

申請日期	85.5.31
案 號	85106494
類 別	C07K ^{14/79} ; C12N ^{15/12} ^{15/12} ^{15/88} ^{5/10}

A4
C4

公告本

517060

(以上各欄由本局填註) A61K^{38/17} ^{3/70} ^{4/8}

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	用於將選定物質運輸入細胞之雜混性蛋白質
	英 文	Chimeric Proteins For Use In Transport Of A Selected Substance Into Cells
二、發明 創作人	姓 名	1. 麥可 W. 賀特萊恩 2. 傑佛瑞 F. 里蒙 3. 麥可 F. 康西諾
	國 籍	美 國
	住、居所	1. 美國, 麻州 01719, 波克斯郡, 蘆葦農莊路 167 號 2. 美國, 麻州 02165, 西紐頓, 水路道路 166 號 3. 美國, 麻州 02159, 紐頓, 艾梭史坦路 76 號
三、申請人	姓 名 (名稱)	越核治療公司
	國 籍	美 國
	住、居所 (事務所)	美國, 麻州 02139, 劍橋, 烏木街 195 號
	代 表 人 姓 名	K. 麥可. 方尼斯特

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：

美 國 (地區) 申請專利，申請日期： 1995.06.06 案號： 08/470,058 ， ☐有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明 (1)

本發明之背景

細胞膜上分子的傳送是在分子層次及整體器官上維持平衡之生理機轉中很重要的一環。直接或間接被用於架構細胞組成的分子，通常藉著能運送這些分子之特定細胞，其表面上能與選定物質結合之特定受器，由細胞外的體液被運送至細胞內。許多能影響細胞活性之荷爾蒙，酵素，及藥物也會經過細胞表面特定之受器被運送至細胞內。再者，體內（如經由正常或代謝途徑異常所產生）或經攝食或經曝露於環境中所產生之有毒分子，能被某些種類的細胞吸收或代謝掉。通常在生理狀況下，將由體內所產生的或由細胞外液體而來之外來物質，如血液或淋巴細胞，加以移除，乃是屬於一種正常的程序。然而，在許多情況下，其被移除的程度均沒有想像中來的完全，疾病也因此而產生。一個有關於低密度脂蛋白（LDL）膽固醇的例子，如果要避免不正常的膽固醇量的增加以及不利的現象發生，則必須將其以一定的速率移除。在人體中膽固醇過高現象的特點是血清中整體膽固醇量的提高。通常是由過量之低密度脂蛋白（LDL）膽固醇或缺乏高密度脂蛋白（HDL）膽固醇所引起，通常會導致動脈粥狀硬化及冠狀動脈疾病。低密度脂蛋白不斷的在血液中由肝臟所製造之去脂脂蛋白（apolipoprotein）來形成。為保持一穩定的量，低密

五、發明說明 (2)

度脂蛋白不斷的由血液中以幾乎相當於其合成速率的速率被移除。如果移除低密度脂蛋白的機轉出了問題，血液中低密度脂蛋白的量便會增加，因此也增加了動脈粥狀硬化的罹患機率。目前動脈粥狀硬化為美國主要致死疾病中的一種，幾乎佔死亡人數中的一半 (Harrison's Principles of Internal Medicine, Ed. J. D. Wilson et al., 12th ed., p.995, McGraw-Hill, New York, 1991)。

低密度脂蛋白分子幾乎攜帶了血漿中 60 至 70% 的膽固醇。低密度脂蛋白為一大型球狀顆粒，具有由約 1500 個膽固醇分子所組成之油狀核心，每一個膽固醇分子均藉著酯鍵與一長鏈脂肪酸連結。環繞著油狀核心的是一層由磷脂及未酯化的膽固醇所組成的雙分子層，其安排的方式乃是使磷脂中親油性的基團均朝外排列，因此使得低密度脂蛋白能溶於血液或細胞間質液中。每一低密度脂蛋白含有一分子之去脂脂蛋白 B-100 (ApoB-100)，其為包埋於低密度脂蛋白親油性外衣中的一大型蛋白質分子。去脂脂蛋白 B-100 能被細胞表面之低密度脂蛋白受體認得並與之結合。與低密度脂蛋白受體結合之低密度脂蛋白會被帶入細胞中，而後兩者會分開。低密度脂蛋白受體會重新循環再被送回細胞膜表面，而低密度脂蛋白則被運送至溶酶體中。在溶

五、發明說明(3)

酶體中，經處理過的低密度脂蛋白會釋放出未經酯化的膽固醇分子來。被釋出之膽固醇分子可再併入所有新合成之細胞膜上，以及在某些特定細胞中，被用於其它之目的（例如，類固醇荷爾蒙之合成，膽汁的製造）。

血清中低密度脂蛋白之平衡濃度有很大一部分取決於肝臟低密度脂蛋白受體（LDLRs）的數目，其在循環低密度脂蛋白的移除中扮演了舉足輕重的角色。（Brown, M.S, and Goldstein, J.L., Science, 232: 34-47 (1986)）罹患高膽硬脂血症（FH）之個體可以雜合或同合的方式進行基因突變以得到異常的肝臟低密度脂蛋白受體，因此這些個體血清中會出現過量的低密度脂蛋白。其它具有高量血清低密度脂蛋白濃度之個體也可能有不完整或未曾被報導過的肝臟低密度脂蛋白受體的突變或由於攝入過量膳食中的脂肪所造成的低密度脂蛋白過量。高膽硬脂血症與非高膽硬脂血症患者此也可因以提高低密度脂蛋白代謝進而增加細胞吸收力為基礎的治療而受益。

因此，有必要發展能提高將選定物質運送入細胞的方法。這些物質可以是如上所述原來即已注定要被代謝的物質，或是經設計為能影響胞內反應而被視為調控藥劑的物質。因此，細胞的活性可因導入能調控特定細胞

五、發明說明(4)

反應之新調控物質而改變。例如，胞內蛋白質磷酸化反應之模式，某些特定基因的表現，以及細胞生長的性質，均可因適當調控物質的導入而有所改變。這些調控物質可以是具有酵素活性之蛋白質或能與胞內特定目標結合的蛋白質，此類特定目標包括核酸，蛋白質，碳水化合物，油脂，或醣蛋白。

本發明之摘要

細胞表面受體提供了一個將選定物質導入細胞的途徑。這些受體之天然配體可以是雜混性蛋白質的一部分，其中配體區域在功能上與蛋白質能在細胞內產生所要效果且具有藥學活性的區域互相銜接。或者，蛋白質區域也可與一須被由細胞外體液中移除以進行代謝或其它代謝反應之特定物質互相結合。

本發明係關於一可將胞外，如血液或淋巴細胞，一特定選定物質運送至胞內之雜混性蛋白質；以下列方式進行選定物質之定量分析：以雜混性蛋白質，帶有雜混性蛋白質基因之 DNA；含有帶有雜混性蛋白質基因之 DNA 的質粒；哺乳類動物細胞；經改良含有帶有雜混性蛋白質基因之 DNA 的質粒，能表現或分泌此雜混性蛋白；製造雜混性蛋白質之方法；分離雜混性蛋白質之方

五、發明說明(5)

法；以雜混性蛋白質來分析所選定物質的方法；藉使用雜混性蛋白質來降低細胞外選定物質之濃度，使選定物質能被送入細胞內。本發明亦係關於一基因治療得方法，能表現並分泌埋殖於個體中之雜混性蛋白質的方法，其中雜混性蛋白質能被表現並分泌且與選定物質結合之方法。所得選定物 - 雜混性蛋白質複合物會被吸入體細胞中，使選定物質在胞外的濃度因而降低。

選定物質可為血液中正常組成之一（體內自然產生的），如營養素，代謝物，自然存在的荷爾蒙或脂蛋白，或外來物質，如病原菌，毒素，環境污染物或藥物或藥學藥劑。無論是何種情況，選定物質藉著會與其和體細胞，特別是人類體細胞，胞膜上一或多種受體結合之雜混蛋白，被由細胞外的體液中移除，如血液或淋巴液。所得選定物 - 雜混性蛋白質複合物會與細胞表面之受體結合而被運送至胞內，再被吸收或代謝掉，使選定務在胞外的濃度得以降低。

本發明之雜混蛋白包含至少兩種組成：一個有功能的區域與一個能攜帶物質的區域。功能區含有能和須傳送至胞內之選定物質結合的氨基酸順序（多肽）或含能影響標的細胞之氨基酸順序。能攜帶物質的區域含能與體細胞外一或多種表面受體結合之氨基酸順序。功能區

五、發明說明(6)

之氨基酸順序可與選定物質配體結合區相同；攜帶區域之氨基酸順序可與細胞表面之受體結合因此可作為細胞表面受體的配體。功能區與攜帶區均可藉轉錄後修飾來加以改良，例如，在某些特定位置進行醣化反應。當選定物為血液，淋巴液，或體液中正常存在的物質時，能與選定物結合之配體區域的氨基酸順序為正常狀況下能與選定物結合之順序（亦即，與人體之選定物結合），此種氨基酸順序的修飾型式如結合性質改變，或正常狀況下不會在人體發現之型式可以藉合成或基因工程方法來製造。例如，功能和 / 或攜帶區域形成一個組合的肽的資料庫或噬菌體展示資料庫。功能和 / 或攜帶區域也可含有一免疫球蛋白或單鏈抗體之抗原結合區域，其中免疫球蛋白或單鏈抗體之抗原結合區域會認得所要之選定物質或細胞表面之受體。當選定物為外來物質時，能與選定物結合之氨基酸順序乃選自能與外來物質結合之天然存在配體結合區域的氨基酸順序或設計成能與與外來物質結合之氨基酸順序。能與細胞表面受體結合之氨基酸順序也會和能與選定物結合之受體除外的其它受體結合。因此，此法使得選定物能以正常組織吸收管道以外的方式進入細胞內。

雜混蛋白之不同區域可以許多種不同構形互相連接，只要所得之雜混蛋白能與選定物質及細胞表面之受體

五、發明說明 (7)

結合即可。通常，這兩個區域乃由一重組 DNA 分子中單一讀碼之基因而來，且中間以一肽鍵互相銜接。兩區域可以同樣由此讀碼解讀而來之一或多個氨基酸加以分開。或者，兩區域也可由不同的 DNA 分子表現而得並在體內或體外藉由非共價（如氫鍵或離子鍵）或共價（如雙硫鍵）鍵互相銜接。

一旦選定物與雜混蛋白之配體區域結合之後，所得之複合物被稱為選定物 - 雜混性蛋白質複合物。存在於選定物 - 雜混性蛋白質複合物上之細胞表面受體配體與其細胞表面受體結合之後，整個複合物被運送至細胞內（如，胞飲作用），因此使得循環系統中選定物質之濃度降低。

在一具體化實例中，本發明係關於一種可將低密度脂蛋白運送至細胞內的雜混蛋白；含有此雜混蛋白之藥學組成；以雜混蛋白分析低密度脂蛋白的方法；含有此雜混蛋白基因之 DNA；含有帶有雜混性蛋白質基因 DNA 的質粒；哺乳類動物細胞；經改良含有帶有雜混性蛋白質基因之 DNA 的質粒，能表現或分泌此雜混性蛋白（經基因改良的細胞）；製造雜混性蛋白質之方法；分離雜混性蛋白質之方法；以雜混性蛋白質來分析低密度脂蛋白的方法以及藉使用雜混性蛋白質來降低細胞外

五、發明說明(8)

低密度脂蛋白之濃度，使低密度脂蛋白能被送入細胞內。

在一降低細胞外低密度脂蛋白濃度之具體化實例中，一種能與低密度脂蛋白及除了低密度脂蛋白受體外之細胞膜表面受體結合的雜混性蛋白，被用於希望能降低血漿中膽固醇含量之人類患者身上。在另一降低細胞外低密度脂蛋白濃度之具體化實例中，將經修飾過帶有能表現出雜混性蛋白基因之細胞，殖入一個體身上。在此個體身上，經基因修飾過的細胞能表現並分泌此一雜混性蛋白，其會與血液中之低密度脂蛋白結合以形成低密度脂蛋白 - 雜混性蛋白的複合物，而被運送至未經基因修飾之細胞中，因此能降低血漿中低密度脂蛋白之濃度。

本發明之雜混性蛋白對低密度脂蛋白之傳送及其在樣品中的分析非常有用，包含至少下列兩種組成：含有低密度脂蛋白受體之配體結合區域之氨基酸順序的功能區域，及可攜帶區域，其中之氨基酸順序能與體細胞上一或多種除了低密度脂蛋白受體外的細胞受體結合，特別是人類體細胞。在一可增加細胞吸收低密度脂蛋白之雜混性蛋白之具體化實例中，將包含了低密度脂蛋白受體中配體結合區域（亦即低密度脂蛋白之結合區域） N

五、發明說明(9)

端氨基酸順序與包含了細胞表面受體配體之 C 端氨基酸順序連接在一起。亦即將低密度脂蛋白結合區域之 C 端與細胞表面受體配體之 N 端互相連接

在一雜混蛋白之具體化實例中，其中之兩種組成為人類低密度脂蛋白受體及人類輸鐵蛋白之配體結合區域；低密度脂蛋白受體之低密度脂蛋白結合區域與成熟之人類輸鐵蛋白多肽的 N 端互相銜接。此雜混蛋白可以和低密度脂蛋白及輸鐵蛋白受體結合。一旦與細胞表面之輸鐵蛋白受體結合後，如肝臟細胞，此雜混蛋白及雜混蛋白上低密度脂蛋白受體所結合之低密度脂蛋白會由輸鐵蛋白受體所媒介之胞飲作用被送入細胞內，由於低密度脂蛋白的進入細胞受體導致細胞外低密度脂蛋白的濃度減弱。輸鐵蛋白受體廣泛存在於各種不同型式之哺乳類動物細胞上，使此雜混蛋白能促進許多種哺乳類細胞中低密度脂蛋白的吸收。

在第二個具體化實例中，包含了功能區域為低密度脂蛋白受體配體結合區域之雜混性蛋白，以及可攜帶區域氨基酸順序為能與細胞表面輸鐵蛋白受體以外之受體結合之氨基酸順序，如血清白蛋白受體，無涎醣蛋白受體，腺病毒受體，還原病毒受體，CD4，脂蛋白 (α)，免疫球蛋白 Fc 受體，乙醯化之低密度脂蛋白受體

五、發明說明(10)

，甘露糖受體，或 6-磷酸甘露糖受體。一般而言，能與任一受體結合並與結合之配體一同被轉送至細胞內之氨基酸順序均可使用。與低密度脂蛋白及細胞表面受體結合之雜混蛋白，可用來提高許多種細胞中低密度脂蛋白的吸取速率。一旦與受體結合，此雜混蛋白 - 低密度脂蛋白複合物便會經胞飲作用被送至細胞內，使得低密度脂蛋白進入細胞因而降低了細胞外低密度脂蛋白之濃度。

本發明之雜混性蛋白乃是由含有此雜混蛋白基因之適當的哺乳動物細胞所合成的。本發明中經修飾改良過之哺乳動物細胞（亦即，改良使其含有能合成本發明中雜混性蛋白的核酸順序）包括在安定的細胞中或以下列物質快速轉殖或感染的細胞，如一質體，核酸片段，或其它載體，包括病毒載體，含此雜混蛋白之 DNA 或 RNA 或由能修飾含此雜混蛋白 DNA 或 RNA（亦即，質體，核酸片段，或其它含 DNA 或 RNA 之載體）之哺乳類細胞衍生而來。

製造本發明中雜混蛋白之方法的具體化實例之一，所用之哺乳動物細胞為一細胞株，如中國大頰鼠卵巢細胞株（CHO），其含有並能表現此雜混蛋白之 DNA。或者，將此雜混蛋白分泌至培養轉殖細胞的培養基中。

五、發明說明(11)

在製造本發明中雜混蛋白之方法的第二個具體化實例中，經修飾過的哺乳類動物細胞為一級或二級細胞，如一級或二級之人類纖維母細胞，經轉殖或感染了此雜混蛋白之基因。經修飾過的哺乳類動物細胞（經轉殖或感染的一級或二級之人類纖維母細胞）能表現所要的雜混蛋白，且選擇性的將其分泌至培養基中。或者，可將經轉殖或感染的一級或二級細胞用於個體身上，例如，人類，所分泌之雜混蛋白具有藥學上的目的。

由經修飾過的細胞中所製造之雜混蛋白，可由細胞水解液或培養基中以適當之方法加以分離。此種方法之一，如以下所述，乃藉由親和性的管柱色層層析法而得，此雜混蛋白首先與具有針對細胞表面受體配體而合成的抗體管柱結合，沖洗後，再與帶有特選物質之管柱結合，此特選物質具有能與雜混蛋白中之配體結合區域相結合的性質。例如，與低密度脂蛋白及細胞表面之輸鐵蛋白受體相結合之雜混性蛋白可首先藉著與抗 - 低密度脂蛋白抗體管柱結合而加以分離，之後再與固定在抗低密度脂蛋白抗體之管柱結合。使用此分離方法的結果是能得到完整純化的雜混性蛋白。或者，在帶有特選物質之管柱結合，此選定物質具有能與雜混蛋白中之配體結合區域相結合的性質，之後在第二步驟中，與帶有抗細胞表面受體之抗體的管柱結合。如所述，包含來自低

五、發明說明(12)

密度脂蛋白受體之不同區域與輸鐵蛋白的雜混蛋白可被純化出來。

本發明之雜混性蛋白可用來將選定物質，低密度脂蛋白，傳送至細胞內，例如，肝細胞，使得細胞外低密度脂蛋白的濃度得以降低。此可應用在臨床或藥學上，如控制或降低血清中低密度脂蛋白的濃度，如患有高膽硬脂血症的個體上。在本發明中，以雜混性蛋白將低密度脂蛋白傳送至細胞內的方法之一具體化實例中，能表現出此雜混性蛋白之細胞被殖入一欲降低血清中低密度脂蛋白濃度的個體中。在此個體中，細胞所製造之雜混性蛋白能進入細胞間質液中。而後由細胞間質液再進入淋巴液，最後進入血液中，與低密度脂蛋白結合形成雜混性蛋白與低密度脂蛋白之複合物。此複白受體的細胞（如肝細胞），由於輸鐵蛋白區域，-輸鐵蛋白受體之間作用力的關係使其能與細胞結合。雜混性蛋白與低密度脂蛋白之複合物可經由正常狀況下用來將輸鐵蛋白運至胞內，由輸鐵蛋白受體所媒介的胞飲作用，而被帶入細胞內。在本方法之另一具體化實例中，純化或部分純化之雜混性蛋白被用於須要增加細胞內低密度脂蛋白運輸之個體上（特別是針對人類而言）。

雜混性蛋白也可用在許多其它非臨床或藥學之應用

五、發明說明 (13)

上，例如降低循環系統中由正常或不正常管道所產生的代謝物或養分（亦即經乙醯化的低密度脂蛋白，去脂蛋白 E4，腫瘤壞死因子 α ，轉化生長因子 β ，細胞素，免疫球蛋白，荷爾蒙，葡萄糖，膽汁鹽，糖脂【如聚集在高歇氏病患者體內之腦苷糖脂類或聚集在法柏氏病患者體內之神經醯胺己糖脂類】，或是葡萄糖胺糖苷【如聚集在亨特氏，胡耳勒氏或史萊症候群之病患者體內之物質】或一外來物（如病原菌，環境污染物，或酒精）。

本發明之雜混性蛋白也可用來分析，特別是定量分析，與配體結合區域結合之選定物質。例如，可用來決定血液中低密度脂蛋白，免疫球蛋白，生長激素，及去脂蛋白 E 的含量。例如，此雜混性蛋白可當作已知測試方法中的一種組成，如與酵素接合的分析，以分析選定物質。

附圖之簡要說明

圖 1 為低密度脂蛋白經由正常低密度脂蛋白受體媒介（低密度脂蛋白受體途徑）與經由輸鐵蛋白媒介（輸鐵蛋白途徑）而進入細胞的概要圖。圖 2 為經由質體 pEFBOS/LDLrTF1.S 所表現出之低密度脂蛋白受體 /

五、發明說明(14)

輸鐵蛋白的概要圖。質體上的特定區域以陰影或線標出。以已知之 E. Coli 片段處理 XbaI-pEF-BOS 所得的結果和以限制酶之核酸內切酶作用所切除的位置相同。DNA 聚合酶和連接到有融合基因之 EcoNI-SmI 片段其 EcoNI 位置亦有類似的鈍端，標示於括號內。

圖 3A 至 3E 為 pEFBOS/LDLrTF1.S 中此雜混性蛋白 cDNA 的核苷酸順序（順序號碼：1）與相對之氨基酸順序，其中起始之蛋氨酸為融合蛋白氨基酸順序中的第一個氨基酸。．．．．．結束（停止）代碼；劃底線之代碼表示其是此雜混性蛋白中人類輸鐵蛋白的部分，未劃底線之代碼表示其是此雜混性蛋白中低密度脂蛋白受體的部分，核苷酸順序 1 至 13：為 5' 端非低密度脂蛋白受體的順序；核苷酸順序 3236 至 3428：為 3' 端非輸鐵蛋白的順序。

圖 4 為經由質體 pEFBOS/LDLrTF-710 所表現出之低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白的概要圖，質體上的特定區域以陰影或線標出。

圖 5A 至 5F 為 pEFBOS/LDLrTF1-710 中此雜混性蛋白 cDNA 的核苷酸順序（順序號碼：3）與相對之氨基酸順序（順序號碼：4），其中起始之蛋氨酸為

五、發明說明 (15)

融合蛋白氨基酸順序中的第一個氨基酸。 結束 (停止) 代碼；劃底線之代碼表示其是此雜混性蛋白中人類輸鐵蛋白的部分，未劃底線之代碼表示其是此雜混性蛋白中低密度脂蛋白受體的部分，核苷酸順序 1 至 13 : 為 5' 端非低密度脂蛋白受體的順序；核苷酸順序 4244 至 4603 : 為 3' 端非輸鐵蛋白的順序。

圖 6 顯示以非還原性 SDS-PAGE 及西方點墨法分析中國大頰鼠卵巢細胞所製造之低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白，其在免疫親和純化過程中各個時期的結果。

圖 7 為在各種低密度脂蛋白濃度下，人類低密度脂蛋白與低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白之間特異性結合的概要圖。

