

申請日期	87 年 7 月 20 日
案 號	87111803
類 別	C12N ¹⁵⁷ /A61K ^{31/25} .C07K ^{9/6}

(以上各欄由本局填註)

公告本

510921

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	經修飾之TNF α 分子、編碼該TNF α 分子之DNA，及含有經修飾TNF α 分子與DNA的疫苗
	英 文	Modified TNF α molecules, DNA encoding such TNF α molecules and vaccines comprising such modified TNF α molecules and DNA
二、發明 創作人	姓 名	(1) 馬丁·詹森 Jensen, Martin Roland (2) 索恩·莫里生 Mouritsen, Søren (3) 漢瑞克·愛爾生能 Elsner, Henrik
	國 籍	(1) 丹麥 (2) 丹麥 (3) 丹麥
	住、居所	(1) 丹麥荷利席德瑞登路6號 Sydskejsnten 6, DK-2840 Holte, Denmark (2) 丹麥貝爾克德臨德凡路二十四號 Lindevangsvej 24, DK-3460 Birkerød, Denmark (3) 丹麥布爾希賽芬葛恩司凡路36號 Svend Gangesvej 36, DK-2700 Børnshøj, Denmark
	代 表 人 姓 名	(1) 歐里·傑魯夫·詹森 Kjerulf-Jensen, Ole
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 法馬提克勞伯瑞費利股份有限公司 Farmaceutisk Laboratorium Ferring A/S
	國 籍	(1) 丹麥
	住、居所 (事務所)	(1) 丹麥凡路斯印德多芬路10號 Indertofte 10, DK-2720 Vanløse, Denmark
	代 表 人 姓 名	(1) 歐里·傑魯夫·詹森 Kjerulf-Jensen, Ole

申請日期	87 年 7 月 20 日
案 號	87111806
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 創作人	姓 名	(4) 依班·戴魯 Dalum, Iben
	國 籍	(4) 丹麥
	住、居所	(4) 丹麥何希奴歐格司凡路 1 3 號 Olgasvej 13, DK-2970 Horsholm, Denmark
	姓 名 (名稱)	
三、申請人	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國 (地區)	申請專利，申請日期：	案號：	， ☐ 有 ☐ 無主張優先權
丹麥	1997 年 4 月 15 日	0418/97	☒ 無主張優先權

有關微生物已寄存於：	， 寄存日期：	， 寄存號碼：
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940215
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940216
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940217
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940218
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940219
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940220
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940221
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940222
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940223
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940224

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(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

有關微生物已寄存於：	，寄存日期：	，寄存號碼：
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940225
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940226
食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC940227

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

訂

線

五、發明說明(1)

發明之技術領域

本發明係關於人胞激素腫瘤壞死因子 α (TNF α) 分子，其經過修飾，故將此經修飾 TNF α 分子施加至人類宿主能夠誘生對抗野生型人 TNF α 之中和抗體。本發明也關於根據該經修飾 TNF α 分子之人 TNF α 疫苗。本發明其它方面將揭示於下文討論中。

發明背景

生理學上而言，脊椎動物之免疫系統係作為對抗感染物，例如微生物，侵害身體之防禦機制。外來蛋白質藉由高特異性之循環抗體而經由網狀內皮系統予以有效清除，病毒與細菌則由細胞性與體液性機制組成之複合式屏障予以攻擊，該機制包括抗體，胞毒性 T 淋巴細胞 (CTL)，天然殺手細胞 (NK)，補體等等。領導此種抗戰的是 T 輔助 (T_H) 淋巴細胞，其輔以抗原表現細胞 (APC)，可經由胞激素之複合網路而調節免疫對抗作用。

T_H 淋巴細胞可辨識呈現在 APC 表面之蛋白質抗原。但不辨識天然抗原本身。相反地，其顯然可辨識由兩種組份組成之複合式配體，該組份是“經處理”(片段化)之蛋白質抗原(所謂的 T 細胞抗原決定位)與主要組織相容性錯合物第 I 類分子 (O.Werdelin 等人, Imm, Rev. 106, 181 (1988))。此辨識作用最後造成 T_H 淋巴細胞專一地輔助 B 淋巴細胞生產對抗完整蛋白質抗原之特異抗體 (Werdelin 等人, 如上)。某特定 T 細胞僅辨識一些抗原—MHC 的組合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(2)

，但不辨識上述相同抗原或另一個 M H C 對偶基因之基因產物所表現的另一抗原。此現象稱為 M H C 限制性。

自體蛋白質的片段也會呈現在 M H C 上，但這些片段一般被 T 輔助淋巴細胞忽略或不被辨識。此乃個體為何通常不會有自體抗體存在其血清中，最後致使攻擊該個體之自身蛋白質（所謂自體蛋白質或自身蛋白質）的主要理由。但有極少數例子，此過程失誤，免疫系統變成對抗個體之自身組份，如斯導致自體免疫疾病。

某些自體蛋白質在其量升高會導致病症的情況下，此自體蛋白質的出現是不當的。腫瘤壞死因子 α (T N F α) 乃已知能夠對癌症病人及患有其它慢性疾病之病人引起惡病質者 (H.N.Langstein等人, Cancer Res.51.2302-2306, 1991)。T N F α 也在發炎過程中扮演重要角色 (W.P.Arend等人, Arthritis Rheum.33,305-315,1990)，且利用單株抗體中和 T N F α 業已證實對慢性炎症疾病例如類風濕性關節炎有效 (Elliott等人, Lancet 1994,344:1105-10)及對空氏症 (Crohn's)有效 (Van Dullemen等人, Gastroenterology 109(1): 129-135(1995))。故冀求一種用於誘生對抗這種 T N F α 蛋白質之中和抗體的方法，而本發明包括提供此特性之對抗 T N F α 的疫苗。

腫瘤壞死因子

1. 總論

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (3)

腫瘤壞死因子 (T N F) 是調節性蛋白質中胞激素族的一員 (參見 Walsh,G及 Headon,D.E.,Protein Biotechnology, 1994,John Wiley & Sons Ltd.,England,p257-267),該族亦包括干擾素與間白素。目前已知 T N F 有兩型,分別為 T N F α 與 T N F β 。雖然此兩種蛋白質皆與相同受體結合並誘發廣效之相似生物學反應,但其為不同分子且同質性不到 30%。命名為腫瘤壞死因子之原始蛋白質係以 T N F 表示,命名為 T N F α 更恰當,其亦以惡病質素 (cachectin)而為人所知。T N F β 也可表示淋巴細胞毒素 (lymphotoxin)。

T N F α 係由多種細胞製造,最著名的是經活化的巨噬細胞,單核球,某些 T 淋巴細胞與 N K 細胞,以及腦細胞和肝細胞。誘生 T N F α 合成之最強誘發物是一種複合生物分子,命名為脂多醣 (L P S)。其含有脂肪與多醣兩種組份,也可表示為內毒素。脂多醣本身不具有任何抗腫瘤活性。注射脂多醣之動物血清中發現含有對癌細胞有毒性的因子,此因子由對脂多醣產生反應之特定細胞生產,命名為腫瘤壞死因子。諸如某些病毒,黴菌及寄生蟲等多種其它因素也可刺激此胞激素的生產與釋出。此外, T N F α 也可呈現自體分泌方式,刺激其本身的生產。

天然人類 T N F α 是同三體,由繞著左右對稱之三重軸而緊密結合之三個相同的多肽亞單位組成,下文將進一步說明。此種排列方式類似許多病毒鞘蛋白之蛋白質亞單位的組合。人 T N F α 之個別多肽亞單位是無醣化者,由

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(4)

157個胺基酸組成。此分子之分子量為17300道耳吞，僅含一個鏈內雙硫鍵結。人TNF α 最初係合成233個胺基酸前驅物分子。在包括訊號序列之-76至-1前序列的蛋白質水解切割作用，釋出了天然TNF α 。TNF α 也可呈現26000Da之膜結合型式。三個TNF α 單體亞單位非共價結合而形成三聚體，下文進一步說明。

TNF α 藉由結合易感細胞表面的特異受體而誘發其生物作用。已鑑定出兩種不同的TNF α 受體。其中一個受體(TNF-R55)具有55000Da分子量，而第二受體(TNF-R75)具有約75000Da分子量。此兩種不同的受體型式顯示不超過25%序列相同。TNF-R55出現在多種細胞上，但TNF-R75的分佈較侷限。兩者皆為穿膜糖蛋白，具細胞外結合區，厭水性穿膜區及細胞內促動區。

TNF α 誘發生物作用之確實分子機制仍有待確定。TNF α 結合至其受體似乎起動了多種G-蛋白質調節的反應，並活化了腺苷酸環化酶，磷脂酶A2及蛋白質激酶。由TNF α 誘生之確實生物作用隨細胞種類改變。諸如額外胞激素等其它因子的存在，進一步調節TNF α 作用在敏感細胞所造成之觀察到的分子效果。

已選殖出TNF α 基因且殖入多種重組表現系統，細菌及真核細胞。所生成之經純化且具生物活性TNF α 之大量可利用性有助於臨床評估多種疾病，尤其是癌症。已

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(5)

完成單獨使用 $TNF\alpha$ 或與干擾素合併使用之多種試驗，但結果令人十分失望。大量的 $TNF\alpha$ 不能施加至病患，因為其有毒性，即使不致死，也有副作用。

如上所述，持續生產不當升高量之 $TNF\alpha$ 也會發展惡病質，耗廢症狀通常與慢性寄生蟲或其它感染症及癌症有關。 $TNF\alpha$ 也涉及某些癌症之轉移與生長，以及誘發貧血。再者， $TNF\alpha$ 也直接涉及某些人類慢性發炎失調症的發展，包括類風濕性關節炎及空氏症，這些病症已知施加抗- $TNF\alpha$ 單株抗體是有效的。 $TNF\alpha$ 也涉及骨質疏鬆症與牛皮癬。此外，動物模式中已顯示，施加抗- $TNF\alpha$ 抗體可減輕或預防移植或轉植組織的排斥。

2. $TNF\alpha$ 之結構

1. 簡介

人腫瘤壞死因子 ($TNF\alpha$) 之三度空間結構早已解決 (參見 "Tumor Necrosis Factors Structure, Function and Mechanism of Action", Bharat B. Aggarwal 與 Jan Vilcek 編輯, 1992 Marcel Dekker 公司, New York, 第五章 "Crystal Structure of $TNF\alpha$ ", Jones, E.Y., Stuart, D.I., 及 Walker N.P.C 合著)。 $TNF\alpha$ 之生物活性由其與其受體之間的交互作用決定。此種交互作用由正確摺疊之三級結構的精確組合所控制。故欲了解 $TNF\alpha$ 分子如何在胺基酸交互作用之層次上表現其生物學功能，吾等不僅必須知道胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (6)

序列，也要知道三度空間結構。

I I . 三度空間結構

藉由分析性超離心，小角度 x - 射線離散法，及凝膠電泳，得知具生物活性之 T N F α 在水溶液中是三聚體構型，而藉由交聯研究顯示此構型是該蛋白質之活性形式（Smith與Baglioni,1987,J.Biol.Chemistry 252,6951-6954）。結合分析法顯示，此三聚體比單體之活性至少高出 8 倍。實驗證據顯示天然與重組 T N F α 在生理條件下皆以三聚體為主要存在形式。圓二色性圖譜之分析將 T N F α 歸類為全部是褶板等級的蛋白質（Davis氏等人，Biochemistry 1987,26,1322-1326，此文獻報導藉由硫氫基滴定法，凝膠過濾法與圓二色法分析純化之重組 T N F α 結構的結果）。人重組 T N F α 之數種不同結晶型已有記載。所有記載的結晶型呈現結晶圖及／或非結晶圖上之三級對稱性，顯示 T N F α 在結晶中係以三聚體形式存在。此 T N F α 三聚體呈疏鬆之填充排列，由直徑 100 Å 之溶劑通道貫穿成多孔。此分子表面只有一小部份涉及結晶之填充接觸。這類接觸僅輕微擾亂其較佳溶液構形上的小部份側鏈，甚至可能是固有可變主鏈上的短短一區。

A . T N F α 單體之主鏈褶疊

T N F α 三聚體中 157 胺基酸之單一個次單元的整體形狀是具有約 55 Å 高度且距底部最寬 35 Å 之楔形。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(7)

主鏈之拓撲學說明於圖 1 a - c ; 基本上是由 2 個反平行之 β 褶板形成 β - 三明治式結構。主鏈褶疊係遵照傳統肉凍圖式 (圖 1 c) (病毒鞘蛋白常見此圖式)。圖 1 中用於標記二級結構單位的名稱係遵照針對病毒結構所建立的習慣。標準之 8 個 β - 股 (B 至 I) 皆呈現出來, 但在 B 與 C 之間有一段插入, 其在兩個 β - 褶板的邊界增加了一個短股並將 C 之 N - 終端半段截斷, 如此每一個 β - 褶板含有 5 個反平行的 β - 股, 向後 β - 褶板含有 β - 股 B' , B, I, D 及 G, 而向前褶板含有 β - 股 C' , C, H, E 及 F。

N - 終端是可高度彎曲的, 此區域, 遠至第 10 個殘基 (參見圖 1 b), 與分子之其餘部份通常無關, 其前幾個殘基在溶劑中無法取得多樣的構形。相反地, C 終端埋在向後 β - 褶板之底部, 形成此相當扁平之二級結構單位的主要部份, β - 股之逐漸加長現象與 β 股 B 與 C 之間的插入作用, 協同產生了由幾乎全部環所形成的正面, 此為 β - 三明治 "被隱藏" 的一側, 但在三聚體中是表現至溶劑者。結晶學數據測得此結構多個部份具相當可屈折性。 β - 股形成相當不能屈折的鷹架; 詳言之, 向後 β - 褶板位在三聚體核心, 故特別穩固。可預期的是, 裝飾該分子接觸溶劑之表面的環會呈現高度的可屈折性與易變性。整體而言, 當核心在分子上半部褶疊愈鬆散, 穩固性通常會降低。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8)

B . T N F α 三聚體之一般拓撲學

三個 T N F α 單體次單位非共價連結而形成緊密之圓錐形三聚體，其具有約 55 Å 長度，最大寬度為 50 Å。此三個個別 β - 三明治的 β - 股對此三聚體之三向軸的排列接近平行（傾度約約 30°）。次單位藉三向軸連接之的交互作用是經由 β - 三明治之簡單由邊至面的褶疊方式； β - 三明治的邊係由一個次單位的 F 股與 G 股組成，此邊通過三向關連之次單位的向後 β - 褶板 [G D I B B']（參見圖 2）。羧基終端位在接近三向軸處。此種由邊至面的褶疊模式在次單位之間產生極緊密的關連。因此三聚體的核心是完全接觸不到溶劑。

C . 胺基酸種類之分佈

T N F α 三級結構中胺基酸殘基種類的整體分佈反應蛋白質之一般原則：即厭水性殘基集聚在分子核心中，而帶價殘基分佈在表面。故 T N F α 三明治之核心預期會充滿緊密交聯的大而無極性殘基。

此系統能量學上不喜 T N F α 以單體狀態存在。對於互補殘基（例如極性殘基與極性殘基互補吻合）所組成的大界面區域而言，喪失可接觸溶劑之表面積表示有相當能量利於形成寡聚物（即三聚體）。由通常埋在三聚體界面中較低部份中之強厭水性殘基組成的大片塊，其接觸溶劑通常會令 T N F α 單體不安定。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(9)

3. 結構一功能之探針

A. $TNF\alpha$ / 抗體 交互作用

現今已發現由一種動物（例如人）拮抗 $TNF\alpha$ 所產生的抗體不會與另一種動物（例如鼠）之 $TNF\alpha$ 交叉反應，縱然其序列相同性超過 80% 且 $TNF\alpha$ 具有結合至另一物種之 $TNF\alpha$ 受體的能力。若將序列差異的程度在三級結構上作圖，立刻顯示分子序列上最可變化的區域對應了可接觸抗體的表面環。在三明治中或三聚體交接面上，由高度保留殘基構成的區域，對抗體而言，是十分不易被發現的。因此針對抗 - $TNF\alpha$ 抗體之抗原決定位通常會含有一些可在物種之間變化的殘基，因此阻止了抗體與其結合。此現象表示 $TNF\alpha$ 與其受體之間的交互作用一定有些特性與抗體結合至 $TNF\alpha$ 所需的特性不同。

B. 位置決定之突變作用

利用位置決定之突變技術（Jones et al., op.cit. p.113-119），置換不同胺基酸或刪除部份序列，藉此指出 $TNF\alpha$ 分子與其生物（細胞毒性）活性及受體結合情形有關之多種特異殘基與區域所扮演的角色。

自 N - 終端刪除高達 8 個殘基卻對生物活性無任何不利影響，可茲證明這些區域的本質對整個分子安定性係非必要的。N - 終端殘基對 $TNF\alpha$ 三聚體之生物有效性顯然是運用非直接之次級作用。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (10)

對形成 β - 三 明 治 之 緊 密 摺 疊 核 心 的 正 常 高 度 保 留 殘 基 進 行 非 保 留 性 取 代 作 用， 會 扭 轉 結 構， 故 廢 止 T N F α 之 生 物 活 性 (Yamagishi et al., Protein Engineering, Vol.3, No.8, p713-719(1989))。 許 多 這 類 突 變 型 蛋 白 質 (又 稱 muteins) 不 能 形 成 穩 定 且 正 確 摺 疊 的 分 子。 有 些 保 留 性 取 代 作 用 是 允 許 發 生 在 具 三 度 摺 疊 軸 之 底 部 的 厭 水 小 區 內； 但 靠 近 三 聚 體 頂 端 之 排 列 較 疏 鬆 區 域 中 似 乎 有 更 多 的 變 化 餘 地。 尤 其 是 在 分 子 之 排 列 疏 鬆 的 頂 端， 形 成 兩 個 連 接 環 之 間 雙 硫 鍵 橋 的 C y s 6 9 及 C y s 1 0 1， 其 對 變 化 相 當 不 敏 感 (參 見 圖 1 a)。 一 般 而 論， 爲 了 保 留 T N F α 之 某 些 生 物 活 性， 靠 近 T N F α 中 軸 之 突 變 作 用 一 定 要 具 有 高 度 保 留 性， 以 保 有 T N F α 之 完 整 構 形。

分 子 表 面 的 殘 基 具 有 相 當 大 的 自 由 度， 可 進 行 突 變 而 不 產 生 災 難 般 的 結 構 性 報 應， 此 可 由 不 同 動 物 品 種 間 這 類 殘 基 變 化 的 再 現 而 得 證。 因 此， 由 於 此 區 域 取 代 作 用 而 導 致 T N F α 生 物 活 性 顯 著 地 減 少， 指 出 這 類 殘 基 直 接 參 與 T N F α 三 聚 體 與 其 受 體 之 間 的 交 互 作 用。 下 列 殘 基 包 括 位 在 後 β 摺 板 之 B 與 B' 股 之 間 之 連 接 環 內 的 A r g 3 1， A r g 3 2 及 A l a 3 3； 位 在 前 β 摺 板 之 E 及 F 股 之 間 之 連 接 環 內 的 S e r 8 6 及 T y r 8 7； 以 及 位 於 前 β 摺 板 之 H 股 與 後 β 摺 板 之 I 股 之 間 的 連 接 環 內 的 G l u 1 4 6， 顯 示 即 爲 這 類 殘 基 (參 見 圖 3)。 這 些 殘 基 似 乎 歸 屬 於 T N F α 單 體 前 側 與 後 側 的 兩 個 不 同 的 “ 熱 門 點 ” 區 域。 不 管 結 構 性 分 類， 所 有 不 利 突 變 作 用 的 分 佈 情 形 更

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (11)

進一步地加強此種構圖。這種“熱門點”的存在係提供生物功能對突變作用的敏感性，有關評論可參見Yamagishi氏等人，上述引證；及G o h氏等人，Protein Engineering, Vol.4, No.4, p385-389(1991)。

人類 T N F α 多肽之突變研究早已記載於多件專利申請案。

Yamagishi氏等，(E P 2 5 1 0 3 7) 揭示多種位置特異之經突變 T N F α 分子，其為可溶的且具有活體外及／或活體內人類 T N F α 特徵之細胞毒性活性及抗腫瘤活性。

其它具有 T N F α 活性之突變型蛋白質揭示於 W O 9 0 / 0 7 5 7 9。對人類 p 7 5 - T H F 受體之結合親和力比對人類 p 5 5 - T N F 受體之結合親合力更高的突變型蛋白質係揭示於 E P - A - 6 1 9 3 7 2。

這些引證案併入本案作為參考，但無任一引證案揭示 T N F α 分子之修飾作用係為了廢除 T N F α 之生物活性，但提供誘生對抗野生型人 T N F α 之抗體的能力。

僅管如此，這些引證案提供了有關 T N F α 及其生物學作用的有用背景資料。製造及表現 T N F α 類似物與其配方，以及受體結合分析法也有揭示。

4 . 發明簡述

許多各式各樣的數據現已導引出 T N F α 結構對功能之特異關係。所有適用的證據指出三聚體為安定之天然單

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (12)

位的重要性。位於 T N F α 單體不同側上的兩個熱門點區域，以三聚體中相鄰亞單位的角度來看，顯然彼此十分接近。故由殘基 3 1 至 3 5，8 4 至 8 7，及 1 4 3 至

1 4 8 組成之具有功能上重要性的區域，似乎位在三聚體後半部上的兩個亞單位之間的界面上。上述 Yamagishi 氏等人報告 A s p 1 4 3 突變為 T y r 時，會失去受體結合能力及細胞毒性；Tsujimoto 氏等人，J.Biochem.101,p919-925(1987)報告 A r y 3 1 及 A r g 3 2 突變為 A s n 及 T h r 時有類似效果。因此該位置可能與受體結合力及細胞毒性有直接關連。有趣的是，T N F α 之受體結合區域顯然位在兩個亞單位之間的界面上。

簡言之，T N F α 之詳細三級結構係用於解釋抗體結合情形，寡聚合情形及位置主導的突變作用之各式各樣觀察。當結構與最近且大量由位置主導的突變體一起考慮時，具有與受體結合有關之生物學重要性的區域似乎位在三聚體之下半部的亞單位上。

先前技藝之說明

W O 9 5 / 0 5 8 4 9 中揭示，本案之部份發明人揭示修飾自體蛋白質的方法，藉此誘生對抗未修飾自體蛋白質的抗體反應，其中自體蛋白質類似物係以分子生物學方法提供。詳言之，自體蛋白質之一種或一種以上的肽片段被含有免疫顯性之外源 T 細胞抗原決定位之一種或一種以上的肽片段取代。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(13)

在本發明申請前，導引出 W O 9 5 / 0 5 8 4 9 之技藝早已知道共軛型肽類或蛋白質，其包括自身蛋白質，與含有 T 細胞抗原決定位之載體蛋白質共軛形成者。W O 9 2 / 1 9 7 4 6 揭示重組多肽，其含有 L H R H 序列，一種或一種以上 T 細胞抗原決定位及純化位置，此多肽係用於動物之免疫去勢疫苗。

W O 9 5 / 0 5 8 4 9 為主之文獻說明了嵌入免疫顯性之 T 細胞抗原決定位，藉此保留嵌入後抗原決定位兩側任一側的外側區域，此區域源自原先的蛋白質，包括至少 4 個胺基酸。換句話說，抗原決定位不應該與自身蛋白質共軛而成融合蛋白質。較好進行取代作用，如此原先蛋白質之三級結構基本上可予保留。除了沒有明確指導方針是關於被嵌入抗原決定位的細胞內最佳位置，以藉此製造對抗未經修飾之自身蛋白質的最強抗體反應，可預期的，自身蛋白質之間互有差異，但根據本發明說明書之一般指導方針即可決定最適合的位置而不需繁重的實驗，此係藉由篩選含有適當免疫顯性之抗原決定位的肽類，以自身蛋白質分子內之基本上具有相同長度之多種蛋白質部份來替換該肽序列，並利用適合的分析技術決定所升高的抗體反應。

利用現今的模型工具，可能十分困難預測蛋白質中一個或一個以上肽片段之取代作用對原先蛋白質之三級結構的改變。故尋找前導性化合物之藥物發展計劃的研究中，一定要在發展前期考慮一種標準篩選流程，藉以評估那一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (14)

個經修飾之自身蛋白質保留了原先蛋白質之三級結構。可使用數種實驗技術完成評估，這些技術早已描述在蛋白質鑑定法有關之許多教科書中，例如螢光分光法，近 U V 圓二色性分析法，傅立葉 (Fourier) 轉形紅外線分光法及多向 N M R 技術 ("Physical Methods to Characterize Pharmaceutical Proteins", Pharmaceutical Biotechnology, 第 7 冊，Eds. J. N. Herron, W. Jiskoot & D. J. A. Crommelin, Plenum Press, New York (1995))，前導性化合物之篩選方法中，爲了評估三級結構是否發生變化，確實應該組合兩種或兩種以上之上述實驗技術。

圖式之簡要說明

圖 1 (a) 說明天然 T N F α 單體之結晶結構。此圖係由次單位褶疊組成之圖解式骨架， β 股係以胺基至羧基方向呈粗箭頭表示，連接環係以閃電標誌表示，高度曲折區以交叉斜線表示。三聚體之三度空間軸將與此圖定位垂直。

圖 1 (b) 是 T N F α 單體結晶結構之 C α 鏈全貌。此詳細表示法應與圖 1 (a) 共同使用，藉以提供胺基酸序列對應至次單位褶疊之較清楚且特殊造型表現儀式的精確關連。

圖 1 (c) 表示以果凍捲爲主題式的 T N F α 結構。 β 股 (B 與 C) 之間的嵌入作用係以虛線表示。

圖 2 表示 T N F 三聚體中 β 三明治的邊對面式褶疊方

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (15)

式。三級軸向下看，顯示三聚體之窄平板上具有 β 股，其由穿進穿出平板之絲帶方式表示。

圖3 (a) 說明編碼腫瘤壞死因子之DNA序列，該因子具有之胺基酸序列示於圖3 (b) 。

DNA序列可得自Gen Bank, 編號M10988, SEQ ID NO: 339739。

此DNA序列已被Wang氏等人揭示於Science 228,149-154(1985)。此序列包括編碼人類TNF α 之前序列1 - 76至-1)。

包括不表現子之完整基因序列係由Nedwin氏等人揭示於Nucleic Acids, Res.13(17)6361-6373(1985); Shirai氏等人揭示於Nature 313(6005), 805-806(1985); 及Dennica氏等人揭示於Nature 312(5996), 724-729(1984)。

圖3 (b) 表示人TNF α 之胺基酸序列，包括-76至-1之前序列。

圖4 (a) 繪圖說明野生型TNF α (WT) 中免疫顯性抗原決定位P2與P30之取代作用，藉此形成TNF α 同系物TNF2-1至2-7，以及TNF30-1至30-5。

圖4 (b) 表示個別TNF α 同系物在WT序列上確實之取代位置。

圖5 (a) 及5 (b) 表示根據圖1 (a) 之同系物結構，其中P2與P30分別在 β 褶板的各股間及連接環上造成的不同取代作用係以黑色標示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (16)

圖 6 表示 L 9 2 9 分析法中，T N F α 同系物與重組 T N F α 比較之生物活性 (Meager,A.,Leung,H.,&Woolley,J. Assays for Tumor Necrosis Factor and related cytokines.,J. Immunol.Meth.116,1-17(1989))。

圖 7 表示免疫接種經修飾 T N F α 分子之兔子體內的抗 - 人 T N F α 抗體反應。

圖 8 表示 P 2 / P 3 0 經修飾人 T N F α 分子誘生中和抗體的能力，其係由 L 9 2 9 細胞分析法測定。

圖 9 表示對兔子施加 P 2 / P 3 0 經修飾人 T N F α 分子所誘生中和抗體的能力，此係由受體分析法測定。

圖 1 0 表示三位捐血者對 T T，以及 P 2 與 P 3 0 肽之周邊血液單核細胞 (P B M C) 反應。

圖 1 1 表示兩位捐血者對不同的 P 2 與 P 3 0 經修飾 T N F α 分子的多株增殖反應。

圖 1 2 表示 3 4 個試驗所計算出之對於 P 2 及 P 3 0 經修飾 T N F α 分子的增殖指數 (P I s)。

圖 1 3 表示 P 2 及 P 3 0 特異反應者，分別對 P 2 及 P 3 0 經修飾 T N F α 蛋白質所產生的 P B M C 反應。

圖 1 4 表示另兩位捐血者之類似 P B M C 反應。

圖 1 5 表示外側胺基酸對 T 細胞辨識 P 2 及 P 3 0 之影響。

圖 1 6 表示用於製備經修飾 T N F α 分子之突變策略。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (17)

發明簡述

本發明之目的在於提供上述 W O 9 5 / 0 5 8 4 9 一般範圍內的某一特定自身蛋白質，即人類 T N F α ，應如何修飾之指導方針，此修飾是爲了不具有生物活性，但能夠誘生對野生型，具生物活性之 T N F α 的強中和抗體反應。本說明書中，“不具生物活性”乙詞表示不具野生型 T N F α 之活性，主要是其細胞毒性活性。

由上述 T N F α 三級結構之討論可知，具生物活性之 T N F α 是三個次單位組成之三聚體。由於“邊對面”之褶疊方式，“後 β - 褶板”呈現次單位之間的接觸“隱藏”區域，其完全不能接觸溶劑。此區域之明顯取代作用會幾乎無法避免地改變 T N F α 分子的全部生物活性。相反地，“前 β - 褶板”與連接區域提供可接觸的表面區域，其包括與 T N F α 受體交互作用的區域。故對抗此區域的抗體似乎可干擾受體之結合，因此具有 T N F α 中和特性。

欲根據 W O 9 5 / 0 5 8 4 9 而構築去毒性但具免疫原性之 T N F α 分子的熟悉該技術領域之士，其首要選擇將是把免疫顯性之 T 細胞抗原決定位嵌入 T N F α 單體之後 β - 褶板。此區域的修飾作用最可能阻斷 T N F α 之生物活性，但保留可接觸受體之前 β - 褶板而自由地與抗體交互作用。此選擇係與上述在 β - 三明治所構成之緊密褶疊核心進行位置主導式突變作用是一致的。

然而，令人無法預期地，事實卻非如此。下列實驗結

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (18)

