中表現突變型 hIL-4 蛋白質之可誘發性啟動子，亦可以此相同之方法使用。必須視所選擇之啟動子之本質，而決定使用適宜之誘發技術。

實施例 8突變型 IL-4 蛋白質之回收細胞崩解與內含體之分離

將 25 克濕重由實施例 7 獲得之大腸桿菌存於 200 毫升緩衝液 (0.1 M 磷酸鹽緩衝液，pH 7.3，0.1 % 三通 (Triton)，1 mM EDTA，1 微克/毫升抑肽素) 中，並以超音波振盪崩解 (Branson Sonifier B15)。含有產物之內含體以離心法 (35,000xg，20 分鐘) 分離，並於另外含有 4 M 尿素之崩解緩衝液中清洗。

產物之溶解化作用與亞硫酸分解作用

(請先閱讀背面之注意事項，再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (27)

將經清洗之內含體，溶解於125毫升緩衝液(0.2 M Tris，pH8.1，8 M 氫氧化胍)中。將 4克亞硫酸鈉與 2克四硫磺酸鉀加入，並將反應混合攪拌 2小時。待反應完成後，將未溶解之組成物以離心法(35,000xg，20分鐘)去除。

凝膠過濾

將上清液裝載於凝膠過濾管柱(Sephacryl-S-300 HR，法瑪西雅，10x90 公分)，並於含有 6 M 氫氧化胍之PBS緩衝液中，使用280毫升/小時之流速，進行凝膠過濾。將含有產物之流份以SDS PAGE確定，並收集組合。

性質還原

將 β -羥基乙醇(最終濃度15mM)加入，以使分子還原。於室溫下培育2小時之後將混合物以水稀釋5倍，並於緩衝液(3mM NaH_2PO_4 ，7mM Na_2HPO_4 ，2mM KCl，120mM NaCl)中進行透析3-4天。

濃縮

使用醋酸將經過透析之物質調整至pH 5，並藉由添加水，將傳導度減低至小於等於10mS/公分。將50毫升CM-瓊脂糖凝膠-FF(法瑪西雅)(其以25mM醋酸銨平衡，pH 5.0)於攪拌同時加入混合物中，將未鍵結之物質濾除，並用該凝膠來填充管柱。產物以線型梯度之0-1M NaCl(存於25mM醋酸銨中，pH 5.0)，使用300毫升/小時之流速進行溶析。含有產物之流份，以SDS PAGE或以分析用RP色層分析術確定。

最後純化

將全部CM-瓊脂糖凝膠裝載於一Vydac C-4管柱(1x25公分，10微米)，其已經以0.1% TFA平衡，之上，並以上

(請先閱讀背面之注意事項，再填寫本頁)

裝

訂

86年10月30日 修正
B7
補充

五、發明說明(28)

升梯度之乙腈溶析。將含有純產物之流份收集組合並冷凍乾燥。

圖式簡單說明

圖1說明載體RPRa-IL-4-Y124D之構造

序列明細表

(1)一般資料：

(i)申請者：

(A)名稱：拜爾AG

(B)街道名：拜爾威爾克(Bayerwerk)

(C)城市名：里佛庫森(Leverkusen)

(E)國名：德國

(F)郵遞區號：D-51368

(G)電話：0214/3061455

(H)傳真號碼：0214/303482

(ii)申請案名稱：作為人類間白素4之拮抗劑或部份促動劑之新穎突變型hIL-4蛋白質

(iii)序列數目：5

(iv)電腦可讀取形式：

(A)介質類型：軟式磁碟片

(B)電腦：IBM PC可相容

(C)操作系統：PC-DOS/MS-DOS

(D)軟體：專利入放(Patent In Release)#1.0，
譯本#1.25(EPA)

(2)序列鑑定第1號(SEQ ID No.1)之資料

(i)序列特徵：

(A)長度：16鹼基對

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

及

五、發明說明 (29)