圖 8 顯示以顯微培養皿結合分析來分析雜混性蛋白與低密度脂蛋白之間的結合，其結果之圖示。

圖 9 顯示低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白之西方點墨分析結果。

本發明之詳細說明

五、發明說明(16)

本發明範例提供了將選定物質帶入細胞作體內治療的方法。同時，本發明教導吾人使用基因治療的方式來製造具藥學活性的蛋白質以將選定物質運送入細胞中。

如所述，申請者發明了一個全新的方法，藉著雜混性蛋白質的使用及一種機轉將正常情況下無法進入細胞之選定物質運送至細胞內。此雜混性蛋白會與選定物質結合亦會與體細胞上之受體結合，特別是人類之體細胞。雜混性蛋白與特選物質之結合導致雜混性蛋白 - 選定物質複合物的形成，此會再與細胞表面上的受體結合而被運送至含有此受體的細胞內。選定物質可以是天然存在（身體自然製造的）於細胞外體液之組成，如血液或淋巴液，或是外來成分如藥物或毒素。本發明之雜混性蛋白可自我運送或施用於個體上或以基因治療的方式施用於個體上，亦即將會表現並分泌此雜混性蛋白之細胞導入個體體中，以製造分泌此雜混性蛋白。此雜混性蛋白會選擇性的與個體體液中之選定物質結合，因此造成一選定物質 - 雜混性蛋白之複合物。此複合物之配體結合區域與個體體細胞上之受體結合。此複合物再被送入其所結合之細胞內，使選定物質在胞外的濃度因而降低。

五、發明說明(17)

能降低血清中低密度脂蛋白濃度之雜混性蛋白

在一具體化實例中，申請者發明了一個正常狀況下不存在於人體中，能運送低密度脂蛋白的新方法，此法能繞過有缺陷的低密度脂蛋白受體或並補充高膽硬脂血症患者體內不足之低密度脂蛋白受體，加強或提高細胞吸收低密度脂蛋白的能力（那些具有正常數目且有功效之低密度脂蛋白受體與那些具有異常數目的低密度脂蛋白受體）。申請者已定出位於人類細胞表面之受體可作為低密度脂蛋白運送至細胞內的一種方法，如肝臟細胞。細胞表面之受體，如輸鐵蛋白受體，血清球蛋白受體，無涎醣蛋白，腺病毒受體，還原病毒受體，CD4，脂蛋白（ α ）受體，免疫蛋白Fc受體， α -體，乙醯化之低密度脂蛋白受體，甘露糖受體，或6-磷酸鹽甘露糖受體，均可作為低密度脂蛋白運送至細胞內的方法。這些受體分別存在許多不同種類之細胞上因此可使低密度脂蛋白被運送至許多不同種類之細胞中。

申請者製造了可將低密度脂蛋白運送至細胞內的雜混性蛋白。這些雜混性蛋白為本發明之主題，同樣的此雜混性蛋白之核苷酸順序；能在細胞內表現，含有此雜混性蛋白DNA（或RNA）之哺乳類動物細胞；分離此雜混性蛋白之方法，及可將此雜混性蛋白用於低密度脂

五、發明說明(18)

蛋白定量分析的方法，以及降低細胞外低密度脂蛋白濃度之方法，包括一種降低個體血清內低密度脂蛋白濃度的藥學方法，也都是本發明之主題。在藥學方法中，能與低密度脂蛋白及除了人類低密度脂蛋白受體外之人類細胞表面受體結合之雜混性蛋白的使用，可藉使用此雜混性蛋白本身或使用（如殖入）會表現那一種方式，此雜混性蛋白均可與低密度脂蛋白及人類低密度脂蛋白受體結合且此複合物會被運送至與其結合的細胞內，以降低胞外低密度脂蛋白的濃度。

在一具體化實例中，此雜混性蛋白包含了第一區域，亦即低密度脂蛋白受體上的配體結合區域，與第二區域，亦即輸鐵蛋白（TF）。人類輸鐵蛋白受體對其配體有很高的親和力；其解離平衡常數（Kd）為 2 至 7 nM（Trowbridge, I.S. et al., Biochem. Pharmacol. 33: 925-993 (1984)）。即使在濃度非常低的情形下，輸鐵蛋白仍可與其受體結合。同樣的，低密度脂蛋白受體對其配體亦有很高的親和力（對肝臟受體而言其 Kd= 7.2 nM（Krampler, F. et al., J. Clin. Invest., 80:401-408 (1987) 對纖維母細胞受體而言其 Kd= 2.8 nM（Innerarity, T.L. et al., Meth. Enzymol., 129:542-565 (1986)）。因此，在此具體化實例中之雜混性蛋白，對其兩個必須靠的很近

五、發明說明(19)

才能藉由輸鐵蛋白受體所媒介的胞飲作用來傳送低密度脂蛋白進入細胞的組成，具有很高的親和力（人類低密度脂蛋白受體和人類輸鐵蛋白受體）。圖 1 顯示低密度脂蛋白受體 - 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質，如何藉由輸鐵蛋白受體來促進低密度脂蛋白的吸收。經由任一途徑所吸取之低密度脂蛋白被代謝後會釋出膽固醇和自由氨基酸。在低密度脂蛋白受體的途徑中，低密度脂蛋白受體在釋出膽固醇後被送回細胞膜表面。而在輸鐵蛋白受體途徑中，低密度脂蛋白被釋出後，而輸鐵蛋白受體和低密度脂蛋白受體 - 輸鐵蛋白所形成之雜混性蛋白則經循環回到細胞膜表面。

雜混性蛋白中可存在有整個人類輸鐵蛋白質；或者，雜混性蛋白中可包含存在於人類細胞上能與鐵結合之輸鐵蛋白中的一部分。在中性 pH 下，每一個輸鐵蛋白受體和兩個含兩個鐵的（亦即，飽和鐵）輸鐵蛋白分子結合。結合位置為每一輸鐵蛋白受體 N 端的區域。含單一個鐵之輸鐵蛋白較不易與輸鐵蛋白受體結合，而去鐵之輸鐵蛋白受體（亦即，未與鐵結合之輸鐵蛋白受體）則無法與輸鐵蛋白受體結合。相反的，當鐵被釋放於融鹼體之酸性環境下時，去鐵之輸鐵蛋白受體仍保持與輸鐵蛋白受體結合的狀態以利其再被循環送到細胞膜表面。如本文中所使用的，“人類輸鐵蛋白或存在於人類

五、發明說明(20)

細胞上能與鐵結合之輸鐵蛋白中的一部分。

在一具體化實例中，人類低密度脂蛋白受體上的配體結合區域與人類輸鐵蛋白於成熟的輸鐵蛋白分子之 N 端上結合。配體結合區域可包含存在於天然受體中低密度脂蛋白受體的其它區域。

雜混性蛋白之製造

本發明之雜混性蛋白，如用來傳送低密度脂蛋白進入細胞之雜混性蛋白，可使用能表現含有整個雜混性蛋白之單一核酸順序或超過一個核酸順序之宿主細胞，每一個核酸順序代表此雜混性蛋白中的一個區域，且其中之一個氨基酸或數個氨基酸可用來連接不同之區域。也可以化學合成的方式來生產此雜混性蛋白。

A. 宿主細胞

可用於製造此雜混性蛋白質之宿主細胞為細菌，酵母，昆蟲，非屬於哺乳類之脊椎動物，或哺乳類動物；哺乳類動物包括，但不受其限制，田鼠，猴，猩猩，狗，貓，牛，豬，小鼠，老鼠，兔子，羊和人類細胞。這些細胞可以是能持續生長分裂之細胞（如細胞株）或無

五、發明說明 (71)

法再分裂之細胞（一級或二級）且可以是許多種不同型式細胞中的任何一種，例如，但不受其限制，纖維母細胞，角質細胞，上皮細胞（亦即，乳房上皮細胞，腸上皮細胞），卵巢細胞（亦即，中國大頰鼠之卵巢細胞或稱 CHO 細胞），內皮細胞，神經膠質細胞，神經細胞，血液之形成要素（亦即，淋巴細胞，骨髓這些體細胞之前驅細胞。

帶有或含有能表現此雜混性蛋白質 DNA 或 RNA 之細胞在此通稱為經基因修飾之細胞。帶有或含有能表現此雜混性蛋白質 DNA 或 RNA 之哺乳類動物細胞在此通稱為經基因修飾之哺乳類動物細胞。以已知之感染方法例如電穿透作用，顯微注射，顯微性注射撞擊，磷酸鈣沉澱法，改良之磷酸鈣沉澱法，陽離子性油脂處理法，光子穿透作用，融合法，媒介轉移之受體，或寶利畢沉澱法（polybrene precipitation），將 DNA 或 RNA 帶至細胞內。或者，亦可以病毒載體將 DNA 或 RNA 帶至細胞內。細胞之製造方法，包括帶有或含有能表現此雜混性蛋白質 DNA 或 RNA 之哺乳類動物 U.S.S.N 08/334,797，標題“用於基因治療之體內蛋白質製造及傳送系統”，由 Richard F. Selden, Douglas A. Treco and Michael W. heartlein (filed November 4, 1994) 所提出；專利申請案 U.S.S.N 08/334,455

五、發明說明 (72)

，標題“用於基因治療之體內紅血球生成素及胰島素生成素之製造及傳送系統”，由 Richard F. Selden, Douglas A. Treco and Michael W. heartlein (filed November 4, 1994) 所提出以及專利申請案 U.S.S.N 08/231,439，標題“將 DNA 帶進一級或二級標的細胞之 DNA 內及它們作為基因治療之應用”，由 Douglas A. Treco, Michael W. heartlein and Ri Selden (filed April 20, 1994) 所提出。這些專利之應用在此以參考文獻的方式列出。

以藉著雜混性蛋白質的使用及一種機轉將正常情況下無法進入細胞之選定物質運送至細胞內。帶有或含有能表現此雜混性蛋白質 DNA 或 RNA 之細胞在此通稱為經基因修飾之細胞。

B. 核苷酸結構

用來表現此雜混性蛋白質之核苷酸結構可以在受感染之哺乳類動物細胞之染色體外表現或被隨機性的或於固定位置被併入接受細胞基因之染色體內而表現。一個可在染色體外表現之核苷酸結構包含，除了帶有此雜混性蛋白質之順序，以及足夠在細胞中表現此蛋白質之順序外，尚須有可以複製此核苷酸結構之順序。一般而言

五、發明說明 (73)

， 它含有一啟動子，帶有此雜混性蛋白質之 DNA 及一能進行多聚腺苷酸化的位置。帶有此雜混性蛋白質之 DNA 在核苷酸結構中的位置必須受啟動子之控制。或者，此核苷酸結構亦可含許多如下列之額外的組成：一個進行剪接的位置，一段增強子選標示基因，以及一受制於適當啟動子之放大標示基因。

在那些被併入細胞基因庫中之 DNA 結構的具體化實例中，它僅須含有帶有此雜混性蛋白質之核苷酸順序。或者，亦可包含一啟動子及一增強子順序，能進行多聚腺苷酸化的位置，一個進行剪接的位置，一帶有特選標示基因之核苷酸順序，一帶有特選放大標示基因和或與接受細胞基因庫中 DNA 類似之 DNA，以將 DNA 併入基因庫中之標的位置（標示 DNA 或 DNA 順序）。

C. 培養細胞之方法

含有此雜混性蛋白質 DNA 或 RNA 之哺乳類動物細胞培養於能表現其 DNA 或 RNA 之適當的生長環境下。以已知的方法和在此所描述之方法來鑑別那些能表現此雜混性蛋白質之細胞，並以已知的方法和在此所描述之方法，在有或無放大製造此雜混性蛋白質之情況下，將這些雜混性蛋白質加以分離。鑑別可藉，例如，篩選那

五、發明說明(24)

些能展現帶有此雜混性蛋白質 DNA 或 RNA 之表現型之哺乳類動物細胞來達成，例如以 PCR 進行篩選，南方點墨分析法篩選，或是否表現此一雜混性蛋白質作為篩選的條件。選擇具有將此雜混性蛋白質 DNA 併入之細胞，可藉在 DNA 結構中併入標示基因，並的感染細胞而得。可藉在適當的情況下培養經基因修飾之哺乳類細胞，來進一步放大此引入之 DNA 結構（亦即，在一適當之藥物濃度下，培養含有此特選標示基因之經基因修飾之哺乳類細胞，使那些含有數分此特選標示基因拷貝之細胞得以生存）。

可藉，如本文中所述之，表現產物的偵測，來鑑別能表現此雜混性蛋白質且經基因修飾之哺乳類細胞。例如，能表現此雜混性蛋白質之哺乳類動物細胞，其第二個區域是輸鐵蛋白可以三明治式之酵素免疫分析加以分析，在此法中雜混性蛋白質在微滴定盤中與針對低密度脂蛋白結合區域之單株抗體結合而被補獲，此結合之雜混性蛋白質再與一針對人類輸鐵蛋白結合區域之單株抗體結合而測得。在大部分經基因修飾之哺乳類動物細胞中，此雜混性蛋白質之例行性分析可以能偵測人類輸鐵蛋白（範例 6）之 ELISA 試驗進行，此乃由於每一個表現出的雜混性蛋白質均有可被偵測得到物細胞。再者，也可以此領域中所熟知的方法加以偵測（Sambrook,

五、發明說明 (75)

J. et al., Molecular Cloning; a laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. A. et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York, 1994) 。

D. 雜混性蛋白質之純化

由經基因修飾之哺乳類細胞所製造出之雜混性蛋白質，可以此領域中所熟知的方法或如本文中所述之方法加以分離或純化。如範例 7 中所述，藉一直接與此雜混性蛋白質之兩個區域結合的方法，將此雜混性蛋白質由會表現此蛋白質之細胞中分離出來。此法包含兩個步驟：首先牽涉到與輸鐵蛋白受體上輸鐵蛋白結合位置之免疫親和力，另一則牽涉到與配體結合區域與低密度脂蛋白受體之親和性。欲純化低密度脂蛋白受體配體結合區域輸鐵蛋白之雜混性蛋白質，進行下列步驟：將能表現出此雜混性蛋白質之培養液與細胞分離，一般而言，以切線式流速超過濾法 (tangential-flow) 性蛋白之培養基，與固定於管柱上之抗人類輸鐵蛋白單株抗體 (anti-TG Mab) 接觸，則所有培養基中含有輸鐵蛋白區域之蛋白質均會與此抗體結合。再將結合之蛋白質由免疫親和管柱中洗出，所得具免疫親和性純化之雜混性蛋

五、發明說明(26)

白質再接著進行配體親和性的純化步驟，在適於低密度脂蛋白與低密度脂蛋白受體結合的情況下，與固定於管柱基質上之抗低密度脂蛋白抗體相接觸。因此，含輸鐵蛋白與一完整的低密度脂蛋白受體之配體結合區域的雜混性蛋白質會與低密度脂蛋白結合，將此雜混性蛋白質由管柱中洗出可得一高度純化之雜混性蛋白質的製備。如範例 7 中所顯示，此法可將度脂蛋白配體結合區域以外之配體結合區域而第二區域為除輸鐵蛋白以外之細胞表面受體之雜混性蛋白質。

在本發明純化內含完整低密度脂蛋白受體結合區域和輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的具體化實例中，以下列步驟進行純化：將能表現出此雜混性蛋白質之培養液與細胞分離，一般而言，以切線式流速超過濾法在能讓分子大小為 100,000 Da 之膜上進行濃縮。在其中的一個實驗中，培養基約濃縮了 32 倍。

固定於固態支持物上，例如聚苯乙烯珠子（亦即，以溴化氫活化之 Sephrose 4B），之抗人類輸鐵蛋白單株抗體（亦即，HTF-14, Biodesign, Kennebunk, ME，乃如範例 7 中所述，分離自腹水液中），以形成一具免疫親和性的管柱。經濃縮之細胞培養基與此結合了抗人類輸鐵蛋白單株抗體之固態支持物相接觸，藉著

五、發明說明(7)

將培養基加到 HTF-14 之免疫親和性管柱中，並在適宜的情況下與抗人類輸鐵蛋白單株抗體接觸一段足夠長的時間，使培養基中之雜混性蛋白質之輸鐵蛋白區域能與抗人類輸鐵蛋白單株抗體結合（亦即，使雜混性蛋白藉著雜混性蛋白中之輸鐵蛋白區域與 HTF-14 酸，pH 2.3）將與固態支持物結合之雜混性蛋白質由管柱中洗出並收集。

範例 7 中所述之一具體化實例中，以 0.1M Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 7.4 (TBS) 清洗含有結合了的雜混性蛋白質之 HTF-14 免疫親和性管柱，之後再以 0.1 M 甘氨酸，pH 2.3 之條件將雜混性蛋白質洗出。收集 2 ml 之餾出液進入含有適當 pH 之緩衝液中並加以中和。分析結果顯示此步驟中由濃縮液所得之純化倍數約為 8,000 倍。所得具免疫親和性純化之雜混性蛋白質為一混合物，如範例 7 中述，含有輸鐵蛋白及完整之低密度脂蛋白受體結合區域，先前曾受到絲氨酸酶的分解，因此不包含完整之低密度脂蛋白受體之結合區域。純化步驟中的第二步驟為配體親和性步驟，含區域之雜混性蛋白加以分離。在此步驟中，將以免疫親和性純化之雜混性蛋白混合物加到內含已結合了人類低密度脂蛋白（藉由固定於珠子上的兔子抗人類低密度脂蛋白之多株抗體），以溴化氰活化之賽弗絡斯膠 4B 之

五、發明說明 (28)

配體親和性管柱中。將以免疫親和性純化之雜混性蛋白混合物加到抗低密度脂蛋白配體親和性管柱中，再適宜的情況下作用一段足夠長的時間使位於珠子上之低密度脂蛋白能與雜混性蛋白中之低密度脂蛋白受體互相結合，使雜混性蛋白以非共價鍵的方式與管柱結合。再以 TBS 及 20 mM EDTA, pH 7.4 沖洗管柱。收集沖洗液並分析其結果，第 2 及第 3 部分之洗出液中含有最高量濃度之蛋白質。

E. 在體外此雜混性蛋白質特性之鑑別

在此所描述之此雜混性蛋白質之分析（範例 10）顯示其能與低密度脂蛋白結合且此結合須二價的陽離子存在，此亦是已知低密度脂蛋白與低密度脂蛋白受體結合時之特性。進一步的分析顯示此雜混性蛋白質與低密度脂蛋白之間的結合不會在酸性的情況下發生，且 EDTA 與酸性緩衝液均會促使低密度脂蛋白與此雜混性蛋白質解離（範例 10）。此也是廣為大眾所熟知的低密度脂蛋白與低密度脂蛋白受體結合時之作用特性，亦即在體內呈酸性之核內體中低密度脂蛋白會由低密度脂蛋白受體中釋放出來。此一結果暗示此雜混性蛋白質在體內的也會有類似的反應，亦會將低密度脂蛋白總言之，這些發現可以支持此雜混性蛋白質之功用，其會與血清

五、發明說明(29)

中的低密度脂蛋白受體結合並被帶入細胞中作進一步的代謝。

除此外的分析結果顯示(範例 9)當低密度脂蛋白濃度為時可達最高結合量的一半,此結果與純化之低密度脂蛋白受體在固相結合分析中的結果(Innerarity, T.L. et al., Meth. Enzymol., 129:542-565 (1986))以及已發表在人體纖維母細胞中低密度脂蛋白由低密度脂蛋白受體中釋出之 K_d 值可以互相比較。此結果可以支持此雜混性蛋白質對低密度脂蛋白受體之親和力可以和完整的、細胞膜上與低密度脂蛋白結合之低密度脂蛋白受體之親和力類似。

此雜混性蛋白質之功能活性,其中其第一個區域是低密度脂蛋白受體中的配體結合區域而第二個區域則是輸鐵蛋白,如範例 11, 13 和 14 中所描述。使用一肝臟細胞株,如 HrpG2,來測定是否此雜混性蛋白質會促使細胞經由輸鐵蛋白受體來吸取低密度脂蛋白。為測定是否此雜混性蛋白質能與培養液中之人類低密度脂蛋白受體結合並藉著輸鐵蛋白受體被帶入肝臟細胞中,測定如範例 13 中所示,在此雜混性蛋白質存在下未經標示之低密度脂蛋白或未經標示之輸鐵蛋白抑制經標示之低密度脂蛋白(亦即, ^{125}I -LDL)被帶入肝臟細胞

五、發明說明(30)

中之能力。當由輸鐵蛋白進入細胞內之低密度脂例 13 之法加以偵測。例如，由於低密度脂蛋白被吸收入細胞內導致膽固醇的生合成作用受到抑制，此抑制作用可以藉一種酵素的合成，如 3- 羥基 -3- 甲基戊二酸基輔酶 A 還原酶 (HMG CoA reductase) 來加以量測，此酵素在體內會被細胞中供過於求之膽固醇量加以抑制。或者，一酵素之量或其活性之測定，如醯基輔酶 A 膽固醇醯基轉移酶 (ACAT)，隨著細胞內膽固醇量的增加而增加，可被用來評估低密度脂蛋白是否經由輸鐵蛋白受體而被帶進細胞內並代謝成膽固醇增加之 ACAT 的活性即為細胞內膽固醇量增加的一種指標。

F. 在體內此雜混性蛋白質特性之鑑別

此雜混性蛋白質抗高膽固醇血症的效果，可以如範例中所述之法來評定。簡言之，為研究人類高膽固醇血症，將此雜混性蛋白質施用於一動物模型中，如不含低密度脂蛋白受體之老鼠或 Watanabe 兔子，並測定其對血清中膽固醇含量的效果。在適量施用此一雜混性蛋白質於不含低密度脂蛋白受體之老鼠或 Watanabe 兔子之後，血清中膽固醇含量的降低乃是此雜混性蛋白質運送膽固醇進入細胞中能力的指標。

五、發明說明 (31)