論顯示相當不同的結果，因為涉及後 β - 褶板之 B 股與 G 股的取代作用竟然令人驚喜地提供了 T N F α 同系物，此不能誘生對抗 T N F α 之中和抗體。

因此，本發明冀求提供一種經修飾人 T N F α 分子，將此經修飾 T N F α 分子接種人類宿主後，會誘生對抗野生型人 T N F α 的中和抗體，此分子中至少有一個人

T N F α 分子之肽片段被至少一個含有已知免疫顯性 T 細胞抗原決定位之肽取代；或者提供該經修飾 T N F α 分子的截斷型，其含有一免疫顯性抗原決定位與人 T N F α 分子之一側或兩側外側區域（包括至少一個 T N F α B 細胞抗原決定位），其中取代作用造成前 β - 褶板胺基酸序列之實質改變，此取代係發生在任一個連接環及／或前 β - 褶板之 B'，I 或 D 股之任一股。根據推測，後 β - 褶板之 B 股與 G 股的取代作用應予避免。

本說明書中，“實質改變”乙詞表示超過個別胺基酸之保留式取代所造成的改變，且超過不改變野生型 T N F α 二級及／或三級結構之點突變作用所造成的改變。易言之，T N F α 序列中導入的 T 細胞抗原決定位，較好導入與野生型 T N F α 序列之相同性極低的序列。

本發明也提供經修飾人 T N F α 分子，接種該經修飾人 T N F α 分子至人類宿主後，會誘生對抗野生型人 T N F α 之中和抗體，此分子中至少有一個人 T N F α 分子之肽片段被至少一個含有已有已知免疫顯性 T 細胞抗原決定位之肽取化；或提供該經修飾 T N F α 分子之截斷型

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 (19)

，其含有免疫顯性抗原決定位與人 T N F α 分子之一側或兩側外側區域（包括至少一個 T N F α B 細胞抗原決定位），其中該經修飾 T N F α 分子實質上無 T N F α 活性。

本說明書中，“實質上無 T N F α 活性”乙詞表示將這類經修飾 T N F α 分子接種至人類，不會產生明顯副作用，此作用係由天然 T N F α 誘導的已知細胞激素作用所致。易言之，本發明之經修飾 T N F α 分子是藥學上可接受的物質。

爲了要測試本發明之經修飾人 T N F α 分子是否實質上無 T N F α 活性，可使用本發明書所記載的 L 9 2 9 生物分析法。此外，爲了確認此經修飾 T N F α 分子之免疫原特性，於適當宿主體內誘生的抗經修飾 T N F α 分子的抗體將明顯抑制野生型 T N F α 之活性，如 L 9 2 9 生物分析法所示，及／或該抗體會明顯抑制野生型 T N F α 結合至 5 5 k D T N F α 受體 1 (T N F α - R 5 5) 或結合至 7 5 k D T N F α 受體 (T N F α - R 7 5) 。

這些適當的宿主例如有靈長類（例如恆河猴或 Cynomuleus 猴），齧齒類（例如大鼠，小白鼠或天竺鼠），或兔類（例如兔子）。

適用於評估本發明經修飾分子特性之分析法係使用抗體或抗血清完成，其濃度視分析法而定，且此分析法應該反映出所涉及之反應物的生理狀況，或應能由分析法所得結果而外推其生理狀況。易言之，分析法之結果一定要顯示活體內對抗 T N F α 之抗體生理濃度能夠降低 T N F α

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (20)

活性，至少降低 10%，15%，25%，30%，35%，40%，45%，55%，60%，65%，70%，75%，80%，85%，90%，95% 或 100%。熟悉該項技術者可輕易知悉如何測知這些狀況。

欲了解的是，“明顯抑制野生型 TNF α ”較好是造成減輕或去除野生型 TNF α 之副作用。這類抑制作用較好至少 10%，至少 15%，至少 15%，至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40%，至少 45%，至少 50%，至少 55%，至少 60%，至少 65%，至少 70%，至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 95%，或甚至 100%。

據此技術背景，本發明之經修飾人 TNF α 分子的特徵在於，此 TNF α 分子中發生取代的區域涉及前 β - 褶板及／或連接環，如此基本上保留了後 β - 褶板任一之 β - 褶板結構。

雖然尚未經實驗充分確認，其必然可假設形成後 β - 褶板之任一皆具有此分子特徵，故較好在 TNF α 分子內的取代作用係發生在不包括後 β - 褶板任一完整股的區域內。由上述殘基 31 - 35 之功能重要性可假設，後 β - 褶板之各股間的連接環較好也避免取代。

然而，取代可以發生在 TNF 分子中只涉及後 β - 褶板 D 股片段的區域。

根據本發明之較佳實施體系，取代作用包括前 β - 褶板之 H 股的至少一片段，及連接至後 β - 褶板 I 股之連接

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (21)

環的至少一片段，較好是胺基酸 1 3 2 至 1 4 6。根據本發明另一實施體系，取代作用包括 H 股與 I 股之片段及整個連接環，較好是胺基酸 1 3 2 至 1 5 2。根據本發明另一較佳實施例系，取代作用包括後 β -褶板 D 股之片段，前 β -褶板 E 股之至少一個片段，以及整個連接環，較好是胺基酸 6 5 至 7 9 或 6 4 至 8 4。

根據本發明之另一實施體系，取代作用包括前 β -褶板之完整 C' 股與 C 股，及後 β -褶板 D 股之一片段，較好是胺基酸 4 0 至 6 0。

根據本發明之另一實施體系，取代作用包括前 β -褶板 E 股之至少一片段及連接環之一或兩者至少一片段，較好是胺基酸 7 6 至 9 0。

被嵌入的 T 細胞抗原決定位較好應為任何已知在絕大多數人 H L A 第 I I 類分子中具免疫原性者。適合的抗原決定位可衍自破傷風毒素，較好是抗原決定位 P 2 及 / 或 P 3 0，請參見 Panina-Bordignon 氏等人，Eur.J.Immunol.19: 2237-42, 1989。也可使用衍自白喉毒素之抗原決定位。

較佳之經修飾人 T N F α 分子 (T N F α 同系物)，參照上述取代位置，係示於本文附錄序列表中的 S E Q I D N O : 8 及 S E Q I D N O : 1 6。其它可用的 T N F α 同系物列示於 S E Q I D N O : 4, 1 0, 1 4 及 1 6。

本發明也關於上述本發明經修飾 T N F α 同系物之截斷型同系物。故此 T N F α 分子之截斷型同系物也可構成

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (2)

本發明 T N F α 疫苗中的活性組份，該截斷型同系物含有任一免疫顯性 T 細胞抗原決定位及包括至少一個 T N F α B 細胞抗原決定位之一側或兩側外側區域，較好含有至少 5 個胺基酸。T 細胞抗原決定位藉 A P C 呈現至 M H C 第 I 類分子時，會誘使 T 細胞增生，同時 B 細胞抗原決定位將被 B 細胞上的免疫球蛋白受體辨識，隨後被 M H C 第 I 類分子表現在這些細胞上。根據 W O 9 5 / 0 5 8 4 9 與本發明，構建了誘生對抗野生型 T N F α (其攜帶 B 細胞抗原決定位) 之免疫反應的基礎。

理論上及實驗上皆可鑑定出 T N F α 中的 B 細胞抗原決定位。鑑定可能是直線型 B 細胞抗原決定位之十進位方法早已發表，這些方法形成調查這些潛力抗原決定之實驗基礎。注射含有 T 細胞抗原決定位之截斷型 T N F α 分子至異源系統 (例如兔子) 所誘生的抗體，可在活體外分析其結合天然人 T N F α 的能力，較好以中和方法分析。可活體外篩選多組已知之中和單株抗體，藉以得知其結合 T N F α 之潛力 B 細胞抗原決定位的能力。上述兩種方法皆為鑑定最佳可能之 B 細胞抗原決定位的策略。

咸信上述 T N F α 同系物維持單體形底，因為修飾作用會破壞野生型 T N F α 原有之三聚體傾向。

本發明另關於所請經修飾 T N F α 分子之二聚體，寡聚體，特別是三聚體或多聚體，其前提為不具有 T N F α 活性，也關於編碼所請經修飾 T N F α 分子之經分離 D N A 分子。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (23)

編碼較佳 T N F α 同系物之經分離 D N A 分子具有 S E Q I D N O : 7 及 1 5 所示序列，編碼其它適用同系物之 D N A 分子列示於 S E Q I D N O : 3 , 9 , 1 3 及 1 5 。

本發明另包括載體，其含有編碼該同系物之經分離 D N A 分子；以及表現載體，其包括被操作性連接至適合表現控制序列上的該 D N A 分子。

本發明另一方面關於被該表現載體轉形之宿主，其係用於表現該同系物。

此宿主可為表現所常用之任一宿主，例如細菌，酵母菌或黴菌，昆蟲，哺乳動物或禽類細胞株。

本發明另關於製造所請 T N F α 同系物之方法，其係於可生產同系物之合適條件下，令用於表現同系物之表現載體所轉形的宿主細胞生長，及回收所產製的同系物。

若有需要，本發明之經修飾 T N F α 分子可與適當佐劑分子一起表現而形成一融合蛋白質或其一部份，該佐劑分子較好是免疫活性佐劑，例如 G M - C S F , H S P 7 0 或間白素（例如間白素 2 ）。

詳言之，生產經修飾 T N F α 分子係將適合之基因片段取代至編碼天然人 T N F α 分子之基因中，該片段編碼含有或構成免疫顯性 T 細胞抗原決定位之肽。然後令此經修飾 T N F α 基因在適合的真核或原核表現載體中表現。純化表現後的經修飾 T N F α 分子，如下所述予以再摺疊。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (24)

雖然以嵌入整個 T 細胞抗原決定位為宜，有些情況嵌入肽序列較有利，該肽序列含有抗原決定位與蛋白質之外側區域，該抗原決定位係衍自該蛋白質。

根據本發明，經修飾人 T N F α 分子可用於疫苗以對抗 T N F α 。疫苗配方發展之策略係基於純化之蛋白質，例如經調和之自身蛋白質，其通常相常於任何其它以蛋白質為主之藥品的配方策略。潛在問題與克服這些問題的指導方針（例如保留三級結構），在下列數種教科書中探討，例如 "Therapeutic Peptides and Protein Formulation

Processing and Delivery Systems" .Ed.A.K.Banga;Technomic Publishing AG,Basel 1955。佐劑的使用，例如氫氧化鋁，磷酸鋁（Adju-Phos），磷酸鈣，muramyl二肽同系物，或一些最近疫苗佐劑的發展，例如生物可分解之微米立子及 Iscom's，是配方的加強作用，乃該技術領域之製藥科學家熟知的。

製備本發明疫苗（其含有作為活性組份之肽序列），乃該技術領域普遍熟知的，例如美國專利 4,608,251；4,601,903；4,599,231；4,599,230；4,596,792；4,578,770 皆併入本文作為參考。傳統上，這類疫苗係製成可注射之液體溶液或懸浮液；也可製成適合在注射前溶解或懸浮於液體中的固體型式，也可乳化此製劑。活性且免疫原性的組份通常與賦形劑混合，此懸形劑是藥學上可接受者且與活性組份可相容的。適合的賦形劑包括水，鹽水，葡

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (25)

葡萄糖，甘油，乙醇等，及其組合。若有需要，疫苗可含有少量輔助性物質諸如保濕劑或乳化劑，pH緩衝劑，或加強疫苗效力之佐劑。

已知疫苗接種係採非經腸方式，藉皮下或肌肉內等方式注射。適合其它用藥途徑之其它配方包括栓劑，有些情況可用口服配方。使用栓劑時，傳統結合劑及載劑包括聚烷撐二醇或甘油三酸酯等；這類栓劑可由含有0.5%至10%，較好（-2%，活性組份之混合物製成。口服配方包括一般使用之賦形劑，例如藥用酒精，乳糖，澱粉，硬脂酸鎂，糖精鈉，纖維素及碳酸鎂等。這些組成物之型式有溶液，懸浮液，錠劑，藥丸，膠囊，緩釋配方或散劑，其中含有10-95%活性組份，較好25-70%。

多肽可調配成天然型或鹽型式之疫苗。藥學上可接受之鹽類包括酸加成鹽（與肽之自由胺基反應所形成者），其係與下列無機酸反應而形成的，包括氫氯酸或磷酸，或與有機酸（例如乙酸，草酸，酒石酸，金鋼酸等）反應而形成。與自由羧基形成的鹽類也可衍自無機鹼，例如鈉，鉀，銨，鈣或鐵之氫氧化物；及有機鹼，諸如異丙胺，三甲胺，2-乙基胺基乙醇，組織胺，普魯卡因（procaine）等。

疫苗係以劑量配方可相容的方式予以投服，此種劑量乃治療有效的且免疫原性。投服量係由欲治療之對象決定，包括個體產生免疫反應之免疫系統效能，及所欲保護之程度，此程度乃由病人體內TNF α 量決定。適合的劑量

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 (26)

範圍為每次接種約有數佰毫克之活性組份，較好約 $0.1 \mu g$ 至 $1000 \mu g$ ，例如 $1 \mu g$ 至 $300 \mu g$ ，尤其是約 $1 \mu g$ 至 $50 \mu g$ 。首次接種與補強注射之合適療程也是可改變的，但通常在第一次接種，接著下一次注射或另一種免疫接種。

施打疫苗的方式可有多種變化。可採用任何一種接種疫苗之習知方法。咸信這些方法包括在固體之生理上可接受基質上或於生理上可接受之懸浮液中經口服用，或以注射等方式非經腸施用。疫苗劑量視用藥途徑而定，且隨欲免疫者之年齡，次要病況，欲接種者之體重而變化。

有些本發明之經修飾 $TNF \alpha$ 分子在疫苗中具充分免疫原性，但有些在疫苗中另外含有佐劑物質時，會加強免疫反應。

加強疫苗之佐劑功效的多種方法包括使用諸如氫氧化鋁或磷酸鋁 (alum) 等藥劑，其一般以 0.05 至 0.1% 於磷酸鹽緩衝鹽水中之溶液使用，混合合成之糖類聚合物 (Carbopal) 而以 0.25% 溶液形式使用，疫苗中蛋白質之聚集現象係以 70 至 $101^\circ C$ 之溫度分別處理 30 秒至 2 分鐘。聚集至白蛋白係與經胃蛋白酶處理過的 (Fab) 抗體反應而完成，也可混合使用細菌細胞，例如小棒桿菌 (C.parvum) 或內毒素或葛蘭姆陰性細菌之脂多醣組份，乳化於生理上可接受之油類載劑例如二縮甘露醇單油酸 (Aracel A) 或以作為阻斷取代物之 20% 全氟化碳溶液 (Fluosol-DA) 進行乳化。根據本發明，DDA (溴化二甲

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (27)

基二（十八碳烷基）銨）是佐劑之預期候選物，但 Quil A 與 R I B I 也可使用。其它可能的佐劑有單磷醯基脂肪 A（M R L）及 muramyl 二肽（M D P）。其它適合的佐劑有氫氧化鋁，磷酸鋁（Adju-Phos），磷酸鈣，muramyl 二肽同系物。有些最近發展的疫苗佐劑，例如生物可分解之微粒子與 Iscom's 也適合使用。

另一種高度注意之（即較佳的）達到佐劑作用的可能方法是使用 Gosselin 氏等人，1992 所記載的技術（其併入本案作為參考）。簡言之，相關抗原，例如本發明之經修飾 T N F α 分子，可藉由將此抗原與抗體（或結合抗原之抗體片段）共軛而促進該抗原表現出來，該抗體係對抗單核細胞／巨噬細胞上的 F c r 受體。尤其是抗原與抗 - F c r R I 之所形成的共軛物早已證實可增進免疫接種所需的免疫原性。

也可使用免疫調節物質，例如淋巴激素（如 I F N - γ ，I L - 2 及 I L - 12）或合成之 I F N - γ 誘發劑，例如聚 I : C 與上述佐劑之組合。

許多範例中，必須多次接種疫苗，通常不超過六次接種，更經常不超過四次接種，較好一次或一次以上，通常至少三次接種。免疫接種一般有 2 至 12 週的間期，更常是 3 至 5 週間期。階段性補強係為 1 - 5 年間期，通常 3 年，藉此可冀求維持所需的保護性免疫。

本發明多肽與佐劑摻和的理由之一，是為了活化細胞性免疫反應。但此效果也可由其它方法達成，例如以非病

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (28)

原性微生物表現疫苗中的有效抗原。這類微生物之熟知範例是牛結核桿菌 B C G。

較好非病原性微生物是細菌，例如選自分枝桿菌菌屬，沙門氏桿菌屬，假單胞菌屬及大腸桿菌屬。特別佳的非病原性微生物是牛結核桿菌。

將編碼本發明分子之一套或一套以上的核苷酸序列併入牛結核桿菌 B C G 菌株衍生的分枝桿菌，會增強 B C G 菌株之免疫原作用。較好併入一套以上本發明核苷酸序列以增進免疫反應。因此本發明某一方面係關於一疫苗，其中在微生物基因組中併入至少 2 套（例如至少 5 套）編碼該分子之 D N A 序列。成套之 D N A 序列可與編碼相同分子者相同，或是編碼相同多肽或多肽同系物之相同 D N A 序列的變種，另一實施體系中，成套的 D N A 序列可以是編碼不同多肽之不同 D N A 序列，其中至少有一個多肽是本發明之多肽。

製備本發明之活疫苗可經由培養本發明之經轉形非病原性細胞，將這些細胞轉移至疫苗基質，隨機添加載劑，賦形劑及／或佐劑。

本發明之核酸片段除了可用來作為合成本發明分子之起始物及作為雜交探針（其適用於直接雜交分析法或作為 P C R 等其它分子擴大法中的引子），其也可用於活體內有效表現抗原，即該核酸片段可用於所謂 D N A 疫苗。近期研究顯示，D N A 片段植入在真核細胞內不可複製的載體中，可採肌內注射或皮下接種將此 D N A 片段導入動物

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (29)

(包括人類)，此即所謂的“基因槍”研究。此DNA係由諸如肌肉細胞分離純化，意欲的基因係由在真核細胞內有功能的啟動子(例如病毒啟動子)予以表現，然後基因產物會刺激免疫系統。這些近期發展的方法係描述於Ulmer氏等人，1993，在此併入作為參考。

這類“DNA疫苗”之效力可藉由施用編碼表現產物之基因與編碼能調節免疫反應之多肽的DNA片段而增強。舉例而言，編碼淋巴激素前驅物或淋巴激素(諸如INF- γ ，IL-2，或IL-12)之基因與編碼免疫原性蛋白質之基因一起施用，施用兩種獨立不同的DNA片段或施用包含在相同載體內的兩種DNA片段。

此疫苗可用於預防／治療上述任一疾病，這些疾病在病理生理學上係以TNF釋放為特色，尤其是慢性發炎性疾病。這類疾病可以類風濕性關節炎及發炎性腸病(IBD)作為範例。後者包括潰瘍性大腸炎及康氏(Crohn's)症，尤其是康氏大腸炎。其它範例有癌症，惡病質(通常與癌症有關)，多發性硬化症，糖尿病，牛皮癬，骨質疏鬆症及氣喘。本發明較好可治療或預防的癌症在組織遺傳學上可分類為惡性上皮性腫瘤，包括癌症與腺癌；以及惡性非上皮性腫瘤，包括脂肪肉瘤，纖維肉瘤，軟骨癌，骨癌，平滑肌肉瘤，橫紋肌肉瘤，神經膠質瘤，神經纖維母細胞瘤，骨髓母細胞瘤，惡性黑色素瘤，惡性腦膜瘤，多種白血病，多種骨髓增生性失調症，多種淋巴瘤(Hodgkin淋巴瘤或非Hodgkin淋巴瘤)，血管肉瘤，卡波西

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (60)

氏 (kaposi's) 肉瘤，淋巴管肉瘤，惡性畸胎瘤，生殖不全瘤，精細胞瘤及絨毛膜癌。

癌症與腺癌是最常見的 (估算約有 90 % 死亡係因癌症所致)，故為本發明所欲治療 / 預防之標的疾病。最重要的癌症與腺癌為呼吸途徑 (尤其是支氣管起源者)，乳房，結直腸及胃之癌症。但前列腺，卵巢，淋巴組織與骨髓，子宮，胰臟，食道，膀胱及腎的癌症與腺癌也造成顯著的死亡數，故為意欲治療者。

較好疫苗係以預防性療法予以使用，但就這些疾病的慢性特性與其緩和及再現的傾向觀之，疫苗也可施用至業已診斷出患有上述一種或一種以上疾病的病人，以維持病人於緩和狀態。

根據以鼠進行的早期研究，咸信本發明之經修飾 T N F α 同系物也可作為上述疾病之急性期的一部份治療或至少視為可帶給病人緩和狀態且維持穩定狀態。

目前不能記載特定的有效劑量範圍，因為疫苗尚未在可能患有上述疾病的人類進行測試。

不論何種劑量，將由負責醫師開出處方。

本發明之實施體系中，疫苗含有兩種經不同修飾之 T N F α 分子的混合物，此 T N F α 分子含有衍自破傷風類毒素之兩種不同的 T 細胞抗原決定位，例如 P 2 與 P 30。此混合物可隨機含有適量的藥學上可接受之佐劑。

本發明另一方面，疫苗不含有上述經修飾人 T N F α

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (31)

分子，但含有一構築體，其包括操作性連接在啟動子的非傳染性，非合併之編碼該分子的DNA序列，該啟動子序列可調節該DNA序列在人表現，該構築體的表現量為足夠該構築體進行分離純化且發生充分表現而能足以誘生抗TNF α 之中和抗體反應。

此類疫苗的用途，即所謂的DNA疫苗，係說明於美國專利第5,589,466及5,580,859號等，此兩專利皆併入本案作為參考資料，尤其是有關接種方法之說明。

DNA疫苗可包括病毒表現載體，例如逆轉錄病毒表現載體。

通常本發明疫苗可調製成經口或非經腸方式施用，尤其皮下，肌肉或皮內接種。

本發明另包括藉由施用本發明疫苗而誘生抗體（較好是單株抗體）的用途，尤其是診斷用途。

本發明另關於測試人類體液是否存在TNF β 之方法，包括令含本發明經修飾TNF α 之組成物與人類體液樣品接觸，及測定該抗體是否與樣品中的TNF α 結合。

本發明也關於TNF α 相關疾病的診斷方法，其係使用活體外免疫分析法來測定人類體液中的TNF α 。

此類方法涉及使用三明治式分析法，ELISA分析法或相等物分析法，其可未經擴大或使用抗生物素／生物素技術等予以擴大。

疫苗／重組蛋白質可使用該技術領域之士熟悉的下列

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (32)

分析法予以鑑定：

S D S - P A G E 凝膠，其係以考馬藍或銀染色（提供分子大小與純度的資料），

I E F（等電點聚集法）（提供等電點資料），

內毒素 L A L 分析法（提供純度資料），

宿主蛋白質（提供純度資料），

質譜分析（提供分子量資料），

S E - H P L C 與 U V 測定圖譜（提供分子量分佈資料），

N - 終端序列（提供同一性資料），

圓二色法（提供三級結構之資料），

S E - H P L C 與 M A L L S 測定法（提供光閃射所測知之三級結構資料），

胺基酸組成（提供同一性資料），

異源物種之免疫原性（小白鼠，大鼠或兔子），

西方轉漬法中對抗體的反應性，

N M R 光譜，

結晶結構，

完整胺基酸序列測定。

較佳實施體系之實驗部份與說明

1. 介紹

先前申請案 W O 9 5 / 0 5 8 4 9 中，已知經 T 細

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (33)

胞抗原決定位修飾之鼠 T N F α 分子可誘生高力價的抗體，此抗體會與天然（野生型）鼠 T N F α 交叉反應。這些抗體能在活體外及活體內干擾 T N F α 與其受體。對抗 T N F α 之免疫接種已在患有 T N F α 引起之疾病的數種動物模型中證實具有有利之功效，例如實驗性惡病質，膠原關節炎及實驗性過敏性腦脊髓炎（E A E）。獲得這些動物試驗結果係不管所使用的兩種經修飾鼠 T N F α 分子（命名為 M R 1 0 3 及 M R 1 0 6）並未最佳化而使其對 M H C 第 I I 類單倍體型的 D B A / 1 及 S J L 小鼠中具有最佳之免疫原性。上述小白鼠品系係分別用於膠原關節炎及 E A E 實驗者。另一實驗中，不同之經修飾鼠 T N F α 分子（M R 1 0 5）顯示會提供更強的免疫反應，該重組型鼠 T N F α 係使用甲醛而共軛至大腸桿菌蛋白質上。

M R 1 0 3，M R 1 0 5 及 M R 1 0 6 為小白鼠分子，再者，根據先前申請案 W O 9 5 / 0 5 8 4 9 並未導出有關經 T 細胞抗原決定位適當取代之人經修飾 T N F α 分子的免疫原性及這類分子誘生 T N F α 中和自體抗體（因為其皆為活性分子）之潛在能力的結論。

2. 人 T N F α 構築體之發展

適合人類使用經修飾人 T N F α 分子之 T N F α 疫苗一般應符合下列要求：

a. 其對大部份族群應是免疫原性的。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (34)

b. 其最好應能誘生 T N F α 中和抗體。

c. 其應不具有任何殘留之 T N F α 生物活性。

此外，選擇製法時，其它實施參數，例如重組表現能力，純化容易度，溶解度等，也應予以考慮。

2. 1. 經修飾 T N F α 的免疫確定性

人 T N F α 疫苗之發展過程中，其目標在於生產經修飾人 T N F α 分子，此分子最終對人類族群之最大可能比例，此當然代表不同 H L A 類第 I I 型之大多數，具有免疫原性。因此，使用顯性的 T 細胞抗原決定位，而不是用於先前動物試驗之 M H C 特異抗原決定位。由先前申請案 W O 9 5 / 0 5 8 4 9 不能得知這些抗原位如何影響這類分子誘生中和抗體之能力。

選出科學性文獻中早已充分鑑定之兩個由破傷風類毒素 (T T) 衍生的 T 細胞抗原決定位，P 2 與 P 3 0。這些抗原決定位係已知在 T T 中具免疫顯性的，且能夠與人類族群中至少 8 0 % H L A 類第 I I 型分子結合。

使用這些 T T 抗原決定位，預期可測試 T N F α 構築體於活體外對經 T T 免疫之捐血者所產生之周邊血液單核細胞 (P B M C) 及 T 細胞株的免疫原性。

P 2 抗原決定位之胺基酸序列是

Q Y I K A N S K F I G I T E L 且對應 T T 胺基酸

8 3 0 - 8 4 4，而 P 3 0 抗原決定位之序列是

F N N F T V S F W L R V P K V S A S H L E 且對應至

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (35)

T T 胺基酸 9 4 7 - 9 6 7。將 P 2 及 P 3 0 取代至兩個不同的人 T N F α 分子中，將分別置換約 1 0 % 及 1 5 % 的天然 T N F α 序列。當此兩種抗原決定位插入同一個 T N F α 分子時，此分子約有 2 5 % 被置換，吾等可能會害怕此舉將嚴重干擾剩下的 T N F α 分子之天然部份。故決定發展兩種 T N F α 分子，其分別含有 P 2 或 P 3 0。併用此兩種分子，預期對至少 8 0 % 人類族群具免疫原性。極有可能部份由 P 2 或 P 3 0 抗原決定位及部份由 T N F α 外側區域組成的截斷型分子也會增加免疫原性，進而造成構築體對接近 1 0 0 % 之族群具有免疫原性。

雖然，所有鼠 T N F α 構築體可能在所有被測試的小白鼠品系中誘生抗體（參考上述 M R 1 0 3，1 0 5 及 1 0 6 的討論），但優先的預期將是，外來的 T 細胞抗原決定位插入 T N F α 的某些位置會比其它位置更有利於藉由 M H C 第 I I 類分子而將抗原決定位呈現至 T 細胞。因此決定生產一系列不同之經修飾人 T N F α 分子，其具有 P 2 及 P 3 0 抗原決定位插入分子中的不同位置，參見圖 4。隨後在活體外 T 細胞分析法中測試全部分子，此係根據由多數健康經 T T 免疫之捐血者所分離的週邊血液單核細胞（P B M C）或 P 2 / P 3 0 特異 T 細胞株。

但與預期相反的是，雖然可預見少量的差異，P 2 及 P 3 0 抗原決定位之分子內位置並非具有被抗原表現細胞處理及後續被呈現至 T T 細胞之能力所必要的。因此，P 2 插入位置 1 3 2 至 1 4 6，6 5 至 7 9 及 7 6 至 9 0

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (36)

，且 P 3 0 插入位置 4 0 至 6 0 及 1 3 2 及 1 5 2 (T N F α 2 - 5 , 2 - 3 , 2 - 7 , 3 0 - 2 , 3 0 - 5) 皆被處理且呈現至 T 細胞。故由上述故論可知，這些分子極有可能最後在人類族群中是普遍具有免疫原性的。

2 . 2 經修飾人 T N F α 分子誘生中和抗體的能力

如上所陳，由先前 W O 9 5 / 0 5 8 4 9 描述之鼠研究並不能推測那一個位置是能夠誘生中和 T N F α 抗體之最適合位置，因為此三個同系物 M R 1 0 3 , M R 1 0 5 及 M R 1 0 6 皆能夠誘生抗體，僅管其取代區域不同。因此生產了一系列不同的人 T N F α 分子，其具有 P 2 或 P 3 0 插入不同位置。此取代作用是任意分佈至整個分子。然後以活體外生化及生物學分析法測試經由注射這些分子於兔子所誘生的抗體，以得知其干擾 T N F α 生物活性的能力。

本案說明人於未公開研究中已知，根據被插入之抗原決定位的分子內位置可觀察所誘生之自體抗體的不同且涵蓋全部的特異性。與根據被觀察之 T N F α 分子之結構數據所預期的結果相當不同，即 P 2 或 P 3 0 在前 β 褶板中完成取代作用會完全喪失分子的 T N F α 生物活性，但卻同時保留此經修飾分子誘生 T N F α 中和抗體的能力。

在上述位置含有 P 2 或 P 3 0 之分子已證實對於誘生中和抗體特別有效。故此類分子任一者是用於人 T N F α 疫苗之潛在候選者。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (37)