(B)類型：核酸

(C)股數：單股

(D)拓樸學：線形

(ii)分子類型：cDNA

(iii)假定值：否

(iii)反有意義：否

(vi)原始來源：

(c)個體/分離物：合成

(xi)序列描述：序列鑑定第1號：

CATGCACAAGTGCGAT

(2)序列鑑定第2號之資料

(i)序列特徵：

(A)長度：12鹼基對

(B)類型：核酸

(C)股數：單股

(D)拓樸學：線形

(ii)分子類型：cDNA

(iii)假定值：否

(iii)反有意義：否

(vi)原始來源：

(c)個體/分離物：合成

(xi)序列描述：序列鑑定第2號：

ATCGCACTTGTG

(2)序列鑑定第3號之資料

(請先閱讀背面之注意事項，再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (30)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：21 鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 拓撲學：線形

(ii) 分子類型：cDNA

(iii) 假定值：否

(iii) 反有意義：否

(vi) 原始來源：

(c) 個體/分離物：合成

(xi) 序列描述：序列鑑定第3號：

GCCTCCAAGGACACA ACTGAG

(2) 序列鑑定第4號之資料

(i) 序列特徵：

(A) 長度：24 鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 拓撲學：線形

(ii) 分子類型：cDNA

(iii) 假定值：否

(iii) 反有意義：否

(vi) 原始來源：

(c) 個體/分離物：合成

(xi) 序列描述：序列鑑定第4號：

(請先閱讀背面之注意事項，再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (31)

GTGAAGGAAGCCGACCAGAGTACG

(2) 序列鑑定第5號之資料

(i) 序列特徵：

(A) 長度：36鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 拓撲學：線形

(ii) 分子類型：cDNA

(iii) 假定值：否

(iii) 反有意義：否

(vi) 原始來源：

(c) 個體/分離物：合成

(xi) 序列描述：序列鑑定第5號：

CTGGAGACTG CCATGGCCCA CAAGTGCGAT ATCACC

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱：**作為人類間白素-4之拮抗劑或部份促動劑之
新穎突變型hIL-4蛋白質**)

本發明係關於新穎之突變型 hIL-4蛋白質，其製備方法，以及其用作為醫藥品，尤其用於超常，錯誤引導之免疫反應與自體免疫疾病之用途。

英文發明摘要(發明之名稱：**Novel mutant hIL-4 proteins as antagonists
or partial agonist of human interleukin 4**)

The present invention relates to novel mutant hIL-4 proteins, to processes for their preparation, and to their use as medicaments, in particular for exaggerated, misdirected immune reactions and autoimmune diseases.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

90. 8. 15 修正
年 月 日 補充

專利申請案第 84107101 號
 ROC Patent Appln. No.84107101
 修正之申請專利範圍中文本-附件(一)
Amended Claims in Chinese - Encl. (I)
 (民國 90 年 8 月 15 日送呈)
 (Submitted on August 15, 2001)

1. 一種作為人類間白素 4 之拮抗劑或部份促動劑之人類突變型間白素 4 蛋白質，其特徵為，除了於人類間白素-4 野生型位置 121, 124 或 125 之置換外，丙胺酸經插入於位置 2 中；其中人類間白素-4 野生型具有下述胺基酸序列：

His-Lys-Cys-Asp-Ile-Thr-Leu-Gln-Glu-Ile-	10
Ile-Lys-Thr-Leu-Asn-Ser-Leu-Thr-Glu-Gln-	20
Lys-Thr-Leu-Cys-Thr-Glu-Leu-Thr-Val-Thr-	30
Asp-Ile-Phe-Ala-Ala-Ser-Lys-Asn-Thr-Thr-	40
Glu-Lys-Glu-Thr-Phe-Cys-Arg-Ala-Ala-Thr-	50
Val-Leu-Arg-Gln-Phe-Tyr-Ser-His-His-Glu-	60
Lys-Asp-Thr-Arg-Cys-Leu-Gly-Ala-Thr-Ala-	70
Gln-Gln-Phe-His-Arg-His-Lys-Gln-Leu-Ile-	80
Arg-Phe-Leu-Lys-Arg-Leu-Asp-Arg-Asn-Leu-	90
Trp-Gly-Leu-Ala-Gly-Leu-Asn-Ser-Cys-Pro-	100
Val-Lys-Glu-Ala-Asn-Gln-Ser-Thr-Leu-Glu-	110
Asn-Phe-Leu-Glu-Arg-Leu-Lys-Thr-Ile-Met-	120
Arg-Glu-Lys-Tyr-Ser-Lys-Cys-Ser-Ser	129