G. 此雜混性蛋白質在藥學上的運用

本發明之雜混性蛋白質對提高運送膽固醇進入細胞中，例如肝臟細胞，非常有用。此雜混性蛋白質，如那些將低密度脂蛋白受體配體結合區域與輸鐵蛋白區域融合在一起之雜混性蛋白質，可被用在那些須要提高體內低密度脂蛋白代謝之個體上。此雜混性蛋白質被用於一適當之載體上，可以是生理食鹽水或水或安定劑或輔劑之混合物，如球蛋白或低分子量的糖。以已知的技術和許多不同的途徑，如肌肉注射，靜脈注射，腹膜注射作為使用之方式。或者，亦可將能表現此一雜混性蛋白質之經基因修飾過的哺乳類動物細胞植入個體體中。亦可轉移感染至無法持續分裂之細胞（一級或中。這些細胞包括，但不僅限制於纖維母細胞，角質細胞，上皮細胞（亦即，乳房上皮細胞，腸上皮細胞），卵巢細胞（亦即，中國大頰鼠之卵巢細胞或稱 CHO 細胞），內皮細胞，神經膠質細胞，神經細胞，血液之形成要素（亦即，淋巴細胞，骨髓細胞），肌肉細胞，肝臟細胞及這些體細胞之前驅細胞。也可以本發明之方法感染能持續分裂之細胞，並用其來合成蛋白質或進行基因治療。以本方法用來合成蛋白質或進行基因治療的那些能持續分裂之人類細胞株包括，但不受其限制， HT1080 細胞， Hela 細胞， MCF-7 乳房腫瘤細胞， K-562 白血球細

五、發明說明(32)

胞， KB 癌瘤細胞， 2780AD 卵細胞， Jurkat (ATCC TIB 152) 細胞， Namalwa (ATCC CRL 1432) 細胞， HL-60 (ATCC CCL 240) 細胞， Daudi (ATCC CCL 213) 細胞， RPMI 8226 (ATCC CCL 155) 細胞和 MOLT-4 (ATCC CCL 1582) 細胞。在那些能持續分裂並經基因修飾而用來進行基因治療之細胞中，可將這些細胞包於能讓此雜混性蛋白質擴散出去的半通透性裝置中。

較適宜的是，用於本發明中基因治療之細胞（亦即，纖維母細胞）乃得自欲進行治療之個體身上。藉引入本發明中之一個 DNA 結構而將細胞之基因加以修飾，例如含有其中第一區域為人類低密度脂蛋白受體的配體結合區域且其第二區域為衍生自輸鐵蛋白氨基酸順序之雜混性蛋白質。將所得之經基因修飾的細胞於培養基中放大培養並引入個體體中。能表現含有此一雜混性蛋白質之 DNA 結構的細胞可參考同時送審之美專利申請案 07/787,840，標題“用於基因治療之體內蛋白質製造及傳送系統”，由 Richard F. Selden, Douglas A. Treco and Michael W. heartlein (filed N 文獻的方式列出。細胞表現並分泌此一雜混性蛋白質，之後與低密度脂蛋白結合並被運送至表面具有輸鐵蛋白受體的細胞內。由輸鐵蛋白受體所媒介之雜混性蛋白質低密度脂蛋白複合物的胞飲作用，能將低密度脂蛋白引入細胞，

五、發明說明(33)

並因而降低細胞外低密度脂蛋白之量。此雜混性蛋白質之 DNA 其中第二區域為除輸鐵蛋白以外細胞表面受體之配體，例如以上所列出者，均能被引入哺乳類動物細胞體內。可將能表現並分泌此雜混性蛋白質的那些經基因修飾過之哺乳類動物細胞植入個體體中，使此雜混性蛋白質與低密度脂蛋白結合。所得之雜混性蛋白質低密度脂蛋白複合物，再與第二受體相結合，且經由受體所媒介之胞飲作用進入細胞。因此，可降低循環系統中低密度脂蛋白之含量。

植入個體體中經基因修飾過之哺乳類動物細胞的數目以欲傳送及細胞中所表現之雜混性蛋白質的量來決定。個體所須之量視年紀，體型，性別，血清中低密度脂蛋白的含量，和此雜混性蛋白質在血清中之半生期而有不同之考量。須要的劑量可以實驗或由已知之此雜混性蛋白質的藥學性質計算而決定。

其它相關之雜混性蛋白質可被用來清除氧化之低密度脂蛋白，此亦為臨床上血液內低密度脂蛋白總量的一種很顯著的指標。一般深信初期動脈硬化斑的形成乃發生在循環系統中高含量之低密度脂蛋白與血管內之上皮細胞作用而來，其中由於自由基的攻擊而發生在 apoB-100 上氨基團的氧化（亦即，在賴氨酸和精氨酸之

五、發明說明(34)

殘基上)。在低密度脂蛋白顆粒上 apoB-100 的氧化會倒致其與低密度脂蛋白受體間親和力的喪失。氧化的低密度脂蛋白不會被肝臟代謝，相反的會屯積在循環系統中直到其能與食腐細胞受體結合 (AcLDLR；以前稱醯基低密度脂蛋白受體)，可大量發現於巨噬細胞脂蛋白，在胞內形成很大的脂質液泡而被稱為泡沫細胞 (foam cells)。一般相信帶有細胞表面能與上皮細胞黏合之基團的泡沫細胞，在初期動脈硬化斑的形成上拌演一個相當重要的角色，是實上在動脈硬化斑的各個時期也都可以發現它的存在。

含有融和在人類輸鐵蛋白上食腐細胞受體配體結合區域之雜混性蛋白質 (AcLDLR/TF) 有很大的藥學功能，特別是在肝臟中能藉由輸鐵蛋白受體，結合並清除氧化的低密度脂蛋白。此外，由於可大量供應此雜混性蛋白質，它也可用作巨噬細胞上醯基低密度脂蛋白受體的競爭者，使大部分氧化的低密度脂蛋白會與 AcLDLR/TF 結合，而非與巨噬細胞上醯基低密度脂蛋白受體結合。因此，可降低聚積在巨噬細胞上氧化的低密度脂蛋白含量，因此在心臟血管上皮細胞中發現的泡沫細胞數目可大為降低，而可干擾初期動脈硬化斑的形成。

一般而言，其它之雜混性蛋白質在降低與疾病相關

五、發明說明 (35)

之其它生化物質上也有其藥學上的重要性。雜混性蛋白質上高親和力之配體結合區域毋須限制在那些已知的受體分子上（如低密度脂蛋白受體或醯基低密度脂蛋白受體），但可包含對蛋白質配體及小分子具有高親和力之其它型式的蛋白質。具有抗體中抗原結合性質之分子或具有可逆之結合活性的其它蛋白質，均可用來架構內含人類輸鐵蛋白或能與其它細胞受體配體結合之配體的雜混性蛋白質之氨基酸順序。具有能與抗體抗原結合之分子（例如，單鏈之抗體）或其它具有可逆結合活性之蛋白質可用來架構內含人類輸鐵蛋白或能與其它細胞受體配體結合之配體的雜混性蛋白質之氨基酸順序。

在一具體化實例中，此雜混性蛋白質對去脂脂蛋白 E4（apoE4），而非 apoE3 或 apoE2，具有高度親和力之結合專一性。大約一半罹患阿滋海默氏疾病的病症與專一對偶性型的去脂脂蛋白 E 相關，且此去脂脂蛋白 E 之對偶性型式 E4 被發現會聚積在腦部澱粉樣纖維中，正是此種疾病之一大危險因子。apoE3 及 apoE2 並不會增加患病的機率但可能在抵抗疾病的能力上拌演一些角色。能降低去脂脂蛋白 E4 含量的雜混性蛋白質可被用於藥學治療上來延緩阿滋海默氏疾病的發展。藉此所描述之方法，內含一去脂脂蛋白 E4 結合區域之雜混性蛋白質可與輸鐵蛋白互相融環系統中移

五、發明說明(36)

除的分子，並能逆轉在週邊組織沉積的現象。

此雜混性蛋白質在臨床診斷上的應用

此雜混性蛋白質在生化分析上也是一種很有用的診斷試劑。例如，可用此雜混性蛋白質來測定一個生化樣品中（亦即，細胞之溶解液，血液，淋巴細胞，尿，水或乳汁）選定物質的含量，例如低密度脂蛋白。如果須要的話，將欲分析之生化樣品進行處理，使選定物質能與適當之雜混性蛋白質（例如，對低密度脂蛋白而言，其中之第一區域為人類低密度脂蛋白受體之配體結合區域）之第一區域結合，並在適於選定物質與第一區域結合的情況下與此雜混性蛋白質接觸。一般而言，可將此雜混性蛋白質在適於選定物質與此雜混性蛋白質之第一區域結合之狀況下固定於一固定之表面上之珠子或其它之表面上。如果生物樣品中存有選定物質，它會與雜混性蛋白質結合，且所得之選定物質 - 雜混性蛋白質複合物可以已知之法加以偵測（例如，使用能與選定物質結合並以共價鍵連接在一具活性的酵素或放射性核上之抗體。此酵素之活性藉著具有顏色或會產生螢光之物質的裂解而加以偵測）。此雜混性蛋白質可以一直接分析的方法，以具高專一性很便利的形式，例如在一微量計數盤上，對物質進行偵測。在此所提出的一個範例中，

五、發明說明(37)

低密度脂蛋白受體乃藉著與固定在微量計數盤上低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質結合來作定量上的分析。所得之結合的低密度脂蛋白藉與一抗低密度脂蛋白抗體的反應而測得。

在其它之具體化實例中，此雜混性蛋白質可取代 ELISA 試驗中所用的抗體。例如，直接或間接結合於盤上之低密度脂蛋白，可捕獲一具有低密度脂蛋白受體配體結合區域之雜混性蛋白質。此被捕獲之雜混性蛋白質再與一直接對抗此雜混性蛋白質第二區域並與 HPR 形成共軛之抗體反應來加以偵測，例如抗輸鐵蛋白抗體可與低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質中輸鐵蛋白區域反應。在另一範例中，能與人類免疫不全病毒 (HIV) 組成結合之雜混性蛋白質，可用來偵測在複雜的生物樣品中，如血液或組織標本，此病毒的存在與否。

本發明可以下列之範例加以闡述，但本發明並不限於下列之範例。

範例 1 建立融合了人類低密度脂蛋白受體氨基酸順序 1-374 與人類輸鐵蛋白氨基酸順序 20-698 之低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的基因質粒

五、發明說明 (48)

孔洞之培養皿中培養。在一段生長期後，以 TF-FLISA 測試培養基是否存有輸鐵蛋白之抗原，其中的 22 個呈現陽性反應。呈陰性反應之聚落（在經 pSV2neo 轉殖後所分離之細胞，沒有轉殖但能在有或無 G418 存在下生長之細胞）並不會表現可偵測得到的人類輸鐵蛋白抗原。將 22 個呈現陽性反應中的 16 個聚落擴大培養作進一步的分析。將培養在 T-25 培養瓶中的細胞養至將近融和不再分裂的階段再換新鮮的培養基。24 小時之後，以 TF-FLISA 分離並定量分析培養基瓶中培養基內雜混性蛋白質之總量（相當於輸鐵蛋白之 ng，[TFeq]）除以每一培養瓶中細胞的總數，可得表現速率的定量測量，可以 [TFeq]/106 細胞 / 天來表示。在 15 個表現之細胞聚落中此雜混性蛋白質之量為：2，7，11，21，49，52，90，93，99，131，175，193，200，206 和 231 [TFeq]/106 細胞 / 天]。

B. 在中國大頰鼠卵巢細胞 (CHO) 中的轉移感染

在此範例中藉磷酸鈣沉澱法，以此雜混性蛋白質之表現質粒，pEFBOS/LDLrTF1.S，對中國大頰鼠卵巢細胞作轉移感染（Graham, F.L., and van der Eb, A.J., Virology, 52:456 (1973); Chu and Sharp,

五、發明說明 (49)

Gene, 13: 197 (1981))) 。一個同時被轉移感染且具優勢的選擇性標示質粒， pSV2dhfr ，也被用作轉殖之安定性的篩選因子，此乃基於在宿主細胞中一個互補的不具功能性的二氫呋喃還原酶 (dhfr) 基因， DUKX-B11 (in Chasin, L. and Urlaub, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)) 之故。在下述之實驗中，所使用的是 pSV2dhfr 質粒上之 dhfr 基因。

將由 DUKX-B11 基因中所得之細胞培養在含有 aMEM (不含核糖核苷及去氧核糖核苷， Sigma M-4562) ， 10% 牛血清 (Hyclone A-1111) ， 4 mM 之 L-穀胺醯胺 (Gibco 25030-016) ，各 50 units/ml 之盤尼西林和鏈黴素 (Gibco 15070-014) ， 15 μ g/ml 之 L- 輔氨酸 (Sigma P-4655) ， 10 μ g/ml 之腺苷 (Aigma A-4036) ， 10 μ g/ml 之胸苷 (Sigma T-1895) ，和 10 μ g/ml 之去氧腺苷 (Sigma D-8668) 之完整的培養基中。

將養在 T75 培養瓶 20 ml 之完整的培養基中約 60 至 70% 呈融合不再分裂狀態的細胞，餵食 10 ml 新鮮的培養基後在 30 $^{\circ}$ C 下培養 4 小時。在 4 小時結束前的 30 分鐘，以下列步驟製備磷酸鈣與質粒 DNA

五、發明說明 (50)

沉澱之懸浮液：

將 pEFBOS/LDLrTF1.S (50 μ g) 與 pSV2dhfr (1 μ g) 質粒合併於 0.5 ml 內含 0.25 M CaCl₂ 之 TE 緩衝液中 (1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.9) 。一滴滴將此溶液加入另一內含 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂ HPO₄, 50 mM Hepes, pH 7.1 之溶液中。將 1 ml 之混合液於室溫下靜置約 30 分鐘以行成磷酸鈣沉澱。將此 1 ml 之懸浮液加入先前的細胞培養基中作用 4 小時。將培養基加以旋轉攪拌使其中的粒子得以分散並讓細胞在 30 °C 下繼續培養 4 小時。將培養基移除讓細胞在室溫下與內含 20% 甘油 5 ml 之培養基作用 1 分鐘。之後將甘油移去並以 15 ml 完整的培養基餵食細胞並在 30 °C 下培養 24 小時，使染色體能進行整合並表顯轉移感染之質粒的 DNA。24 小時之後，以胰蛋白將細胞分離並分成 7 個平均等分之族群聚落在 DHFR 選擇性培養基中擴大培養 (亦即，族群聚落 A 至 G) 。

DHFR 選擇性培養基能提供那些會表現 pSV2dhfr 質粒 (有或無 pEFBOS/LDLrTF1.S 的存在) 的細胞一種陽性的篩選方法。那些不會表現 DHFR 基因的細胞無法在此培養基中生長。DHFR 選擇性培養基含有 aMEM (

五、發明說明 (51)

參閱上述)，10% 透析過之牛血清，4 mM 之 L- 穀胺醯胺，各 50 units/ml 之盤尼西林和鏈黴素及 15 μ g/ml 之 L- 輔氨酸。此培養基中亦含 0.1% 的葡萄糖及 0.22% 之碳酸鈉。

讓族群聚落 A 至 G 中的細胞於 DHFR 選擇性培養基生長 17 天，至幾近融合不再分裂的狀態，在此期間每隔 3 至 4 天便換加新鮮的培養基。之後於每一族群聚落中的細胞中加入 20 ml 新鮮的培養基並培養 24 小時，回收培養基並以 TF-ELISA 分析其中雜混性蛋白質的含量。

在此選擇性培養基中所含之牛輸鐵蛋白抗原不會與用於 TF-ELISA 試驗中的人類輸鐵蛋白抗體反應。再則，未經轉移感染之宿主中國大頰鼠卵巢細胞株，DUKX-B11，無法合成一個於此試驗中可被測出的分泌性輸鐵蛋白抗原。因此，在轉移感染細胞群之培養基中所測得的任何超出背景值的輸鐵蛋白抗原 (1 ng/ml) 代表經轉移感染之細胞群能表現並分泌一低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質。

在 DHFR 選擇性培養基中生長 17 天之後，培養 24 小時後族群聚落 A 至 G 之培養基含有可偵測得到

五、發明說明 (52)

的雜混性蛋白質的含量。在此範例中，族群聚落 A 至 G 在一天的培養之後分別產生 53，52，52，79，74，75，和 33 [TFeq]/ml。因此，開始時每一族群聚落所生成之雜混性蛋白質量類似但不相等。因此，篩選乃是在選擇能表現 pSV2dhfr 質粒中所帶的 DHFR 酵素基因與衍生自 pEFBOS/LDLrTF1.S 之雜混性蛋白質之細胞，因為有許多細胞能將此兩種質粒同時併入其基因中。

之後將族群聚落 A 至 G 之細胞以許多種已知能放大 DHFR 酵素基因之法處理 (Kaufman, R.J. and Sharp, P.A., J. Mol. Biol. 159:601 (1982))，亦即能篩選那些能表現出高量 DHFR 酵素的細胞族群聚落，此又能增加細胞對抗胺基甲基葉酸 (methotrexate, MTX) 之抵抗力有關。在此範例中，首先篩選能抵抗 20 nM 胺基甲基葉酸之細胞族群，而後是 50 nM 之胺基甲基葉酸 (Sigma M-8407)。在每一步驟中，以 TF-ELISA 測試每一可能的細胞族群中同時表現出的分泌性雜混性蛋白質量。在能表現此雜混性蛋白質之再培育的細胞族群中可能含有能分泌出很高量雜混性蛋白質的細胞亞株，可藉細胞選殖的方法將此亞株分離出來。

在此範例中，細胞族群聚落 E 和 F 與其它細胞聚

五、發明說明 (53)

落相較下，在 20 nM MTX 和 50 nM MTX 之處理下能表現出很高量的雜混性蛋白質。以限制性稀釋法培育在 50 nM MTX 之處理下所篩選出的細胞，經以 TF-ELISA 在多孔培養盤中測試證實由細胞族群聚落 E 中培育出的 9 個細胞株和細胞族群聚落 F 培育出的 14 個細胞株為分離出的眾多細胞株中具最高產量之細胞株。這 23 個細胞株，包括兩個由細胞聚落 E 中培育出的高產量之細胞株 (E77 和 E117) 及兩個由細胞聚落 F 中培育出的高產量之細胞株 (F3 和 F57)，均針對其在經過另一次放大 DHFR 酵素基因之法處理後增加其產物的輸出率 (範例 4)。

範例 4 生產細胞株的鑑定與雜混性蛋白質可能之改良製造法的評估

A. 生產細胞株的鑑定

將衍生自缺乏 dhfr 之中國大頰鼠卵巢細胞株，DUKX-B11，中能抗胺基甲基葉酸 (MTX) 之中國大頰鼠卵巢細胞株培養在添加了 100nM 胺基甲基葉酸 (MTX) 之 DHFR 選擇性培養基中。此培養基中並含有 0.1% 的葡萄糖。某些培養基中也含有 2mM 之丁酸鈉 (Fluka 19364)，或絲氨酸酶抑制劑 aprotinin (

五、發明說明 (54)

Boehringer mannheim 981-532) 或 Pefablock SC (Bohringer mannheim 1429-876) 。

將由細胞族群聚落 E 中培育出的高產量之細胞株 (E77 , 在 4 天得期間於 6- 孔盤中合成約 1.5μ g TFeq/ml , 而 E117 則在 4 天得期間於 6- 孔盤中合成約 1.1μ g TFeq/ml) 分開培養並以其對 100nM 胺基甲基葉酸 (MTX) 之抗性來篩選作擴大培養 , 以決定所合成之雜混性蛋白質量是否會增加。將 9 個由細胞聚落 E 中培育出的高產量之細胞株) 合併成一個新的細胞族群聚落 , 稱細胞族群聚落 H , 之後同樣以其對 100nM 胺基甲基葉酸 (MTX) 之抗性來篩選作擴大培養。同樣的 , 將由細胞族群聚落 F 中所得之 2 個高產量之細胞株 (F3 和 F57) 分開培養並以其對 100nM 胺基甲基葉酸 (MTX) 之抗性來篩選作擴大培養 , 將所有由 F 中獲得之 14 個聚落合併成細胞族群聚落 J , 同樣作放大培養。

評估 4 個細胞株 (E77 , E117 , F3 , 和 F57) 和細胞聚落 H 及 J 中其在 T75 細胞培養瓶中增加的製造力 (TFeq/106 細胞 / 天) 對增加之 DHFR 基因放大所得之函數。合成之雜混性蛋白質量以 TF-ELISA 進行分析。藉著測量在接下來以同樣濃度的胺基甲基葉

五、發明說明 (55)

酸再培育的細胞其對胺基甲基葉酸的抗性作為其製造力的穩定性的一種指標。

結果顯示 (見表 1) E77 之細胞株為最產量最高安定的細胞株。接下來以 200 nM 及 500 nM 之胺基甲基葉酸再培育的細胞並不會增加其製造雜混性蛋白質的能力。同樣的，在細胞族群聚落 H 及 J 中篩選也沒有增加其製造雜混性蛋白質的能力。

E77 之細胞株顯然能在 100 nM 之胺基甲基葉酸中生長，因此選擇其作為滾瓶式培養法中的生產細胞株。

表 1 在經轉移感染之中國大頰鼠卵巢細胞族群聚落及細胞株中，其雜混性蛋白質製造力 (ng TFeq/10⁶ 細胞/天) 與胺基甲基葉酸 (MTX) 濃度與再培育的代數之間的關係

[MTX] 再培養		E77	E117	F3	F57	族群聚落	族群聚落
(nM) 之代數						H	J
50	1	1577	479	616	830	404	328
50	2	1168	ND	552	608	ND	ND
100	1	3554	800	620	1031	505	224
100	2	1842	1532	347	604	381	187

五、發明說明(56)

100	3	2011	729	641	1135	252	121
100	4	1462	593	ND	ND	ND	ND
200	1	1791	779	699	1045	404	90
200	2	2000	728	855	948	327	97
200	3	1598	928	975	546	510	100
500	1	1577	957	855	ND	319	50
500	2	ND	954	ND	ND	322	52

ND: 未決定

B. 雜混性蛋白質可能之改良製造法的評估

於 T 形培養瓶及滾式培養瓶中研究由生長細胞株 E77 所製造之雜混性蛋白質的量與品質。

先前之免疫沉澱實驗顯示少量之蛋白質，會由具輸鐵蛋白區域但缺乏完整低密度脂蛋白受體區域的 pEFBOS/LDLrTF1.S 質粒轉移感染後的人類纖維母細胞之細胞上層液中被免疫沉澱出來。同樣情形也在由細胞株 E77 所分泌之雜混性蛋白質（以及經轉移感染之中國大頰鼠卵巢細胞族群聚落及細胞株中）中發現。會導致此少量產物形成的原因可能由於特定之內肽酶在低密度脂蛋白受體中的特定位置作用而來，此可藉測定所累積之此物質可被特定的肽酶抑制劑或去活化的血清所抑