2 . 3 不同 T N F α 構築體之生物活性

疫苗中使用如 T N F α 般有毒性的分子顯然無法實施。故經修飾 T N F α 分子必須無毒性，即沒有任何殘留的 T N F α 活性。

緣是之故，於活體外 T N F α 依賴式生物分析法與受體結合分析法中測試全部突變型 T N F α 蛋白質，爲了檢查這些分子是否無毒性。清楚顯示這些經修飾 T N F α 分子 (T N F 2 - 5 , 2 - 3 , 2 - 7 , 3 0 - 2 及 3 0 - 5) 皆無 T N F α 生物活性。因此符合了這些分子作爲普遍使用之無毒性疫苗而誘生抗一人 T N F α 中和抗體的所有必要條件。

實例 1

遺傳構築程序

決定了製造 1 0 個不同的經修飾人 T N F α 分子—其中 5 個含有 P 2 抗原決定位，另 5 個含有 P 3 0 抗原決定位。這些抗原決定位分佈在分子內的不同位置。進行遺傳構築係使用多種標準限制酶與 P C R 爲主的突變技術。遺傳構築體以圖示於圖 4 a 及 4 b。編碼經修飾 T N F α 分子之 D N A 序列及其對應胺基酸序列示於 S E Q I D N O : 1 ~ S E Q I D N O : 2 0。突變型人 T N F 2 - 5 基因之構築，選殖與突變策略，及隨後的表現，分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (38)

離與純化 T N F 2 - 5 同系物將由下列實例加以說明。

構築與製造 T N F 2 - 5 :

突變型人 T N F 2 - 5 基因之遺傳構築，選殖及突變策略

編碼突變型人 T N F 2 - 5 同系物之基因的遺傳構築法，係根據以傳統 P C R 為基礎之突變技術，以及所有其它遺傳構築法。

人 T N F α 之天然 D N A 序列，其編碼此分子可溶部份，係藉由傳統 P C R 選殖法製得，其中使用由市售人 c D N A 庫，C L O N T E C H Laboratories 廠，Palo Alto, CA, USA (圖 1 6 , 1) 之人工合成的引子 I 與 I I (表 I 及 S E Q I D N O : 2 1 及 2 2) 。天然基因被插入市售大腸桿菌表現載體 p E T 2 8 c ，其可購自 Novagen 廠，Madison, WI 53711, USA, 此插入方式係可令該基因被 I P T G 可誘發啟動子同架構轉錄者。

進行 T N F α 突變同系物 T N F 2 - 5 之遺傳構築法，係將 P C R 突變技術施加至天然 D N A 序列。將編碼 T 細胞抗原決定位之核酸序列併入人工合成之 7 5 個單元體的寡核苷酸，(即引子 " mut 2 - 5 " ，表 1 及 S E Q I D N O : 2 7) ，此寡核苷酸係介於 T N F 同系 D N A 之 3 ' 及 5 ' - 接合延伸端兩者之間，故 " m u t " 引子能在選擇用於 T N F 2 - 5 之特定位置上接合天然人 T N F α 基因序列 (參見圖 1 6 , 2 a) 。 " m u t "

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (39)

寡核苷酸中，編碼 T 細胞抗原決定位之密碼數目完全吻合 T N F 同系 D N A 之 3' - 與 5' - 接合延伸端兩者之間所刪除之 T N F 密碼數目。突變引子係用於製造一種 P C R 產物，其含有編碼 T 細胞抗原決定位之 D N A，以及跟隨（或 3' 端）被嵌入之抗原決定位的 T N F α 序列（見圖 1 6，2 a）。在抗原決定位嵌入點之前（或 5' 端）延伸的 T N F α D N A，係由第二種 P C R 產物提供，其使用引子 I 及 I I（表 1，S E Q I D N O：2 3）（圖 1 6，2 b）。此兩種 P C R 產物在最後一次 P C R 反應中被連接在一起（圖 1 6，3），其係由兩次反應使用兩個最遠端的引子（I，I I）而完成的。然後將完整之突變型 T N F 2 - 5 D N A 序列導入市售之大腸桿菌表現載體，以類似天然基因之表現選殖方法，如此基因可被經轉形細胞中 I P T G 可誘發的啟動子轉錄。

用於構築其它同系物（T N F 2 - 1，2 - 3，2 - 4，2 - 7，3 0 - 1，3 0 - 2，3 0 - 3，3 0 - 4 及 3 0 - 5）之“mut”引子分別示於 S E Q I D N O：2 3 - 2 6 及 2 8 - 3 3。

表 1

引子 I 人 TNF- α FW. 24個單元體

NcoI-位置

5' -GAC AAG CCC ATG GTC AGA TCA TCT-3'

引子 II 人 TNF- α Rev 30個單元體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(40)

XbaI位置

5'-TCT CTA GAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC-
3'

引子 "mut2-5" 突變型寡P2-5(tt830-44), 75個單元體

5'-G AAG GGT GAC CGA CAG TAC ATT AAG GCC AAT
TCG AAG TTC ATT GGC ATC ACT GAG CTG TCT GGG
CAG GTC TAC TT-3'

引子 III 人TNF-alpha Rev2'nd 21個單元體

5'-CCC AAA GTA GAC CTG CCC AGA-3'

培養重組型細菌，回收及溶解包涵體

T N F 2 - 5 同系物之蛋白質純化

T N F 2 - 5 蛋白質之製法類似其它重組 T N F 分子之製法。

1. 令含有 50 μ g / ml 卡本黴素 (Carbenicillin) 之 20 ml T B 培養基中，接種經轉形之大腸桿菌菌株，此菌株攜帶承載編碼重組蛋白質之 T N F 基因的

I P T G 可誘發質體載體，令此大腸桿菌在 37 $^{\circ}$ C 震盪生長一夜

2. 令此隔夜培養物以 1 : 25 稀釋於含有 50 μ g / ml 卡本黴素之 250 ml T B 培養基中，令培養物生長至 O D 450 為 1。藉添加 I P T G 至終濃度為 1 mM

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (41)

而誘發重組蛋白質的表現。於 37°C ，震盪培養一夜。

3. 藉離心 ($-3500 \times g$)，自培養基回收重組細胞。以 B S B 緩衝液清洗細胞團塊一次。每 50 克涇重之細菌使用 150 ml B S B。

4. 以最大震幅，超音波震盪 4 次，各 30 秒，直到細菌懸浮液完全均質化。進行超音波震盪係使用 M S E Soniprep 150 超音波震盪器，其配有 9.5 mm 標準探針 (Soniprep 05 38 121-1154)。

5. 每克細胞團塊添加 $8 \mu\text{l}$ P M S F (50 mM) 及 $80 \mu\text{l}$ 溶解酶溶液 ($10 \text{ mg} / \text{ml}$)。室溫培養 30 分鐘。

6. 每克細胞團塊添加 4 mg 脫氧膽酸，混合並保存於 37°C 。

7. 當此溶液變得黏稠，每克細胞團塊添加 $20 \mu\text{l}$ D N A s e ($1 \text{ mg} / \text{ml}$)，以及 M g C l 至終濃度為 5 mM ，混合並保存於室溫歷 30 分鐘。

8. 以最大震幅，在冰上超音波震盪 5 次 (各 30 秒)，每次間隔 30 秒，直到溶液變成非黏稠性的液體。

9. 離心 1 小時 ($20,000 \times g$)，保留上清液以供檢查日後清洗步驟，即檢查是否有包涵體已被沈澱出來。

10. 令細胞團塊再次懸浮於 MiliQ 水中 (每克大腸桿菌用 1 毫升水)，搖盪 1 小時。

11. 離心 1 小時 ($20,000 \times g$)，保留上清

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (42)

液以供檢查是否有包涵體已被沉澱出來。

1 2 . 令細胞團塊再次懸浮於 1 M 尿素 (每克大腸桿菌溶解於 1 毫升中) , 搖盪 1 小時。

1 3 . 離心 1 小時 ($20,000 \times g$) , 保留上清液以供檢查是否有包涵體已被沉澱出來。

1 4 . 令細胞團塊再次懸浮於 1 M 胍 , 每克大腸桿菌溶於 1 m l 中 , 搖盪 1 小時。

1 5 . 離心 1 小時 ($20,000 \times g$) , 保留上清液以供檢查是否已有包涵體沉澱出來。

1 6 . 令細胞團塊再次懸浮於 25 毫升 6 M 胍 + 20 m M T r i s p H 8 . 0 , 搖動一夜。

1 7 . 離心 1 小時 ($20,000 \times g$) , 保留上清液以供檢查是否所有包涵體皆被溶解 , 該上清液中含有重組蛋白質之包涵體。

1 8 . 令蛋白質溶液對 miliQ 水充分透析 , 隨後令此溶液冷凍乾燥。

1 9 . 將冷凍乾燥後的物質溶於 20 m M T r i s , 6 M 胍 , 30 % 2 - 丙醇 (p H 8 . 0) , 濃度為 20 m g / m l 。可溫和攪動而令其溶解一夜。單體的存在情形係以 Superdax 200 管柱 (XK16, Pharmacia 廠 , 直徑 1 . 6 公分 , 高度 750 公分) 予以檢視。操作緩衝液以 1 m l / m i n 進行。比較相同緩衝液下的標準物。

20 . 進行蛋白質純化係於 Superdex 200 管柱 (XK26, Pharmacia 廠 ; 高度 100 公分 , 直徑 2 . 6 公分) 進行凝膠

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (43)

過濾，該管柱經過平衡緩衝液平衡。以平衡緩衝液分析。施加約為1%總管柱體積之樣品體積。

21. 藉透析將重組蛋白質再褶疊。將蛋白質稀釋至0.1 mg/ml，於平衡緩衝液中，將此溶液置入經煮沸的透析袋中，以20 mM Tris，4 M 尿素 (pH 8.5) 透析，換液三次，室溫下歷一夜。將透析袋轉放至Tris緩衝液中 (20 mM Tris，150 mM NaCl (pH 8.0))。換液三次，第一次置於室溫。冷房中正一夜。

再褶疊情形係於Superose 12管柱上評估，該管柱經過Tris緩衝液 (20 mM Tris，150 mM NaCl (pH 8.0)) 平衡過。與標準物比較。

保存 重組蛋白質係以冷凍乾燥保存。

大量生產經修飾TNF α 分子時，可進行如下所述：
起始物：

500公升之大腸桿菌醱酵培養物，其以水透析過濾至約50公升。

1) 清洗細胞

A) 丟離冷凍後的細胞淤漿，

B) 令細胞離心10分鐘 (4000 × g)，

C) 令細胞團塊再次懸浮於50 mM Tris，

150 mM NaCl，pH 8.0。重複步驟B) 及C

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(44)

) 三次。

2) 均質化細胞

A) 以 Rannie 均質器均質細胞，於 700 巴，五次循環，

B) 令包涵體離心 30 分鐘 ($16,500 \times g$)，

C) 清洗包涵體三次，使用 3 M 胍，1 M NaCl，5 mM EDTA，20% 蔗糖，及 50 mM Tris (pH 8)。令此包涵體離心 30 分鐘 ($16,500 \times g$)。

3) 溶解包涵體

令細胞團塊再次懸浮於 6 M 胍，10 mM DTT，150 mM NaCl，5% 乙醇，50 mM Tris (pH 8.0)。每 100 mg 細胞團塊使用約 1 ml 緩衝液。

4) 超離心包涵體

A) 以 0.45 μ 濾紙除去粗製不純物，

B) 以 30 KD 濾紙除去高分子量組份，

C) 以 5 KD 濾紙濃縮包涵體。

5) 變換緩衝液

製備進行離子交換層析所用之樣品。將緩衝液變換為 6 M 尿素，1 mM DTT (於 50 mM Tris

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (45)

p H 8 中)，此係利用透析過濾法。

6) S P - Sepharose 純化法

將蛋白質添入 SP-Sepharose 管柱。以四倍體積之 A 緩衝液清洗管柱，以 100% B 緩衝液溶離蛋白質，匯集所有含 T N F α 之流份。

A 緩衝液：6 M 尿素，1 m M D T T，50 m M

T r i s / C l，p H 8。

B 緩衝液：6 M 尿素，1 M N a C l，1 m M

D T T，50 m M T r i s / C l，p H 8。

7) 再褶疊人 T N F α

將匯集的蛋白質稀釋至約 0.1 m g T N F α / m l (6 M 尿素，1 m M D T T，50 m M N a C l，5% 乙醇於 20 m M T r i s / C l，p H 8.8)，藉透析過濾法逐步以下列緩衝液組成除去尿素：

A) 2 M 尿素，1 m M D T T，150 m M

N a C l 於 20 m M T r i s / C l，p H 8.8 - 於 5 °C 歷一夜；

B) 1 M 尿素，1 m M D T T，150 m M

N a C l 於 20 m M T r i s / C l，p H 8.8 - 於 5 °C 8 小時；

C) 1 m M D T T，150 m M N a C l，於 20

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (46)

m M T r i s / C l , p H 8 . 8 - 5 ° C 歷一夜 ;

D) 1 5 0 m M N a C l 於 2 0 m M T r i s /
C l p H 8 . 8 - 5 ° C 歷一夜。

8) 保存人 T N F α 同系物

濃縮蛋白質至 1 . 0 m g / m l , 令樣品保存於
- 2 0 ° C 。

T B 培養基

根據使用說明，將 Terrific Broth (G I B C O 廠
B R L 2 2 7 1 1 - 2 2) 溶於 MiliQ 水。以 1 2 1 ° C 高
壓高溫滅菌 2 0 分鐘。

卡本黴素之 1 0 0 倍母液 (5 0 m g / m l) 。

卡本黴素二鈉鹽 (Sigma 廠 , C 1 3 8 9) 溶於 MiliQ 水
，濃度為 5 0 m g / m l 。經 0 . 2 μ M 濾紙 (Sterifix
0409 9206) 將此溶液過濾滅菌。

T P T G 之 1 0 0 倍母液 1 0 0 m M

將 1 . 1 9 克 P T G (異丙基 - β - D - 硫代半乳糖
苷) (I P T G , U S B 1 7 8 8 4) 溶入 MiliQ 水，添
加 5 0 0 m l 。令此溶液通過 0 . 2 μ M 濾紙 (Sterifix
0409 9206) 而過濾滅菌。

B S B 緩衝液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(47)

細菌懸浮緩衝液

50 m M T R I S (Trisma base, Sigma T1503) ,
 0 . 5 M N a C l (Ridel-de.Haen 31434) ,
 5 m M D T T (D L - 二硫蘇胺酸 , Sigma D-0632) ,
 p H 8 . 0 。

P M S F

50 m M , 苯基甲基磺醯氟 , S I G M A # P -
 7 6 2 6 , 溶於 2 - 丙醇 。

溶解酶溶液

10 m g / m l 等級 I I I 之源自雞蛋白的溶解酶 (
 E C 3 . 2 . 1 . 1 7) , S I G M A # L - 7 0 0 1 。

脫氧膽酸

(7 - 脫氧膽酸) Sigma # D - 6 7 5 0

D N A s e

1 m g / m l D n a s e I , 去氧核糖核酸酶 I
 , E C . 3 . 1 . 2 1 . 1) , Boehringer商品編號
 1 2 8 4 9 3 2 。

尿素

五、發明說明 (48)

尿素 (GibcoBRL 15716-020)

胍

胍鹽酸鹽 (Sigma G4505)

2 - 丙醇

操作緩衝液

20 mM TRIS (Trisma base, Sigma T1503),

8 M 尿素 (Gibco BRL 15716-020),

0.1% β - 巰基乙醇,

pH 8.0

平衡緩衝液

20 mM Tris (Trisma base, Sigma T1503),

8 M 尿素 (GibcoBRL 15716-020),

0.1% β - 巰基乙醇。

實例 2

經 P 2 及 P 3 0 修飾之 TNF α 分子的表現，純化與再摺疊

重組蛋白質在表現，純化及再摺疊之過程中有不同的表徵乃早已熟知的，所有蛋白質皆由大腸桿菌表現，得到

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (49)

表現量在 2 - 20 % 範圍內。所有蛋白質皆以西方轉漬試驗加以辨識，其使用市售之兔子抗人 TNF α 多株抗體。

然後令 TNF α 構築體一個接一個地在 200 ml 培養基中表現，每批的量為 3 - 4 公升。全部經修飾

TNF α 蛋白質係以包涵體形式表現，大於 85 % 純度之經再褶疊的蛋白質製劑係如上所述予以製備。

蛋白質含量係以標準 BCA 分析法測定。所有蛋白質之純化係以每種分子至少進行三次獨立操作，各獨立之蛋白質批次全部予以測試並發現結果類似。此蛋白質以 0.2 - 1.0 mg / ml (於 PBS) 之濃度保存於 -20 °C 直到使用。

標準定量分析包括 SDS 凝膠電泳，對個別之蛋白質製劑同時以考馬辛藍染色及銀染色。發現蛋白質全部具有預期的分子大小且超過 85 % 純度。

在位置 4 嵌入抗原決定位的分子 (TNF 2 - 4 及 TNF 30 - 4)，僅表現相當低的量 (約 2 %)。此外，這些分子極難純化，尤其再褶疊時困難重重。此兩個分子，尤其是 TNF 30 - 4，極不易溶於 PBS 且在保存過程中易於沉澱。

實例 3

不同 TNF α 構築體之生物活性

純化之 TNF α 分子的直接生物活性係以 L929 生

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (60)

物分析法測試，此分析法是測定 T N F α 生物活性之標準活體外分析法。如圖 6 所見，經 P 2 或 P 3 0 修飾之 T N F α 分子中無任一者能夠在所測試的濃度下（高達 6 0 m g / m l）殺死 L 9 2 9 細胞。市售重組 T N F α 分子卻在約 0 . 6 n g / m l 具有充分活性。野生型 T N F α 製劑在測試的全部劑量範圍中也是具有充分活性。

實例 4

經修飾 T N F α 分子誘生中和抗體的能力

以 1 0 種構築體中的每一種免疫兔子，藉以得知這些構築體是否可誘生能夠在活體外中和具生物活性之 T N F α 的抗體。使用每組三隻兔子，每隻兔子皮下接種 1 0 0 m g T N F α （其於 Freund's 完全佐劑中），接著每隔第三週接種 1 0 0 m g T N F α （於 Freund's 不完全佐劑中）。

在 1 8 週之整個免疫過程中，以規則的間期收集血液樣品並測定血清的抗 - T N F α 活性，此係以習知 E L I S A 分析法進行，其中使用市售的純，無修飾人 T N F α 作為抗原。

免疫過程中，所有兔子皆產生抗 - T N F α 抗體，最高產量或抗體力價在每組的十進位區隔下變化。平均抗體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (61)

力價示於圖 7。TNF 2-5, TNF 2-7, TNF 2-3, TNF 2-1 及 WT-TNF α 在 2-4 週內誘生 100 之力價，但 TNF 2-4 的反應明顯較慢。類似動力學可在 TNF 30 蛋白質上觀察到，其中也發現 TNF 30-4 有較慢的反應。

這些血清干擾人 TNF α 與其受體的能力，係以 L929 分析法及固相受體結合分析法測定。

L929 分析法中，免疫血清與未免疫之對照血清的稀釋物在將此混合液加至 L929 細胞之前，令此稀釋物添加至市售之人 TNF α 。重複測試兩次由各組之三隻兔子所得的血清並計算平均值。由於正常血清有增加顏色測定系統之背景值的傾向，故所有數值皆減去此背景值共計算相對抑制百分比。免疫計劃之第 14 週時，所有兔子的抑制能力結果示於圖 8。

TNF 2-5 的後 β -褶板的各股片段中沒有取代作用，其誘生中和抗體之能力與其它構築體比較，明顯超越之，此分子與具完全毒性之 WT-TNF α 分子可相比擬（數據未顯示）。TNF 2-3 在 D β -股有一個小片段被取代，TNF 2-7 在後 β -褶板各股上無任何被取代的片段，其皆能誘生抑制性抗體，且對於 TNF 2-7 之中和抗體力價在接著的三週內明顯增加（數據未顯示）。TNF 2-4 與 2-1 分別含有後 β 褶板之 G-與 B β -股，不能在 L929 分析法中誘生中和抗體。

TNF 30 蛋白質之結果歧異較大，雖然 TNF 30

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (62)

- 3 似乎是第 1 4 週功效最好的。T N F 3 0 - 1 及 T N F 3 0 - 4 在後 β - 褶板之 G 及 B β - 股分別有取代作用，但於 L 9 2 9 分析法中不會誘生中和抗體。

固相受體結合分析法中，令重組人 5 5 K D T N F α 受體 1 (T N F - R 5 5) 固著於微量滴定盤上，添加適量稀釋之市售經生物素鍵結之人 T N F α 。然後測定對受體之特異結合情形，其係使用經蕁菜過氧化酶標幟之鏈抗生物素蛋白及呈色物質。測定經免疫兔子血清時，上述試劑添加至經生物素鍵結之人 T N F α 溶液，然後將此混合液加至經 T N F - R 5 5 塗覆之微量滴定盤。每組三隻兔子之全部血清皆予測定且計算平均值。未免疫兔子所得的血清係作為陰性對照組。背景值極低且此分法十分敏感。結果示於圖 9。

可發現的是，分別由 L 9 2 9 分析法及固相受體結合分析法獲得的結果幾乎與 T N F α 2 構築體相同。固相分析法中，T N F 3 0 - 2，3 0 - 3 及 3 0 - 5 之間的差異並不如 L 9 2 9 分析法所觀察的結果明顯。然固相分析法是更有再現性的，因為其根據生化特性，而非細胞特性，且正常血清值在此分析法中並不減去。

對 T N F 2 - 3，T N F 2 - 5，T N F 2 - 7，T N F 3 0 - 2，T N F 3 0 - 3，T N F 3 0 - 5 及 W T - T N F α 任一者之對應血清分別計算其血清相對量（以百分比計），藉此得知抑制 T N F α 結合之最大抑制作用的一半值（I C₅₀ 值）。假設類似苗線會出現在對抗

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (53)

T N F 2 - 1 , T N F 2 - 1 , T N F 3 0 - 1 及
T N F 3 0 - 4 之抗血清 , 則以外推法進行 , 另一併計算
這些血清之 I C ₅₀ 值。結果示於表 I I 。

表 I I :

固相分析法中 , 兔子抗人 T N F α 血清之 I C ₅₀ 值										
2-1	2-3	2-4	2-5	2-7	WT	30-1	30-2	30-3	30-4	30-5
>100	2.02	>100	0.53	1.38	0.43	>100	0.82	0.88	>74	1.69
%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%

可發現的是 , T N F 2 - 5 在兔子誘生抗一鼠
T N F α 中和抗體的能力相當於野生型 (W T) 鼠
T N F α 。 T N F 2 - 1 , T N F 2 - 4 , T N F 3 0 -
1 及 T N F 3 0 - 4 皆含有後 β 褶板之 B 股或 G 股的取代
作用 , 其極少誘生或甚至完全不能誘生這類抗體。此現象
令人訝異地發現 , 雖然後 β - 褶板的 B 股與 G 股並不參與
受體之結合 , 然而此區域的突變卻會導致參與受體結合之
人 T N F α 區域的干擾。T N F 3 0 - 2 及 T N F 3 0 -
3 似乎相當成功地誘生中和抗體。

實例 5

經修飾 T N F α 分子刺激經 P 2 及 P 3 0 免疫之健康捐血
者之 T 細胞的能力

五、發明說明 (54)

由於經修飾 T N F α 分子中的 P 2 及 P 3 0 抗原決定位的位置被預期也會影響被嵌入抗原決定位之抗原處理與表現，進而影響其免疫原性，故全部 1 0 種分子皆以不同的 T 細胞分析法加以測試。使用多株週邊血液分子細胞（P B M C）分析法，建立多個 P 2 及 P 3 0 特異 T 細胞株，其係使用習知之免疫學方法測定具有被嵌入 P 2 及 P 3 0 抗原決定位之 T N F α 肽及重組蛋白質。

首先測定 2 8 位健康之志願者（捐血者），於已知 P B M C 增殖分析法中測定其對 T T 及 P 2 與 P 3 0 肽之反應。根據這些結果，將能夠對 T T，P 2 及 P 3 0 肽產生明顯反應的 1 9 位個體篩選出來以進一步實驗。雖然反應程度變化極大，此現象清楚證實了 P 2 與 P 3 0 是不加選擇且免疫顯性的 T 細胞抗原決定位。

除了這 2 8 位志願者，另也選出 7 位志願者。因為上述理由，這些捐血者中有一些人進行篩選其對 P 3 0 或 P 2 之反應能力。第二組志願者中有一些人也用於誘生 P 2 或 P 3 0 之特異 T 細胞株，此係為了研究 P 2 與 P 3 0 經修飾之 T N F α 合成肽與經修飾分子之抗原表現情形。圖 1 0 顯示三位志願者對 T T 及 P 2 與 P 3 0 肽之多株，P B M C 增殖反應的代表性範例。

全部 1 0 種重組蛋白質皆重複測試三次，至少以 6 種不同濃度，自約 1 0 0 m g / m l 開始，所有 P B M C 實驗皆對每一個個體重複進行 2 - 3 次。細胞內攝入經 3 H 標幟之胸嘧啶的情形係用於評估 T 細胞增殖情形，實驗係

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (65)

於 96 孔盤之規模下回收與計數。計算每滴定曲線所得之最大增殖指數 (PI)，此係作為實驗組孔洞之 CPM 平均數除以無抗原孔洞 (只有 PBS) 所得之 CPM 平均數的關係。T 細胞增殖數據進行重複三次，Con A，及 P2 與 P30，係分別用來作為陰性與陽性對照。圖 11 中，三組實例顯示由兩位不同捐血者所進行之實驗，其係使用不同之經 P2 及 P30 修飾的 TNF α 分子。

JH 只對 P2 反應，然而 SR 對 P2 與 P30 兩者反應。此現象也由經 P2 及 P30 修飾之 TNF α 蛋白質的增殖反應反映出來，其反應程度不一，但皆可刺激 PBMCs。

圖 12 顯示由 34 組實驗計算而得的增殖指數 (PIs)。雖然不同實驗之間很難定量比較 PIs (因為 PBS 背景不同)，但似乎可清楚得知，全部構築體多多少少皆能夠引起增殖反應。

第二組志願者中，有些個體在實驗前 1-2 個月予以免疫接種以對抗 TT。由這些人所得的 PI 值 (HB, MR, KG, 及 MW) 皆低於全部經修飾 TNF α 構築體所測得之最高 PIs，且此數值易於計算。另有三位個體 (DL, ID 及 LS) 免疫接種超過 5 年，其皆顯示 PIs 低於平均值。此結果支持所測得的 PIs 是抗原特異的。關於最後一次 TT 免疫接種日期並無適用第一組志願者之數據。但其免疫狀態顯然極易變化。

僅僅根據 PI 值之平均大小，不可能篩選出較佳的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (6)

T N F α 2 或 T N F α 3 0 蛋白質。原因可能是由所用個體之不同的接種狀態，及具有可變反應狀態之個體所獲得之 P B M C 分析法的多變特性所致。令人驚喜的是，T N F α 中 P 2 及 P 3 0 之全部嵌入位置似乎皆能被處理而呈現給 T 細胞。爲了排除抗原製劑仍可含有明顯濃度之非特異促細胞分裂劑的可能，即使經過重複的親和層析，凝膠過濾及透析，要進行其它實驗。

來自第二組之志願者已知對 P 2 無反應，但對 P 3 0 有反應，令此志願者與具有相反反應結果的志願者進行 P B M C 分析法之測試。圖 1 3 顯示 D L 及 I D 對 P 2，P 3 0，以及 T N F α 2 與 T N F α 3 0 蛋白質之反應。

可預見的是，個別 T 細胞抗原決定位與個別經修飾之 T N F α 分子可獲得特異反應。但不能發現 D L 有對抗 T N F α 3 0 蛋白質之明顯增殖反應（上圖），且 I D 無對抗 T N F α 2 蛋白質之明顯增殖反應（下圖），此結果支持 T N F α 純化製劑中無非特異之促細胞分裂劑。

上述可能性甚至可另外使用第二組志願者分離而得的 P 2 及 P 3 0 特異 T 細胞株加以檢查，此細胞株已培養至少 6 週，以進行至少三回合使用個別合成之 P 2 及 P 3 0 肽的刺激作用。兩種這類實驗的結果示於圖 1 4。

可預見 P 2 及 P 3 0 特異 T 細胞株只被其對應之 P 2 及 P 3 0 蛋白質刺激。再者，再次可發現全部 T N F α 構築體皆能夠誘生 T 細胞增生，再次強調抗原的處理雖對於表現 P 2 及 P 3 0 的量重要，但似乎並非抗原表現之重要

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (57)

定性的限制因子。

文獻已報導 T 細胞抗原決定位之外側區域會影響抗原性肽類結合至 M H C 第 I I 類分子。因為選擇嵌入 P 2 或 P 3 0 之 T N F α 的位置中，無任一者阻礙抗原表現，故調查被嵌入之抗原決定位的不同外側 T N F α 序列是否會影響 T 細胞對 P 2 及 3 0 抗原決定位之反應，此為區別式結合至人 H L A 第 I I 類分子之結果。表 I I I 所示肽係代表被嵌入的抗原決定位以及人 T N F α 外側胺基酸且為合成的。這些肽命名為 P P 2 - 5，P P 3 0 - 3 等。命名為 P e p 2 - 1 至 P e p 3 0 - 5 之胺基酸序列示於序列表中的 S E Q I D N O : 3 4 至 S E Q I D N O : 4 2。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (58)

表 I I I

代表 P 2 與 P 3 及其外側 T N F α 區域之合成肽			
2-1	SRTPSQYIKANSKFIGITEL QLQWL	30-1	SRTPSFNNFTVSFWLRVP KVSASHLERRANA
2-3	SQVLFQYIKANSKFIGITEL ISRIA	30-2	ALLANFNNFTVSFWLRVP KVSASHLEQVLFK
2-4	AEAKPQYIKANSKFIGITE LGDRLS	30-3	YSQVLFNNFTVSFWLRVP KVSASHLEVSYQT
2-5	EKGDRQYIKANSKFIGITE LSGQVY	30-4	QRETPFNNFTVSFWLRVP KVSASHLEKGDRL
2-7	ND	30-5	EKGDRFNNFTVSFWLRVP KVSASHLEGIIAL