；及人類間白素-4 野生型位置 121, 124 或 125 上之胺基酸被天門冬胺酸或穀胺酸置換。

六、申請專利範圍

2. 一種作為人類間白素 4 之拮抗劑或部份促動劑之醫藥組成物，其包含根據申請專利範圍第 1 項之人類突變型間白素 4 蛋白質。

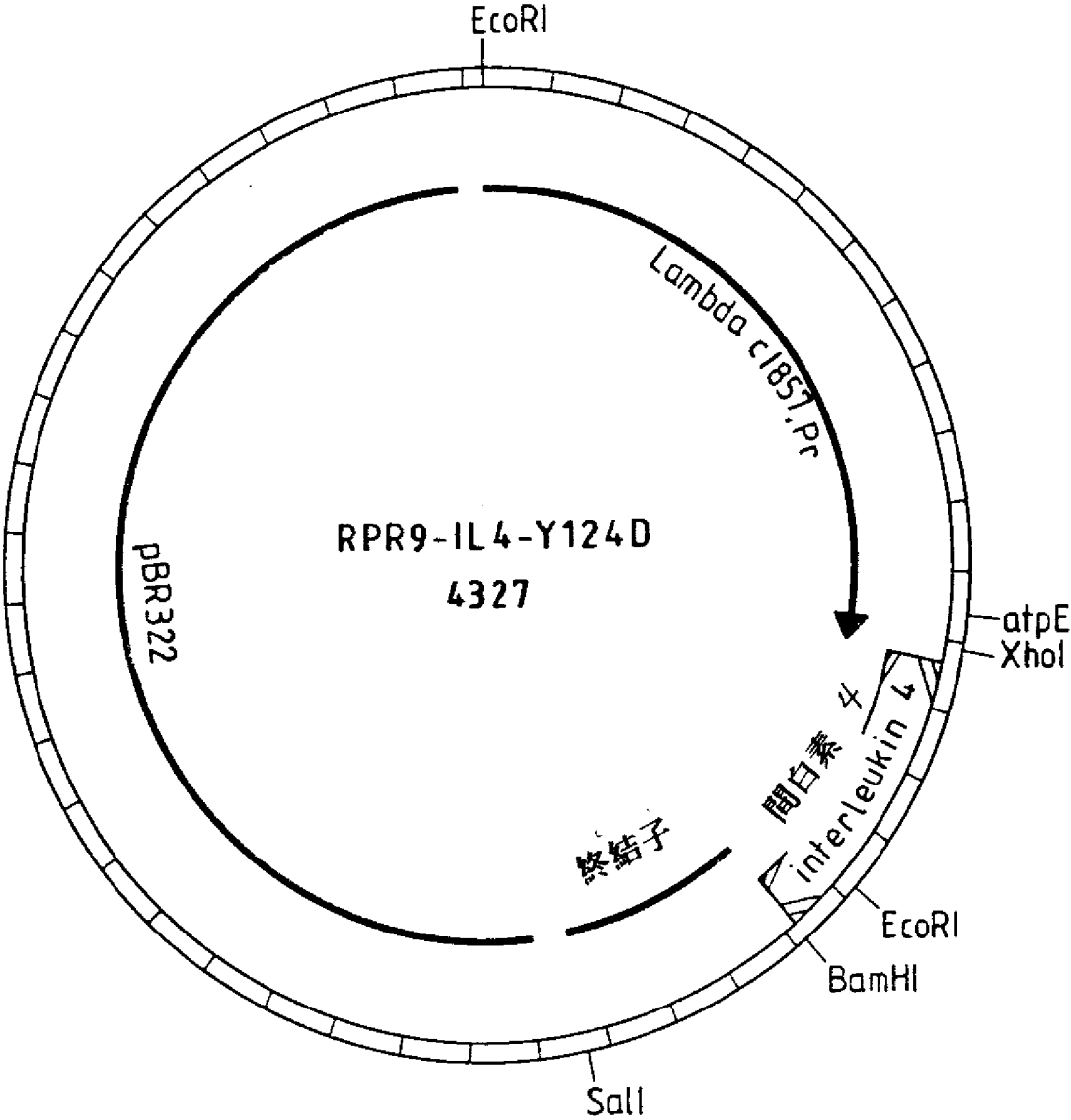
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