五、發明說明(5)

制而加以評估。 0.002% 之絲氨酸蛋白酶抑制劑 aprotinin 對降低此物質有少做許效果。因此，使用更高濃度之 aprotinin (0.5%) 作測試。

細胞以 3 種培養基於 T75 培養瓶中培養至呈融合不再分裂的狀態，所使用之培養基均含 DMEM 及 100 nM MTX。培養基 A 含 10% 透析過的牛血清，培養基 B 含 10% 經加熱去活性透析過的牛血清，培養基 C 與培養基 A 同樣的組成並添加了 0.5% 之 aprotinin。分別以培養基 A，培養基 B，和培養基 C 餵養細胞。在餵養 1 至 2 天後將少量的培養基移出並繼續於 37 °C 下培育 7 天。之後，以非還原性的 SDS/ 聚丙烯醯胺凝膠對每一樣品做電泳分析，並將其轉移至硝基纖維素濾紙上，藉著其與和羊抗人類輸鐵蛋白形成共軛之山葵過氧化酶 (HRP) 的結合來加以偵測。

結果顯示在培養基 A 中兩天所聚積的少量物質，在一天後也會以低量存在於所有培養基中。以培養基 B (經加熱去活性的血清) 來培育細胞同樣也無法防止此類體外的蛋白質分解反應，與先前之推論相合，即蛋白質分解物質並非血清中經熱去活性的組成成分。然而，添加 0.5% 之 aprotinin (培養基 C)，可顯著的降低此蛋白質分解反應。此可支持在培育呈融合不再分裂

五、發明說明 (48)

的細胞過程中，完整長度的雜混性蛋白質之裂解，乃由於具特定內肽酶活性之絲氨酸蛋白酶之分泌所造成。

以可以另一抑制劑 (Pefablock SC; PB) 來抑制絲氨酸蛋白酶的分泌。當以培育 3 天後的培養基作西方點墨法分析時，發現增加培養基中 PB 的濃度會使相對的 100 kd 的蛋白質量降低。使用 0.6 mM PB 有很強的抑制效果，雖然 0.3 至 0.5 mM PB 也同樣的可顯著的降低此裂解作用。

範例 5. 以滾瓶式製造低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質

在開使擴大生產此雜混性蛋白質時使用具 20 個擴大表面 (1450 cm²) 之滾瓶 (Falcon 3096)，每一瓶中裝 250 ml 的培養基，以每分鐘 0.3 轉的速度滾動。每週將 E77 細胞株培養至融合不再分裂的狀態並收穫 (範例 4)。將 20 個滾瓶分成 3 個處理組。滾瓶 RB8 至 RB12 以含 100 nM MTX 之培養基餵養。RB3 至 RB7 則以不含 MTX 之培養基餵養。RB13 至 RB22 以含 100 nM MTX 之培養基餵養，在此之前並先種植了 E77 細胞株的亞株 SC7。

五、發明說明 (59)

整體來說，合成的 48.5 L 內含 96 mg TFeq 或 149 mg 之雜混性蛋白質，平均每一升中含 3.1 mg 之雜混性蛋白質。RB13 至 RB22 含有最低的雜混性蛋白質平均濃度 2.2 mg/ml，而 RB3 至 RB7 和 RB12 之雜混性蛋白質平均濃度分別為 3.3 mg/L 和 3.8 mg/L。由這些結果中，似乎移去 MTX 選擇性藥劑並不會增加產率。將由 RB13 至 RB22 所得之 48.5 升培養基合併並濃縮以進行下列之純化過程。

範例 6 TF ELISA 分析

在用來偵測雜混性蛋白質中人類輸鐵蛋白抗原區域之三明治式酵素免疫分析法中，在 1 倍的磷酸緩衝液 (Gibco 310-4200AJ) 中以 1:100 比例的單株抗體 HTF-4 (Biodesign H61016M) 來塗佈培養盤。以溶於 ELISA 緩衝液 (PBS, 2% BSA, 0.05% Tween-20) 之人類去鐵輸鐵蛋白 (apo-TF, Sigma T-1147) 作為標準。含飽和鐵之人類輸鐵蛋白所表現出的標準曲線與人類去鐵輸鐵蛋白所表現的相同。用作偵測的酵素共軛物是山葵過氧化酶 - 羊抗人類輸鐵蛋白 (Biodesign K90070P)，以 1:5000 的比例溶於溶於 ELISA 緩衝液中使用。是山葵過氧化酶之受質是 OPD (Dako S-2000)，製備方法乃是以 8 mg OPD 溶於 0.1M 檸

五、發明說明 (60)

檸檬酸磷酸緩衝液， pH 5.0， 0.0125% 之過氧化氫而得。

藉著與人類輸鐵蛋白之標準曲線相比， TF-ELISA 試驗可以很有效的偵測出此雜混性蛋白質之莫耳濃度。此雜混性蛋白質之蛋白質組成部分之分子量 (116.3 kd) 約比人類輸鐵蛋白大了 55%。假設此雜混性蛋白質對單株抗體 HTF-4 與山葵過氧化酶 - 羊抗人類輸鐵蛋白之親和力和人類輸鐵蛋白之標準相同，則此雜混性蛋白質之濃度可以相當於多少輸鐵蛋白 ng/ml 之值來代表 (亦即， ng TFeq/ml)。因此，在此範例中，以 ng/ml 的標準所測出之雜混性蛋白質濃度約高出 55%。

範例 7. 低密度脂蛋白受體/輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的純化

下列物質及方法被用於此範例中。使用山羊抗 - 老鼠免疫球蛋白 G 真菌凝膠珠子 (Hyclone EK-4081)，由腹水單株抗體 HTF-4 中純化免疫球蛋白 G。以會和羊抗老鼠免疫球蛋白 G 行成共軛之山葵過氧化酶 (Cappel 55565) 來偵測老鼠免疫球蛋白 G 的存在。HTF-4 免疫球蛋白 G 與以溴化氫活化的賽弗絡斯膠 (sepharose) 反應才能使抗體與賽弗絡斯膠行成共價鍵

五、發明說明(61)

結合以免疫親和性 (IA) 來純化含有輸鐵蛋白之雜混性蛋白質。在以免疫親和性色層層析管柱來結合低密度脂蛋白的方法中，以親和力所純化出來的兔子抗人類低密度脂蛋白 (Biomedical Technologies BT-905) 共價鍵，之後，將其以非共價鍵方式用來固定純化的人低密度脂蛋白 (Biomedical Technologies BT-905)。以會和山羊抗兔子免疫球蛋白 G 行成共軛之山葵過氧化酶 (Cappel 55565) 來偵測兔子免疫球蛋白 G 的存在。

A. 以抗輸鐵蛋白免疫親和性色層層析管柱來進行純化

1. 由腹水單株抗體 HTF-4 中純化免疫球蛋白 G

以單株抗體親和性分析系統 (Hyclone, EK-4081) 由腹水 (Biotest, H61016M, subclass IgG1) 中純化抗輸鐵蛋白單株抗體 HTF-4。此系統使用一塗佈了抗老鼠免疫球蛋白 G 的真菌凝膠珠子來結合並由腹水中分離單株抗體。以內含 85% NaCl, 50 ml 之 30mM 醋酸滴入固態的硼酸鈉所得之 0.1M 硼酸鈉, 30 mM 之醋酸, 85% 之 NaCl 來進行沖洗, 將此抗體一次洗出。立即將其放入能讓 12 至 14 kd 大小物質通過的透析管中, 於 4 °C 下作整夜的透析並隨後凍於 -20

五、發明說明 (62)

℃。將其解凍，與 Amicon Centriprep 50 合併至 12.5 ml，最後濃度為 4.36mg 蛋白質 /ml。由 112 ml 產率為 99%。

2. 將 HTF-14 固定於以溴化氫活化的賽弗絡斯膠中

將純化之抗人類輸鐵蛋白抗體之單株抗體 (HTF-14) 以共價鍵的方式結合在以溴化氫活化的 Sepharose 4B 中 (Pharmacia)。以 37 ml 之 0.01N HCl 將 12 克的支持物加以膨脹。以內含 0.5M NaCl 之 0.1M 碳酸氫鈉，pH 8.3，10 倍體積的溶液來清洗這些珠子。抗體溶液，HTF-14 以 4.36mg/ml 之濃度添加入內含 0.5M NaCl 之 0.1M 碳酸氫鈉，pH 8.3 的溶液中，使其反應並於 4℃ 下緩緩的在一馬達轉盤上搖動 20 小時。藉添加 30ml 1M 的乙醇胺，pH 8.3，在轉動下作用 3 小時將所有自由的氨基均堵住。

3. 由濃縮的培養基中結合並洗出雜混性蛋白質

將支持物作抽氣處理後倒入 50 ml 之 Pharmacia 的 Econo 管柱中。使其在 pH 7.4 的 TBS 緩衝液中達到平衡。先前已將培養基的上清液濃縮了 32 倍 (由

五、發明說明 (63)

48.5 L 至 1.5 L) 。再進行一次分析顯示其內含相當於 62.3 mg 之輸鐵蛋白，總蛋白質量為 1044 g 。以 10,000 轉將此培養基的上清液離心並以 0.22 μ m 的濾紙過濾。之後將其以 100 ml/hr 的速率加到 HTF-14 之免疫親和性管柱中並循環 40 小時。將管柱以 10 倍體積之 pH 7.4 的 TBS 緩衝液清洗。之後以 pH 2.3 之 0.1 M 甘氨酸沖洗使蛋白質流出。收集每管 2 ml 的洗出液至內含 1 ml pH 8.5 的 Tris-HCl 緩衝液中以中和洗出液。將第 7 至 30 管中的液體合併。並定出在 54 mg 的總蛋白質中含有 26.4 mg 的雜混性蛋白質（未被裂解的及經蛋白質酶裂解的），相當於 49% 的純度及 8,193 倍的濃縮。

B. 低密度脂蛋白配體親和性色層層析法

1. 將兔子之抗人類低密度脂蛋白固定於以溴化氰活化的賽弗絡斯膠上

將 5mg 之兔子之抗人類低密度脂蛋白多株抗體（Biomedical Technologies, BT-905）結合在以溴化氰活化的賽弗絡斯膠 4B 上（CN-Br 4B）（Pharmacia）。將兔子之抗人類低密度脂蛋白多株抗體透析至內含 0.5 M NaCl 之 pH 8.3 的 0.1M 碳酸氫鈉溶液中。以

五、發明說明 (64)

0.01N HCl 將 350 μ g 的支持物加以膨脹。之後以內含 0.5M NaCl, 10 倍體積的 pH 8.3, 之 0.1M 碳酸氫鈉溶液來清洗這些支持物。加入抗體溶液使其反應並於 4 $^{\circ}$ C 下緩緩的搖動 24 小時。藉添加 2 ml 1M 的乙醇胺, pH 8.5, 在轉動下作用 1 小時將所有自由的氨基均堵住。99% 的抗體均會與管柱結合, 造成每 1ml 之抗人類低密度脂蛋白管柱中有 5 mg 以共價鍵結合的抗人類低密度脂蛋白。

2. 低密度脂蛋白的結合

獲得 10mg 之低密度脂蛋白 (Biomedical Technologies, BT-905) 以 5mg/ml 的濃度溶於 50mM Tris, 0.15M NaCl 和 0.3 mM EDTA 中。將其透析至內含 2 mM 之 CaCl_2 溶液中。將 10mg 之低密度脂蛋白於抗人類低密度脂蛋白管柱中以 2 mg/ml 的濃度循環 10 次。之後 3.2 mg 之低密度脂蛋白仍留在溶液中, 表示約有 6.8 mg 之低密度脂蛋白會與管柱結合。

3. 雜混性蛋白質在免疫親和性管柱中的結合與洗出

1 ml 內含 138 μ g 之濃縮的以免疫親和性純化之雜混性蛋白質 (於抗輸鐵蛋白之免疫親和性管柱純化

五、發明說明 (65)

) 於抗人類低密度脂蛋白 / 低密度脂蛋白配體親和性管柱中循環 10 次。假設未裂解與經蛋白質酶裂解後之蛋白質比例為 1:1，則完整之蛋白質約為 $67 \mu\text{g}$ 。溶液中仍含 $29 \mu\text{g}$ 或 21% 之雜混性蛋白質。以 20 倍體積之 TBS, pH 7.4 清洗管柱，之後以 20 mM EDTA 在 TBS pH 7.4 將蛋白質洗出。並收集每管 1ml 之洗出液。以在 280 nm 下之吸收度定出第 2 和第 3 管中有最高量的蛋白質。將其以 Amicon Centriprep 的過濾裝置濃縮並以每分鐘 1000 轉的轉速離心 30 分鐘。結果顯示在高峰部分約有 $10.2 \mu\text{g}$ 之雜混性蛋白質被洗出。

範例 9. 以抑制蛋白質酶與牛低密度脂蛋白之解離結合來純化低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質

前述之範例描述了一種方法，能將未裂解之低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質由以滾瓶培養之中國大類鼠生產細胞株 E77 中以下列步驟純化出來：1) 聚積和濃縮其培養基，2) 免疫親和性色層層析管柱（能使此雜混性蛋白質中的人類輸鐵蛋白區域與固定之 HTF-14 單株抗體形成專一性的結合），3) 配體親和性色層層析管柱（能使此雜混性蛋白質中的人類低密度脂蛋白受體區域與固定之低密度脂蛋白形成專一性

五、發明說明(66)

的結合)。前述之範例描述了內含兩個步驟的方法以分離低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質，相對來說其中之配體親和性色層層析管柱步驟的效率並不被回收)。此或許是因為以免疫親和性所純化出來的雜混性蛋白質含有結合的膽固醇之故，可能是衍生自用於培養細胞時之透析的牛血清中，並以牛低密度脂蛋白粒子的形式存在。因此，此雜混性蛋白質與人類低密度脂蛋白的結合有一部分會受到結合的牛血清中牛低密度脂蛋白 - 膽固醇的抑制。在此範例中所用的方法即關於將牛低密度脂蛋白由未與固定之人類低密度脂蛋白結合前之雜混性蛋白質中解離出來。

雜混性蛋白質聚積於內含蛋白質酶抑制劑 Pefablock SC 的培養基中(以 0.2 mM 的濃度添加於新鮮的培養基中)。此 1 抑制劑對所產生之雜混性蛋白質的總量沒有明顯的影響，但其會增加完整之低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白的相對產率。將培養基濃縮並加入於 HTF-14 之免疫親和性色層層析管柱中。由於低密度脂蛋白與此雜混性蛋白質中低密度脂蛋白受體區域的結合須要二價陽離子，而單株抗體 HTF-14 與此雜混性蛋白質中輸鐵蛋白區域的結合則不須要二價陽離子，因此以 EDTA 沖洗已結合了此雜混性蛋白質之管柱即能將專一性結合在雜混性蛋白質上的牛低密度脂蛋白洗出

五、發明說明 (67)

受體 / 輸鐵蛋白產物中含有較低量之膽固醇。以此物用於體內及體外的實驗中或藥學應用上。或者，也可以人類低密度脂蛋白配體親和性色層層析管柱作進一步的純化，將已喪失低密度脂蛋白受體結合區域的裂解物移除。

為了顯示出以免疫親和性所純化出來的雜混性蛋白質且含有結合的牛低密度脂蛋白（範例 7）與以免疫親和性所純化出來的雜混性蛋白質但不含結合的牛低密度脂蛋白（本範例）之間的差異，首先將以蛋白質酶抑制劑所生成之雜混性蛋白質結合到 HTF-14 之免疫親和性色層層析管柱中，洗出之後，再令其通過於 HTF-14 管柱。將在 0.2 mM Pefablock SC 存在下，內含 56.1 mg 此雜混性蛋白質之全部 43.51 L 的培養基濃縮至體積 1.17 L 內含 50.8 mg 之雜混性蛋白質（91.8% 的回收率），以 Pellicon Tangential 流動性過濾系統在分子量 100,000 的過濾筴（Millipore）中進行濃縮。將濃縮液（50.8 mg 之雜混性蛋白質，總蛋白質含量為 90.7 g）加至 HTF-14 管柱中（87% 結合率）並以 0.1 M 甘氨酸溶液（pH 2.3）將雜混性蛋白質洗出。幾乎所有的雜混性蛋白質均會在前面 24 個管子中被洗出。將這些管中的液體合併其中蛋白質總量為 82.6 mg 而此雜混性蛋白質的量為 35.9 mg，相當於 776

五、發明說明(68)

倍的純化而回收度則為 71%。此洗出之雜混性蛋白質每 mg 中含 2.9 mg 之膽固醇。

將由免疫親和性色層層析管柱 IA1 中所得之 24.4 mg 的雜混性蛋白質再加回 HTF-14 管柱 (99.9% 結合率) 中。以 20 mM EDTA 沖洗並無法很明顯的釋放出此雜混性蛋白質 (釋出之雜混性蛋白質佔全部量的 0.005%)。接下來以 0.1 M 甘氨酸溶液 (pH 2.3) 將雜混性蛋白質洗出，將有吸收峰的管柱中溶液合併，並以 PBS 作透析所得之溶液含有 19.13 mg 之雜混性蛋白質 (78% 的回收度)。此洗出液中的雜混性蛋白質 (稱 IA2) 每 mg 中含 0.13 mg 之膽固醇。因此，95% 以上結合在雜混性蛋白質上之膽固醇均藉著在甘氨酸溶液前的 20 mM EDTA 沖洗而被移除。

將 IA2 中之雜混性蛋白質在二價陽離子存在下加至人類低密度脂蛋白配體親和性管柱中，並以較範例 7 中高出 1 莫耳濃度之 EDTA 沖洗作進一步的純化。所加入的物質，不含牛低密度脂蛋白，與範例 7 中所述的物質相較下其結合與洗出之回收率均較高，在範例 7 中由於結合在雜混性蛋白質上之受體牛低密度脂蛋白之固，其結合與洗出之回收率均會受到抑制。

五、發明說明(69)

圖 6 顯示中國大頰鼠卵巢細胞生產株所製造的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質，在免疫親和性純化過程中各種階段的形式，及以非還原性 SDS/PAGE 與西方點墨法分析的結果。在硝基纖維素濾紙上之蛋白質會與和過氧化酶共軛的抗人類輸鐵蛋白抗體結合，之後藉過氧化酶所產生之化學螢光來加以偵測。主要的蛋白質帶為低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質，而較小較少的蛋白質帶則為已喪失低密度脂蛋白結合區域的產物。

第 1 道顯示由中國大頰鼠卵巢細胞濃縮之培養基中所表現出的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質。第 2 道顯示以範例 7 中的方法由中國大頰鼠卵巢細胞濃縮之上清液中所純化的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質。所加入的物質乃由 IA1 管柱 (HTF-14 單株抗體) 中所洗出的蛋白質部分。第 3 道顯示由第 2 道中所得之低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質經 TBS 透析後之結果。第 4 道顯示以範例 7 中的方法由中國大頰鼠卵巢細胞之上清液中所純化的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質。將濃縮之培養基由抗人類輸鐵蛋白免疫親和性管柱中結合並洗出，接著再由抗人類低密度脂蛋白配體親和性管柱中結合並洗出。第 5 道顯示以範例 8 中的方法

五、發明說明 (70)

由中國大頰鼠卵巢細胞之上清液中所純化的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質，其中並包括了將牛低密度脂蛋白加以解離的步驟。第 3 道所示之雜混性蛋白質 (IA1) 能與 IA 管柱結合，之後再藉含 EDTA 之 TBS 的沖洗將結合的牛低密度脂蛋白加以移除。在此所顯示之雜混性蛋白質 (稱 IA2) 代表由 IA 管柱中以 EDTA 沖洗後的蛋白質。第 1，2，3 和 5 中之物質則是在絲氨酸蛋白質抑制劑 Pefablock SC 的存在下，由中國大頰鼠卵巢細胞之生長液中分離而得。

範例 9. 於體外結合分析中測量結合在低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白上之低密度脂蛋白的量

為研究低密度脂蛋白與低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白上之親和力，發展出一種微量培養盤的結合分析。在此分析中，塗佈了抗輸鐵蛋白單株抗體之培養盤可與此雜混性蛋白質結合並藉此捕獲人類低密度脂蛋白。再以和抗人類低密度脂蛋白抗體的反應來偵測人類低密度脂蛋白。此分析方法須要同時含有輸鐵蛋白及低密度脂蛋白受體區域之雜混性蛋白質。

在 37 °C 下將單株抗體 HTF-14 (1:500 in 50 mM

五、發明說明 (71)

Tris-HCl, 2mM CaCl₂, pH 8.0) 塗佈於 96 - 孔洞的微量培養盤中 45 分鐘，之後以溶液 B (50 mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, pH 8.0, 0.5% BSA, 0.05% Tween-20) 清洗此培養盤 3 次。將培養盤在 37 °C 下之阻止溶液 (50 mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, pH 8.0, 1% BSA, 0.5% Tween-20) 中作用 45 分鐘。將阻止溶液移除並以各種結合液取代並在 37 °C 下作用 30 分鐘。結合液中乃是以濃度在 0.5 μ g/ml (0.97 nM apoB-100) 和 50 μ g/ml (97 nM apoB-100) 之人類低密度脂蛋白於溶液 B 中所形成，此外，尚有 1.55 μ g/ml (13.3 nM) 雜混性蛋白質，1 μ g/ml (13.3 nM) 人類輸鐵蛋白，或不添加任何物質。以溶液 B 清洗此培養盤 3 次，之後以對人類低密度脂蛋白具有專一性的羊多株抗體 (IgG) 在 37 °C 下作用 30 分鐘 (1:100 in solution B; biomedical Technologies, Inc., BT-999)。以溶液 B 清洗此培養盤 3 次，之後以對羊多株抗體具有專一性的過氧化酶共軛之兔子多株抗體在 37 °C 下作用 20 分鐘 (1:500 in solution B; Cappel, 55814)。以溶液 B 清洗此培養盤 3 次，之後以過氧化酶之受質 1, 2- 二苯胺 (1,2-phenylenediamine) 在 37 °C 下作用 5 分鐘 (0.67mg/ml in 0.1M citric acid-phosphate, pH 5.0)。加入硫酸至 0.8N 而使反應終止，之後以微量培養盤