這些肽係用於刺激 P 2 與 P 3 0 特異之 T 細胞株。刺激 P 3 0 細胞株之結果示於圖 1 5。可發現得自 M R 及 K G 的 P 2 特異 T 細胞株當被該肽或對應之 T N F α 2 蛋白質刺激時，呈現平行的刺激圖像。由此清楚得知，T N F 2 - 5 是優良且有潛力之抗原，這些數據進一步支持所觀察的 T 細胞增殖現象是抗原特異的，當源自 M R 及 K G 之 P 3 0 特異 T 細胞株被肽或蛋白刺激時，一般在刺激反應上無特性上的差異（數據未顯示）。源自 H C 之 P 3 0 特異 T 細胞株傾向於辨識 T N F 3 0 - 3，並與 T N F 3 0 - 2 稍有反應。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (69)

結 論

10種不同之經修飾人TNF α 蛋白質已被製造且鑑定。其構築為含有2個已知且不經選擇之T細胞抗原決定位，P2與P30，為了在至少85%的族群中具有潛在的免疫原性。

所有蛋白質皆可被表現及純化，雖然TNF2-4及TNF30-4之產量較低。TNF α 中這類肽的突變位置似乎干擾再褶疊，故造成蛋白質之溶解度低。這些經修飾TNF α 分子中無任一者可測出TNF α 生物活性。

兔子被全部10種蛋白質與天然TNF α 免疫。免疫接種後2-3個月，所有血清中可測到對人之未經修飾TNF α 有強烈交叉反應的高力價抗體。

這些抗體干擾天然TNF α 之生物活性的能力，係以兩種不同的活體外分析法—L929生物分析法與固相受體結合分析法加以測定。兩種分析法皆顯示基本上相同的結果，即TNF2-1，TNF2-4，TNF30-1及TNF30-4不能誘生顯著的中和抗體，但TNF2-5與其它構築體比較更優良。TNF30-2及TNF30-3在誘生中和抗體之能力上同等有效，且為合理有效之TNF30-5的兩倍。

有些令人驚喜的是，不可能預見這些分子刺激PBM C增殖之能力有明顯差異。可證的是，此現象並非因為抗原製劑中有促細胞分裂劑的存在，且根據這些數據可論結，P2與P30所選用的座落位置皆能讓個別抗原

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (60)

決定位表現出來。此反應的特異性進一步使用經修飾
TNF α 蛋白質加以證實，其係使用抗原決定位特異之T細胞株，以及代表被嵌入之抗原決定位與外側TNF α 序列的合成肽。由這些實驗可清楚證實，TNF 2-5，
TNF 30-2及TNF 30-3是其它構築體中最強效之
潛力免疫原。

寄存資料

寄存微生物	寄存機關	寄存日期	寄存號碼
質體 pMR101	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940215
質體 pMR117	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940216
質體 pMR123	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940217
質體 pMR125	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940218
質體 pMR126	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940219
質體 pMR127	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940220
質體 pMR128	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940221
質體 pMR129	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940222
質體 pMR130	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940223
質體 pMR141	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940224
質體 pMR150	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940225
質體 pMR151	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940226
質體 pMR152	食品工業發展研究所	1998 年 7 月 20 日	CCRC 940227

序列表

- (1)一般資料
- (i)申請人：
- (a)姓名:Farmaceutisk Laboratorium Ferring A/S
 - (b)街:Indertoften，10號
 - (c)市:Vanloese
 - (d)國:丹麥
 - (e)郵遞區號(ZIP):DK-2720
- (ii)發明名稱:經修飾之TNF α 分子，編碼該TNF α 分子之DNA，及含有經修飾TNF α 分子與DNA的疫苗
- (iii)序列數目:42
- (iv)電腦可讀型式：
- (a)介質型式:套裝軟體
 - (b)電腦:IBM PC相容者
 - (c)操作系統:PC-DOS/MS-DOS

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (61)

(d) 軟體:PatentIn Release #1.0, 第 #1.30版 (EPO)

(2) S E Q I D N O : 1之資料:

(i)序列特性:

(a)序列長度: 477 個鹼基對

(b)序列類型: 核酸

(c)股數: 雙股

(d)拓撲學: 線形

(ii)分子型式: cDNA

(iii)假設: 無

(iv)反意義: 無

(v)原始來源:

(A) 生物: 人類

(ix)特色:

(a)名稱 / 索引: CDS

(b)位置: 1...477

(c)鑑定方法: 實驗

(d)其他資料: / 密碼開始 = 1

/ 功能 = “抗原”

/產物 = TNF α 同系物

/證據 = 實驗

/基因 = “tnfP2-1”

/標準名稱 = “TNF2-1”

A7
B7

五、發明說明 (62)

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 1

ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT CAG TAC ATT AAA GCC AAT	48
Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Gln Tyr Ile Lys Ala Asn	
1 5 10 15	
TCT AAA TTC ATC GGT ATA ACT GAG CTG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC	96
Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg	
20 25 30	
CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG	144
Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln	
35 40 45	
CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC	192
Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu	
50 55 60	
TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC	240
Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr	
65 70 75 80	
ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT	288
Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser	
85 90 95	
GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC	336
Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala	
100 105 110	
AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG	384
Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu	
115 120 125	
AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC	432
Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp	
130 135 140	
TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTC TAG	477
Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu *	
145 150 155	

(2) S E Q I D N O : 2之資料:

(i)序列特性:

(a)序列長度: 159個胺基酸

(b)序列類型: 胺基酸

(c)拓撲學: 線形

(ii)分子型式: 蛋白質

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

A7
B7

五、發明說明 (63)

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 2

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

(2) S E Q I D N O : 3 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 477 個 鹼 基 對
- (b) 序 列 類 型 : 核 酸
- (c) 股 數 : 雙 股
- (d) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : DNA (基 因 組)

(iii) 假 設 : 無

(iv) 反 意 義 : 無

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (64)

(vi)原始來源：

(A) 生物：人類

(ix)特色：

(a)名稱 / 索引：CDS

(b)位置：1...477

(c)鑑定方法：實驗

(d)其他資料：/ 密碼開始=1

/ 功能 = “抗原”

/產物 =TNF α 同系物

/證據 = 實驗

/ 基因 = “tnfP2-3”

/標準名稱 = “TNF2-3”

(xi) 序列說明：SEQ ID NO. 3

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

A7
B7

五、發明說明 65)

ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His 160 165 170 175	48
GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg 180 185 190	96
CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln 195 200 205	144
CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu 210 215 220	192
TTC CAG TAC ATA AAG GCC AAC TCC AAG TTT ATC GGC ATC ACC GAG CTC Phe Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu 225 230 235	240
ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser 240 245 250 255	288
GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala 260 265 270	336
AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu 275 280 285	384
AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp 290 295 300	432
TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTC TAG Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu * 305 310 315	477

(2) S E Q I D N O : 4 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 159 個 胺 基 酸
- (b) 序 列 類 型 : 胺 基 酸
- (d) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : 蛋 白 質

(xi) 序 列 說 明 : SEQ ID NO. 4

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明 (66)

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

(2) S E Q I D N O : 5 之 資 料 :

(i)序 列 特 性 :

- (a)序 列 長 度 : 477 個 鹼 基 對
- (b)序 列 類 型 : 核 酸
- (c)股 數 : 雙 股
- (d)拓 撲 學 : 線 形

(ii)分 子 型 式 : DNA (基 因 組)

(iii)假 設 : 無

(iv)反 意 義 : 無

(vi)原 始 來 源 :

(A) 生 物 : 人 類

(ix)特 色 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (67)

- (a)名稱 / 索引 :CDS
- (b)位置 :1...477
- (d)其他資料 :/ 密碼開始 =1
 - / 功能 = “抗原”
 - /產物 =TNF α 同系物
 - /證據 = 實驗
 - / 基因 = “tnfP2-4”
 - /標準名稱 = “TNF2-4”

(xi) 序列說明 :SEQ ID NO. 5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (68)

ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT	48
Met Val Arg Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His	
160 165 170 175	
GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC	96
Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg	
180 185 190	
CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG	144
Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln	
195 200 205	
CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC	192
Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu	
210 215 220	
TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC	240
Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr	
225 230 235	
ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT	288
Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser	
240 245 250 255	
GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC	336
Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala	
260 265 270	
AAG CCC CAG TAT ATC AAG GCC AAT TCG AAA TTC ATC GGC ATC ACG GAG	384
Lys Pro Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu	
275 280 285	
CTC GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC	432
Leu Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp	
290 295 300	
TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTC TAG	477
Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu *	
305 310 315	

(2) S E Q I D N O : 6 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 159 個 胺 基 酸
- (b) 序 列 類 型 : 胺 基 酸
- (c) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : 蛋 白 質

(xi) 序 列 說 明 : SEQ ID NO. 6

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (69)

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

(2) S E Q I D N O : 7 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 477 個 鹼 基 對
- (b) 序 列 類 型 : 核 酸
- (c) 股 數 : 雙 股
- (d) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : DNA (基 因 組)

(iii) 假 設 : 無

(iv) 反 意 義 : 無

(vi) 原 始 來 源 :

(A) 生 物 : 人 類

(ix) 特 色 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (70)

(a)名稱 / 索引 :CDS

(b)位置 :1...477

(c)鑑定 方法：實驗

(d)其他資料 :/ 密碼開始 =1

/ 功能 = “抗原”

/產物 =TNF α 同系物

/ 基因 = “tnfP2-5”

/標準名稱 = “TNF2-5”

(xi) 序列說明 :SEQ ID NO. 7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

A7
B7

五、發明說明 (71)

ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His 160 165 170 175	48
GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg 180 185 190	96
CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln 195 200 205	144
CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu 210 215 220	192
TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr 225 230 235	240
ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser 240 245 250 255	288
GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala 260 265 270	336
AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu 275 280 285	384
AAG GGT GAC CGA CAG TAC ATT AAG GCC AAT TCG AAG TTC ATT GGC ATC Lys Gly Asp Arg Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile 290 295 300	432
ACT GAG CTG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTC TAG Thr Glu Leu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu * 305 310 315	477

(2) S E Q I D N O : 8 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 159 個 胺 基 酸
- (b) 序 列 類 型 : 胺 基 酸
- (c) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : 蛋 白 質

(xi) 序 列 說 明 : SEQ ID NO. 8

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (72)

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

(2) S E Q I D N O : 9 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 477 個 鹼 基 對
- (b) 序 列 類 型 : 核 酸
- (c) 股 數 : 雙 股
- (d) 拓 撲 學 : 線 形
- (ii) 分 子 型 式 : DNA (基 因 組)
- (iii) 假 設 : 無
- (iv) 反 意 義 : 無
- (vi) 原 始 來 源 :

(A) 生 物 : 人 類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (73)

(ix)特色：

(a)名稱 / 索引 : CDS

(b)位置 : 1...477

(c)其他資料 : / 密碼開始 = 1

/ 功能 = “抗原”

/ 產物 = TNF α 同系物

/ 證據 = 實驗

/ 基因 = “tnfP2-7”

/ 標準名稱 = “TNF2-7”

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO. 9

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

A7
B7

五、發明說明 (74)

ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT	48
Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His	
160 165 170 175	
GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC	96
Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg	
180 185 190	
CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG	144
Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln	
195 200 205	
CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC	192
Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu	
210 215 220	
TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CAG TAC ATC AAA	240
Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Gln Tyr Ile Lys	
225 230 235	
GCT AAC TCC AAA TTC ATC GGC ATC ACC GAA CTG GTT AAC CTC CTC TCT	288
Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Val Asn Leu Leu Ser	
240 245 250 255	
GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC	336
Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala	
260 265 270	
AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG	384
Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu	
275 280 285	
AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC	432
Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp	
290 295 300	
TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTC TAG	477
Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu *	
305 310 315	

(2) S E Q I D N O : 10 之資料:

(i)序列特性:

(a)序列長度: 159 個胺基酸

(b)序列類型: 胺基酸

(c)拓撲學: 線形

(ii)分子型式: 蛋白質

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 10

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明 (75)

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

(2) S E Q I D N O : 11 之資料:

(i)序列特性:

(a)序列長度: 477 個鹼基對

(b)序列類型: 核酸

(c)股數: 雙股

(d)拓撲學: 線形

(ii)分子型式: DNA (基因組)

(iii)假設: 無

(iv)反意義: 無

(vi)原始來源:

(A) 生物: 人類

(ix)特色:

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (76)

(a)名稱 / 索引 :CDS

(b)位置 :1 ... 477

(c)其他資料 :/ 密碼開始 =1

/ 功能 = “抗原”

/產物 =TNF α 同系物

/ 基因 = “tnfP30-1”

/標準名稱 = “TNF30-1”

(xi) 序列說明 :SEQ ID NO. 11

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (77)

ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT TTC AAC AAT TTT ACC GTA	48
Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Phe Asn Asn Phe Thr Val	
160 165 170 175	
AGC TTT TGG CTC CGT GTA CCT AAG GTG TCG GCC TCG CAC CTG GAG CGC	96
Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Arg	
180 185 190	
CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG	144
Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln	
195 200 205	
CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC	192
Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu	
210 215 220	
TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC	240
Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr	
225 230 235	
ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT	288
Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser	
240 245 250 255	
GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC	336
Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala	
260 265 270	
AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG	384
Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu	
275 280 285	
AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC	432
Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp	
290 295 300	
TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTC TAG	477
Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu +	
305 310 315	

(2) S E Q I D N O : 12 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 159 個 胺 基 酸
- (b) 序 列 類 型 : 胺 基 酸
- (c) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : 蛋 白 質

(xi) 序 列 說 明 : SEQ ID NO. 12

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明 (78)

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

(2) SEQ ID NO:13 之資料：

(i)序列特性：

(a)序列長度：477 個鹼基對

(b)序列類型：核酸

(c)股數：雙股

(d)拓撲學：線形

(ii)分子型式：DNA (基因組)

(iii)假設：無

(iv)反意義：無

(vi)原始來源：

(A) 生物：人類

(ix)特色：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (79)

(a)名稱 / 索引 :CDS

(b)位置 :1 ... 477

(c)其他資料 :/ 密碼開始 =1

/ 功能 = “抗原”

/產物 =TNF α 同系物

/ 基因 = “tnfP30-2”

/標準名稱 = “TNF30-2”

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

A7
B7

五、發明說明 (80)

ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His 160 165 170 175	48
GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg 180 185 190	96
CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT TTC AAC AAC TTC ACA GTT AGC TTC Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe 195 200 205	144
TGG TTG AGG GTA CCA AAG GTC TCG GCC AGC CAC CTC GAG CAG GTC CTC Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Val Leu 210 215 220	192
TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr 225 230 235	240
ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser 240 245 250 255	288
GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala 260 265 270	336
AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu 275 280 285	384
AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp 290 295 300	432
TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTC TAG Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu * 305 310 315	477

(2) S E Q I D N O : 14 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 159 個 胺 基 酸
- (b) 序 列 類 型 : 胺 基 酸
- (c) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : 蛋 白 質

(xi) 序 列 說 明 : SEQ ID NO. 14

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明 (81)

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

(2) S E Q I D N O : 15 之 資 料 :

(i)序 列 特 性 :

- (a)序 列 長 度 : 477 個 鹼 基 對
- (b)序 列 類 型 : 核 酸
- (c)股 數 : 雙 股
- (d)拓 撲 學 : 線 形

(ii)分 子 型 式 : DNA (基 因 組)

(iii)假 設 : 無

(iv)反 意 義 : 無

(vi)原 始 來 源 :

(A) 生 物 : 人 類

(ix)特 色 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (82)

(a)名稱 / 索引 :CDS

(b)位置 :1...477

(c)其他資料 :/ 密碼開始 =1

/ 功能 = “抗原”

/產物 =TNF α 同系物

/ 基因 = “tnfP30-3”

/標準名稱 = “TNF30-3”

(xi) 序列說明 :SEQ ID NO. 15

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (83)

ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His 160 165 170 175	48
GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg 180 185 190	96
CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln 195 200 205	144
CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu 210 215 220	192
TTC AAC AAC TTT ACC GTC TCC TTC TGG CTT CGG GTA CCC AAG GTC AGC Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser 225 230 235	240
GCT AGC CAC CTC GAG GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT Ala Ser His Leu Glu Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser 240 245 250 255	288
GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala 260 265 270	336
AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu 275 280 285	384
AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp 290 295 300	432
TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTC TAG Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu * 305 310 315	477

(2) S E Q I D N O : 16 之 資 料 :

- (i) 序 列 特 性 :
 - (a) 序 列 長 度 : 159 個 胺 基 酸
 - (b) 序 列 類 型 : 胺 基 酸
 - (c) 拓 撲 學 : 線 形
- (ii) 分 子 型 式 : 蛋 白 質
- (xi) 序 列 說 明 : SEQ ID NO. 16

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明 (84)

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

(2) S E Q I D N O : 17 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 477 個 鹼 基 對
- (b) 序 列 類 型 : 核 酸
- (c) 股 數 : 雙 股
- (d) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : DNA (基 因 組)

(iii) 假 設 : 無

(iv) 反 意 義 : 無

(vi) 原 始 來 源 :

(A) 生 物 : 人 類

(ix) 特 色 :

(a) 名 稱 / 索 引 : CDS

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (85)

(b)位置:1...477

(c)其他資料:/ 密碼開始=1

/ 功能 = “抗原”

/產物 =TNF α 同系物

/ 基因 = “tnfP30-4”

/標準名稱 = “TNF30-4”

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 17

ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT	48
Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His	
160 165 170 175	
GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC	96
Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg	
180 185 190	
CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG	144
Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln	
195 200 205	
CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC	192
Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu	
210 215 220	
TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC	240
Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr	
225 230 235	
ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT	288
Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser	
240 245 250 255	
GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA TTT AAT AAT TTC ACC	336
Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Phe Asn Asn Phe Thr	
260 265 270	
GTG TCC TTC TGG TTG CGC GTC CCT AAG GTA AGC GCT TCC CAC CTG GAG	384
Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu	
275 280 285	
AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC	432
Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp	
290 295 300	
TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTC TAG	477
Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu *	
305 310 315	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (86)

(2) S E Q I D N O : 18 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 159 個 胺 基 酸
- (b) 序 列 類 型 : 胺 基 酸
- (c) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : 蛋 白 質

(xi) 序 列 說 明 : SEQ ID NO. 18

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

(2) S E Q I D N O : 19 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 477 個 鹼 基 對
- (b) 序 列 類 型 : 核 酸

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (87)

- (c)股數： 雙股
- (d)拓撲學： 線形
- (ii)分子型式： DNA (基因組)
- (iii)假設： 無
- (iv)反意義： 無
- (vi)原始來源：
 - (A) 生物： 人類
- (ix)特色：
 - (a)名稱 / 索引 :CDS
 - (b)位置 :1...477
 - (c)其他資料 :/ 密碼開始 =1
 - / 功能 = “抗原”
 - /產物 =TNF α 同系物
 - / 基因 = “tnfP30-5”
 - /標準名稱 = “TNF30-5”

(xi) 序列說明 :SEQ ID NO. 19

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明 (88)

ATG GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT Met Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His 160 165 170 175	48
GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg 180 185 190	96
CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln 195 200 205	144
CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu 210 215 220	192
TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr 225 230 235	240
ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser 240 245 250 255	288
GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala 260 265 270	336
AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu 275 280 285	384
AAG GGT GAC CGA TTC AAC AAT TTC ACC GTA AGC TTC TGG CTT CGC GTC Lys Gly Asp Arg Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val 290 295 300	432
CCT AAG GTG TCT GCG TCG CAC CTC GAA GGG ATC ATT GCC CTC TAG Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gly Ile Ile Ala Leu * 305 310 315	477

(2) S E Q I D N O : 20 之資料:

(i)序列特性:

(a)序列長度: 159個胺基酸

(b)序列類型: 胺基酸

(c)拓撲學: 線形

(ii)分子型式: 蛋白質

(xi) 序列說明: SEQ ID NO. 20

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(89)

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

(2) S E Q I D N O : 21 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 24 個 鹼 基 對
- (b) 序 列 類 型 : 核 酸
- (c) 股 數 : 單 股
- (d) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : DNA (基 因 組)

(iii) 假 設 : 無

(iv) 反 意 義 : 無

(ix) 特 色 :

- (a) 名 稱 / 索 引 : misc_feature
- (b) 位 置 : 1...24

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(60)

(c)鑑定方法：實驗

(d)其他資料：

/功能 = “用於PCR選殖編碼TNF α 之DNA的引子”

/產物 = “結合在TNF α 基因上的引子”

/證據 = 實驗

/標準名稱 = “TNF α 引子 I”

/標記 = 引子 1

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 21

GACAAGCCCCA TGGTCAGATC ATCT

(2) SEQ ID NO : 22 之資料:

(i)序列特性:

(a)序列長度: 30 個鹼基對

(b)序列類型: 核酸

(c)股數: 單股

(d)拓撲學: 線形

(ii)分子型式: DNA (基因組)

(iii)假設: 無

(iv)反意義: 無

(ix)特色:

(a)名稱/索引:misc_feature

五、發明說明(61)

(b)位置:1...30

(c)鑑定方法:實驗

(d)其他資料:

/功能="用於PCR選殖編碼TNF α 之DNA的引子"

/產物="結合在TNF α 基因上的引子"

/證據=實驗

/標準名稱="TNF α 引子II"

/標記=引子2

(xi)序列說明:SEQ ID NO. 22

TCTCTAGAGG GCAATGATCC CAAAGTAGAC

(2) S E Q I D N O : 23 之資料:

(i)序列特性:

(a)序列長度:21個鹼基對

(b)序列類型:核酸

(c)股數:單股

(d)拓撲學:線形

(ii)分子型式:DNA(基因組)

(iii)假設:無

(iv)反意義:無

(ix)特色:

五、發明說明 (92)

(a)名稱 / 索引 : misc_feature

(b)位置 : 1...21

(c)鑑定方法 : 實驗

(d)其他資料 :

/ 功能 = “用於 PCR 選殖編碼 TNF α 之 DNA 的引子”

/ 產物 = “結合在 TNF α 基因上的引子”

/ 證據 = 實驗

/ 標準名稱 = “TNF α 引子 III”

/ 標記 = 引子 3

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO. 23

CCCAAAGTAG ACCTGCCCAG A

(2) S E Q I D N O : 24 之資料 :

(i) 序列特性 :

(a) 序列長度 : 69 個鹼基對

(b) 序列類型 : 核酸

(c) 股數 : 單股

(d) 拓撲學 : 線形

(ii) 分子型式 : DNA (基因組)

(iii) 假設 : 無

(iv) 反意義 : 無

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (93)

(v)原始來源:

(A) 生物: 人類

(ix)特色:

(a)名稱 / 索引:insertion_seq

(b)位置:7.....51

(c)鑑定方法: 實驗

(d)其他資料:

/ 功能 = “用於PCR選殖編碼TNF α 同系物之DNA的引子”

/ 證據 = 實驗

/ 生物 = 人類

/標準名稱 = “引子 “mut2-1””

/標記 = mut2-1

/註解 = 引子 “mut2-1”是用合成法合成之具有69個核苷酸的寡核苷酸，其包括編碼人類T細胞抗原決定位P2之DNA，該抗原決定位介於DNA之伸展區與伸展區之間，該伸展區同質於人TNF α 基因之伸展區”

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 24

ACCCCGAGTC AGTACATTAA AGCCAATTCT AAATTCATCG GTATAACTGA GCTGCAGCTC	60
CAGTGGCTG	69

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(94)

(2) S E Q I D N O : 25 之 資 料 :

(i)序 列 特 性 :

(a)序 列 長 度 : 73 個 鹼 基 對

(b)序 列 類 型 : 核 酸

(c)股 數 : 單 股

(d)拓 撲 學 : 線 形

(ii)分 子 型 式 : DNA (基 因 組)

(iii)假 設 : 無

(iv)反 意 義 : 無

(v)原 始 來 源 :

(A) 生 物 : 人 類

(ix)特 色 :

(a)名 稱 / 索 引 : insertion_seq

(b)位 置 : 15...59

(c)鑑 定 方 法 : 實 驗

(d)其 他 資 料 :

/ 功 能 = “用 於 PCR選 殖 編 碼 TNF α 同 系 物 之 DNA
的 引 子 ”

/ 證 據 = 實 驗

/ 生 物 = 人 類

/標 準 名 稱 = “ 引 子 “mut2-3” ”

/標 記 = mut2-3

/註 解 = 引 子 “mut2-3” 是 用 合 成 法 合 成 之 具 有 73個
核 苷 酸 的 寡 核 苷 酸 , 其 包 括 編 碼 人 類 T細 胞 抗 原 決 定

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(95)

位 P2 之 DNA，該抗原決定位介於 DNA 之伸展區與伸展區之間，該伸展區同質於人 TNF α 基因之伸展區”

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 25

CCCAGGTCCT CTTCCAGTAC ATAAAGGCCA ACTCCAAGTT TATCGGCATC ACCGAGCTCA	60
TCAGCCGCAT CGC	73

(2) S E Q I D N O : 26 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 75 個 鹼 基 對
- (b) 序 列 類 型 : 核 酸
- (c) 股 數 : 單 股
- (d) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : DNA (基 因 組)

(iii) 假 設 : 無

(iv) 反 意 義 : 無

(v) 原 始 來 源 :

(A) 生 物 : 人 類

(ix) 特 色 :

- (a) 名 稱 / 索 引 : insertion_seq
- (b) 位 置 : 12...56
- (c) 鑑 定 方 法 : 實 驗

經濟部中央標準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)

五、發明說明(96)

(d)其他資料：

/ 功能 = “用於PCR選殖編碼TNF α 同系物之DNA的引子”

/ 證據 = 實驗

/ 生物 = 人類

/標準名稱 = “引子 “mut2-4””

/標記 = mut2-4

/註解 = 引子 “mut2-4”是用合成法合成之具有75個核苷酸的寡核苷酸，其包括編碼人類T細胞抗原決定位P2之DNA，該抗原決定位介於DNA之伸展區與伸展區之間，該伸展區同質於人TNF α 基因之伸展區”

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 26

AGTCGGTCAC CGAGCTCCGT GATGCCGATG AATTTCTGAAT TGGCCTTGAT ATACTGGGGC	60
TTGGCCTCAG CCCCC	75

(2) S E Q I D N O : 27 之資料：

(i)序列特性：

- (a)序列長度：75 個鹼基對
- (b)序列類型：核酸
- (c)股數：單股
- (d)拓撲學：線形

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

訂

五、發明說明 (67)

(ii)分子型式：DNA (基因組)

(iii)假設：無

(iv)反意義：無

(v)原始來源：

(A) 生物：人類

(ix)特色：

(a)名稱 / 索引:insertion_seq

(b)位置:8....52

(c)鑑定方法：實驗

(d)其他資料：

/ 功能 = “用於PCR選殖編碼TNF α 同系物之DNA的引子”

/ 證據 = 實驗

/ 生物 = 人類

/標準名稱 = “引子 “mut2-5””

/標記 = mut2-5

/註解 = 引子 “mut2-5” 是用合成法合成之具有75個核苷酸的寡核苷酸，其包括編碼人類T細胞抗原決定位P2之DNA，該抗原決定位介於DNA之伸展區與伸展區之間，該伸展區同質於人TNF α 基因之伸展區”

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 27

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (98)

GAAGGGTGAC CGACAGTACA TTAAGGCCAA TTCGAAGTTC ATTGGCATCA CTGAGCTGTC 60
TGGGCAGGTC TACTT 75

(2) S E Q I D N O : 28 之 資 料 :

(i) 序 列 特 性 :

- (a) 序 列 長 度 : 80 個 鹼 基 對
- (b) 序 列 類 型 : 核 酸
- (c) 股 數 : 單 股
- (d) 拓 撲 學 : 線 形

(ii) 分 子 型 式 : DNA (基 因 組)

(iii) 假 設 : 無

(iv) 反 意 義 : 無

(v) 原 始 來 源 :

(A) 生 物 : 人 類

(ix) 特 色 :

- (a) 名 稱 / 索 引 : insertion_seq
- (b) 位 置 : 14.....58
- (c) 鑑 定 方 法 : 實 驗
- (d) 其 他 資 料 :

/ 功 能 = “ 用 於 PCR 選 殖 編 碼 TNF α 同 系 物 之 DNA 的 引 子 ”

/ 證 據 = 實 驗

/ 生 物 = 人 類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (99)

/標準名稱 = “ 引子 “mut2-7”

/標記 = mut2-7

/註解 = 引子 “mut2-7” 是用合成法合成之具有80個核苷酸的寡核苷酸，其包括編碼人類T細胞抗原決定位P2之DNA，該抗原決定位介於DNA之伸展區與伸展區之間，該伸展區同質於人TNF α 基因之伸展區”

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 28

CACCCATGTG CTCCAGTACA TCAAAGCTAA CTCCAAATTC ATCGGCATCA CCGAACTGGT	60
TAACCTCCTC TCTGCCATCA	80

(2) SEQ ID NO:29 之資料:

(i)序列特性:

(a)序列長度: 96 個鹼基對

(b)序列類型: 核酸

(c)股數: 單股

(d)拓撲學: 線形

(ii)分子型式: DNA (基因組)

(iii)假設: 無

(iv)反意義: 無

(v)原始來源:

(A) 生物: 人類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (100)

(ix) 特色：

(a) 名稱 / 索引 : insertion_seq

(b) 位置 : 10.....72

(c) 鑑定方法：實驗

(d) 其他資料：

/ 功能 = “用於 PCR 選殖編碼 TNF α 同系物之 DNA 的引子”

/ 證據 = 實驗

/ 生物 = 人類

/ 標準名稱 = “引子 “mut30-1””

/ 標記 = mut30-1

/ 註解 = 引子 “mut30-1” 是用合成法合成之具有 96 個核苷酸的寡核苷酸，其包括編碼人類 T 細胞抗原決定位 P30 之 DNA，該抗原決定位介於 DNA 之伸展區與伸展區之間，該伸展區同質於人 TNF α 基因之伸展區”

(xi) 序列說明 : SEQ ID NO. 29

ACCCCGAGTT TCAACAATTT TACCGTAAGC TTTTGGCTCC GTGTACCTAA GGTGTCGGCC 60

TCGCACCTGG AGCGCCGGGC CAATGCCCTC CTGGCC 96

(2) S E Q I D N O : 30 之資料：

(i) 序列特性：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (101)