圖1



五、發明說明(19)

專利申請案第84107101號
ROC Patent Appln. No. 84107101
中文說明書修正第21及30頁 - 附件(一)
Amended Pages 21 & 33 of the Chinese Specification - Encl. I
(民國 86 年 10 月 20 日修正並送呈)
(Amended & Submitted on October 20, 1997)

於位置(+2)插入一胺基酸，以於大腸桿菌中製備缺少N-末端甲硫胺酸之IL-4突變型蛋白質。

為製備一種缺少N-末端甲硫胺酸之IL-4突變型蛋白質，遂將一胺基酸插入於位置(+2)上，其於大腸桿菌中，促使一種特定之甲硫胺酸胺基肽酶，將N-末端甲硫胺酸去除(佛林達(Flinta)等人, Eur. J. Biochem. 154 193-196, 1986)。為進行此項工作，將載體pRR9-IL4-Y124D(圖1)以限制核酸內切酶XhoI與BamHI切開。

所形成(大約450bp)帶有IL4Y124D基因序列訊息之DNA片段，與較短(大約50bp)得自載體atpE區域之片段，經由瓊脂凝膠電泳術純化，並將其重新選殖至M13mp18(其已用SalI與BamHI切開)。製備單股DNA並使用下列寡核苷酸，進行活體外突變生成反應：

5'CTGGAGACTGCCATGGCCCCACAAGTGGGATATCAA3'

此項突變生成之結果，胺基酸丙胺酸(密碼GCC)係插於IL4Y124D基因之位置(+2)中。此外，將NcoI裂解部位引入於基因之5'端，以幫助後續於表現載體中之篩選與選殖。以限制分析之方法使用雙股M13 RF DNA(複製形式)來篩選溶菌斑。具正表現之選殖株，以酵素NcoI與BamHI之限制消化確定。除此之外，已定序法確認正確之序列。

使用NcoI與BamHI將一長度大約400bp之DNA片段，從選得之M13mp18選殖株中切出，以瓊脂凝膠電泳術純化，並選殖於載體pTrc99A(可由法瑪西雅)P-L生物化學品公司(Pharmacia P-L Biochemicals)購得)中，其同樣也已經以

86年10月30日 修正
B7
請見

五、發明說明(28)

升梯度之乙腈溶析。將含有純產物之流份收集組合並冷凍乾燥。

圖式簡單說明

圖1說明載體RPRa-IL-4-Y124D之構造

序列明細表

(1)一般資料：

(i)申請者：

(A)名稱：拜爾AG

(B)街道名：拜爾威爾克(Bayerwerk)

(C)城市名：里佛庫森(Leverkusen)

(E)國名：德國

(F)郵遞區號：D-51368

(G)電話：0214/3061455

(H)傳真號碼：0214/303482

(ii)申請案名稱：作為人類間白素4之拮抗劑或部份促動劑之新穎突變型hIL-4蛋白質

(iii)序列數目：5

(iv)電腦可讀取形式：

(A)介質類型：軟式磁碟片

(B)電腦：IBM PC可相容

(C)操作系統：PC-DOS/MS-DOS

(D)軟體：專利入放(Patent In Release)#1.0，
譯本#1.25(EPA)

(2)序列鑑定第1號(SEQ ID No.1)之資料

(i)序列特徵：

(A)長度：16鹼基對

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

及