五、發明說明 (72)

讀計測定其在 490 nm 下之吸收度。在每一低密度脂蛋白濃度中，在含有人類輸鐵蛋白之結合液中所得之訊號與不含輸鐵蛋白或此雜混性蛋白質的訊號類似，此被認為是非專一性結合之背景值的最主要來源。由於非專一性結合之故，每一低密度脂蛋白濃度之平均吸收度須由在雜混性蛋白質存在下所得之訊號中扣除，以得到能代表低密度脂蛋白與此雜混性蛋白質間專一性結合的數值。將此值與低密度脂蛋白濃度作圖，如圖 7 所示。假設在 $50 \mu \text{ g/ml}$ 所得之訊號為最大的結合，則最大結合的一半出現在 $1.6 \mu \text{ g/ml}$ (3.1 nM) 之低密度脂蛋白。

範例 10. 低密度脂蛋白受體/輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的結合與解離性質

低密度脂蛋白 / 低密度脂蛋白受體間的作用已有很詳細的報導，且已知其須要鈣離子和其它二價之陽離子。此外，低密度脂蛋白配體與低密度脂蛋白受體之結合視 pH 而定，亦即在低 pH 時較易解離 (J.L. goldstein and M.S. Brown, ann. Rev. Biochem., 46: 897 (1977))。此種特性在生理上非常重要，使低密度脂蛋白得以在較酸的內質體中被釋放出來，並可將受體再循環使用。因此，設計來專門研究低密度脂蛋

五、發明說明 (73)

白 / 低密度脂蛋白受體間的作用的一種體外分析方法，被用來研究低密度脂蛋白由低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質中解離出來時，其對 pH 和陽離子的依賴性。

檢視以範例 8 中所述之方法製造並純化之低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質，其與低密度脂蛋白結合的性質。特別是，在有或無 EDTA 存在下，低密度脂蛋白與雜混性蛋白質中低密度脂蛋白受體區域結合時其對陽離子的依賴性。同樣的，低密度脂蛋白與雜混性蛋白質結合時其對 pH 的依賴性分別以 pH 8.0 對 pH 5.2 的溶液來測試其結合時和結合後的影響。低 pH 下結合力的降低表示在內質體的酸性環境下，低密度脂蛋白會由低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白：輸鐵蛋白受體複合物中解離出來，使整個複合物可再被循環使用。一種微量培養盤上的分析方法被發展出來研究此種影響，其結果顯示於圖 8。

以微量培養盤所進行的分析方法可以偵測與固定在塗佈了抗低密度脂蛋白抗體之 ELISA 盤上的低密度脂蛋白結合之雜混性蛋白質的量。在一個 96 孔洞的微量計數盤上塗佈 5 μ g/ml 溶於 50 mM Tris-HCl，pH 8.0，2 mM CaCl₂ (溶液 A) 之羊抗人類低密度脂

五、發明說明 (74)

蛋白抗體 (Biomedical Technologies, Inc., BT-999) 。 以溶液 A 及 0.5% BSA 清洗並以溶液 A 及 1% BSA 在 37 °C 下作用 30 分鐘。作為陰性反應控制組的樣品孔洞並未塗佈抗人類低密度脂蛋白抗體 (無抗體) 。

未結合之低密度脂蛋白藉著以溶液 A 及 0.5% BSA 清洗而加以移除。由於低密度脂蛋白：抗低密度脂控制組的樣品孔洞以溶液 A, 0.5% BSA 和 20 mM EDTA 來清洗 (先以 EDTA 清洗過) 。接著，將雜混性蛋白質以 1 μ g/ml 溶於溶液 A 及 0.5% BSA 的濃度添加到所有的樣品孔洞中 (未處理) ，並在 37 °C 下作用 30 分鐘。某些樣品孔洞則以溶於溶液 A, 0.5% BSA 和 20 mM EDTA 之雜混性蛋白質來處理 (在 EDTA 中結合) ，其它的則以溶於 pH5.2 內含 25 mM 醋酸鈉，150 mM NaCl，和 2 mM CaCl₂ 之緩衝液中的雜混性蛋白質來處理 (在 pH 5.2 中的結合) 。之後以下列三種溶液之一來清洗所有的樣品孔洞：1) 溶液 A 及 0.5% BSA (未處理) ，2) 溶液 A, 0.5% BSA 和 20 醋酸鈉 (pH 5.2) ，150 mM NaCl，和 2 mM CaCl₂ 之緩衝液 (以 pH 5.2 清洗) 。之後以山葵過氧化酶共軛羊抗人類輸鐵蛋白抗體在樣品孔洞中進行培育 (Biodesign K90070P, 1:5000 dilution in solution A plus 0.5% BSA) ，在 37 °C 下作用 30 分鐘，之後以溶液 A, 0.5% BSA 作完全的清洗。某些樣品孔洞以溶於溶液 A,

五、發明說明 (75)

0.5% BSA 和 20 mM EDTA 來清洗 (在以 EDTA 清洗山葵過氧化酶之後)，其它的則以 25 mM 醋酸鈉 (pH 5.2)，150 mM NaCl，和 2 mM CaCl_2 之緩衝液 (在以 pH 5.2 清洗山葵過氧化酶之後)。最後的清洗步驟乃在以受質鄰 - 二苯胺 (ortho-p-之硫酸中止反應後，分析培養盤於 490 nm 下之吸收度。

如圖 8 中所示，雜混性蛋白質與培養盤之結合完全視培養盤上固定之低密度脂蛋白而定，因為沒有塗佈抗體 (抗低密度脂蛋白) 所得之讀值僅為此雜混性蛋白質之背景值 (無抗體)。此外，EDTA 不會顯著的增加固定的低密度脂蛋白與塗佈之抗體間的解離，此可由最後之雜混性蛋白質結合訊號上非常小的影響來顯示 (以 EDTA 作前處理)。

如果結合反應乃是在 EDTA 多過鈣離子 10 倍莫耳濃度的條件下進行反應 (在 EDTA 中結合) 或在酸性情況下 (與 EDTA 結合) 或在酸性情況下 (在 pH 5.2 下結合)，則與固定在培養盤上的低密度脂蛋白結合之雜混性蛋白質的量會顯著的降至或接近背景值。此顯示雜混性蛋白質：低密度脂蛋白之結合作用視未螯合的二價離子而定且其對 pH 非常敏感，類似在體內或體外所觀察到的低密度脂蛋白：低密度脂蛋白受體間的反應。

五、發明說明(76)

在雜混性蛋白質結合之後，接下來在 EDTA (EDTA 清洗) 或酸性情況下進行清洗 (在 pH 5.2 下清洗) 均能有效的使雜混性蛋白質由低密度脂蛋白中解離出來至背景值或接近背景值的範圍。這些結果顯示在酸性情況下雜混性蛋白質可釋出其所結合的低密度脂蛋白，一如我們在體內或體外所觀察到的低密度脂蛋白受體間的反應。

在雜混性蛋白質結合，清洗，和與山葵過氧化酶共軛之抗人類輸鐵蛋白抗體之後，接下來在 EDTA (在 EDTA 中所進行的山葵過氧化酶之後的清洗步驟) 或酸性情況下 (在 pH 5.2 中所進行的山葵過氧化酶之後的清洗步驟) 所進行之清洗步驟均只能部分有效的將雜混性蛋白質由低密度脂蛋白中解離出來。因此，這些結果顯示 pH 和 EDTA 的效用乃在於解離雜混性蛋白質：低密度脂蛋白之複合物，而不是抑制山葵過氧化酶共軛之抗人類輸鐵蛋白抗體與先前形成之雜混性蛋白質：低密度脂蛋白之複合物中輸鐵蛋白區域的結合。再者，這些結果也建議抗體與雜混性蛋白質中蛋白受體區域有一立體效應 (增加低密度脂蛋白之親和力)，或造成解離藥劑之立體阻礙 (增加低密度脂蛋白：雜混性蛋白質複合物在解離狀況下的安定度)。

五、發明說明 (77)

範例 11 表現於含有完整低密度脂蛋白受體與輸鐵蛋白結構區域的哺乳類動物細胞中的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質

此範例所描述的工作顯示一個低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質會同時含有低密度脂蛋白受體與輸鐵蛋白結構區域，此乃基於所使用的專一性質的單株抗體而下的結論，顯示這些結構區域仍分別保有其原來的功能與和低密度脂蛋白受體及輸鐵蛋白結合的性質。

藉含有人類低密度脂蛋白受體 5' 端 cDNA 順序 (374 個氨基酸之配體結合區域) 在其 3' 端與整個成熟之人類輸鐵蛋白基因序碼互相融合在一起之融合基因，將低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質表現於哺乳類動物細胞中。為展示此雜混性蛋白質仍保有天然之低密度脂蛋白受體與輸鐵蛋白蛋白質間的結構特性，我們也險示了低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質種類可以藉兩種不同之單株抗體： HTF-14 (抗人類輸鐵蛋白， Biodesign H61061M) 和 C7 (抗人類低密度脂蛋白受體， Amersham RPN 537) 將其免疫沉澱出來。

五、發明說明 (78)

已知單株抗體 HTF-14 會與人類輸鐵蛋白上靠近或和輸鐵蛋白受體結合區域相同之專一性構形結合。單株抗體 HTF-14 與低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質之結合乃是此雜混性蛋白質中輸鐵蛋白區域完整性的證明，此結果也顯示低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之構形具有與輸鐵蛋白受體結合的活性。範例 12 之結果顯示低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的確會與人類輸鐵蛋白受體結合。

已知單株抗體 C7 會與人類低密度脂蛋白受體上靠近或和低密度脂蛋白（配體）結合區域形成專一性的結合。單株抗體 C7 與低密度脂蛋白受體的結合會抑制低密度脂蛋白之結合，同樣的，低密度脂蛋白與低密度脂蛋白受體的結合也會抑制單株抗體 C7 之結合。單株抗體 C7 與低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質之結合乃是此雜混性蛋白質中低密度脂蛋白受體區域完整性的證明，此結果也顯示低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之構形具有與低密度脂蛋白結合的活性。其它之範例（範例 9）也顯示低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的確會與人類低密度脂蛋白結合。

由以 pSV2neo（陰性控制組）或同時以

五、發明說明 (77)

pEFBPS/LDLrTF1.S 和 pSV2neo 轉移感染之正常人類纖維母細胞株所獲得的 1 ml 培養基中，先以內含 1% NP-40 溶於 TBS 的山羊抗老鼠免疫球蛋白真菌凝膠珠子 (Hyclone EGK-1060) 作澄清處理，接著加入單株抗體 HTF-14，單株抗體 C7 或一不相關之抗體 (抗人類因子 IX，Hematologic Technologies, Inc. AHIX-5041)。在抗體結合後，以山羊抗老鼠免疫球蛋白真菌凝膠珠子將抗原 - 抗體複合物沉澱出來。清洗這些珠子以移去未結合之物質，並將蛋白質以含有 SDS 沸騰的 SDS/PAGE 緩衝液洗出。將洗出液在 SDS/PAGE (凝膠) 上作電泳，並轉移至硝基纖維素的濾紙上 (Scheicher and Schuell BA-S-85)，以內含 0.05% Tween-20 和 5% (w/v) 脫脂奶粉之 TBS 緩衝液作用數小時。以山葵過氧化酶共軛羊抗人類輸鐵蛋白 (Biodesign K90070P) 處理這些濾紙，可偵測到含有人類輸鐵蛋白區域之蛋白質，包括那些能被 HTF-14 認得的蛋白質。抗體之結合反應乃是在含有 0.05% Tween-20 之 TBS 緩衝液中進行。結合步驟後，以含有 0.05% Tween-20 之 TBS 緩衝液清洗這些濾紙數次並以 TBS 清洗 2 次。在以共軛了化學螢光藥劑的山葵過氧化酶 (Amersham RPN 2106) 加以 (圖 9)。在第 1 道中為 1ml 由陰性控制組 (經 SV2neo 轉移感染) 中所得之培養基以單株抗體 HTF-14 所作的免疫沉澱。並未發現有

五、發明說明(80)

任何雜混性蛋白質的存在。當以 2% 脫脂奶粉進行結合反應時並未發現如第 1 道中所存在的物質，因此不可能是與此雜混性蛋白質相關的物質。在第 2 道中為以 pEFBPS/LDLrTF1.S 和 pSV2neo 轉移感染之正常人類纖維母細胞株所獲得的 1 ml 培養基，以單株抗體 HTF-14 所作的免疫沉澱。可以很明顯的發現有一個主要的蛋白質（約 116 kd）和一較次要的蛋白質（約 110 kd）存在。次要之蛋白質乃衍生自主要蛋白質，其低密度脂蛋白結質酶裂解而來。在第 3 道中為同樣用於在第 2 道中的培養基，但以單株抗體 C7 進行免疫沉澱。可以很明顯的發現有一個主要的蛋白質（約 116 kd），其分子量大小與經單株抗體 HTF-14 所作沉澱出來的類似。此表示一個單獨的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質同時含有低密度脂蛋白受體區域（可以單株抗體 C7 沉澱出來）和輸鐵蛋白區域（在西方點墨法中以單株抗體 HTF-14 加以偵測）。單株抗體 C7 並不能沉澱在第 3 道中所觀察到的次要蛋白質，因其雖仍保有完整的輸鐵蛋白區域但缺乏完整的低密度脂蛋白受體區域。在第 4 道中為同樣用於在第 2 及第受體或輸鐵蛋白結合之人類因子 IX 的專一性單株抗體來進行免疫沉澱。正如預期的，低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質無法被此單株抗體所沉澱。

五、發明說明 (81)

範例 12. 在體外低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質與人類肝臟細胞上輸鐵蛋白受體之結合

藉著與肝臟細胞表面之輸鐵蛋白受體 (TFR) 的結合，來測試以範例 8 所述之方法純化的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的功能性質。如本範例所示，低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質會妨礙輸鐵蛋白與細胞之結合，表示其會結合在肝臟細胞表面之輸鐵蛋白受體上。Hep G2 細胞為一種很有用的體外肝細胞分析系統，因為其能合成大部分正常人體肝細胞所製造的蛋白質，包括輸鐵蛋白受體。

將 Hep G2 細胞 (ATCC # HB 8065) 培養在含有 DMEM (Cellgro 50-013)，10% 牛血清 (Hyclone A-1111)，各 50 units/ml 之盤尼西林和鏈黴素 (Gibco 15070-014)，來自 Amersham (IM 194)，專一性活性為 700-800 Ci/mmol 之放射性輸鐵蛋白配體 (3-[¹²⁵I]iodotyrosyl)-transferrin (人類))。125 碘 - 含飽和鐵之輸鐵蛋白溶於內含 80% DMEM (Cellgro 50-013)，0.5% 不含蛋白質酶之牛白蛋白 (Sigma A-3059)，和 20% 磷酸緩衝液 (PBS, GibcoBRL 14200-026)。以 PBS 稀釋放射性輸鐵蛋白抑制劑的結合並加入結合溶液中以取代 PBS 的

五、發明說明 (82)

組成。在本範例中抑制效果。

將 Hep G2 細胞以每一孔洞 2×10^5 細胞的密度，在 6 個孔洞的組織培養盤中（直徑 35 mm）培養 3 天。之後以 DMRM 清洗細胞 1 至 2 次並接著以 5 ml DMEM 在 37 °C 下培養 30 分鐘。此清洗及培養步驟可幫助將由牛血清所帶進的血清成分移去，包括輸鐵蛋白，其可能會與輸鐵蛋白受體結合而干擾了此結合分析。在 30 分鐘的培育後，將培養盤置於冰上並將培養基拿掉。在每一孔洞中加入冰的結合溶液並在 4 °C 下緩緩搖動或震盪 2 小時（結合期限）。

2 小時之結合期限後，將培養盤置於冰上且接下來的清洗步驟中均在冰上進行。為了將未結合之標示物移除，每一孔洞均以內含 0.5% BSA 之 PBS 清洗 3 次，並以 PBS 另外再洗 3 次。之後以 1 ml 之 0.1 N NaOH 將每一孔洞中的細胞水解並將水解液轉移至 12 x 75 mm 的聚苯乙烯管中（Falcon 2052）。再以額外 1 ml 之 0.1 N NaOH 清洗這些孔洞中的細胞，再將其加到上述之聚苯乙烯管中。藉著所釋出之 γ 射線在 γ 計數器（Beckman）中定量水解液中存在的放射性輸鐵蛋白。由於在結合期間將細胞置於冰上會阻隔經標示的輸鐵蛋白被帶進細胞內，所測得之 γ 射線表示在結量。

五、發明說明 (83)

將水解液中和並以 BCA 蛋白質分析法 (Pierce 23225G) 分析蛋白質的總量，以牛白蛋白做為標準物。放射性總量 (以 cpm 表示) 與蛋白質總量 (以 mg 表示) 的比值為配體結合能力的一種很好的指標。

在 Hep G2 細胞中輸鐵蛋白與輸鐵蛋白受體之解離平衡常數 (k_d) 為 7 nM (Trowbridge, I. S. et al., Biochem. Pharmacol., 33:925-993 (1984))。如果未經標示的輸鐵蛋白以 7 nM 的濃度存在作為 125 碘 - 輸鐵蛋白與輸鐵蛋白受體結合的一種抑制劑，則配體結合力 (in cpm/mg) 將會被抑制約 50%。再者，如果任何未經標示的配體 (以約 7 nM 的濃度存在) 可以類似輸鐵蛋白之親和力 (亦即，低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白) 與輸鐵蛋白受體結合，則可觀察到約 50% 之抑制。在高濃度的未標示配體中 (亦即較 k_d 高出約 50 或 100 倍)，幾乎所有受體結合位置均已被佔滿，且唯一能與細胞結合的配體應是那些結合在非專一性位置上的 (亦即不是輸鐵蛋白受體的位置)。如果一個未標示配體不會與輸鐵蛋白受體結合，則結合抑制不會發生。因此，人類低密度脂蛋白，其不會直接與輸鐵蛋白受體作用，因此不會抑制 ¹²⁵ 碘 - 輸鐵蛋白與輸鐵蛋白間的結合。

五、發明說明 (84)

此種分析方法已被用來顯示低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質，能對在 Hep G2 細胞中輸鐵蛋白受體與 125 碘 - 輸鐵蛋白間表現出競爭性抑制，因此能專一性的與人類輸鐵蛋白受體結合。

在一實驗中，將 Hep G2 細胞在無抑制劑或含飽和鐵之輸鐵蛋白或純化之低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質 [由能表現低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的中國大類鼠卵巢細胞中純化而來，將人類低密度脂蛋白受體氨基酸順序 1 至 395 與人類輸鐵蛋白氨基酸順序 20 至 698 的部分融合 (參閱範例 3)] 存在下，來評估這些蛋白質的抑制效果。分別在 5 nM，50 nM，或 500 nM 內含 10μ M 氯化鐵的含飽和鐵之輸鐵蛋白及雜混性蛋白質中測試，以進一步使輸鐵蛋白或低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質中的鐵結合位置達到飽和。結果顯示於表 2

表 2 125 碘 - 含飽和鐵之輸鐵蛋白 (a) 與 Hep G2 細胞的結合 (b) (在水解液中每 mg 蛋白質所結合之 cpm)

抑制劑	0 nM	5 nM	500 nM	500 nM/ 10μ M

FeCl₃

五、發明說明 (85)

無	62,85	-	-	-
飽和鐵	-	33,602	1,026	1,160
之輸鐵		(53%)	(2%)	(2%)
蛋白				
低密度	-	73,982	3,363	2,724
脂蛋白		(117%)	(5%)	(4%)
受體 / 輸				
鐵蛋白				
之雜混				
性蛋白質				

括符後的數字代表已結合的數值與相對於無抑制劑時結合數值的百分比 (設為 100%)。

a 0.32 nM 之標示輸鐵蛋白

b 以 2×10^5 濃度將細胞種植於直徑 35 mm 的培養盤上

這些結果顯示飽和鐵之輸鐵蛋白與低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質兩者均能有效的抑制經標示之輸鐵蛋白的結合。因此此配體結合分析顯示低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質，能對在 Hep G2 細胞中輸鐵蛋白受體與 125 碘 - 輸鐵蛋白間表現出競爭性抑制，因此能專一性的與人類輸鐵蛋白

五、發明說明 (86)

受體結合。

一種類似的分析方法也可用來顯示此雜混性蛋白質也能和存在於人類纖維母細胞及其它型式之細胞上的輸鐵蛋白受體結合。

範例 13. 在體外分析中將低密度脂蛋白運送至人類肝臟細胞內

以前述範例所純化出來的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質，可測試其與人類低密度脂蛋白及人類輸鐵蛋白受體結合的能力，藉由輸鐵蛋白受體所媒介的途徑來促進細胞吸收低密度脂蛋白。再者，由此雜混性蛋白質所支持的額外的低密度脂蛋白的吸收可被輸鐵蛋白競爭性的加以抑制。

為定量在 Hep G2 細胞中低密度脂蛋白的吸收，將細胞曝露於結合液中，清洗，水解，並以類似範例 12 中所述分析輸鐵蛋白受體結合的分析方法分析放射性強度和總細胞量。然而，在此分析法中，使用經放射性標示的低密度脂蛋白，並在 37 °C 的培育結合後，分析其被細胞吸收的情形。在培育期間，標示的低密度脂蛋白與低密度脂蛋白受體結合並經由正常的低密度脂蛋白受

五、發明說明(89)

體途徑進入細胞。此外，標示的低密度脂蛋白也可與此雜混性蛋白質結合，且此低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白 - 低密度脂蛋白之複合物在與輸鐵蛋白受體結合後經由輸鐵蛋白受體所媒介之途徑進入細胞。因此示的低密度脂蛋白與低密度脂蛋白受體及此雜混性蛋白質兩者的結合，而人類含飽和鐵之輸鐵蛋白僅能抑制低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白 - 低密度脂蛋白之複合物與輸鐵蛋白受體之結合。