- (a) 序列長度：100 個鹼基對
- (b) 序列類型：核酸
- (c) 股數：單股
- (d) 拓撲學：線形
- (ii) 分子型式：DNA (基因組)
- (iii) 假設：無
- (iv) 反意義：無
- (v) 原始來源：
 - (A) 生物：人類
- (ix) 特色：
 - (a) 名稱 / 索引：insertion_seq
 - (b) 位置：12.....74
 - (c) 鑑定方法：實驗
 - (d) 其他資料：
 - / 功能 = “用於 PCR 選殖編碼 TNF α 同系物之 DNA 的引子”
 - / 證據 = 實驗
 - / 生物 = 人類
 - / 標準名稱 = “引子 “mut30-2””
 - / 標記 = mut30-2
 - / 註解 = 引子 “mut30-2” 是用合成法合成之具有 100 個核苷酸的寡核苷酸，其包括編碼人類 T 細胞抗原決定位 P30 之 DNA，該抗原決定位介於 DNA 之伸展區與伸展區之間，該伸展區同質於人 TNF α 基因之伸展區”

五、發明說明 (102)

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 30

TCCTGGCCAA TTTCAACAAC TTCACAGTTA GCTTCTGGTT GAGGGTACCA AAGGTCTCGG	60
CCAGCCACCT CGAGCAGGTC CTCTTCAAGG GCCAAGGCTG	100

(2) S E Q I D N O : 31 之 資 料 :

(i)序列特性:

(a)序列長度: 100 個 鹼 基 對

(b)序列類型: 核 酸

(c)股數: 單 股

(d)拓撲學: 線 形

(ii)分子型式: DNA (基 因 組)

(iii)假 設: 無

(iv)反 意 義: 無

(v)原 始 來 源:

(A) 生 物: 人 類

(ix)特 色:

(a)名 稱 / 索 引 :insertion_seq

(b)位 置 :12....74

(c)鑑 定 方 法: 實 驗

(d)其 他 資 料:

/ 功 能 = “用 於 PCR選 殖 編 碼 TNF α 同 系 物 之 DNA

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (103)

的引子”

/ 證據 = 實驗

/ 生物 = 人類

/標準名稱 = “ 引子 “mut30-3””

/標記 = mut30-3

/註解 = 引子 “mut30-3” 是用合成法合成之具有100個核苷酸的寡核苷酸，其包括編碼人類T細胞抗原決定位P30之DNA，該抗原決定位介於DNA之伸展區與伸展區之間，該伸展區同質於人TNF α 基因之伸展區”

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 31

CCCAGGTCCT CTTCAACAAC TTTACCGTCT CCTTCTGGCT TCGGGTACCC AAGGTCAGCG	60
CTAGCCACCT CGAGGTCTCC TACCAGACCA AGGTCAACCT	100

(2) S E Q I D N O : 32 之資料:

(i)序列特性:

- (a)序列長度: 100 個鹼基對
- (b)序列類型: 核酸
- (c)股數: 單股
- (d)拓撲學: 線形

(ii)分子型式: DNA (基因組)

(iii)假設: 無

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (104)

(iv)反意義： 無

(v)原始來源：

(A) 生物： 人類

(ix)特色：

(a)名稱 / 索引:insertion_seq

(b)位置:15.....77

(c)鑑定方法： 實驗

(d)其他資料：

/ 功能 = “用於PCR選殖編碼TNF α 同系物之DNA的引子”

/ 證據 = 實驗

/ 生物 = 人類

/標準名稱 = “引子 “mut30-4””

/標記 = mut30-4

/註解 = 引子 “mut30-4” 是用合成法合成之具有100個核苷酸的寡核苷酸，其包括編碼人類T細胞抗原決定位P30之DNA，該抗原決定位 介於DNA之伸展區與伸展區之間，該伸展區同質於人TNF α 基因之伸展區”

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 32

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (105)

AGTCGGTCAC CCTTCTCCAG GTGGGAAGCG CTTACCTTAG GGACGCGCAA CCAGAAGGAC 60
ACGGTGAAAT TATTAAATGG GGTCTCCCTC TGGCAGGGGC 100

(2) S E Q I D N O : 33 之 資 料 :

(i)序 列 特 性 :

- (a)序 列 長 度 : 100 個 鹼 基 對
- (b)序 列 類 型 : 核 酸
- (c)股 數 : 單 股
- (d)拓 撲 學 : 線 形

(ii)分 子 型 式 : DNA (基 因 組)

(iii)假 設 : 無

(iv)反 意 義 : 無

(v)原 始 來 源 :

(A) 生 物 : 人 類

(ix)特 色 :

- (a)名 稱 / 索 引 : insertion_seq
- (b)位 置 : 14.....76
- (c)鑑 定 方 法 : 實 驗
- (d)其 他 資 料 :

/ 功 能 = “用 於 PCR選 殖 編 碼 TNF α 同 系 物 之 DNA
的 引 子 ”

/ 證 據 = 實 驗

/ 生 物 = 人 類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (106)

/標準名稱 = “ 引子 “mut30-5” ”

/標記 = mut30-5

/註解 = 引子 “mut30-5” 是用合成法合成之具有100個核苷酸的寡核苷酸，其包括編碼人類T細胞抗原決定位P30之DNA，該抗原決定位 介於DNA之伸展區與伸展區之間，該伸展區同質於人TNF α 基因之伸展區 ”

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 33

GAAGGGTGAC CGATTCAACA ATTTACCGT AAGCTTCTGG CTTCGCGTCC CTAAGGTGTC	60
TGCGTCGCAC CTCGAAGGGA TCATTGCCCT CTAGAGTCGA	100

(2) SEQ ID NO:34 之資料:

(i)序列特性:

(a)序列長度: 25個胺基酸

(b)序列類型: 胺基酸

(c)股性:

(d)拓撲學: 線形

(ii)分子型式: 肽

(iii)假設: 無

(v) 片段型式: 內部

(vi) 原始來源:

(A) 生物: 人類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (107)

(ix)特色：

(a)名稱 / 索引： peptide

(b)位置：1.....25

(c)其他資料：

 /標記 = Pep2-1

 /註解 = “Pep 2-1 是用合成法製備之截斷型TNF α 同系物，其包括人T細胞抗原決定位P2與 人TNF α 之外側部分”

(xi) 序列說明：SEQ ID NO. 34

Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly
1				5				10						15	
Ile	Thr	Glu	Leu	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu							
		20					25								

(2) S E Q I D N O : 35 之資料：

(i)序列特性：

(a)序列長度：25個胺基酸

(b)序列類型：胺基酸

(c)股性：

(d)拓撲學：線形

(ii)分子型式：肽

(iii)假設：無

(v) 片段型式：內部

(vi) 原始來源：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (108)

(A) 生物：人類

(ix)特色：

(a)名稱 / 索引：peptide

(b)位置：1.....25

(c)其他資料：

/標記 = Pep2-3

/註解 = “Pep 2-3 是用合成法製備之截斷型TNF α 同系物，其包括人T細胞抗原決定位P2與人TNF α 之外側部分”

(xi) 序列說明：SEQ ID NO. 35

Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly
1				5					10					15	
Ile	Thr	Glu	Leu	Ile	Ser	Arg	Ile	Ala							
			20					25							

(2) S E Q I D N O : 36 之資料：

(i)序列特性：

(a)序列長度：25個胺基酸

(b)序列類型：胺基酸

(c)股性：

(d)拓撲學：線形

(ii)分子型式：肽

(iii)假設：無

(v) 片段型式：內部

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (109)

(vi) 原始來源：

(A) 生物：人類

(ix) 特色：

(a) 名稱 / 索引：peptide

(b) 位置：1.....25

(c) 其他資料：

/標記 = Pep2-4

/註解 = “Pep 2-4是用合成法製備之截斷型TNF α 同系物，其包括人T細胞抗原決定位P2與人TNF α 之外側部分”

(xi) 序列說明：SEQ ID NO. 36

Ala	Glu	Ala	Lys	Pro	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly
1				5				10					15		
Ile	Thr	Glu	Leu	Gly	Asp	Arg	Leu	Ser							
			20				25								

(2) S E Q I D N O : 37 之資料：

(i) 序列特性：

(a) 序列長度：25個胺基酸

(b) 序列類型：胺基酸

(c) 股性：

(d) 拓撲學：線形

(ii) 分子型式：肽

(iii) 假設：無

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (110)

(v) 片段型式：內部

(vi) 原始來源：

(A) 生物：人類

(ix)特色：

(a)名稱 / 索引：peptide

(b)位置：1.....25

(c)其他資料：

/標記 = Pep2-5

/註解 = “Pep 2-5 是用合成法製備之截斷型TNF α 同系物，其包括人T細胞抗原決定位P2與人TNF α 之外側部分”

(xi) 序列說明：SEQ ID NO. 37

Glu	Lys	Gly	Asp	Arg	Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly
1				5					10					15	
Ile	Thr	Glu	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Tyr							
			20					25							

(2) S E Q I D N O : 38 之資料：

(i)序列特性：

(a)序列長度：31個胺基酸

(b)序列類型：胺基酸

(c)股性：

(d)拓撲學：線形

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (111)

(ii)分子型式： 肽

(iii)假設： 無

(v) 片段型式： 內部

(vi) 原始來源：

(A) 生物： 人類

(ix)特色：

(a)名稱 / 索引： peptide

(b)位置：1.....31

(c)其他資料：

/標記 = Pep30-1

/註解 = “Pep 30-1 是用合成法製備之截斷型 TNF α 同系物， 其包括人 T細胞抗原決定位 P30與 人 TNF α 之外側部分”

(xi) 序列說明：SEQ ID NO. 38

Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu	Arg
1				5				10					15		
Val	Pro	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	
			20					25					30		

(2) S E Q I D N O : 39 之資料：

(i)序列特性：

(a)序列長度： 31個胺基酸

(b)序列類型： 胺基酸

(c)股性：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (112)

- (d)拓撲學：線形
- (ii)分子型式：肽
- (iii)假設：無
- (v) 片段型式：內部
- (vi) 原始來源：
 - (A) 生物：人類
- (ix)特色：
 - (a)名稱 / 索引：peptide
 - (b)位置：1.....31
 - (c)其他資料：

/標記 = Pep30-2

/註解 = “Pep 30-2 是用合成法製備之截斷型TNF α 同系物，其包括人T細胞抗原決定位P30與 人TNF α 之外側部分”

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 39

Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu	Arg
1				5					10					15	
Val	Pro	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Gln	Val	Leu	Phe	Lys	
			20					25					30		

(2) S E Q I D N O : 40 之資料:

- (i)序列特性：
 - (a)序列長度：31個胺基酸
 - (b)序列類型：胺基酸

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (113)

(c)股 性：

(d)拓撲學：線形

(ii)分子型式：肽

(iii)假設：無

(v) 片段型式：內部

(vi) 原始來源：

(A) 生物：人類

(ix)特色：

(a)名稱 / 索引：peptide

(b)位置：1.....31

(c)其他資料：

/標記 = Pep30-3

/註解 = “Pep 30-3 是用合成法製備之截斷型TNF α 同系物，其包括人T細胞抗原決定位P30與 人TNF α 之外側部分”

(xi) 序列說明：SEQ ID NO. 40

Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu	Arg
1				5					10					15	
Val	Pro	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	
			20					25					30		

(2) S E Q I D N O : 41 之資料：

(i)序列特性：

(a)序列長度：31個胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (114)

- (b)序列類型：胺基酸
- (c)股性：
- (d)拓撲學：線形
- (ii)分子型式：肽
- (iii)假設：無
- (v) 片段型式：內部
- (vi) 原始來源：
- (A) 生物：人類
- (ix)特色：
- (a)名稱 / 索引： peptide
- (b)位置：1.....31
- (c)其他資料：
- /標記 = Pep30-4
- /註解 = “Pep 30-4 是用合成法製備之截斷型TNF α 同系物，其包括人T細胞抗原決定位P30與 人TNF α 之外側部分”
- (xi) 序列說明：SEQ ID NO. 41
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Arg | Glu | Thr | Pro | Phe | Asn | Asn | Phe | Thr | Val | Ser | Phe | Trp | Leu | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Val | Pro | Lys | Val | Ser | Ala | Ser | His | Leu | Glu | Lys | Gly | Asp | Arg | Leu | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
- (2) S E Q I D N O : 42 之資料：
- (i)序列特性：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (115)

- (a)序列長度：31個胺基酸
- (b)序列類型：胺基酸
- (c)股性：
- (d)拓撲學：線形
- (ii)分子型式：肽
- (iii)假設：無
- (v) 片段型式：內部
- (vi) 原始來源：

(A) 生物：人類

(ix)特色：

- (a)名稱 / 索引：peptide
- (b)位置：1.....31
- (c)其他資料：

/標記 = Pep30-5

/註解 = “Pep 30-5 是用合成法製備之截斷型TNF α 同系物，其包括人T細胞抗原決定位P30與 人TNF α 之外側部分”

(xi) 序列說明:SEQ ID NO. 42

Glu	Lys	Gly	Asp	Arg	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu	Arg
1				5					10					15	
Val	Pro	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu	
			20					25					30		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 經修飾之 T N F α 分子，編碼該)
T N F α 分子之 D N A，及含有經
修飾 T N F α 分子與 D N A 的疫苗

本發明係關於一種經修飾人 T N F α 分子，其施加至人類宿主能夠誘生對抗野生型人 T N F α 之中和抗體，其中該人 T N F α 分子有至少一個肽片段被至少一個已知含有免疫顯性 T 細胞抗原決定位的肽取代，或被該人 T N F α 分子之截斷型取代，該截斷型含有免疫顯性抗原決定位與該人 T N F α 分子之一側或兩側外側區域，該區域包括至少一個 T N F α B 細胞抗原決定位，其中該取代作用在前 β - 褶板之任一股，任一連接環，及 / 或後 β - 褶板之 B'、I 或 D 股的胺基酸序列上造成實質改變。

經修飾人 T N F α 分子或其編碼 D N A 可調配成對抗 T N F α 之疫苗，其視選擇的含有藥學上可接受之佐劑，該疫苗係用於預防或治療慢性炎症疾病，例如類風濕性關節炎與炎症性腸炎，癌症，多發性硬化症，糖尿病，牛皮癬，骨質疏鬆症，或氣喘。

藉由接觸含有該經修飾 T N F α 之組成物，可測試人

英文發明摘要 (發明之名稱：)
MODIFIED TNF α MOLECULES, DNA ENCODING SUCH TNF α MOLECULES
AND VACCINES COMPRISING SUCH MODIFIED TNF α MOLESULES AND
DNA

A modified human TNF α molecule capable of raising neutralizing antibodies towards wild-type human TNF α following administration of said modified TNF α molecule to a human host, wherein at least one peptide fragment of the human TNF α molecule has been substituted by at least one peptide known to contain an immunodominant T cell epitope or a truncated form of said molecule containing an immunodominant epitope and one or both flanking regions of the human TNF α molecule comprising at least one TNF α B cell epitope, wherein the substitution introduces a substantial change in the amino acid sequence of the front β -sheet, in any one of the connecting loops and/or in any one of the B', I or D strands of the back β -sheet.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

A5
B5

四、中文發明摘要 (發明之名稱：
體液中 T N F α 的存在情形。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

英文發明摘要 (發明之名稱：

The modified human TNF α molecules or DNA encoding them may be formulated as vaccines against TNF α optionally with pharmaceutically acceptable adjuvants, for the prevention or treatment of chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis and inflammatory bowel diseases, cancer, disseminated sclerosis, diabetes, psoriasis, osteoporosis or asthma.

Human body fluids may be tested for the presence of TNF α by contact with a composition containing the modified TNF α .

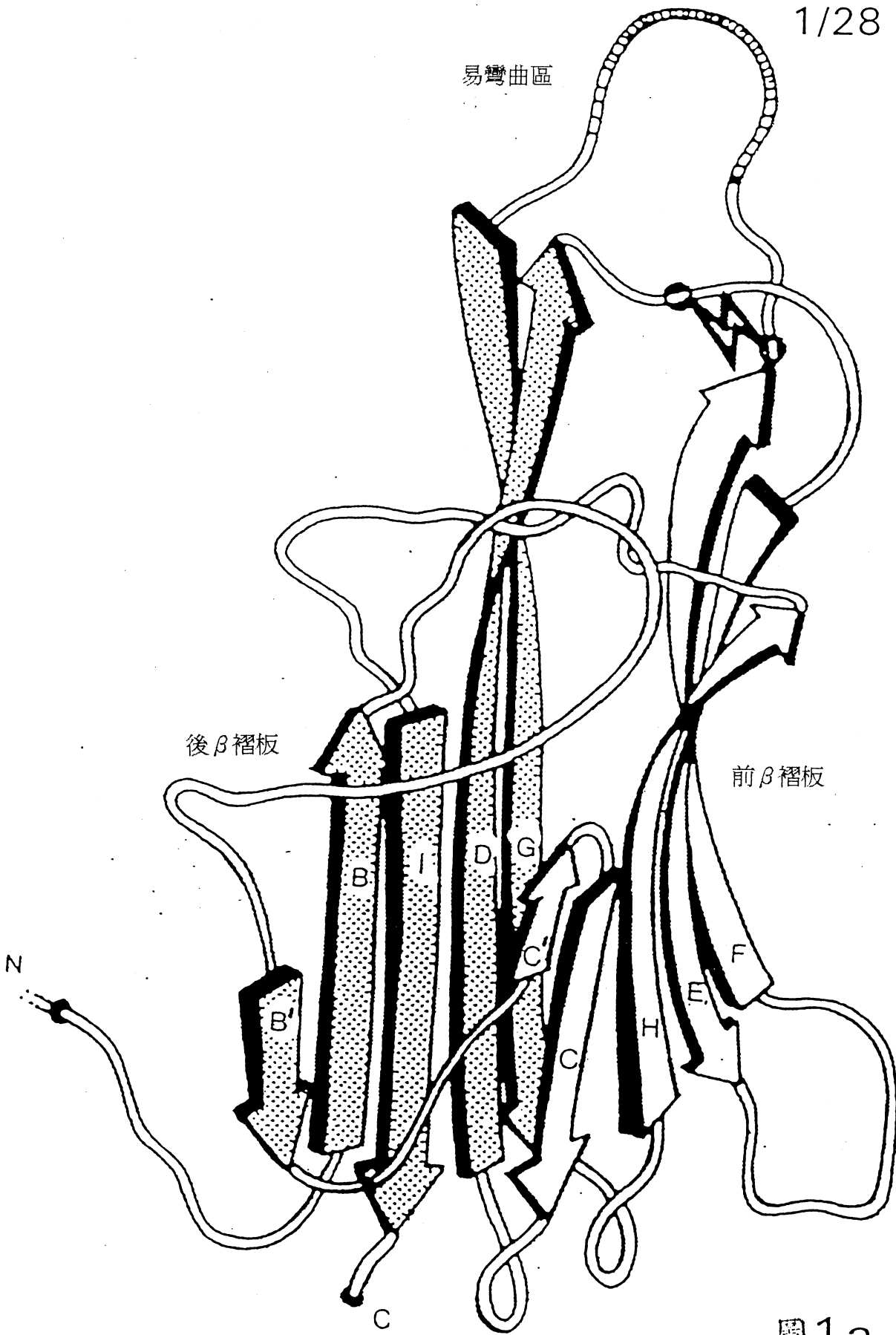
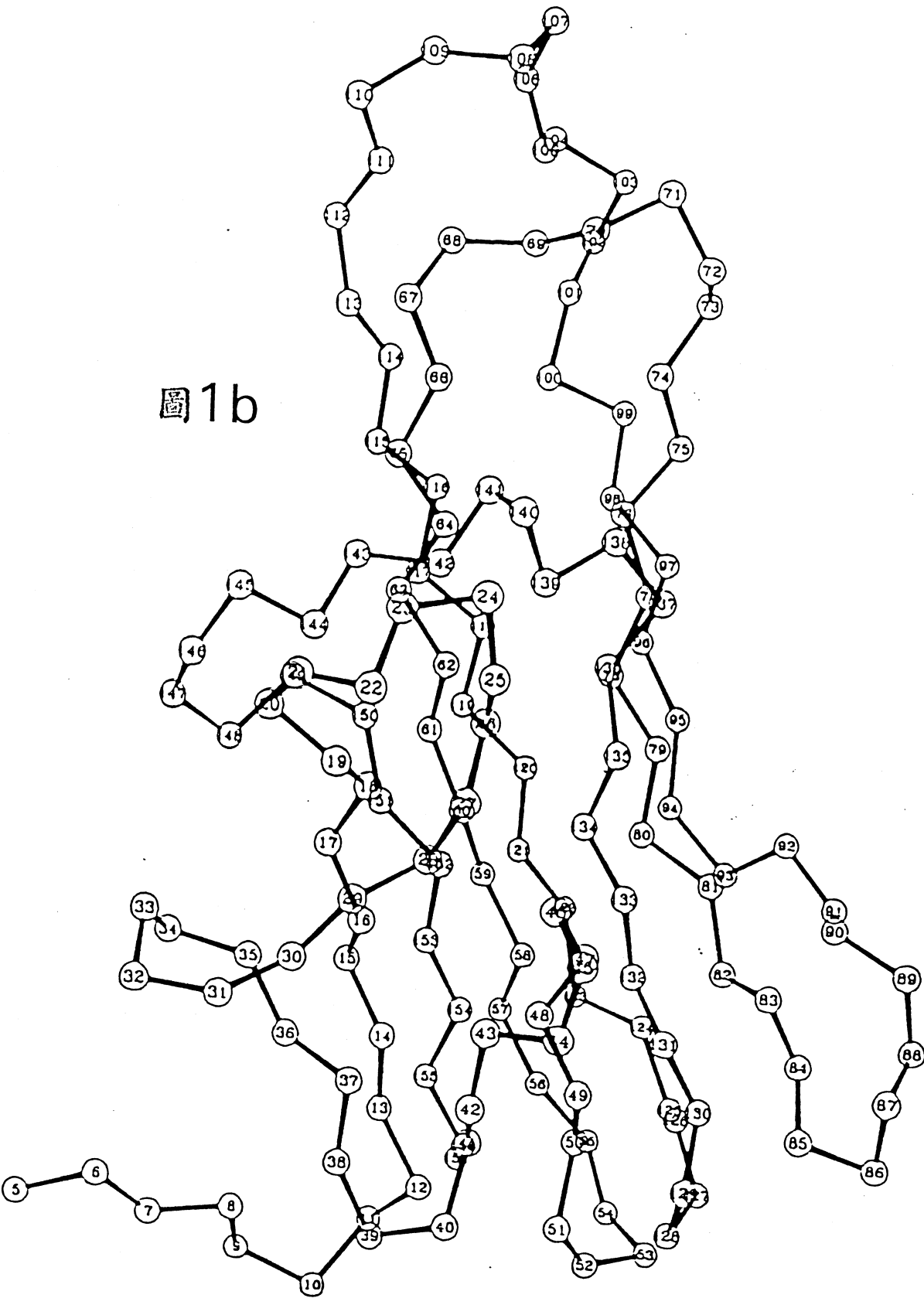


圖1b



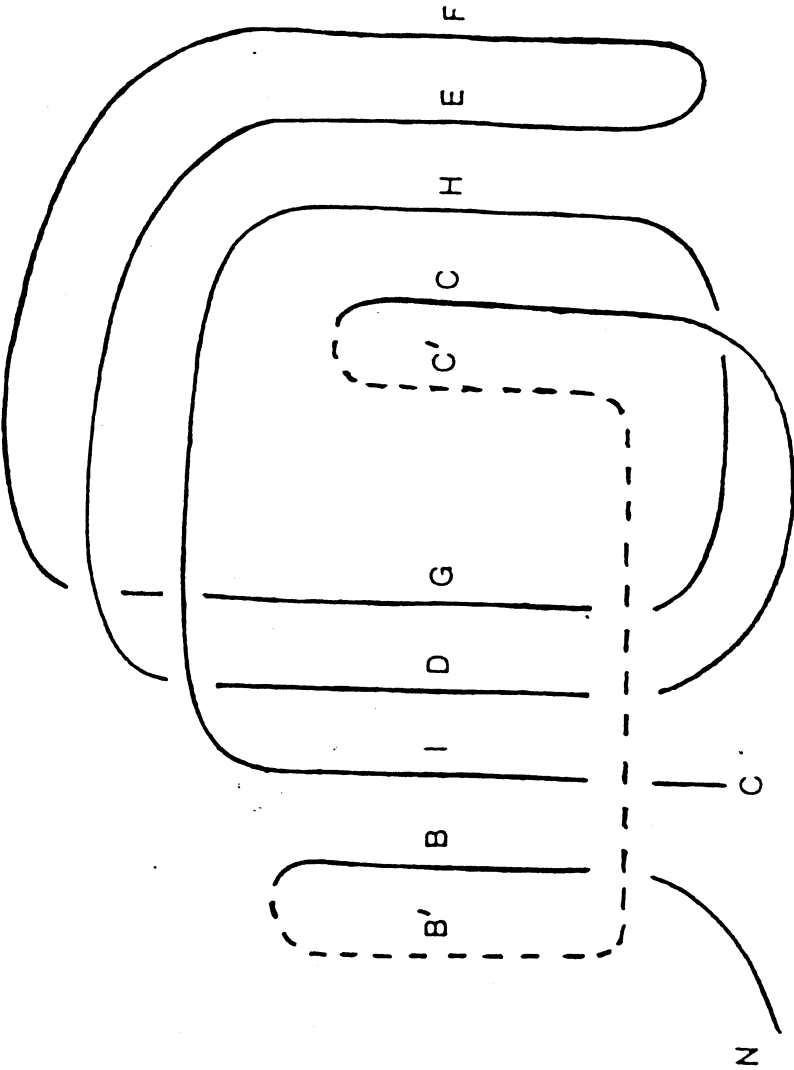
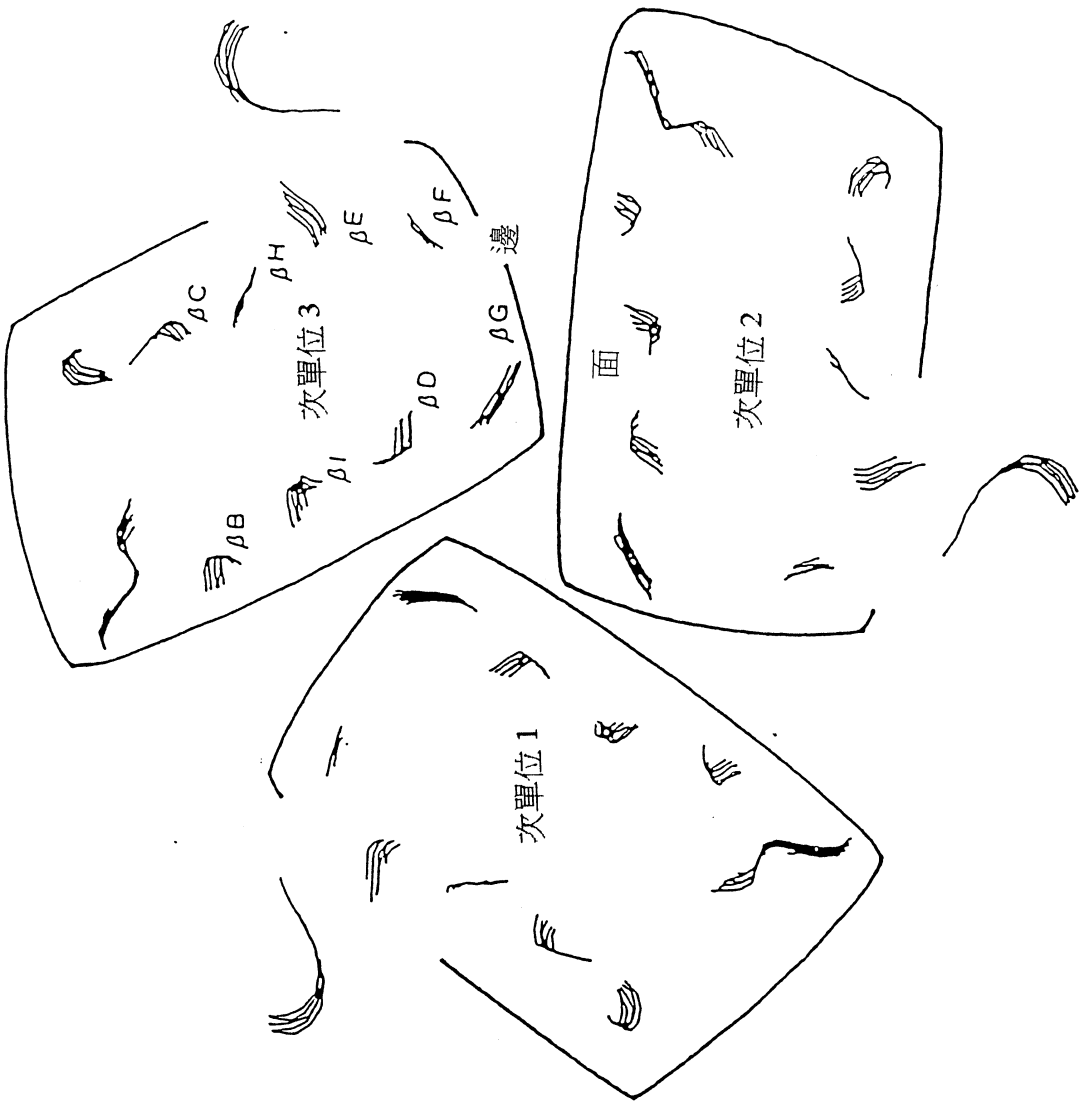


FIG 1C

圖 2



人TNF α 之胺基酸序列

索引 密碼 : Swissprot P01375

-76 MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRRC LFLSLESELI VAGATTLECL
-26 LHEGVIGPQR EEFPRLSLI SPLAQA
1 VRSSSRTPSD KPVAVHVANP QAEGQLQWLN RRANALLANG VELRDNQLVV
51 PSEGLYLIYS QVLFKGQGCP STHVLLTHTI SRIAVSYQTK VNLLSAIKSP
101 CQRETPEGAE AKPWYEPIYL GGVFQLEKGD RLSAEINRPD YLDFAESGQV
151 YFGIIAL