將大於每 ng 低密度脂蛋白 200 cpm 之放射性標示 (^{125}I) 人類低密度脂蛋白 (Biomedical Technologies, Inc.; BT-913R) 稀釋於內含 80% DMEM, 0.5% 無蛋白質酶的牛白蛋白, 和 20% PBS 中。將能抑制放射性標示之人類低密度脂蛋白吸收及結合的抑制劑以 PBS 稀釋並加入此培養基中以取代 PBS 中的組成。在本範例中，在有或無此雜混性蛋白質或未標示之抑制劑如含飽和鐵之輸鐵蛋白 (Sigma T-3400) 或低密度脂蛋白 (Biomedical Technologies, Inc. BT-903) 的存在下測量 ^{125}I 低密度脂蛋白被吸收進入細胞的速度。

將 Hep G2 細胞以每一孔洞 2×10^5 細胞的密度，在 6 個孔洞的組織培養盤中 (直徑 35 mm) 培養 3

五、發明說明 (88)

天，培養基中含 DMEM (Cellgro 50-013)，10% 牛血清 (Hyclone A-1111)，各 50 units/ml 之盤尼西林和鏈黴素 (GibcoBRL 15070-014)。之後以 DMRM 清洗細胞 1 至 2 次並接著以 5 ml DMEM 在 37 °C 下培養 30 分鐘。此清洗及培養步驟可幫助將由牛血清所帶進的血清成分移去，包括輸鐵蛋白，其可能會與輸鐵蛋白受體結合而干擾了此結合分析。在 30 分鐘的培育後，將培養盤置於冰上並將培養基拿掉代之以 1 ml 之結合溶液。將培養盤置於 37 °C 下標準的組織培育。

在吸收期間之後，將培養盤置於冰上且接下來的清洗步驟中均在冰上進行。為了將未結合之標示物移除，每一孔洞均以內含 0.5% BSA 之 PBS 清洗 3 次，並以 PBS 另外再洗 3 次。之後以 1 ml 之 1 N NaOH 將每一孔洞中的細胞水解並將水解液轉移至 12 x 75 mm 的聚苯乙烯管中 (Falcon 2052)。再以額外 1 ml 之 1 N NaOH 清洗這些孔洞中的細胞，再將其加到上述之聚苯乙烯管中。藉著所釋出之 γ 射線在 γ 計數器 (Beckman) 中定量水解液中存在的放射性輸鐵蛋白。由於細胞會將經標示的低密度脂蛋白以胞飲作用帶進細胞內，所測得之 γ 射線表示在結合期終了時在細胞表面具標示的低密度脂蛋白或其在細胞內代謝物的含量，以及

五、發明說明 (89)

在吸收期終了細胞表面上完整的放射性標示低密度脂蛋白之含量。將水解液中和並以 BCA 蛋白質分析法 (Pierce 23225G) 分析蛋白質的總量。放射性總量 (以 cpm 表示) 與蛋白質總量 (以 mg 表示) 的比值為被攜收的低密度脂蛋白的一種很好的指標。此種分析方法已被用來顯示低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質, 能對在 Hep G2 細胞中具放射性標示低密度脂蛋白在細胞內的吸收, 而不具放射性標示之輸鐵蛋白與低密度脂蛋白間可作為此促進細胞吸收力的一種競爭性抑制。

可藉著已知的方法測量經胞飲作用進入細胞之低密度脂蛋白對細胞內各種機轉及基因表現的影響來觀測細胞吸收低密度脂蛋白的情形 (Goldstein, J. L. et al., Meth. Enzymol., 98: 241-260 (1983))。將膽固醇直接由低密度脂蛋白中釋放出來或藉著水解膽固醇酯鍵會導致調控性膽固醇量的增加, 此舉不僅會抑制 3- 羥基 -3- 甲基戊二酸輔助酶 A 還原酶 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase) 表現基因的表現, 同時也會活化乙醯輔助酶: 膽固醇氧 - 醯基轉移酶 acetyl CoA: chloesterol O-acyltransferase (ACAT) 基因的表現。由於 3- 羥基 -3- 甲基戊二酸輔助酶 A 還原酶能催

五、發明說明(90)

化在膽固醇生合成中的速率限制步驟，並下調控此酵素基因的表現，使得當由於低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白的刺激而使胞內膽固醇量上升時，胞內本身膽固醇的合成速率會下降。此外，能酯化過多自由的膽固醇使其能以酯化膽固醇油滴（主要是酯化之膽固醇油酸）的形式儲存於細胞質中的酵素 ACAT，其基因表現的增加，會導致細胞儲存膽固醇能力的上升。最後，低密度脂蛋白受體的合成由於調節性自由膽固醇量的增加而受到下調控。因此，這三種由於增加的自由膽固醇量對膽固醇代謝的二級影響，為保護組織不受過量膽固醇制。

雜混性蛋白質在輸鐵蛋白所媒介的胞飲作用中作用所引發的低密度脂蛋白的吸收，其所釋出的膽固醇並不會像低密度脂蛋白受體對一樣對輸鐵蛋白受體造成下調控。這種下調控的現象會使得胞內膽固醇量下降（此乃由於較低的低密度脂蛋白受體所造成的吸收下降），此又會使得膽固醇的合成增加（由於 3- 羥基 -3- 甲基戊二酸輔助酶 A 還原酶活性增加之故）並降低細胞儲存膽固醇的能力（由於乙醯輔助酶：膽固醇氧 - 醯基轉移酶活性減低之故）。在此雜混性蛋白質存在下藉著輸鐵蛋白受體所媒介的胞飲作用可連續性的將低密度脂蛋白吸收進入細胞內，使得 3- 羥基 -3- 甲基戊二酸輔助酶 A 還原酶的活性受到連續性的抑制而乙醯輔助

五、發明說明(91)

酶：膽固醇氧 - 醯基轉移酶活性則受到連續性的活化。因此，在跳過正常低密度脂蛋白之吸收管道，分別降低合成並增加儲存，可將細胞內膽固醇量維持一段長時期，而達到降低血清中全部膽固醇的含量。

範例 14 低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質對老鼠體內膽固醇含量的影響

為測定低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質在一體內模型系統中是否具有抗高膽硬脂血症的效果，以靜脈注射的方式將此純化的雜混性蛋白質注入並在注射後的不同時間測量膽固醇的含量。由於外來蛋白質如低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白的使用，其在動物體內循環的半生期很有限，一次的注射只能短暫的降低低密度脂蛋白膽固醇，一旦注射之蛋白質被由血液中清除後膽固醇的量便會回升。然而，藉由一緩慢釋放的裝置或基因治療的方式（將能分泌雜混性蛋白質的細胞植入體內）可連續性的釋放此雜混性蛋白質，以達到對低密度脂蛋白膽固醇長期或永久性的影響。

Ishibasji (J. Clin. Invest. 92:883-893 (1993)) 等人描述了一種不含低密度脂蛋白受體的老鼠，其體內總膽固醇量和低密度脂蛋白膽固醇與其它品

五、發明說明(92)

種的實驗性老鼠相較下均較高。此品種的老鼠，含有低密度脂蛋白受體基因的同源性缺失，被用來做低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白在哺乳類動物中之生物影響的體內研究系統。

在正常的老鼠體內，大部分的循環膽固醇均由高密度脂蛋白攜帶，而在人類體內，大部分的循環膽固醇則由低密度脂蛋白攜帶。但是與人類不同的是，70% 老鼠體中的低密度脂蛋白乃與 apoB-48 一起，此乃是一缺乏低密度脂蛋白受體結合區域的不完整去脂脂蛋白 B，其它 30% 的老鼠體中的低密度脂蛋白則與含有低密度脂蛋白受體結合區域的 apoB-100 一起。相反的，98% 之人類低密度脂蛋白則含 apoB-100。以重量百分比來說，老鼠低密度脂蛋白含 9.5% 無酯化的膽固醇，23.5% 膽固醇酯類，和 20.5% 蛋白質；人類低密度脂蛋白含 9.2% 無酯化的膽固醇，37% 膽固醇酯類，和 22% 蛋白質 (Chapman, M., J. Meth. Enzymol. 128: 70-143 (1986))。

低密度脂蛋白受體基因的同源性缺失影響乃是喪失移除低密度脂蛋白的能力 (apoB-100)，導致較高的低密度脂蛋白含量。不含低密度脂蛋白受體的同源性雌鼠其體內膽固醇總量較其它同源性正常野生型老鼠控制

五、發明說明 (93)

組高出 139 mg/dl (Ishibasji et al., J. Clin. Invest. 92:883-893 (1993))。由於有功能的低密度脂蛋白受體會和 apoB-100 低密度脂蛋白，而非 apoB-48 低密度脂蛋白反應，且假設過剩之 139 mg/dl 的膽固醇均在 apoB-100 低密度脂蛋白內，則每隻老鼠體內 1 ml 的血清至少約含 1.39 mg 以 apoB-100 低密度脂蛋白形式存在的膽固醇。假設膽固醇佔低密度脂蛋白重量的 33%，且此部分之蛋白質重約 20.5%，apoB-100 之分子量為 514 kd，則 1.39 mg 的膽固醇總量相當於每隻老鼠體內含 1.68 nmol 的 apoB-100 (每一低密度脂蛋白粒子含一 apoB-100)。對和低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之單一分子的結合 (其不含碳水化物的分子量為 116.3 kd)，1.68 nmol 的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白相當於每隻老鼠 195 μ g 有低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白。欲在不含低密度脂蛋白受體的同源性老鼠體內傳送相當於，在本範例中，10% 之低密度脂蛋白 (apoB-100) 粒子 (0.168 nmol) 須在每隻老鼠體內注射 195 μ g

為建立總膽固醇，高密度脂蛋白膽固醇，和低密度脂蛋白膽固醇之基礎含量資料，在注射此雜混性蛋白質或陰性控制組之前，在麻醉的動物上進行眼眶後取血的手術。在每一隻動物身上，由凝集的血中分離血清並以

五、發明說明(94)

結合了終點比色的酵素分析法 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 來測試總膽固醇和高密度脂蛋白膽固醇的含量。總膽固醇濃度 mg/dl 藉手操作方式於 96-孔洞的微量計數盤上定出。以生理食鹽水稀釋血清和膽固醇標準物，每一樣品中取 $10\ \mu\text{l}$ 並加入 96-孔洞的微量計數盤上之二重覆或三重覆孔洞。在每一孔洞中加入 $200\ \mu\text{l}$ 之膽固醇藥劑 (Sigma 352-20) 並在 $37\ ^\circ\text{C}$ 下培育 10 分鐘，之後以微量計數器讀取 $490\ \text{nm}$ 下的吸光值。在本範例中吸光值在 0 至 $200\ \text{mg/dl}$ (以膽固醇標準物來作標準曲線；Sigma C-0534) 間呈直線，並可輕易的以稀釋方法使其落於此範圍內。

高密度脂蛋白膽固醇的含量 (mg/dl) 在以高密度脂蛋白膽固醇藥劑 (Sigma 352-3) 將低密度脂蛋白及非常低密度脂蛋白沉澱出來後，以總膽固醇將其定量 (操作法如上述) 。將血清與十分之一體積的高密度脂蛋白膽固醇藥劑混合並使其於室溫下反應 5 分鐘。以高速離心 2 分鐘後，將一部分的上清液移除，以正常生理食鹽水稀釋，並以上述方法分析總膽固醇含量。為獲得血清中原來高密度脂蛋白膽固醇的含量，將分析的上清液中之總膽固醇含量乘以 1.1 倍以反應添加高密度脂蛋白膽固醇藥劑時所帶進的 10% 體積的增加。將由總膽固醇量扣除所得之高密度脂蛋白膽固醇量即為

五、發明說明(95)

低密度脂蛋白的含量。

在決定出注射前血清膽固醇的基礎量後，將 50 μ l 適量的低密度脂蛋白 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質（溶於磷酸緩衝液中；PBS）注入麻醉的不含低密度脂蛋白受體的老鼠尾部靜脈中。為評估麻醉和注射的效果，將 50 μ l 之 PBS 注入另一隻不含低密度脂蛋白受體的老鼠體內作為陰性控制組。為決定輸鐵蛋白受體與施用之輸鐵蛋白區域是否會影響脂蛋白的代謝，將 50 μ l 內含飽和鐵輸鐵蛋白之 PBS，以和低密度脂蛋白 / 輸鐵蛋白同樣的濃度，注入不含低密度脂蛋白受體的老鼠中，作為另一個陰性控制組。人類飽和鐵輸鐵蛋白含有與低密度脂蛋白 / 輸鐵蛋白相同數目的輸鐵蛋白區域低密度脂蛋白結合。此種陰性控制組可使由於注射相當量之人類蛋白質或人類輸鐵蛋白抗原所造成的任何影響能夠被加以評估。

在注射雜混性蛋白質或陰性控制組物質後，再次偵對樣品之體積與頻率在適宜的時間進行眼眶後取血的手術。由注射後所取的血中分離血清並分析總膽固醇和高密度脂蛋白膽固醇的含量。低密度脂蛋白膽固醇含量的計算乃是膽固醇和高密度脂蛋白膽固醇含量的差。以此方法，可對低密度脂蛋白 / 輸鐵蛋白降低特定之血清

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(96)

膽固醇的影響加以定量。

也可由注射後所取的血中分析仍留在循環系統中低密度脂蛋白 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的量。可使用人類輸鐵蛋白 ELISA 試驗 (範例 6) , 因為此試驗中所用的抗體不會與老鼠輸鐵蛋白作交互反應。測量此雜混性蛋白質在老鼠血清中消失的速率能預測此雜混性蛋白質在循環系統中的半生期。

可研究特定雜混性蛋白質對脂蛋白移除速率的影響。Ishibashi 等人 (J. Clint. Incest. 92: 883-893 (1993)) 曾報告老鼠體內低密度脂蛋白受體的消失, 會明顯的降低注入之放射性低密度脂蛋白或非常低低密度脂蛋白被移除的速率, 但不會影響注入之放射性標示高密度脂蛋白的清除速率。在注入雜混性蛋白質 (注射或連續性的灌洗) 之後的清除, 可以此方式研究, 以定量由於使用此雜混性蛋白質後所增加的脂蛋白清除速率。

除了使用不含低密度脂蛋白受體的老鼠外, 也可使用具有有缺陷的低密度脂蛋白受體及由於低密度脂蛋白代謝異常而引起高膽硬脂血症的 Watanabe 兔子, 來評估在體內低密度脂蛋白 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質對

五、發明說明(99)

膽固醇含量的影響。

與本發明相當的實驗

那些在此領域中的專精人士應可體認，或能確定使用一些較一般性的實驗方法，許多實驗亦可與本發明中所述的特定之具體化實例相當。下列所申請之專利範圍目的即在涵蓋此類與本發明相當的實驗。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱：)

用於將選定物質運輸入細胞之雜混性蛋白質

能將存在於細胞外液體中，如血液或淋巴液，之選定物質運送至細胞內的雜混性蛋白質，使用此雜混性蛋白質對選定物質作定量分析，雜混性蛋白質之 DNA 序列，帶有此雜混性蛋白質 DNA 之基因表現質粒；經基因修飾而含有此雜混性蛋白質 DNA，或能表現，或能分泌此雜混性蛋白質之哺乳類動物細胞；製造此雜混性蛋白質的方法；分離此雜混性蛋白質的方法；使用此雜混性蛋白質來分析選定物質的方法；以及藉著使用此雜混性蛋白質來降低細胞外選定物質濃度，使得選定物質能被運送至細胞內的方法。

英文發明摘要 (發明之名稱：)

CHIMERIC PROTEINS FOR USE IN TRANSPORT OF A
SELECTED SUBSTANCE INTO CELLS

Abstract of the Disclosure

Chimeric proteins useful in transporting a selected substance present in extracellular fluids, such as blood or lymph, into cells; quantitative assays for the selected substance using chimeric proteins; DNA encoding the chimeric proteins; plasmids which contain DNA encoding the chimeric proteins; mammalian cells, modified to contain DNA encoding the chimeric proteins, which express and, optionally, secrete the chimeric proteins; a method of producing the chimeric proteins; a method of isolating the chimeric proteins; a method of using the chimeric proteins to assay the selected substance; and a method of reducing extracellular levels of the selected substance through administration of the chimeric protein, which results in transport of the selected substance into cells.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

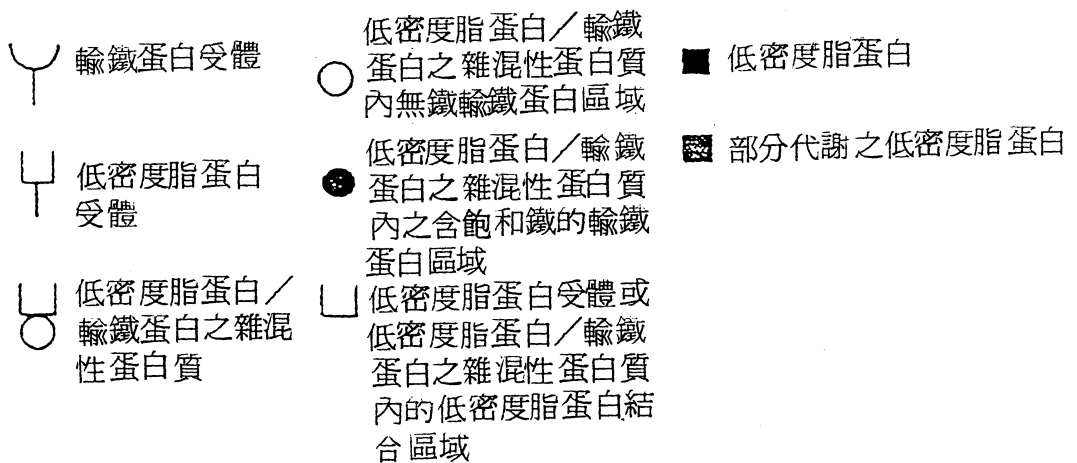
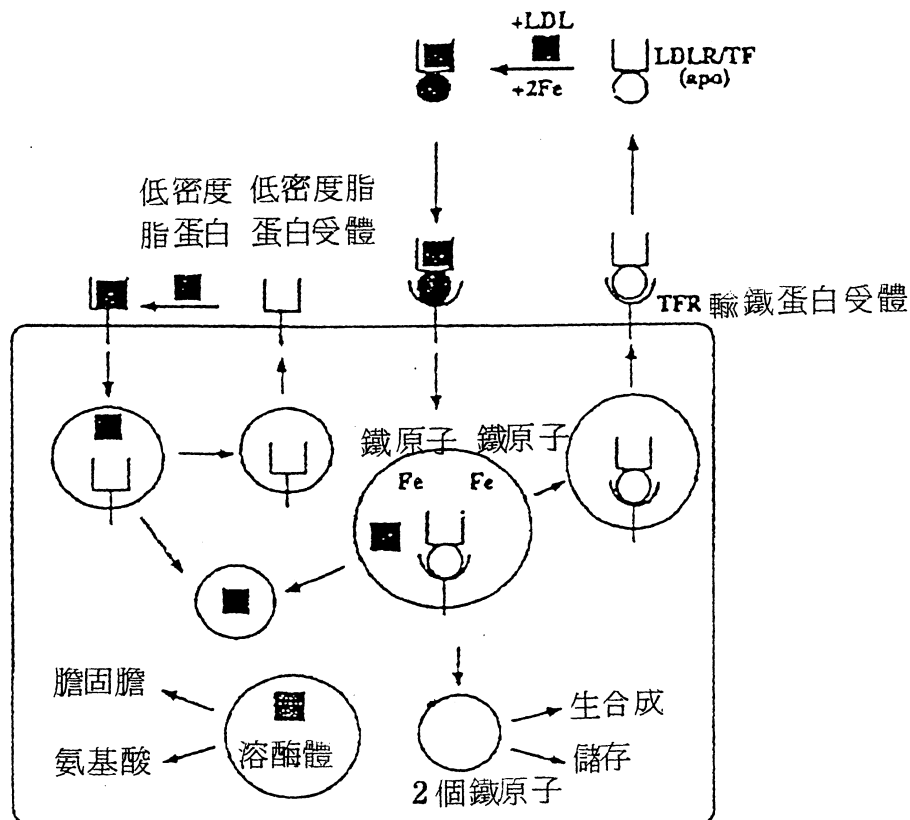
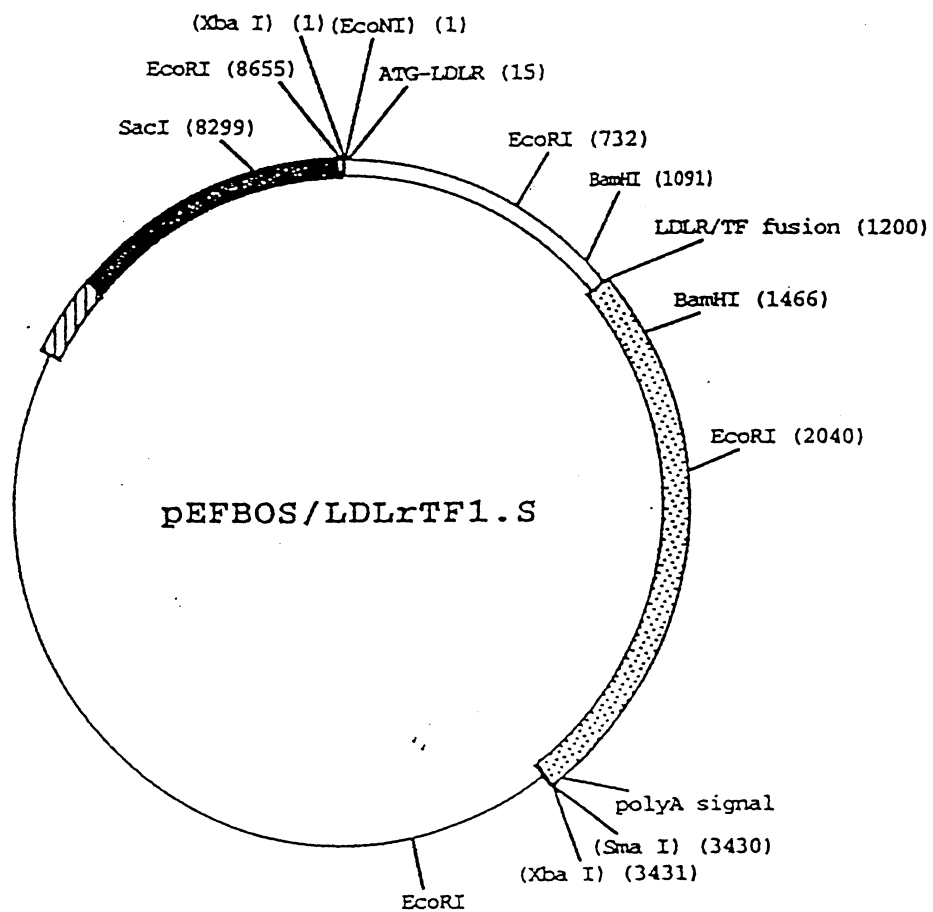