第-14位之爭議序列 F → S。雙硫鍵位於 Cys69-101 之間。訊號定錨序列-41 至-21(劃底線者)。
Lys-581-57 有肉豆蔻基化。

圖 3b

圖 3a

1 cacaccctga caagctgcc a ggcagggtct ctctctctca catactgacc
 51 caccggctcca cctctctctc cctggaaagg acaccatgag cactgaaagc
 101 atgatccggg acgtggagct ggccgaggag gcgctcccca agaagacagg
 151 ggggccccag ggctccaggc ggtgcttggt cctcagcctc ttctccttcc
 201 tgatcgtggc aggcgccacc acgtcttctt gcctgctgca ctttggagtg
 251 atcggcccc agaggggaaga gtcccccagg gacctctctc taatcagccc
 301 tctggcccc gcagtcagat catcttctcg aaccccgagt gacaagcctg
 351 tagcccatgt tgtagcaaac cctcaagctg aggggcagct ccagtggctg
 401 aaccgcgggg ccaatgccct cctggccaat ggcgtggagc tgagagataa
 451 ccagctgggtg gtgccatcag agggcctgta cctcatctac tcccagggtcc
 501 tcttcaaggg ccaaggetgc cctccacccc atgtgctcct caccacaccc
 551 atcagccgca tcgcgtctc ctaccagacc aaggtcaacc tcctctctgc
 601 catcaagagc ccctgccaga gggagacccc agaggggget gaggccaagc
 651 cctgggtatga gcccatctat ctgggagggg tcttcagct ggagaagggt
 701 gaccgactca gcgctgagat caatcggccc gactatctcg accttgccga
 751 gtctgggcag gtctactttg ggatcattgc cctgtgagga ggacgaacat
 801 ccaaccttcc caaacgcctc ccctgcccc atccctttat taccctctcc
 851 ttcagacacc ctcaacctct tctggctcaa aaagagaatt gggggcttag
 901 ggtcggaacc caagcttaga actttaagca acaagaccac cacttcgaaa
 951 cctgggattc aggaatgtgt ggctgcaca gtgaagtgt ggcaaccact
 1001 aagaattcaa actggggcct ccagaactca ctggggccta cagctttgat
 1051 ccctgacatc tggaatctgg agaccagga gcctttggtt ctggccagaa
 1101 tgctgcagga cttgagaaga cctcacctag aaattgacac aagtggacct
 1151 taggccttcc tctctccaga tgtttccaga cttccttgag acacggagcc
 1201 cagccctccc catggagcca gctcccctca tttatgtttg cacttgatgat
 1251 tattttattat ttatttatta tttatttatt tacagatgaa tgtatttatt
 1301 tgggagaccg gggatatcctg ggggaccaa tgtaggagct gccttggtc
 1351 agacatgttt tccgtgaaaa cggaggctga acaataggct gtcccatgt
 1401 agccccctgg cctctgtgcc ttcttttgat tatgtttttt aaaatattat
 1451 ctgattaagt tgtctaaaca atgctgattt ggtgaccaac tgtcactcat
 1501 tgetgaggcc tctgctcccc agggagttgt gtctgtaate ggctactat
 1551 tcagtggcga gaaataaagg ttgcttagga aagaa

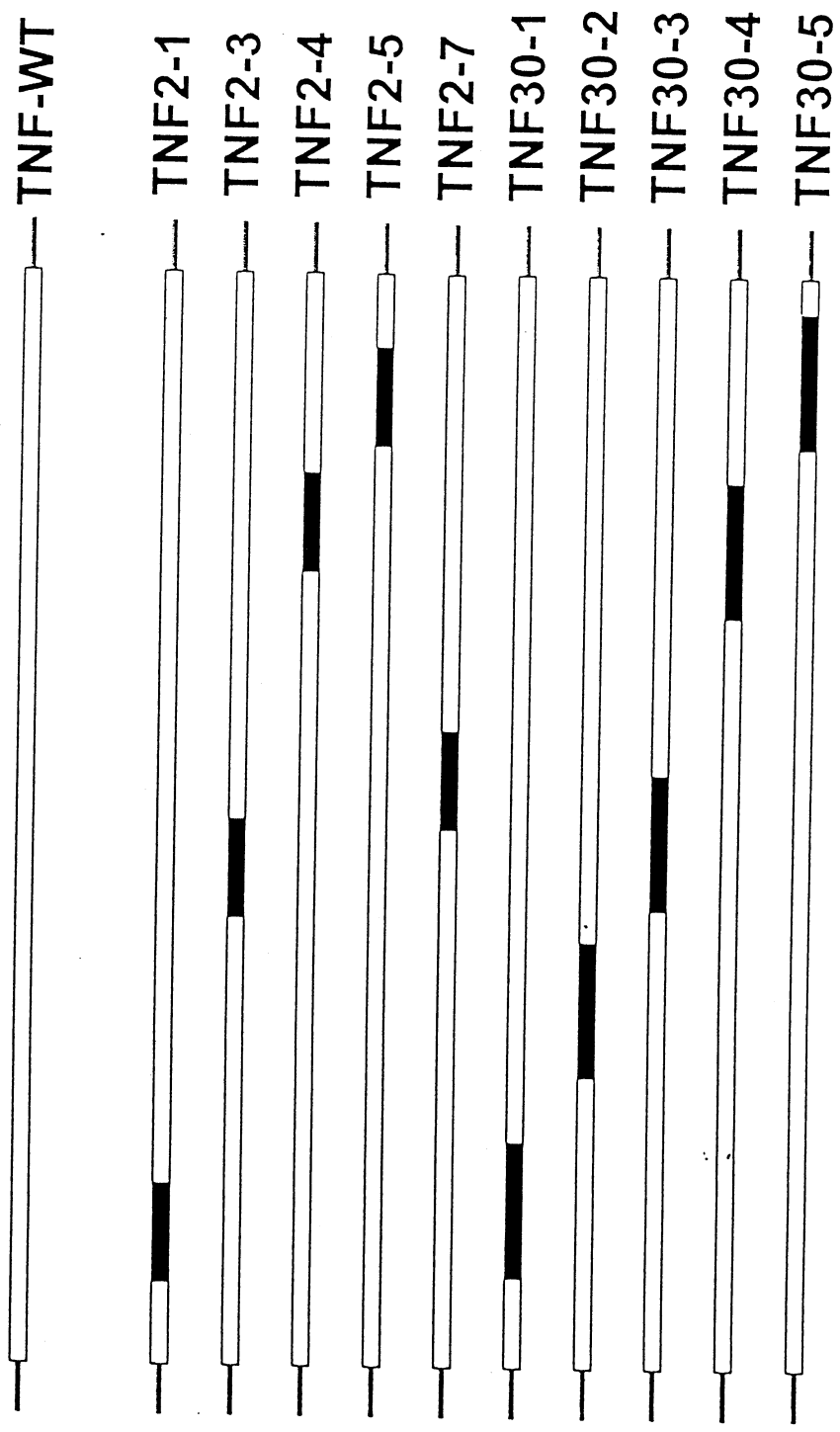


Fig 4a

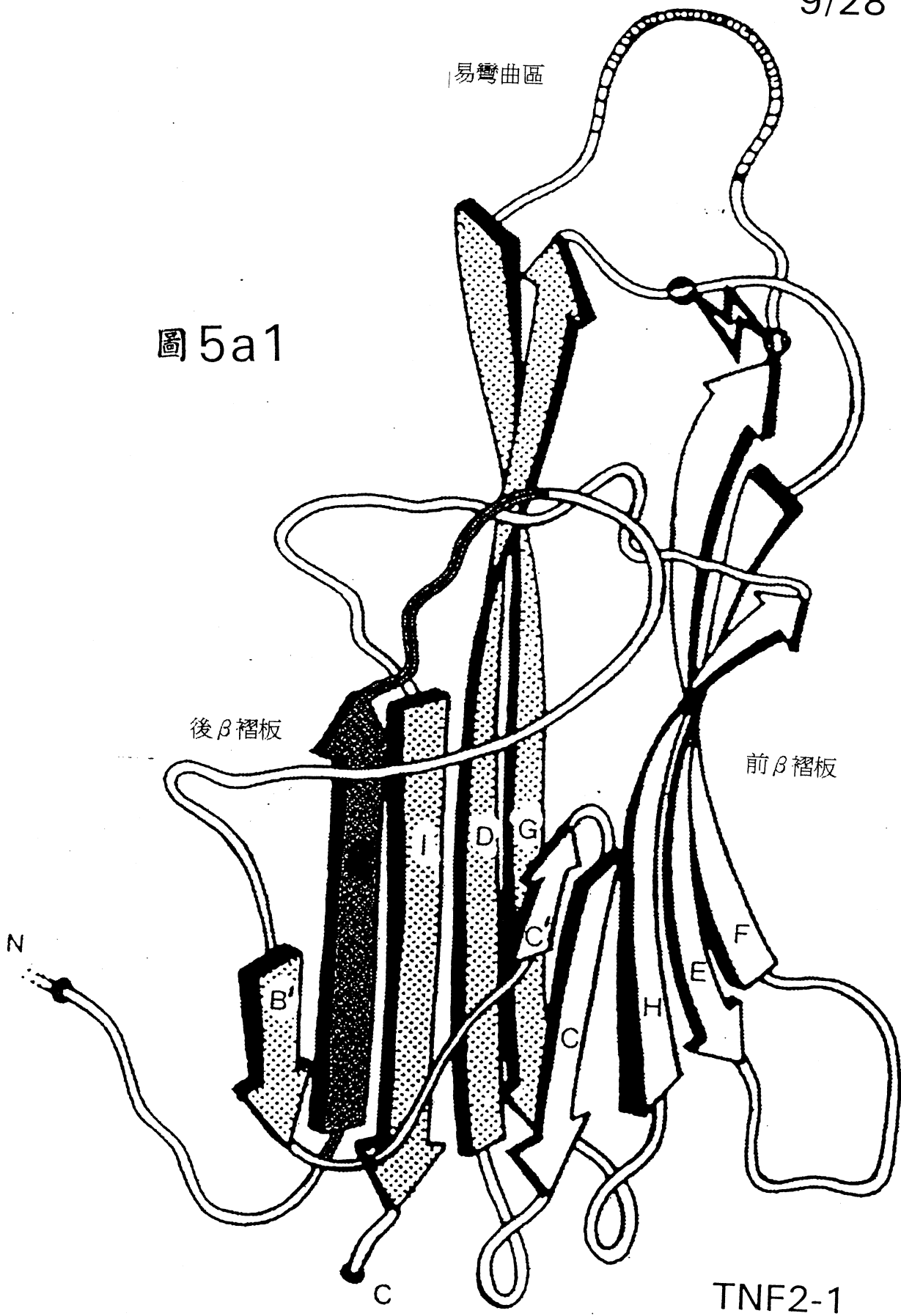


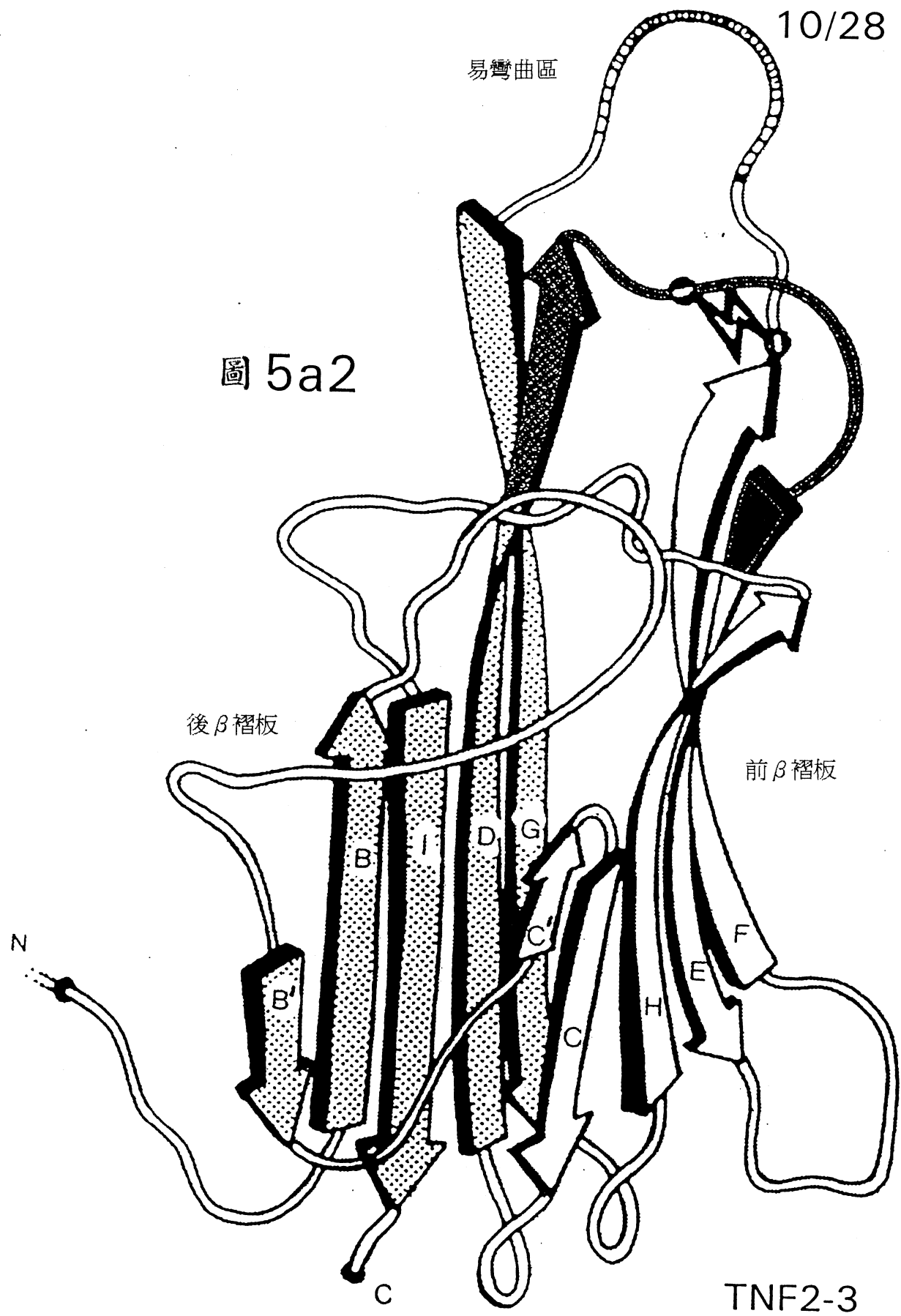
#	1	11	21	31	41	51	61	71
WT	VRSSRTPSD	KPVAHVVANP	QAEQQLQWLN	RRANALLANG	VELRDNQLVV	PSEGLYLIYS	QVLFKGQGCP	STHVLLTHTI
2-1	-----Q	YIKANSKFIG	ITEL-----	-----	-----	-----	-----	-----
2-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2-4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2-5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2-7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
30-1	-----F	NNFTVSFWLR	VPKVSASHLE	-----	-----	-----	-----	-----QYIKA
30-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
30-3	-----	-----	-----	-----F	NNFTVSFWLR	VPKVSASHLE	-----	-----
30-4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----FNNFTVS	FWLRVPKVS
30-5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

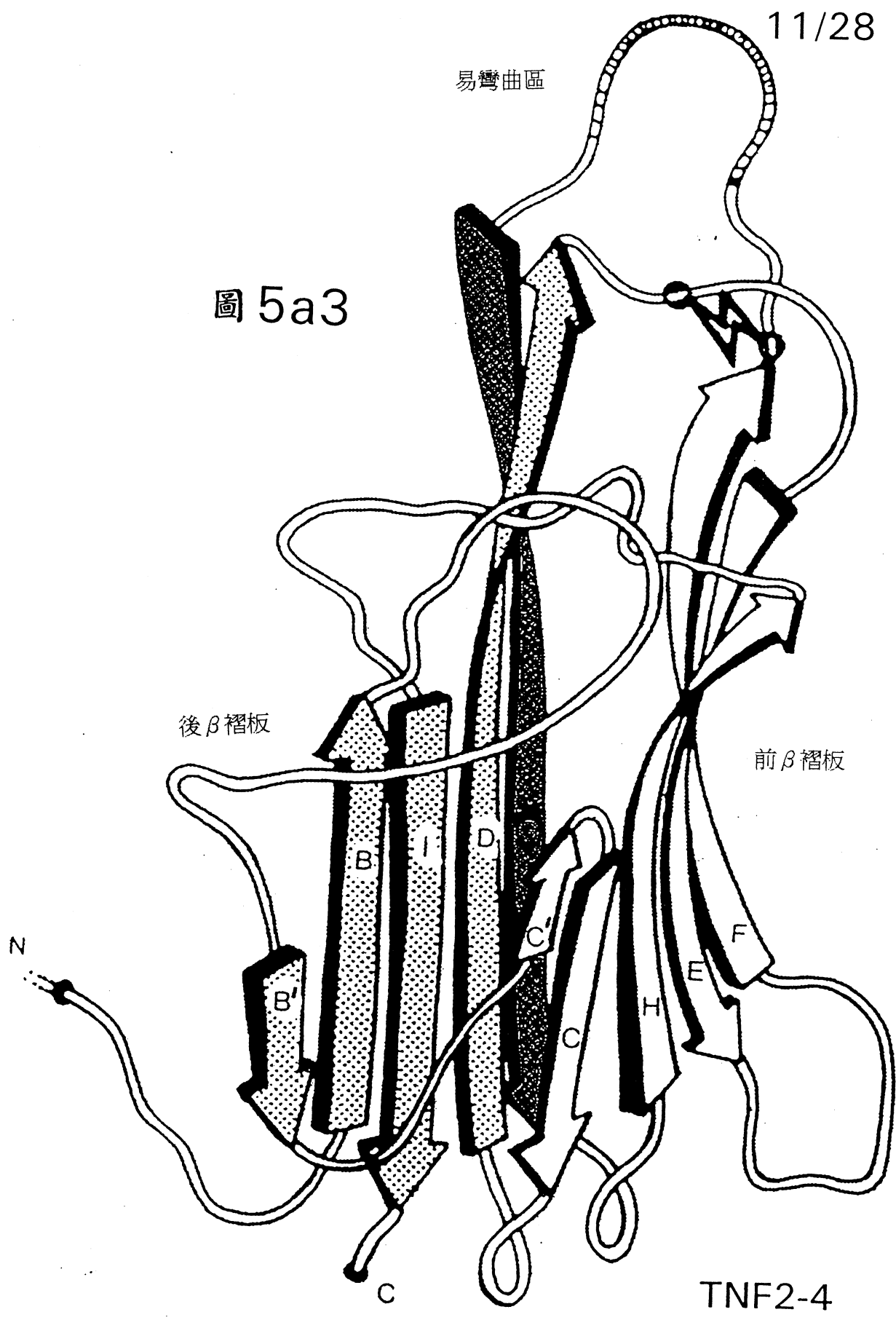
#	81	91	101	111	121	131	141	151
WT	SRIAVSYQTK	VNLLSAIKSP	CQRETPEGAE	AKPWYEPIYL	GGVFQLEKGD	RLSAEINRPD	YLDFAESGQV	YFGIIAL
2-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2-4	-----	-----	-----	-----QYIKANS	KFIGITEL--	-----	-----	-----
2-5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2-7	NSKFIGITEL	-----	-----	-----	-----	-----QYIKANSKF	IGITEL----	-----
30-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
30-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
30-3	SHLE-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
30-4	-----	-----	-----FNNFT	VSFWLRVPKV	SASHLE----	-----	-----	-----
30-5	-----	-----	-----	-----	-----	-----FNNFTVSFW	LRVPKVSASH	LE----