圖 1



說明：

■■■ SV 40 之基因順序 (位置 5092-160) □ 低密度脂蛋白之 cDNA 順序
 ■ EF-1α ■ 輸鐵蛋白之 cDNA 順序 — pUC 119

圖 2

1 AGAGGCTGCGAGC ATG GGG CCC TGG GGC TGG AAA TTG CGC TGG ACC
 1▶Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr

47 GTC GCC TTG CTC CTC GCC GCG GCG GGG ACT GCA GTG GGC GAC AGA
 12▶Val Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg

92 TGT GAA AGA AAC GAG TTC CAG TGC CAA GAC GGG AAA TGC ATC TCC
 27▶Cys Glu Arg Asn Glu Phe Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser

137 TAC AAG TGG GTC TGC GAT GGC AGC GCT GAG TGC CAG GAT GGC TCT
 42▶Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser

182 GAT GAG TCC CAG GAG ACG TGC TTG TCT GTC ACC TGC AAA TCC GGG
 57▶Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly

227 GAC TTC AGC TGT GGG GGC CGT GTC AAC CGC TGC ATT CCT CAG TTC
 72▶Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn Arg Cys Ile Pro Gln Phe

272 TGG AGG TGC GAT GGC CAA GTG GAC TGC GAC AAC GGC TCA GAC GAG
 87▶Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp Asn Gly Ser Asp Glu

317 CAA GGC TGT CCC CCC AAG ACG TGC TCC CAG GAC GAG TTT CGC TGC
 102▶Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp Glu Phe Arg Cys

362 CAC GAT GGG AAG TGC ATC TCT CGG CAG TTC GTC TGT GAC TCA GAC
 117▶His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys Asp Ser Asp

407 CGG GAC TGC TTG GAC GGC TCA GAC GAG GCC TCC TGC CCG GTG CTC
 132▶Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro Val Leu

452 ACC TGT GGT CCC GCC AGC TTC CAG TGC AAC AGC TCC ACC TGC ATC
 147▶Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys Ile

497 CCC CAG CTG TGG GCC TGC GAC AAC GAC CCC GAC TGC GAA GAT GGC
 162▶Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly

542 TCG GAT GAG TGG CCG CAG CGC TGT AGG GGT CTT TAC GTG TTC CAA
 177▶Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln

587 GGG GAC AGT AGC CCC TGC TCG GCC TTC GAG TTC CAC TGC CTA AGT
 192▶Gly Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser

632 GGC GAG TGC ATC CAC TCC AGC TGG CGC TGT GAT GGT GGC CCC GAC
 207▶Gly Glu Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp

677 TGC AAG GAC AAA TCT GAC GAG GAA AAC TGC GCT GTG GCC ACC TGT
 222▶Cys Lys Asp Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys

722 CGC CCT GAC GAA TTC CAG TGC TCT GAT GGA AAC TGC ATC CAT GGC
 237▶ Arg Pro Asp Glu Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly

 767 AGC CGG CAG TGT GAC CGG GAA TAT GAC TGC AAG GAC ATG AGC GAT
 252▶ Ser Arg Gln Cys Asp Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp

 812 GAA GTT GGC TGC GTT AAT GTG ACA CTC TGC GAG GGA CCC AAC AAG
 267▶ Glu Val Gly Cys Val Asn Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys

 857 TTC AAG TGT CAC AGC GGC GAA TGC ATC ACC CTG GAC AAA GTC TGC
 282▶ Phe Lys Cys His Ser Gly Glu Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys

 902 AAC ATG GCT AGA GAC TGC CGG GAC TGG TCA GAT GAA CCC ATC AAA
 297▶ Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys

 947 GAG TGC GGG ACC AAC GAA TGC TTG GAC AAC AAC GGC GGC TGT TCC
 312▶ Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Asn Gly Gly Cys Ser

 992 CAC GTC TGC AAT GAC CTT AAG ATC GGC TAC GAG TGC CTG TGC CCC
 327▶ His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro

 1037 GAC GGC TTC CAG CTG GTG GCC CAG CGA AGA TGC GAA GAT ATC GAT
 342▶ Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Asp Ile Asp

 1082 GAG TGT CAG GAT CCC GAC ACC TGC AGC CAG CTC TGC GTG AAC CTG
 357▶ Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys Val Asn Leu

 1127 GAG GGT GGC TAC AAG TGC CAG TGT GAG GAA GGC TTC CAG CTG GAC
 372▶ Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln Leu Asp

 1172 CCC CAC ACG AAG GCC TGC AAG GCT GTG GTC CCT GAT AAA ACT GTG
 387▶ Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Val Pro Asp Lys Thr Val

 1217 AGA TGG TGT GCA GTG TCG GAG CAT GAG GCC ACT AAG TGC CAG AGT
 402▶ Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser

 1262 TTC CGC GAC CAT ATG AAA AGC GTC ATT CCA TCC GAT GGT CCC AGT
 417▶ Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser

 1307 GTT GCT TGT GTG AAG AAA GCC TCC TAC CTT GAT TGC ATC AGG GCC
 432▶ Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr Leu Asp Cys Ile Arg Ala

 1352 ATT GCG GCA AAC GAA GCG GAT GCT GTG ACA CTG GAT GCA GGT TTG
 447▶ Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ala Gly Leu

 1397 GTG TAT GAT GCT TAC TTG GCT CCC AAT AAC CTG AAG CCT GTG GTG
 462▶ Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu Lys Pro Val Val

 1442 GCA GAG TTC TAT GGG TCA AAA GAG GAT CCA CAG ACT TTC TAT TAT
 477▶ Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr

1487 GCT GTT GCT GTG GTG AAG AAG GAT AGT GGC TTC CAG ATG AAC CAG
 492▶ Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met Asn Gln

 1532 CTT CGA GGC AAG AAG TCC TGC CAC ACG GGT CTA GGC AGG TCC GCT
 507▶ Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala

 1577 GGG TGG AAC ATC CCC ATA GGC TTA CTT TAC TGT GAC TTA CCT GAG
 522▶ Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu

 1622 CCA CGT AAA CCT CTT GAG AAA GCA GTG GCC AAT TTC TTC TCG GGC
 537▶ Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly

 1667 AGC TGT GCC CCT TGT GCG GAT GGG ACG GAC TTC CCC CAG CTG TGT
 552▶ Ser Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys

 1712 CAA CTG TGT CCA GGG TGT GGC TGC TCC ACC CTT AAC CAA TAC TTC
 567▶ Gln Leu Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe

 1757 GGC TAC TCG GGA GCC TTC AAG TGT CTG AAG GAT GGT GCT GGG GAT
 582▶ Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp

 1802 GTG GCC TTT GTC AAG CAC TCG ACT ATA TTT GAG AAC TTG GCA AAC
 597▶ Val Ala Phe Val Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn

 1847 AAG GCT GAC AGG GAC CAG TAT GAG CTG CTT TGC CTA GAC AAC ACC
 612▶ Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr

 1892 CGG AAG CCG GTA GAT GAA TAC AAG GAC TGC CAC TTG GCC CAG GTC
 627▶ Arg Lys Pro Val Asp Glu Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val

 1937 CCT TCT CAT ACC GTC GTG GCC CGA AGT ATG GGC GGC AAG GAG GAC
 642▶ Pro Ser His Thr Val Val Ala Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp

 1982 TTG ATC TGG GAG CTT CTC AAC CAG GCC CAG GAA CAT TTT GGC AAA
 657▶ Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln Ala Gln Glu His Phe Gly Lys

 2027 GAC AAA TCA AAA GAA TTC CAA CTA TTC AGC TCT CCT CAT GGG AAG
 672▶ Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe Ser Ser Pro His Gly Lys

 2072 GAC CTG CTG TTT AAG GAC TCT GCC CAC GGG TTT TTA AAA GTC CCC
 687▶ Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly Phe Leu Lys Val Pro

 2117 CCA AGG ATG GAT GCC AAG ATG TAC CTG GGC TAT GAG TAT GTC ACT
 702▶ Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr Glu Tyr Val Thr

 2162 GCC ATC CGG AAT CTA CGG GAA GGC ACA TGC CCA GAA GCC CCA ACA
 717▶ Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu Ala Pro Thr

 2207 GAT GAA TGC AAG CCT GTG AAG TGG TGT GCG CTG AGC CAC CAC GAG
 732▶ Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His His Glu

2252 AGG CTC AAG TGT GAT GAG TGG AGT GTT AAC AGT GTA GGG AAA ATA
 747▶ Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys Ile

2297 GAG TGT GTA TCA GCA GAG ACC ACC GAA GAC TGC ATC GCC AAG ATC
 762▶ Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile

2342 ATG AAT GGA GAA GCT GAT GCC ATG AGC TTG GAT GGA GGG TTT GTC
 777▶ Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val

2387 TAC ATA GCG GGC AAG TGT GGT CTG GTG CCT GTC TTG GCA GAA AAC
 792▶ Tyr Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn

2432 TAC AAT AAG AGC GAT AAT TGT GAG GAT ACA CCA GAG GCA GGG TAT
 807▶ Tyr Asn Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr

2477 TTT GCT GTA GCA GTG GTG AAG AAA TCA GCT TCT GAC CTC ACC TGG
 822▶ Phe Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp

2522 GAC AAT CTG AAA GGC AAG AAG TCC TGC CAT ACG GCA GTT GGC AGA
 837▶ Asp Asn Leu Lys Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg

2567 ACC GCT GGC TGG AAC ATC CCC ATG GGC CTG CTC TAC AAT AAG ATC
 852▶ Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile

2612 AAC CAC TGC AGA TTT GAT GAA TTT TTC AGT GAA GGT TGT GCC CCT
 867▶ Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro

2657 GGG TCT AAG AAA GAC TCC AGT CTC TGT AAG CTG TGT ATG GGC TCA
 882▶ Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser

2702 GGC CTA AAC CTG TGT GAA CCC AAC AAC AAA GAG GGA TAC TAC GGC
 897▶ Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly

2747 TAC ACA GGC GCT TTC AGG TGT CTG GTT GAG AAG GGA GAT GTG GCC
 912▶ Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly Asp Val Ala

2792 TTT GTG AAA CAC CAG ACT GTC CCA CAG AAC ACT GGG GGA AAA AAC
 927▶ Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn Thr Gly Gly Lys Asn

2837 CCT GAT CCA TGG GCT AAG AAT CTG AAT GAA AAA GAC TAT GAG TTG
 942▶ Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys Asp Tyr Glu Leu

2882 CTG TGC CTT GAT GGT ACC AGG AAA CCT GTG GAG GAG TAT GCG AAC
 957▶ Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu Tyr Ala Asn

2927 TGC CAC CTG GCC AGA GCC CCG AAT CAC GCT GTG GTC ACA CGG AAA
 972▶ Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr Arg Lys

2972 GAT AAG GAA GCT TGC GTC CAC AAG ATA TTA CGT CAA CAG CAG CAC
 987▶ Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln His

3017 CTA TTT GGA AGC AAC GTA ACT GAC TGC TCG GGC AAC TTT TGT TTG
1002▶ Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu

3062 TTC CGG TCG GAA ACC AAG GAC CTT CTG TTC AGA GAT GAC ACA GTA
1017▶ Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val

3107 TGT TTG GCC AAA CTT CAT GAC AGA AAC ACA TAT GAA AAA TAC TTA
1032▶ Cys Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu

3152 GGA GAA GAA TAT GTC AAG GCT GTT GGT AAC CTG AGA AAA TGC TCC
1047▶ Gly Glu Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser

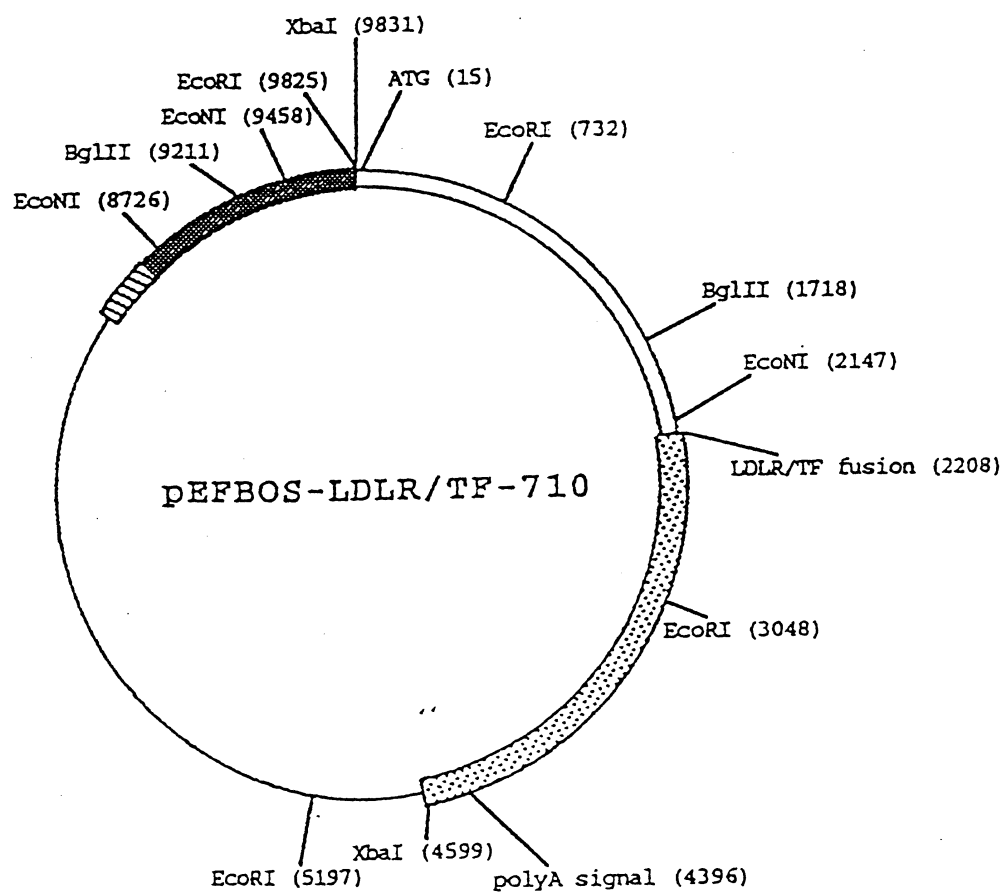
3197 ACC TCA TCA CTC CTG GAA GCC TGC ACT TTC CGT AGA CCT TAAAATCT
1062▶ Thr Ser Ser Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro ...

3244 CAGAGGTAGGGCTGCCACCAAGGTGAAGATGGGAACGCAGATGATCCATGAGTTTGCCCT

3304 GGTTTCACTGGCCCAAGTGGTTTGTGCTAACCACGTCTGTCTTCACAGCTCTGTGTTGCC

3364 ATGTGTGCTGAACAAAAAATAAAAAATTATTATTGATTTTATATTTTCGGGGGGGGGGCTGC

3424 AGCCC



說明：

 SV 40 之基因順序	(位置 5092-160)	 低密度脂蛋白受體之 cDNA 順序
 EF-1α	 輸鐵蛋白之 cDNA 順序	 pUC 119

1 AGAGGCTGCGAGC ATG GGG CCC TGG GGC TGG AAA TTG CGC TGG ACC
 1▶Met Gly Pro Trp Gly Trp Lys Leu Arg Trp Thr

 47 GTC GCC TTG CTC CTC GCC GCG GCG GGG ACT GCA GTG GGC GAC AGA
 12▶Val Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Asp Arg

 92 TGT GAA AGA AAC GAG TTC CAG TGC CAA GAC GGG AAA TGC ATC TCC
 27▶Cys Glu Arg Asn Glu Phe Gln Cys Gln Asp Gly Lys Cys Ile Ser

 137 TAC AAG TGG GTC TGC GAT GGC AGC GCT GAG TGC CAG GAT GGC TCT
 42▶Tyr Lys Trp Val Cys Asp Gly Ser Ala Glu Cys Gln Asp Gly Ser

 182 GAT GAG TCC CAG GAG ACG TGC TTG TCT GTC ACC TGC AAA TCC GGG
 57▶Asp Glu Ser Gln Glu Thr Cys Leu Ser Val Thr Cys Lys Ser Gly

 227 GAC TTC AGC TGT GGG GGC CGT GTC AAC CGC TGC ATT CCT CAG TTC
 72▶Asp Phe Ser Cys Gly Gly Arg Val Asn Arg Cys Ile Pro Gln Phe

 272 TGG AGG TGC GAT GGC CAA GTG GAC TGC GAC AAC GGC TCA GAC GAG
 87▶Trp Arg Cys Asp Gly Gln Val Asp Cys Asp Asn Gly Ser Asp Glu

 317 CAA GGC TGT CCC CCC AAG ACG TGC TCC CAG GAC GAG TTT CGC TGC
 102▶Gln Gly Cys Pro Pro Lys Thr Cys Ser Gln Asp Glu Phe Arg Cys

 362 CAC GAT GGG AAG TGC ATC TCT CGG CAG TTC GTC TGT GAC TCA GAC
 117▶His Asp Gly Lys Cys Ile Ser Arg Gln Phe Val Cys Asp Ser Asp

 407 CGG GAC TGC TTG GAC GGC TCA GAC GAG GCC TCC TGC CCG GTG CTC
 132▶Arg Asp Cys Leu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro Val Leu

 452 ACC TGT GGT CCC GCC AGC TTC CAG TGC AAC AGC TCC ACC TGC ATC
 147▶Thr Cys Gly Pro Ala Ser Phe Gln Cys Asn Ser Ser Thr Cys Ile

 497 CCC CAG CTG TGG GCC TGC GAC AAC GAC CCC GAC TGC GAA GAT GGC
 162▶Pro Gln Leu Trp Ala Cys Asp Asn Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly

 542 TCG GAT GAG TGG CCG CAG CGC TGT AGG GGT CTT TAC GTG TTC CAA
 177▶Ser Asp Glu Trp Pro Gln Arg Cys Arg Gly Leu Tyr Val Phe Gln

 587 GGG GAC AGT AGC CCC TGC TCG GCC TTC GAG TTC CAC TGC CTA AGT
 192▶Gly Asp Ser Ser Pro Cys Ser Ala Phe Glu Phe His Cys Leu Ser

 632 GGC GAG TGC ATC CAC TCC AGC TGG CGC TGT GAT GGT GGC CCC GAC
 207▶Gly Glu Cys Ile His Ser Ser Trp Arg Cys Asp Gly Gly Pro Asp

 677 TGC AAG GAC AAA TCT GAC GAG GAA AAC TGC GCT GTG GCC ACC TGT
 222▶Cys Lys Asp Lys Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ala Val Ala Thr Cys

722 CGC CCT GAC GAA TTC CAG TGC TCT GAT GGA AAC TGC ATC CAT GGC
 237▶ Arg Pro Asp Glu Phe Gln Cys Ser Asp Gly Asn Cys Ile His Gly

 767 AGC CGG CAG TGT GAC CGG GAA TAT GAC TGC AAG GAC ATG AGC GAT
 252▶ Ser Arg Gln Cys Asp Arg Glu Tyr Asp Cys Lys Asp Met Ser Asp

 812 GAA GTT GGC TGC GTT AAT GTG ACA CTC TGC GAG GGA CCC AAC AAG
 267▶ Glu Val Gly Cys Val Asn Val Thr Leu Cys Glu Gly Pro Asn Lys

 857 TTC AAG TGT CAC AGC GGC GAA TGC ATC ACC CTG GAC AAA GTC TGC
 282▶ Phe Lys Cys His Ser Gly Glu Cys Ile Thr Leu Asp Lys Val Cys

 902 AAC ATG GCT AGA GAC TGC CGG GAC TGG TCA GAT GAA CCC ATC AAA
 297▶ Asn Met Ala Arg Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp Glu Pro Ile Lys

 947 GAG TGC GGG ACC AAC GAA TGC TTG GAC AAC AAC GGC GGC TGT TCC
 312▶ Glu Cys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Asn Gly Gly Cys Ser

 992 CAC GTC TGC AAT GAC CTT AAG ATC GGC TAC GAG TGC CTG TGC CCC
 327▶ His Val Cys Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro

 1037 GAC GGC TTC CAG CTG GTG GCC CAG CGA AGA TGC GAA GAT ATC GAT
 342▶ Asp Gly Phe Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Asp Ile Asp

 1082 GAG TGT CAG GAT CCC GAC ACC TGC AGC CAG CTC TGC GTG AAC CTG
 357▶ Glu Cys Gln Asp Pro Asp Thr Cys Ser Gln Leu Cys Val Asn Leu

 1127 GAG GGT GGC TAC AAG TGC CAG TGT GAG GAA GGC TTC CAG CTG GAC
 372▶ Glu Gly Gly Tyr Lys Cys Gln Cys Glu Glu Gly Phe Gln Leu Asp

 1172 CCC CAC ACG AAG GCC TGC AAG GCT GTG GGC TCC ATC GCC TAC CTC
 387▶ Pro His Thr Lys Ala Cys Lys Ala Val Gly Ser Ile Ala Tyr Leu

 1217 TTC TTC ACC AAC CGG CAC GAG GTC AGG AAG ATG ACG CTG GAC CGG
 402▶ Phe Phe Thr Asn Arg His Glu Val Arg Lys Met Thr Leu Asp Arg

 1262 AGC GAG TAC ACC AGC CTC ATC CCC AAC CTG AGG AAC GTG GTC GCT
 417▶ Ser Glu Tyr Thr Ser Leu Ile Pro Asn Leu Arg Asn Val Val Ala

 1307 CTG GAC ACG GAG GTG GCC AGC AAT AGA ATC TAC TGG TCT GAC CTG
 432▶ Leu Asp Thr Glu Val Ala Ser Asn Arg Ile Tyr Trp Ser Asp Leu