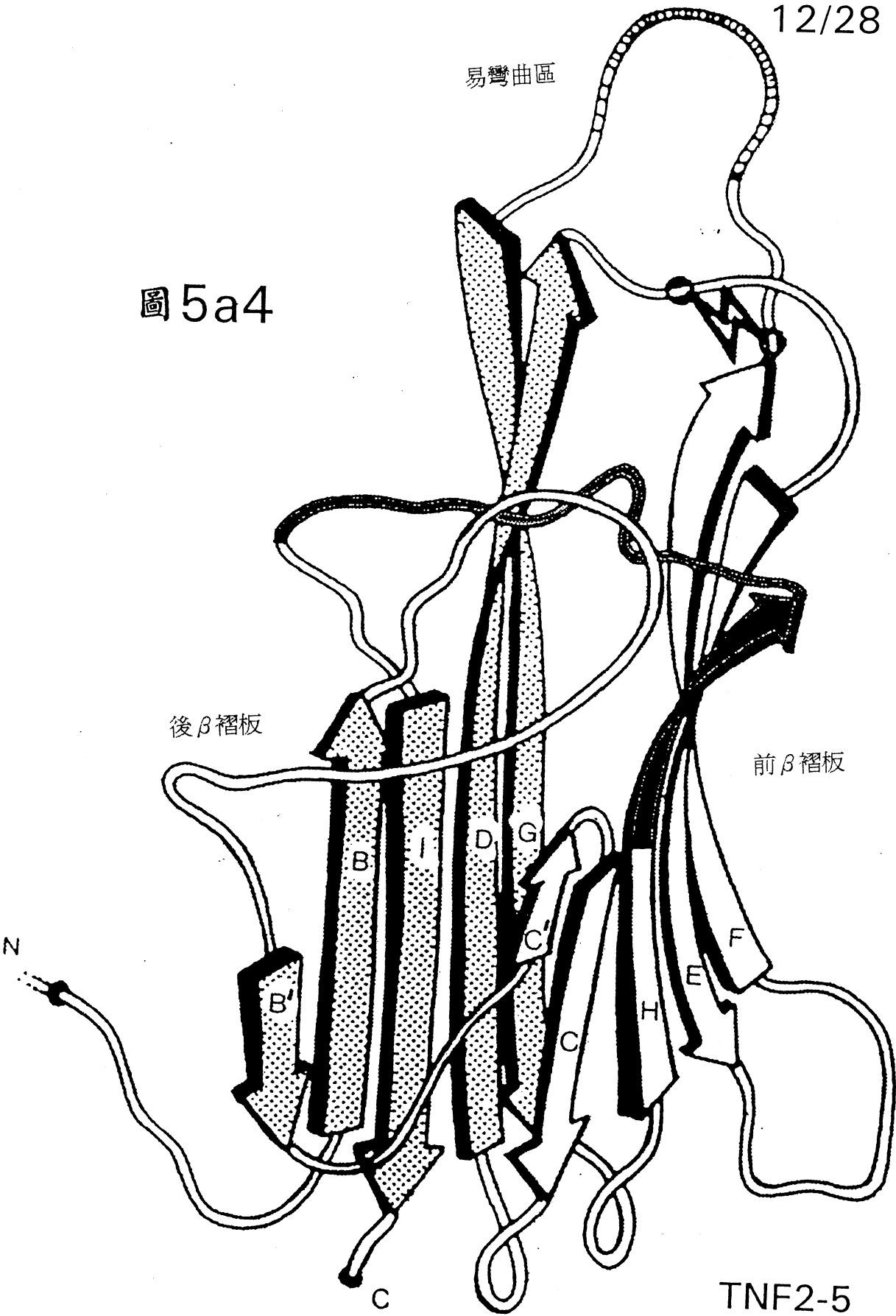
4b

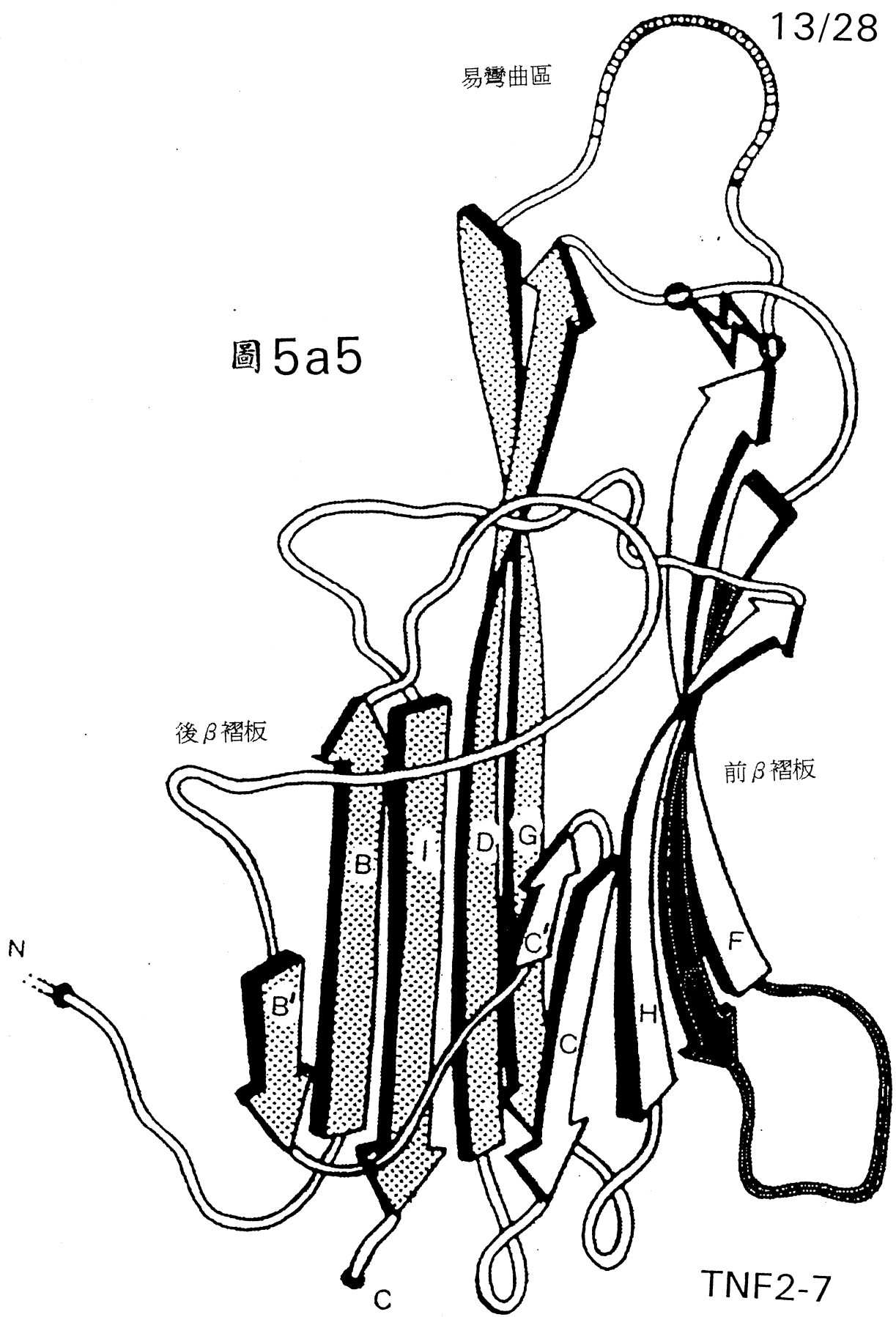
圖 5a1

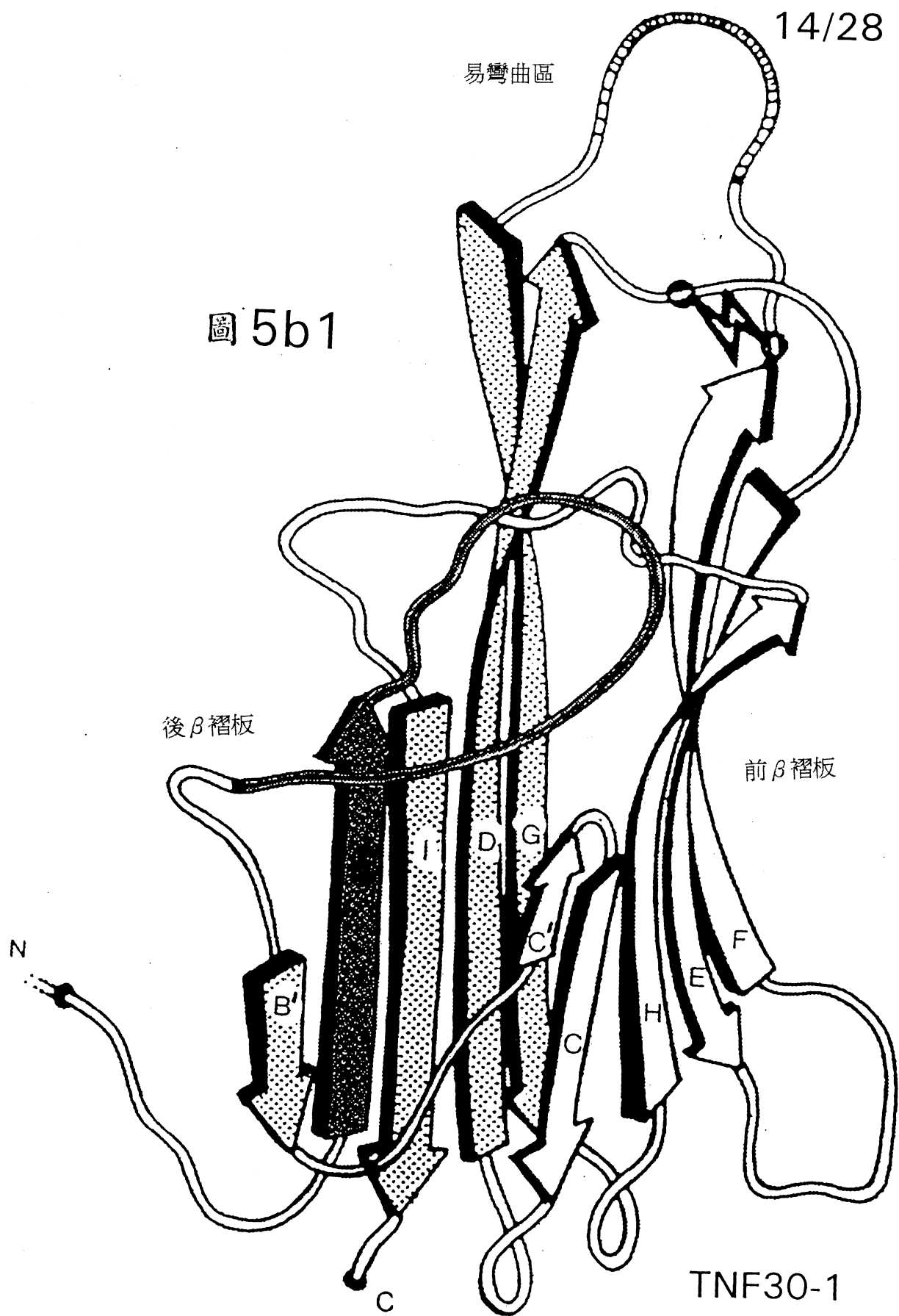


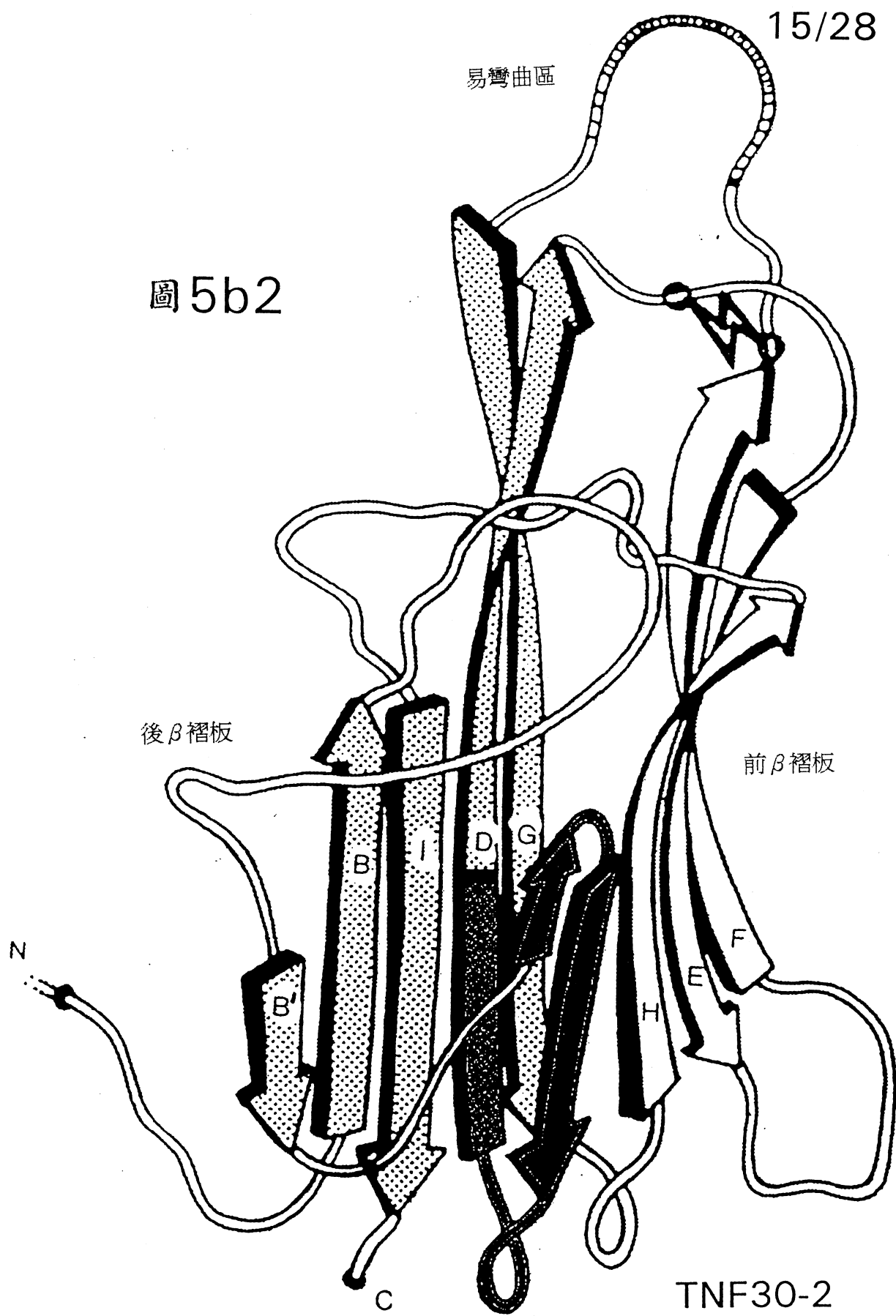


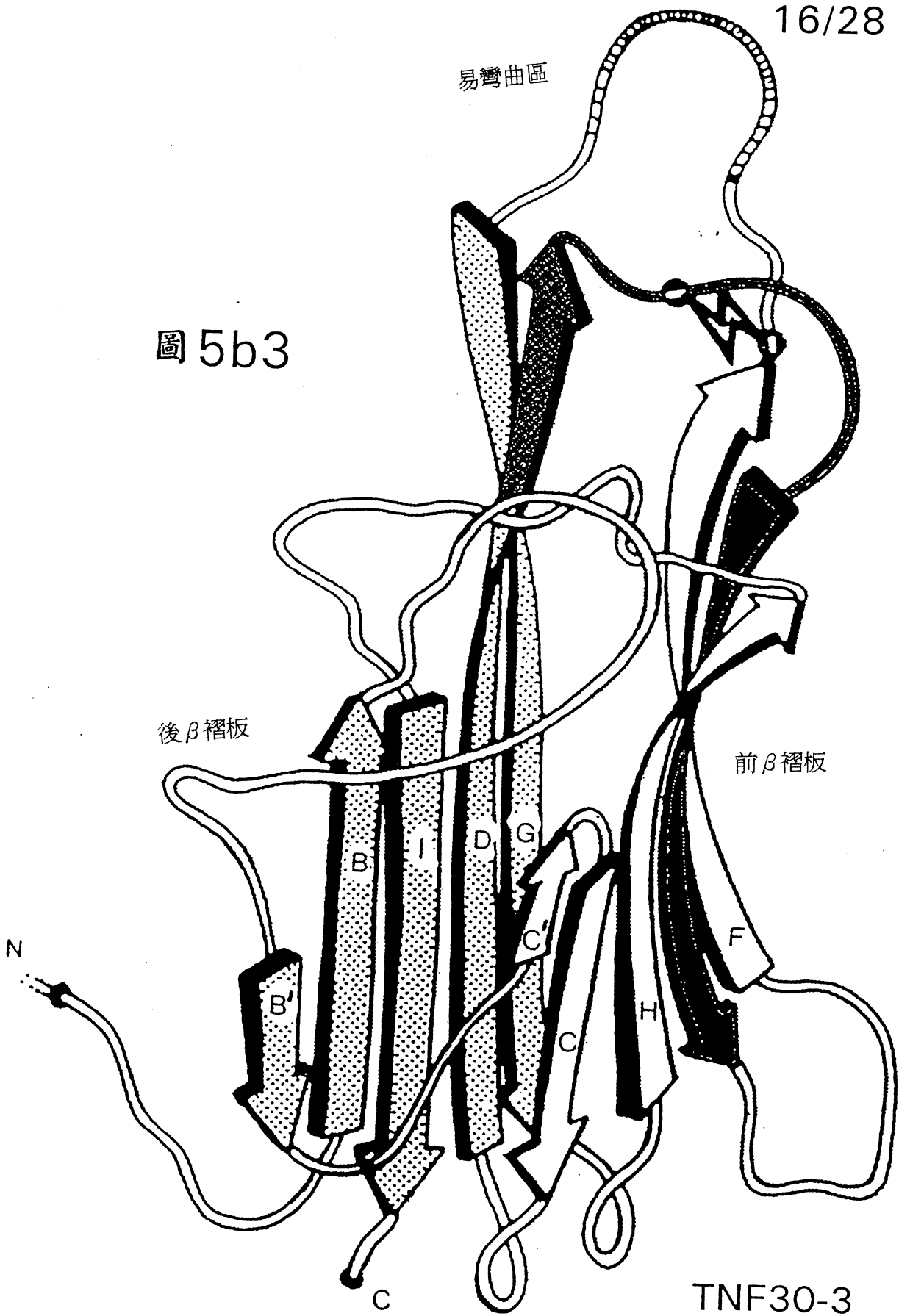


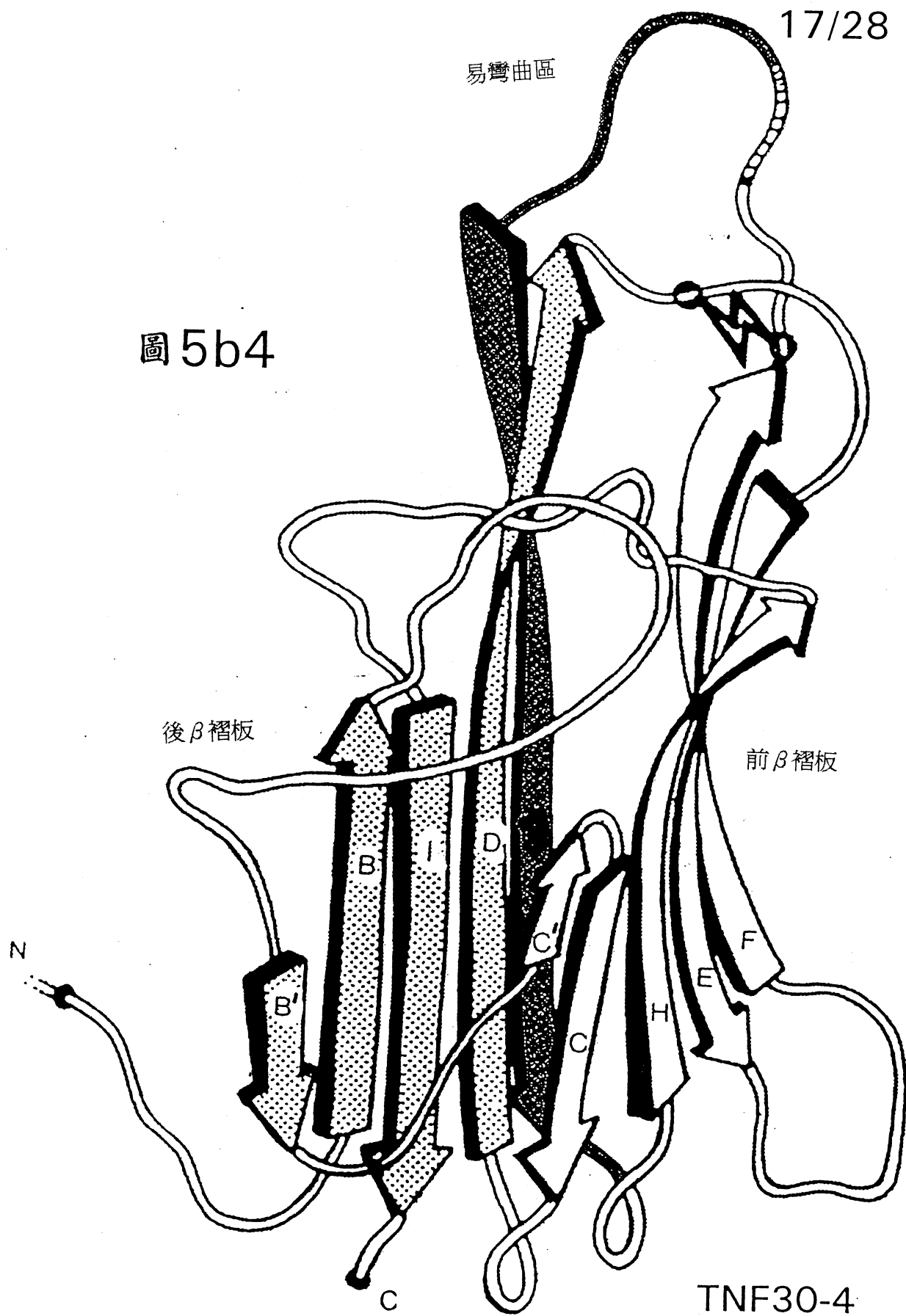


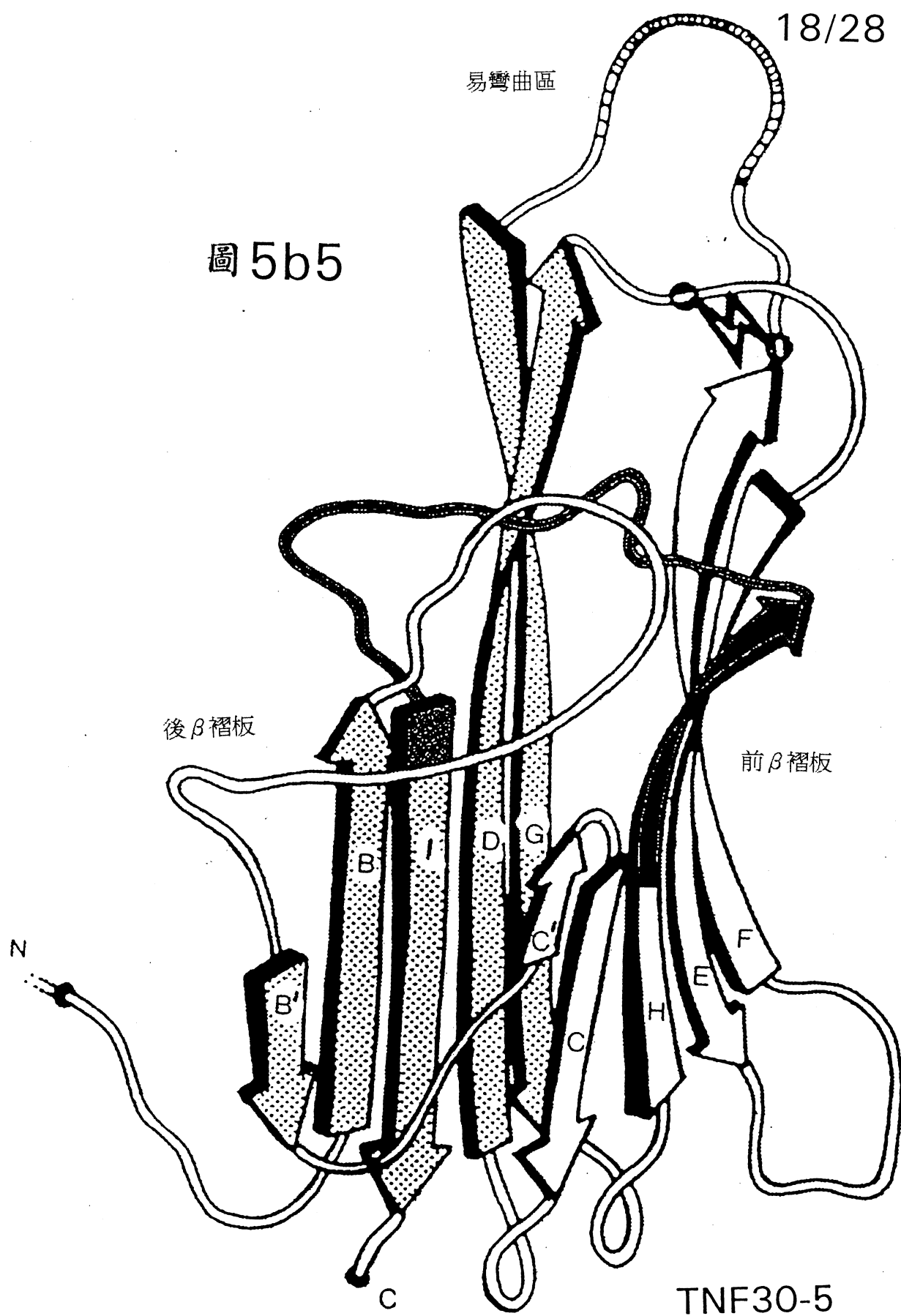


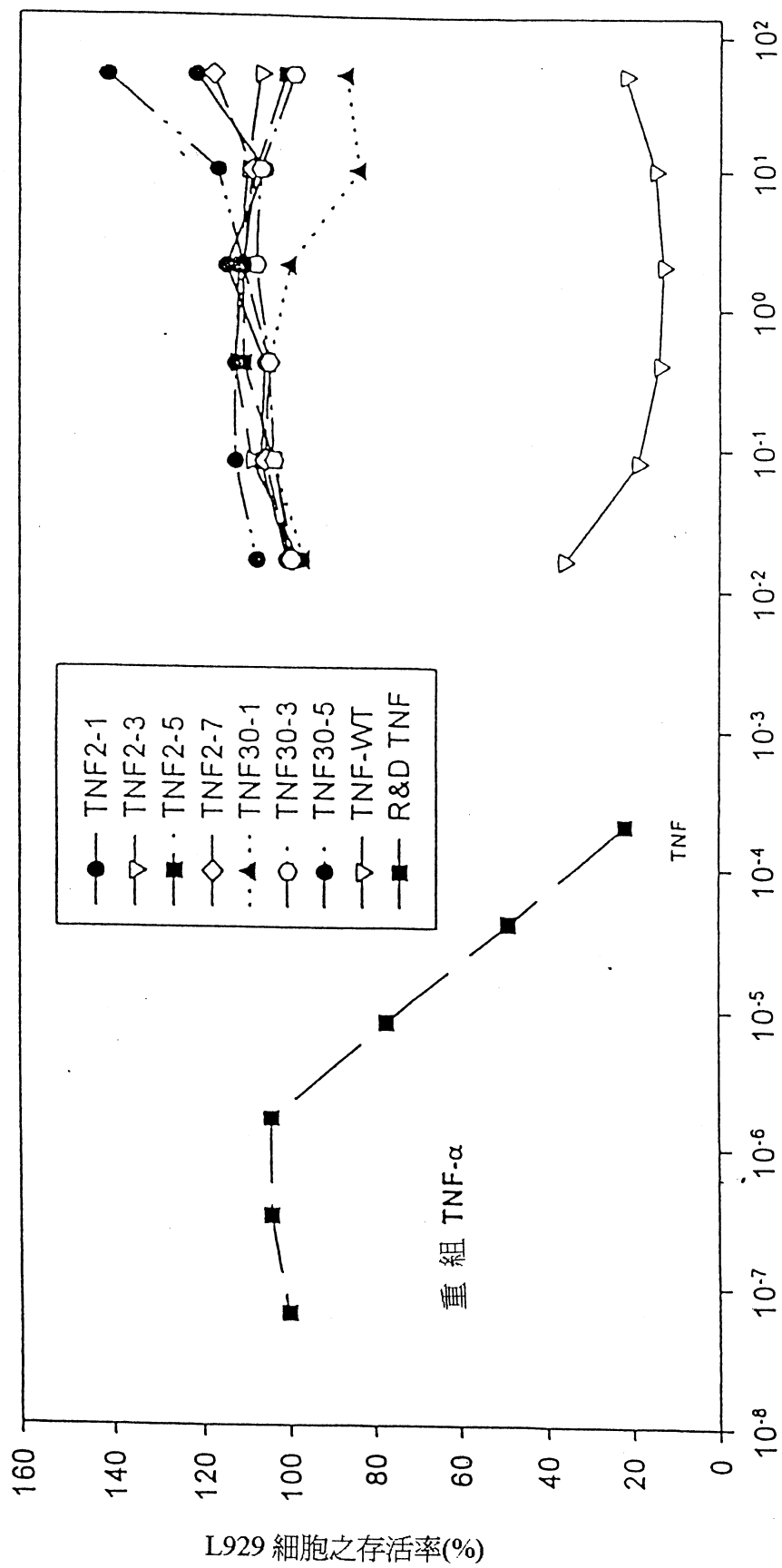












微克/毫升 TNF- α 構架體

圖 6

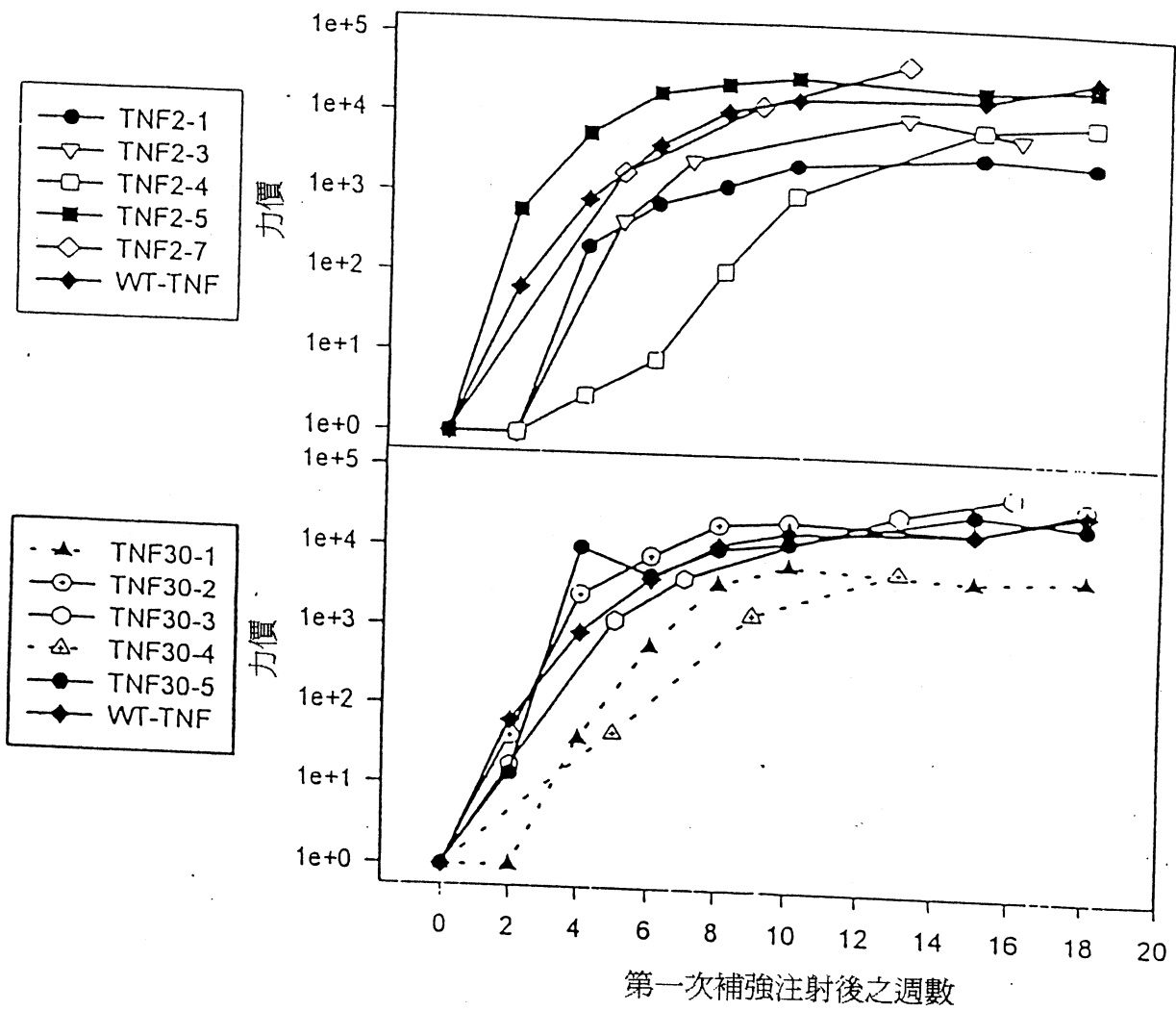
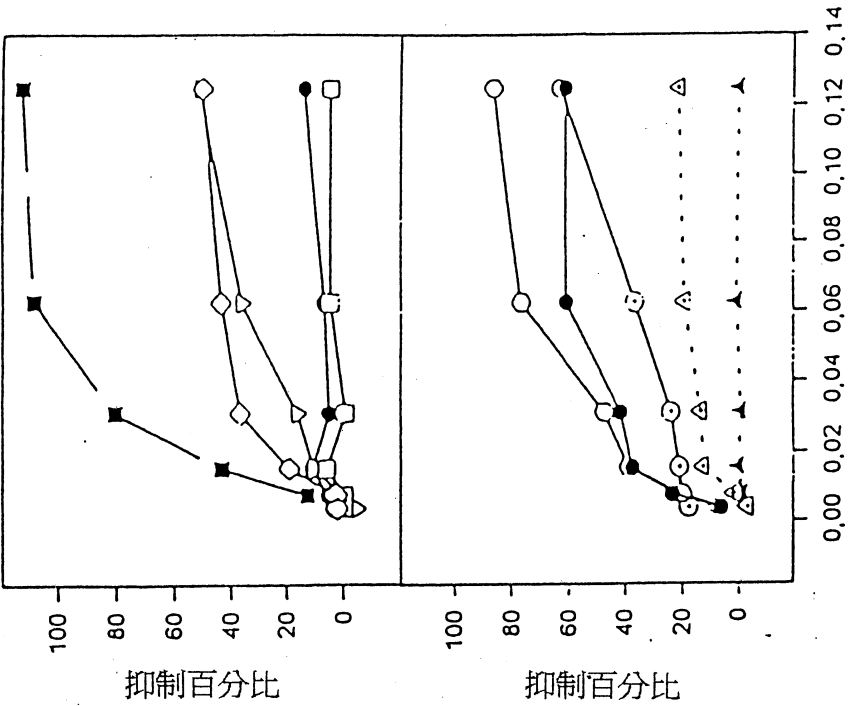


圖 7



TNF2-1
TNF2-3
TNF2-4
TNF2-5
TNF2-7

TNF30-1
TNF30-2
TNF30-3
TNF30-4
TNF30-5

圖 8

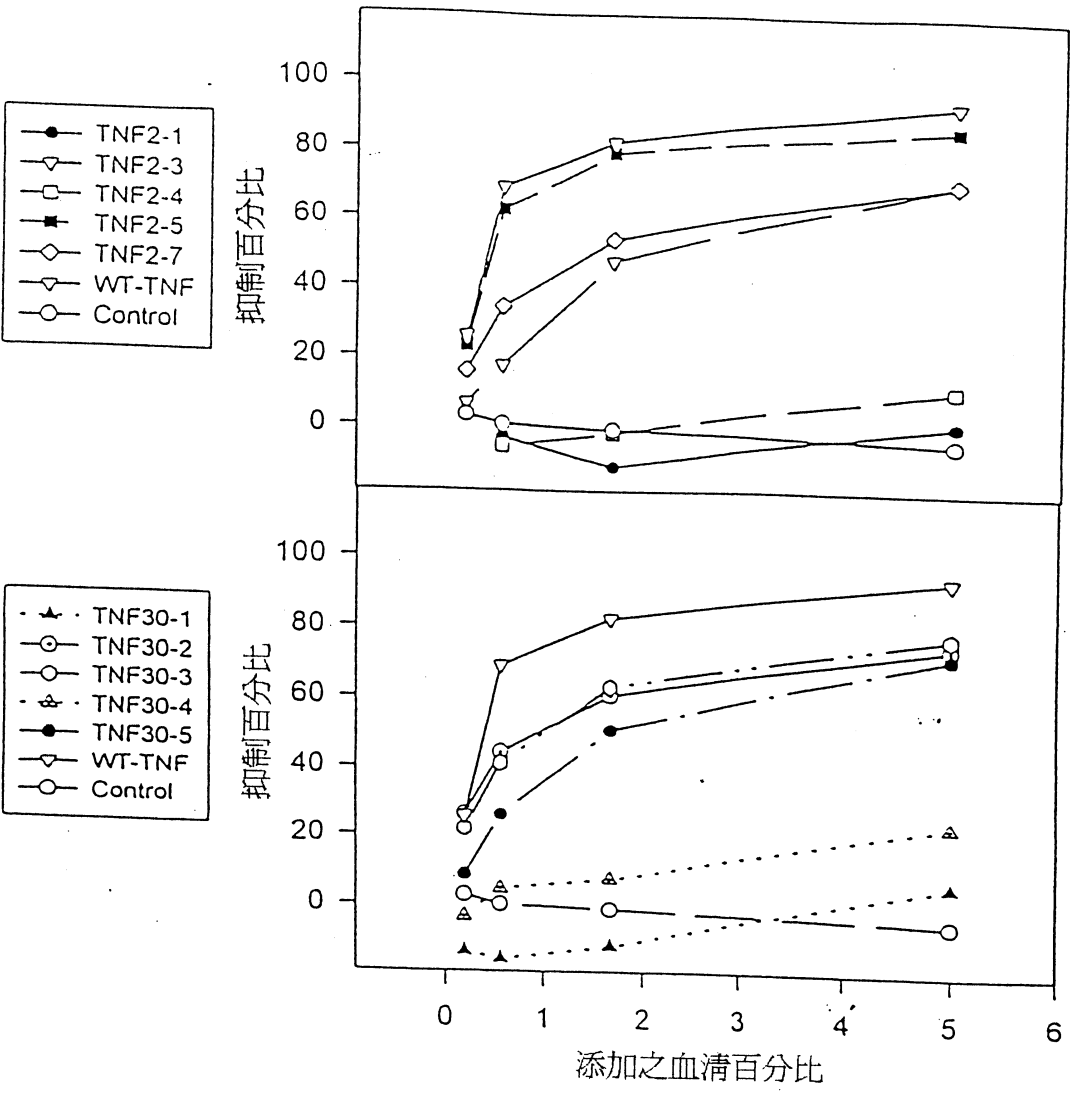


圖 9

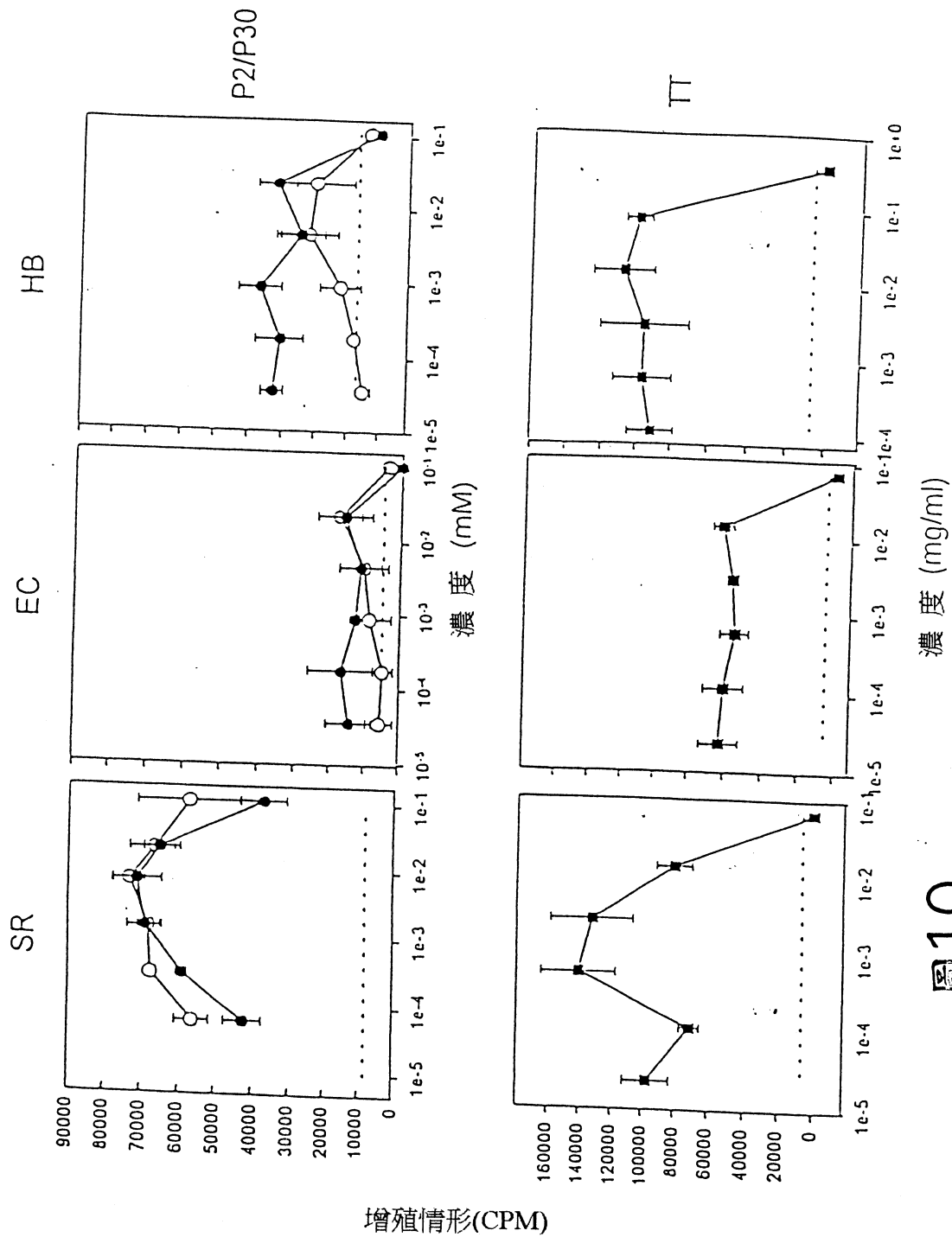


圖10

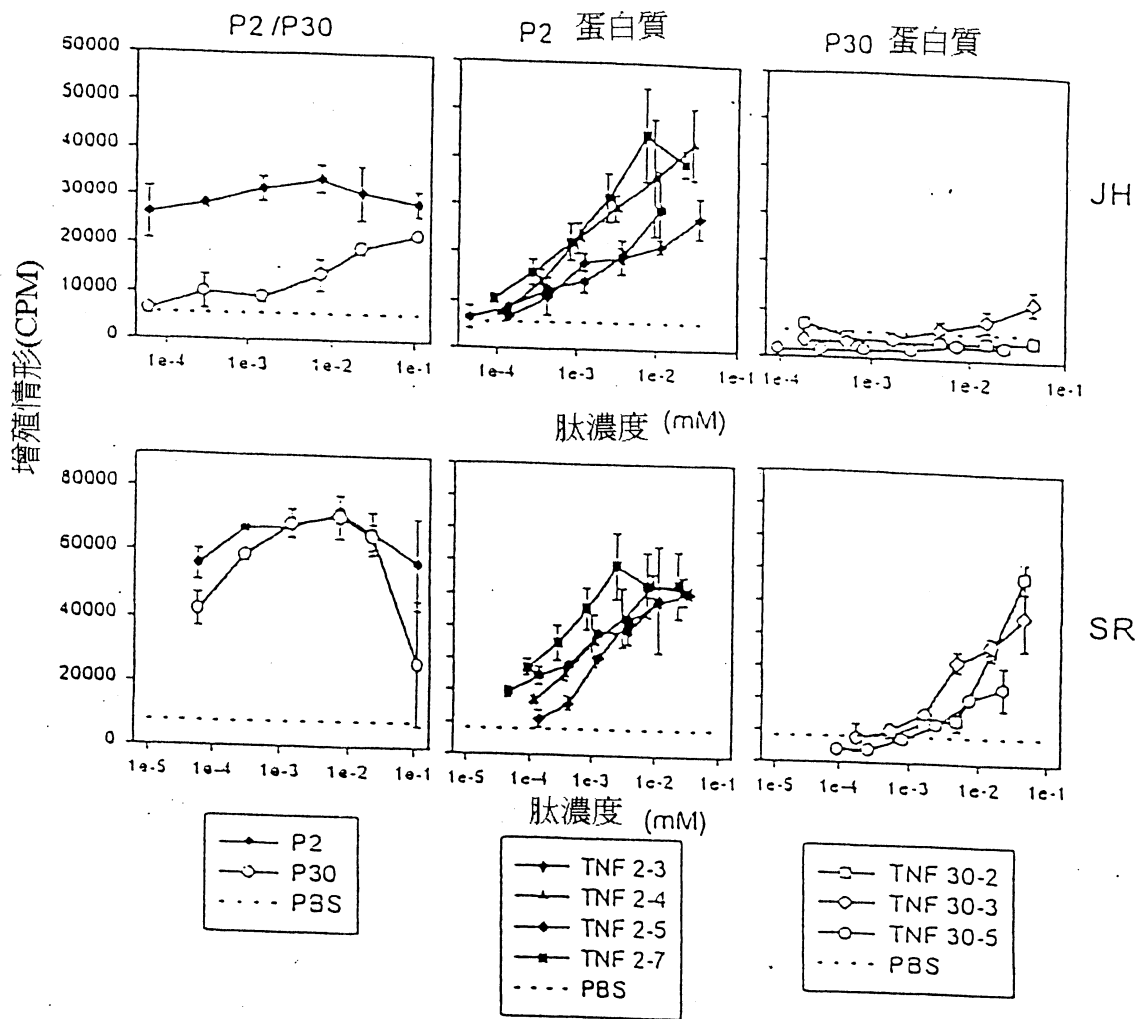


圖 11

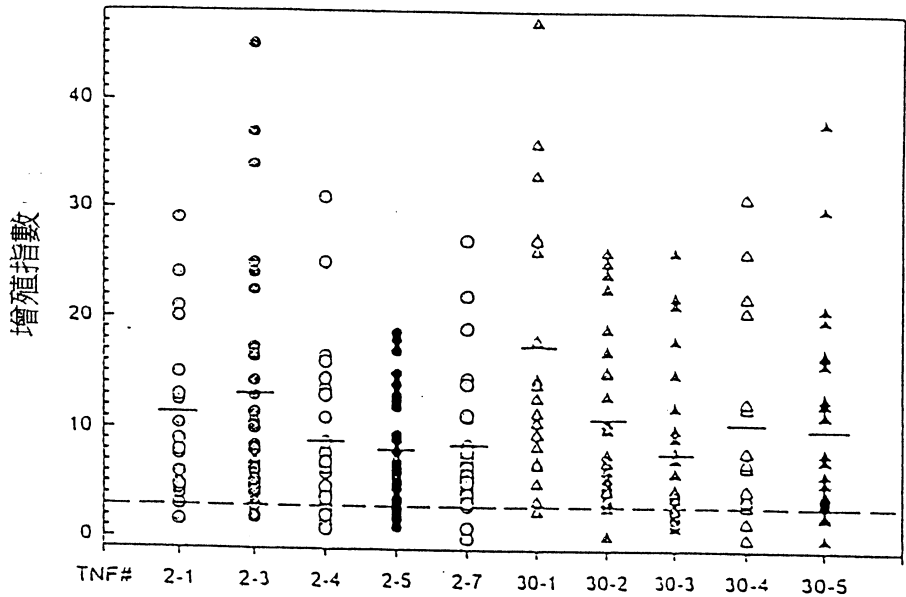


圖12

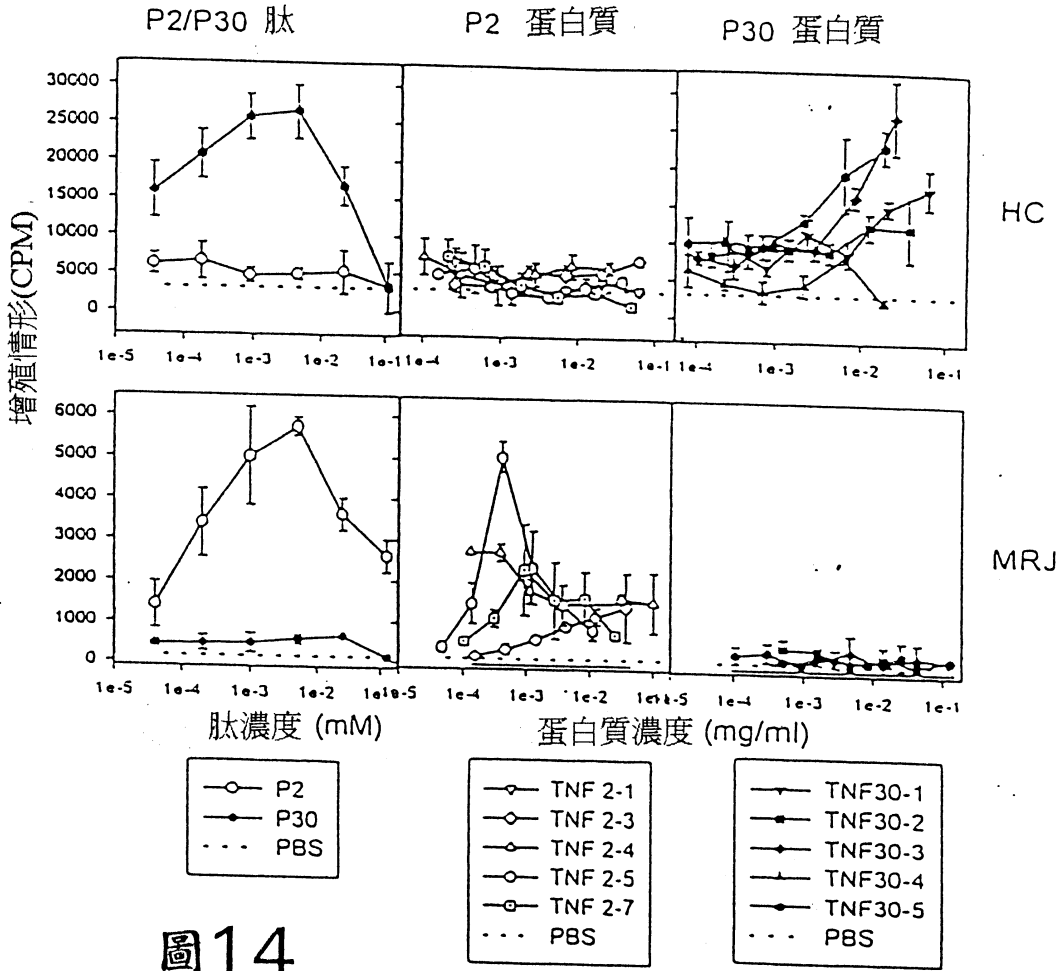


圖14

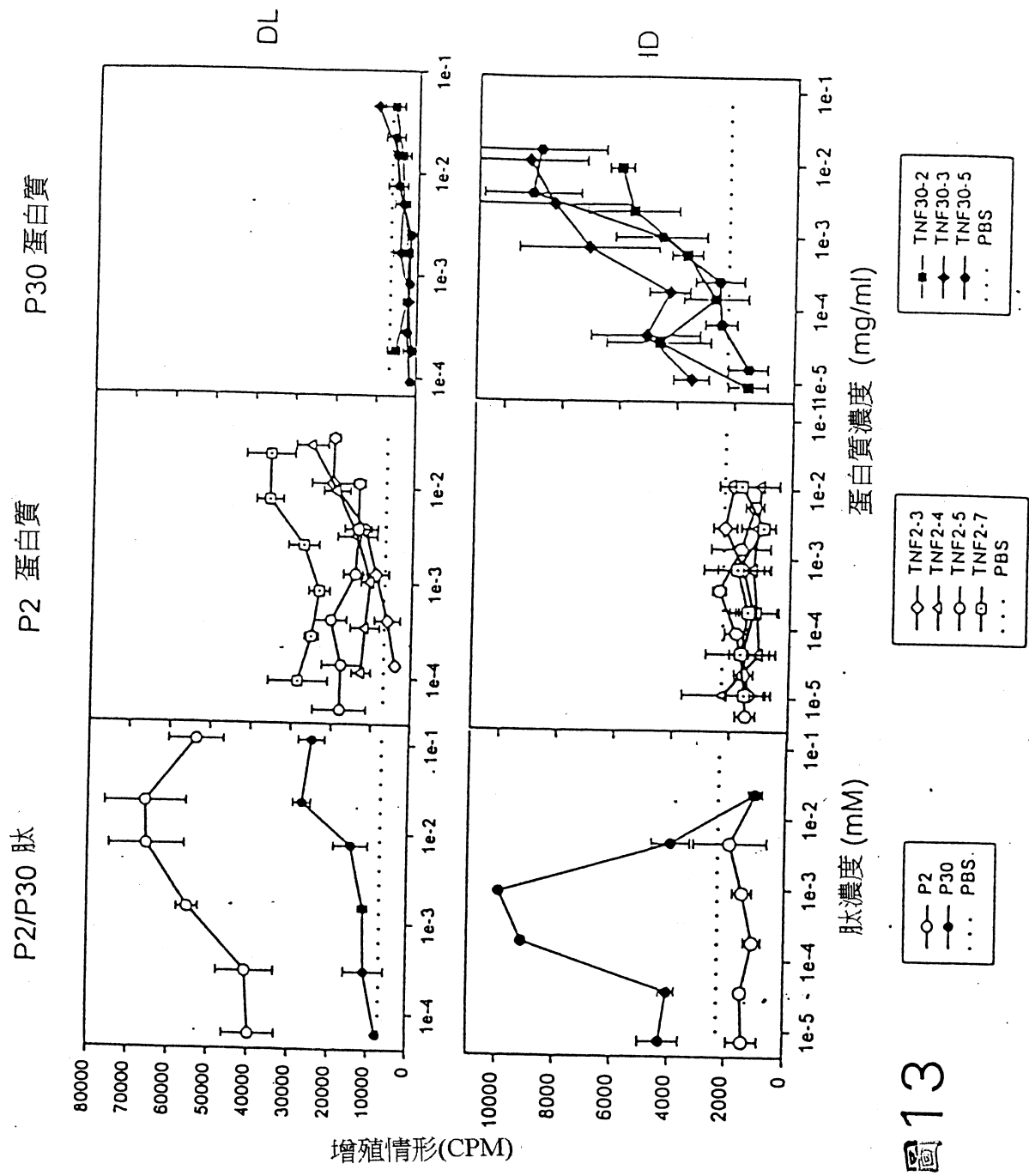


圖13

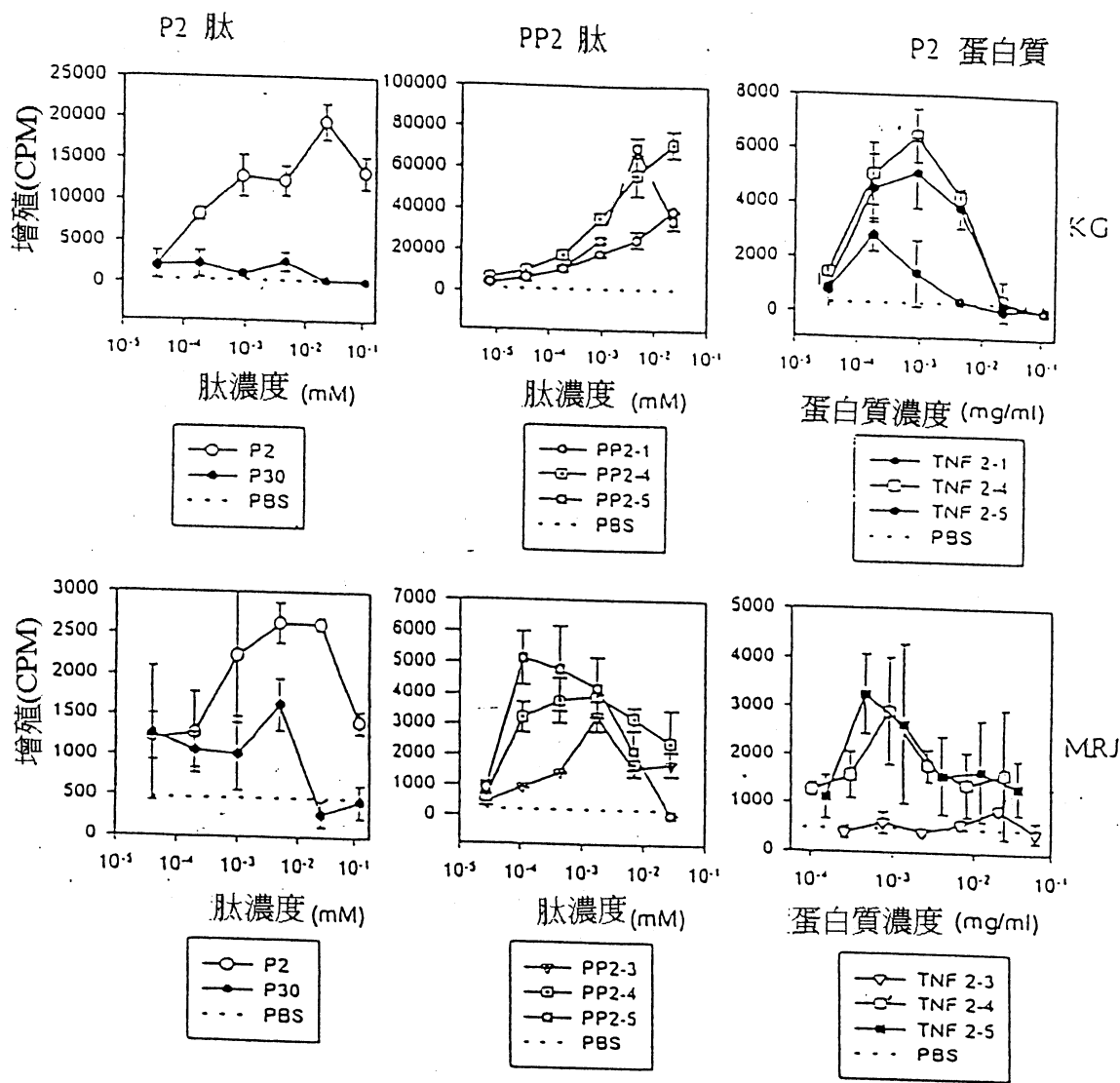
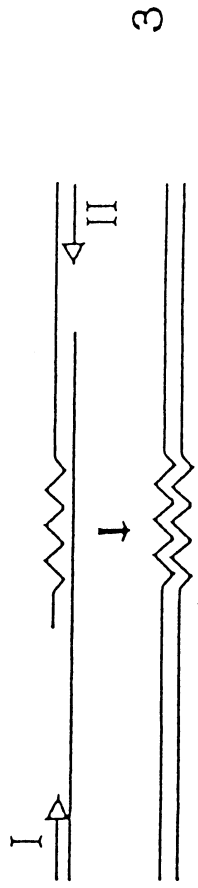
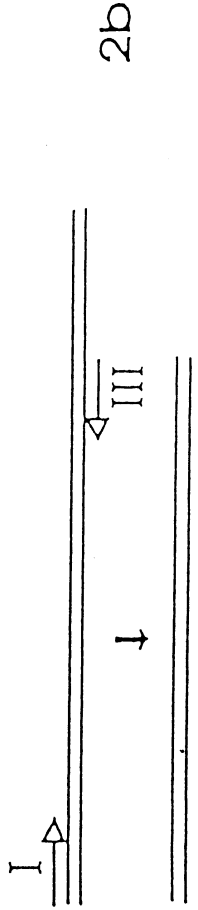
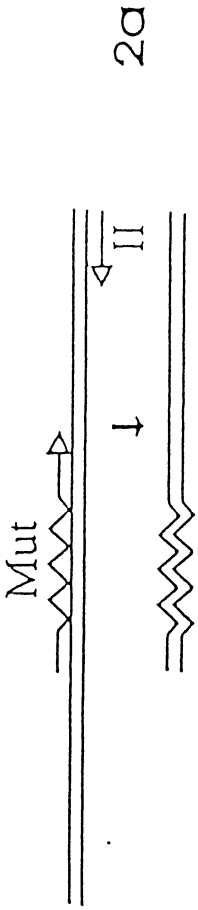
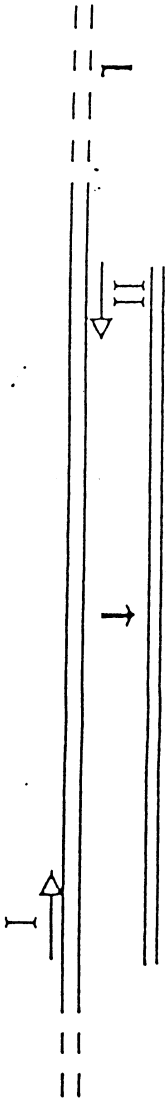


圖15



突變策略

圖16

公告本

修正
年 月 日
91. 9. 23 補充

A8
B8
C8
D8

六、申請專利範圍

附件(A) 第 87111808 號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國 91 年 9 月 23 日呈

1 . 一種經修飾人 T N F α 分子，其施加至人類宿主能夠誘生對抗野生型人 T N F α 之中和抗體，其中該人 T N F α 分子有至少一個肽片段被至少一個已知含有免疫顯性 T 細胞抗原決定位的肽取代，或被該人 T N F α 分子之截斷型取代，該截斷型含有免疫顯性抗原決定位與該人 T N F α 分子之一側或兩側外側區域，該區域包括至少一個 T N F α B 細胞抗原決定位，其中該取代作用在前 β - 褶板之任一股，任一連接環，及 / 或後 β - 褶板之 B'、I 或 D 股的胺基酸序列上造成實質改變，該經修飾人

T N F α 分子具有如下所示之胺基酸序列：

V a l - A r g - S e r - S e r - S e r - A r g -
T h r - P r o - S e r - 嵌入序列 1 - A r g -
A r g - A l a - A s n - A l a - L e u - L e u -
A l a - A s n - 嵌入序列 2 - G l n - V a l -
L e u - 嵌入序列 3 - V a l - A s n - L e u -
L e u - S e r - A l a - I l e - L y s - S e r -
P r o - C y s - G l n - A r g - G l u - T h r - 嵌
入序列 4 - G l y - A s p - A r g - 嵌入序列 5 -
G l y - I l e - I l e - A l a - L e u

其中

嵌入序列 1 是：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

(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

A s p - L y s - P r o - V a l - A l a - H i s
- V a l - V a l - A l a - A s n - P r o -
G l n - A l a - G l u - G l y - G l n - L e u
- G l n - T r p - L e u - A s n , 或
抗原決定位 A - G l n - L e u - G l n - T r p -
L e u - A s n , 或
抗原決定位 B ;

嵌入序列 2 是 :

G l y - V a l - G l u - L e u - A r g - A s p
- A s n - G l n - L e u - V a l - V a l -
P r o - S e r - G l u - G l y - L e u - T y r
- L e u - I l e - T y r - S e r , 或
抗原決定位 B ;

嵌入序列 3 是 :

P h e - L y s - G l y - G l n - G l y - C y s
- P r o - S e r - T h r - H i s - V a l -
L e u - L e u - T h r - H i s - T h r - I l e
- S e r - A r g - I l e - A l a - V a l -
S e r - T y r - G l n - T h r - L y s , 或
P h e - 抗原決定位 A - T h r - I l e - S e r
- A r g - I l e - A l a - V a l - S e r -
T y r - G l n - T h r - L y s , 或
P h e - L y s - G l y - G l n - G l y - C y s
- P r o - S e r - T h r - H i s - V a l -

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

L e u - 抗原決定位 A , 或

抗原決定位 B - V a l - S e r - T y r - G l n
- T h r - L y s ;

嵌入序列 4 是 :

P r o - G l u - G l y - A l a - G l u - A l a
- L y s - P r o - T r p - T y r - G l u -
P r o - I l e - T y r - L e u - G l y - G l y
- V a l - P h e - G l n - L e u - G l u -
L y s , 或

P r o - G l u - G l y - A l a - G l u - A l a
- L y s - P r o - 抗原決定位 A , 或
抗原決定位 B - G l u - L y s ;

嵌入序列 5 是 :

L e u - S e r - A l a - G l u - I l e - A s n
- A r g - P r o - A s p - T y r - L e u -
A s p - P h e - A l a - G l u - S e r - G l y
- G l n - V a l - T y r - P h e , 或

抗原決定位 A - S e r - G l y - G l n - V a l
- T y r - P h e , 或

抗原決定位 B ;

抗原決定位 A 是 :

G l n - T y r - I l e - L y s - A l a - A s n
- S e r - L y s - P h e - I l e - G l y -
I l e - T h r - G l u - L e u ;

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

抗原決定位 B 是：

P h e - A s n - A s n - P h e - T h r - V a l
- S e r - P h e - T r p - L e u - A r g -
V a l - P r o - L y s - V a l - S e r - A l a
- S e r - H i s - L e u - G l u ；

唯其嵌入序列 1 至 5 中之一個嵌入序列，且僅一個嵌入序列，是包含抗原決定位 A 或抗原決定位 B。

2．如申請專利範圍第 1 項之經修飾人 T N F α 分子，其中該經修飾人 T N F α 分子實質上無 T N F α 活性。

3．如申請專利範圍第 2 項之經修飾人 T N F α 分子，其中該經修飾人 T N F α 分子以 L 9 2 9 生物分析法測試時是實質上無 T N F α 活性，且其中由該經修飾之人 T N F α 於適合宿主所誘生的抗體會明顯抑制天然 T N F α 於 L 9 2 9 生物分析法測試時的活性，及／或其中該抗體會明顯抑制野生型人 T N F α 分子對 5 5 K D T N F α 受體 1 (T N F α - R 5 5) 或對 7 5 K D T N F α 受體 (T N F α - R 7 5) 之結合力。

4．如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用在可保留 B 股與 G 股之 β - 褶板結構的 T N F α 分子區域內完成。

5．如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用在涉及前 β - 褶板之任一股及／或連接環且基本上保留後 β - 褶板任一股之 β - 褶板結構的 T N F α 分子區域內完成。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

6 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用在涉及後 β - 褶板之 D 股片段的 T N F α 分子區域內完成。

7 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用包括前 β - 褶板 H 股之至少一片段與 I 股連接環之至少一片段。

8 . 如申請專利範圍第 7 項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用包括第 1 3 2 至 1 4 6 位胺基酸。

9 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用包括 H 股，I 股與整個連接環之片段。

1 0 . 如申請專利範圍第 9 項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用包括第 1 3 2 至 1 5 2 位胺基酸。

1 1 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用包括 D 股片段，E 股至少一片段與整個連接環。

1 2 . 如申請專利範圍第 1 1 項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用包括第 6 5 至 7 9 位或第 6 4 至 8 4 位胺基酸。

1 3 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用包括整個 C' 股與 C 股以及 D 股片段。

1 4 . 如申請專利範圍第 1 3 項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用包括第 4 0 至 6 0 位胺基酸。

六、申請專利範圍

1 5 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用包括 E 股之至少一片段與一個或兩個連接環之前 β - 褶板之至少一片段。

1 6 . 如申請專利範圍第 1 5 項之經修飾人 T N F α 分子，其中該取代作用包括第 7 6 至 9 0 位胺基酸。

1 7 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其具有 S E Q I D N O . 8 所示之胺基酸序列。

1 8 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其具有 S E Q I D N O . 1 0 所示之胺基酸序列。

1 9 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其具有 S E Q I D N O . 4 或 S E Q I D N O . 1 6 所示之胺基酸序列。

2 0 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其具有 S E Q I D N O . 2 0 所示之胺基酸序列。

2 1 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其具有 S E Q I D N O . 1 4 所示之胺基酸序列。

2 2 . 如申請專利範圍第 1 - 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其中被嵌入之 T 細胞抗原決定位是不加選擇的，且已知對人 H L A 第二類之多數型具有免疫生成性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

2 3 . 如申請專利範圍第 2 2 項之經修飾人 T N F α 分子，其中該抗原決定位係衍生自破傷風類毒素，較好是 P 2 及 / 或 P 3 0 抗原決定位。

2 4 . 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其係呈現與佐劑分子融合在一起之融合蛋白質型式，該佐劑分子較好是免疫活性之佐劑，例如 G M - C S F，H S P 7 0 或間白素。

2 5 . 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，其係用於製備治療或預防疾病之藥物，該疾病之病理生理學上至少部分是肇因 T N F α 的釋出或其活性。

2 6 . 一種經分離 D N A 分子，其編碼如申請專利範圍第 1 至 2 5 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子。

2 7 . 一種製造如申請專利範圍第 1 至 2 5 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子的方法，包括如下步驟：在能夠生產經修飾 T N F α 之適當條件下令宿主細胞生長，該宿主被一表現載體轉形，該表現載體含有連接在表現控制序列之申請專利範圍第 2 6 項的經分離 D N A 分子，以及回收所生產的經修飾 T N F α 。

2 8 . 一種對抗 T N F α 之疫苗，其包括免疫生成量之一種或多種如申請專利範圍第 1 至 2 5 項中任一項之經修飾人 T N F α 分子，以及視選擇之藥學上可接受之佐劑，該佐劑例如磷酸鋁、氫氧化鋁、磷酸鈣、muramyl 二肽或 iscom。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

29. 如申請專利範圍第28項之疫苗，其係用於預防或治療由TNF α 分子之釋出或活性所引發的疾病，該疾病係選自慢性炎症疾病、類風濕性關節炎、炎症性腸炎、空氏（Crohn's）症潰瘍性結腸炎，癌症、多發性硬化症、糖尿病、牛皮癬、骨質疏鬆症及氣喘。

30. 如申請專利範圍第28或29項之疫苗，其係用於誘生抗體。

31. 如申請專利範圍第30項之疫苗，其中該抗體係用來作為診斷試劑。

32. 一種活體外測試人體液中TNF α 分子存在情形之方法，包括如下步驟：令含有對抗如申請專利範圍第1-25項中任一項之經修飾人TNF α 分子所誘生之多株抗體的組成物與人體液樣品接觸，以及測定該抗體是否與該樣品中的TNF α 結合。

33. 一種活體外診斷TNF α 相關疾病的方法，其利用活體外免疫分析法測定人體液中的TNF α ，其改良處在於使用對抗如申請專利範圍第1至25項中任一項之經修飾人TNF α 分子所誘生的多株抗體。

34. 如申請專利範圍第32或33項之方法，包括利用三明治分析法、ELISA分析法或均等物分析法，其可利用抗生物素／生物素技術等技術擴大或不擴大分析結果。