 1352 TCC CAG AGA ATG ATC TGC AGC ACC CAG CTT GAC AGA GCC CAC GGC
 447▶ Ser Gln Arg Met Ile Cys Ser Thr Gln Leu Asp Arg Ala His Gly

 1397 GTC TCT TCC TAT GAC ACC GTC ATC AGC AGG GAC ATC CAG GCC CCC
 462▶ Val Ser Ser Tyr Asp Thr Val Ile Ser Arg Asp Ile Gln Ala Pro

 1442 GAC GGG CTG GCT GTG GAC TGG ATC CAC AGC AAC ATC TAC TGG ACC
 477▶ Asp Gly Leu Ala Val Asp Trp Ile His Ser Asn Ile Tyr Trp Thr

1487 GAC TCT GTC CTG GGC ACT GTC TCT GTT GCG GAT ACC AAG GGC GTG
 492▶ Asp Ser Val Leu Gly Thr Val Ser Val Ala Asp Thr Lys Gly Val

 1532 AAG AGG AAA ACG TTA TTC AGG GAG AAC GGC TCC AAG CCA AGG GCC
 507▶ Lys Arg Lys Thr Leu Phe Arg Glu Asn Gly Ser Lys Pro Arg Ala

 1577 ATC GTG GTG GAT CCT GTT CAT GGC TTC ATG TAC TGG ACT GAC TGG
 522▶ Ile Val Val Asp Pro Val His Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp Trp

 1622 GGA ACT CCC GCC AAG ATC AAG AAA GGG GGC CTG AAT GGT GTG GAC
 537▶ Gly Thr Pro Ala Lys Ile Lys Lys Gly Gly Leu Asn Gly Val Asp

 1667 ATC TAC TCG CTG GTG ACT GAA AAC ATT CAG TGG CCC AAT GGC ATC
 552▶ Ile Tyr Ser Leu Val Thr Glu Asn Ile Gln Trp Pro Asn Gly Ile

 1712 ACC CTA GAT CTC CTC AGT GGC CGC CTC TAC TGG GTT GAC TCC AAA
 567▶ Thr Leu Asp Leu Leu Ser Gly Arg Leu Tyr Trp Val Asp Ser Lys

 1757 CTT CAC TCC ATC TCA AGC ATC GAT GTC AAT GGG GGC AAC CGG AAG
 582▶ Leu His Ser Ile Ser Ser Ile Asp Val Asn Gly Gly Asn Arg Lys

 1802 ACC ATC TTG GAG GAT GAA AAG AGG CTG GCC CAC CCC TTC TCC TTG
 597▶ Thr Ile Leu Glu Asp Glu Lys Arg Leu Ala His Pro Phe Ser Leu

 1847 GCC GTC TTT GAG GAC AAA GTA TTT TGG ACA GAT ATC ATC AAC GAA
 612▶ Ala Val Phe Glu Asp Lys Val Phe Trp Thr Asp Ile Ile Asn Glu

 1892 GCC ATT TTC AGT GCC AAC CGC CTC ACA GGT TCC GAT GTC AAC TTG
 627▶ Ala Ile Phe Ser Ala Asn Arg Leu Thr Gly Ser Asp Val Asn Leu

 1937 TTG GCT GAA AAC CTA CTG TCC CCA GAG GAT ATG GTC CTC TTC CAC
 642▶ Leu Ala Glu Asn Leu Leu Ser Pro Glu Asp Met Val Leu Phe His

 1982 AAC CTC ACC CAG CCA AGA GGA GTG AAC TGG TGT GAG AGG ACC ACC
 657▶ Asn Leu Thr Gln Pro Arg Gly Val Asn Trp Cys Glu Arg Thr Thr

 2027 CTG AGC AAT GGC GGC TGC CAG TAT CTG TGC CTC CCT GCC CCG CAG
 672▶ Leu Ser Asn Gly Gly Cys Gln Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln

 2072 ATC AAC CCC CAC TCG CCC AAG TTT ACC TGC GCC TGC CCG GAC GGC
 687▶ Ile Asn Pro His Ser Pro Lys Phe Thr Cys Ala Cys Pro Asp Gly

 2117 ATG CTG CTG GCC AGG GAC ATG AGG AGC TGC CTC ACA GAG GCT GAG
 702▶ Met Leu Leu Ala Arg Asp Met Arg Ser Cys Leu Thr Glu Ala Glu

 2162 GCT GCA GTG GCC ACC CAG GAG ACA TCC ACC GTC AGG CTA AAG GTC
 717▶ Ala Ala Val Ala Thr Gln Glu Thr Ser Thr Val Arg Leu Lys Val

 2207 GTC CCT GAT AAA ACT GTG AGA TGG TGT GCA GTG TCG GAG CAT GAG
 732▶ Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu

2252 GCC ACT AAG TGC CAG AGT TTC CGC GAC CAT ATG AAA AGC GTC ATT
 747▶ Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val Ile

2297 CCA TCC GAT GGT CCC AGT GTT GCT TGT GTG AAG AAA GCC TCC TAC
 762▶ Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr

2342 CTT GAT TGC ATC AGG GCC ATT GCG GCA AAC GAA GCG GAT GCT GTG
 777▶ Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val

2387 ACA CTG GAT GCA GGT TTG GTG TAT GAT GCT TAC TTG GCT CCC AAT
 792▶ Thr Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn

2432 AAC CTG AAG CCT GTG GTG GCA GAG TTC TAT GGG TCA AAA GAG GAT
 807▶ Asn Leu Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp

2477 CCA CAG ACT TTC TAT TAT GCT GTT GCT GTG GTG AAG AAG GAT AGT
 822▶ Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser

2522 GGC TTC CAG ATG AAC CAG CTT CGA GGC AAG AAG TCC TGC CAC ACG
 837▶ Gly Phe Gln Met Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr

2567 GGT CTA GGC AGG TCC GCT GGG TGG AAC ATC CCC ATA GGC TTA CTT
 852▶ Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu

2612 TAC TGT GAC TTA CCT GAG CCA CGT AAA CCT CTT GAG AAA GCA GTG
 867▶ Tyr Cys Asp Leu Pro Glu Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val

2657 GCC AAT TTC TTC TCG GGC AGC TGT GCC CCT TGT GCG GAT GGG ACG
 882▶ Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr

2702 GAC TTC CCC CAG CTG TGT CAA CTG TGT CCA GGG TGT GGC TGC TCC
 897▶ Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser

2747 ACC CTT AAC CAA TAC TTC GGC TAC TCG GGA GCC TTT AAG TGT CTG
 912▶ Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu

2792 AAG GAT GGT GCT GGG GAT GTG GCC TTT GTC AAG CAC TCG ACT ATA
 927▶ Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Ser Thr Ile

2837 TTT GAG AAC TTG GCA AAC AAG GCT GAC AGG GAC CAG TAT GAG CTG
 942▶ Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu Leu

2882 CTT TGC CTA GAC AAC ACC CGG AAG CCG GTA GAT GAA TAC AAG GAC
 957▶ Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu Tyr Lys Asp

2927 TGC CAC TTG GCC CAG GTC CCT TCT CAT ACC GTC GTG GCC CGA AGT
 972▶ Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala Arg Ser

2972 ATG GGC GGC AAG GAG GAC TTG ATC TGG GAG CTT CTC AAC CAG GCC
 987▶ Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln Ala

3017 CAG GAA CAT TTT GGC AAA GAC AAA TCA AAA GAA TTC CAA CTA TTG
 1002▶ Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe

3062 AGC TCT CCT CAT GGG AAG GAC CTG CTG TTT AAG GAC TCT GCC CAC
 1017▶ Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His

3107 GGG TTT TTA AAA GTC CCC CCA AGG ATG GAT GCC AAG ATG TAC CTG
 1032▶ Gly Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu

3152 GGC TAT GAG TAT GTC ACT GCC ATC CGG AAT CTA CGG GAA GGC ACA
 1047▶ Gly Tyr Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr

3197 TGC CCA GAA GCC CCA ACA GAT GAA TGC AAG CCT GTG AAG TGG TGT
 1062▶ Cys Pro Glu Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys

3242 GCG CTG AGC CAC CAC GAG AGG CTC AAG TGT GAT GAG TGG AGT GTT
 1077▶ Ala Leu Ser His His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val

3287 AAC AGT GTA GGG AAA ATA GAG TGT GTA TCA GCA GAG ACC ACC GAA
 1092▶ Asn Ser Val Gly Lys Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu

3332 GAC TGC ATC GCC AAG ATC ATG AAT GGA GAA GCT GAT GCC ATG AGC
 1107▶ Asp Cys Ile Ala Lys Ile Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser

3377 TTG GAT GGA GGG TTT GTC TAC ATA GCG GGC AAG TGT GGT CTG GTG
 1122▶ Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val

3422 CCT GTC TTG GCA GAA AAC TAC AAT AAG AGC GAT AAT TGT GAG GAT
 1137▶ Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp

3467 ACA CCA GAG GCA GGG TAT TTT GCT GTA GCA GTG GTG AAG AAA TCA
 1152▶ Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ser

3512 GCT TCT GAC CTC ACC TGG GAC AAT CTG AAA GGC AAG AAG TCC TGC
 1167▶ Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Lys Lys Ser Cys

3557 CAT ACG GCA GTT GGC AGA ACC GCT GGC TGG AAC ATC CCC ATG GGC
 1182▶ His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly

3602 CTG CTC TAC AAT AAG ATC AAC CAC TGC AGA TTT GAT GAA TTT TTG
 1197▶ Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe Phe

3647 AGT GAA GGT TGT GCC CCT GGG TCT AAG AAA GAC TCC AGT CTC TGT
 1212▶ Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys

3692 AAG CTG TGT ATG GGC TCA GGC CTA AAC CTG TGT GAA CCC AAC AAC
 1227▶ Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn

3737 AAA GAG GGA TAC TAC GGC TAC ACA GGC GCT TTC AGG TGT CTG GTT
 1242▶ Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val

3782 GAG AAG GGA GAT GTG GCC TTT GTG AAA CAC CAG ACT GTC CCA CAG
 1257▶ Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln

3827 AAC ACT GGG GGA AAA AAC CCT GAT CCA TGG GCT AAG AAT CTG AAT
 1272▶ Asn Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn

3872 GAA AAA GAC TAT GAG TTG CTG TGC CTT GAT GGT ACC AGG AAA CCT
 1287▶ Glu Lys Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro

3917 GTG GAG GAG TAT GCG AAC TGC CAC CTG GCC AGA GCC CCG AAT CAC
 1302▶ Val Glu Glu Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His

3962 GCT GTG GTC ACA CGG AAA GAT AAG GAA GCT TGC GTC CAC AAG ATA
 1317▶ Ala Val Val Thr Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile

4007 TTA CGT CAA CAG CAG CAC CTA TTT GGA AGC AAC GTA ACT GAC TGC
 1332▶ Leu Arg Gln Gln Gln His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys

4052 TCG GGC AAC TTT TGT TTG TTC CGG TCG GAA ACC AAG GAC CTT CTG
 1347▶ Ser Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu

4097 TTC AGA GAT GAC ACA GTA TGT TTG GCC AAA CTT CAT GAC AGA AAC
 1362▶ Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn

4142 ACA TAT GAA AAA TAC TTA GGA GAA GAA TAT GTC AAG GCT GTT GGT
 1377▶ Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly

4187 AAC CTG AGA AAA TGC TCC ACC TCA TCA CTC CTG GAA GCC TGC ACT
 1392▶ Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Glu Ala Cys Thr

4232 TTC CGT AGA CCT TAAAATCTCAGAGGTAGGGCTGCCACCAAGGTGAAGATGGGAAC
 1407▶ Phe Arg Arg Pro ...

4288 GCAGATGATCCATGAGTTTGGCCCTGGTTTCACTGGCCCAAGTGGTTTGTGCTAACCACGT

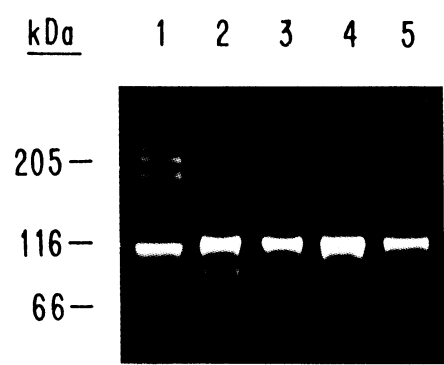
4348 CTGTCTTCACAGCTCTGTGTTGCCATGTGTGCTGAACAAAAATAAAAATTATTATTGAT

4408 TTTATATTTTCGGGGGGGGGCTGCAGCCCCTAGACCTGAGGGTCCCCACCTGGGACCCTT

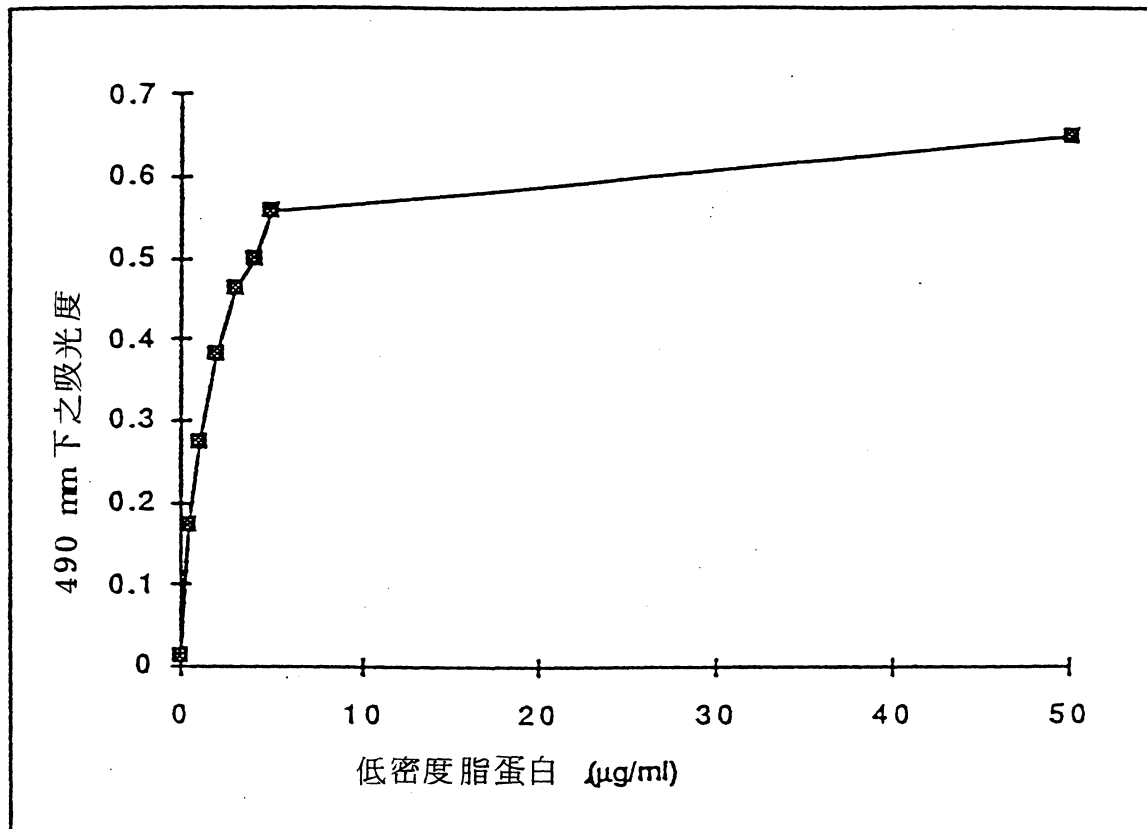
4468 GAGAGTATCAGGTCTCCACGTGGGAGACAAGAAATCCCTGTTTAATATTTAAACAGCAG

4528 TGTTCCTCATCTGGGTCCTTGACCCCTCACTCTGGCCTCAGCCGACTGCACAGCGGCC

4588 CTGCATCCCCTCTAGA



 6



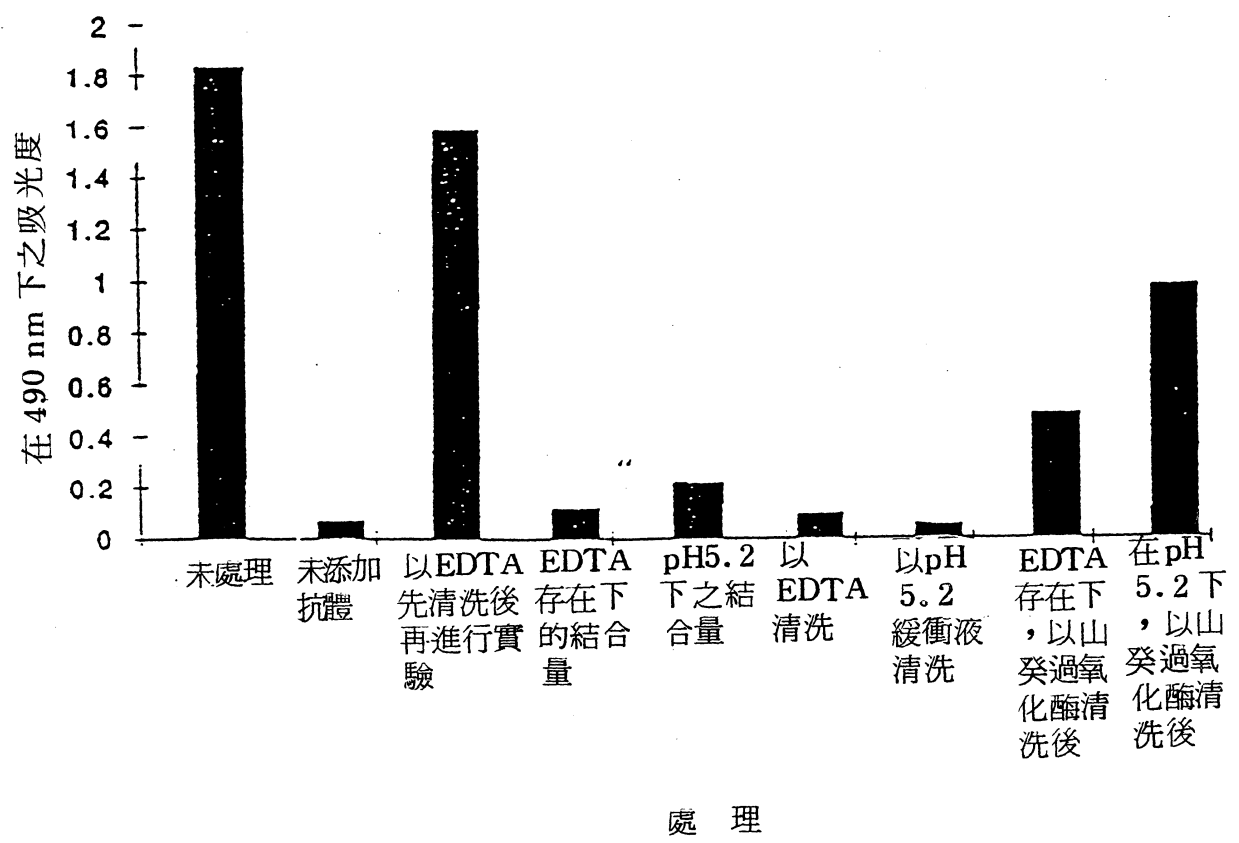
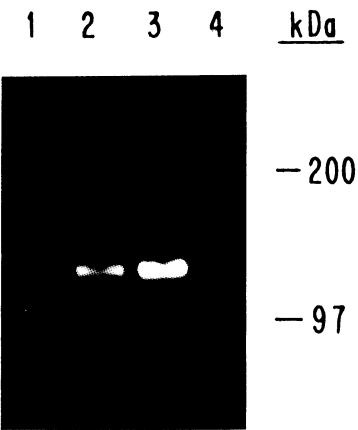


圖 8



85-106494

A7

B7

修正

補充

本884208日

五、發明說明()

此實例所描述的是含有成熟之人類低密度脂蛋白受體氨基酸序列 1-374 與人類輸鐵蛋白氨基酸序列 20-698 融合之編碼低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的基因之組合。

寡核苷酸 1 :

5' GCTGTGGCCA CCTGTCGCCC TGAC (序列號碼 : 5)

寡核苷酸 2 :

5' TGCACACCAT CTCACAGTTT TATCAGGGAC
CACAGCCTTG CAGGCCTTCG TGTGGGGGTC (序列號碼 : 6)

寡核苷酸 3 :

5' GCCTCGAAGC TGGTTCATCT G (序列號碼 : 7)

寡核苷酸 4 :

5' GACCCCCACA CGAAGGCCTG CAAGGCTGTC
GTCCTGATA AAAGTGTGAG ATGGTGTGCA (序列號碼 : 8)

寡核苷酸 1 至 4 被用於聚合酶鏈反應中以製造一融合片段，內含人類低密度脂蛋白受體基因表現序列外顯子 1 至 8 之 cDNA 序列與人類輸鐵蛋白之 cDNA 順序。首先，寡核苷酸 1 和 2 被用來放大 pLDLR2(ATCC

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

煩請委員明示，本發明之技術內容與原實質內容

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

88. 2. 08修正
年 月 日
補充

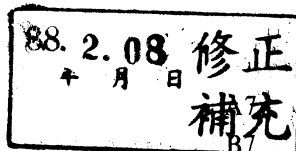
A7

B7

五、發明說明 ()

#39966) 中低密度脂蛋白受體 cDNA 之 522 bp 部分。接著，以質體 Tfr27A (ATCC #53106) 作為模板，將核苷酸 3 和 4 用來放大含有輸鐵蛋白 cDNA 序列中 372 bp 部分。最後，將此兩種放大後的片段混合並進一步放大寡核苷酸 2 和 3 以產生最後的 834 bp 的融合片段。此 PCR 融合片段將低密度脂蛋白受體在輸鐵蛋白序列的 374 位置之纈氨酸（序列號碼乃相對於成熟 LDLR 蛋白質序列）至 20 位置纈氨酸上互相連接。再以 BamHI 將此融合片段做部分切割並以 EcoRI 作完全切割。分析已發表之低密度脂蛋白受體（基因庫密碼 K02573）與輸鐵蛋白（基因庫密碼 M12530）之 cDNA 序列可預測切割此 PCR 融合片段可得一 734 bp 的片段。以凝膠將此 734 bp 的片段純化以進行基因選殖。

為了使帶有人類低密度脂蛋白受體開始的 374 個氨基酸與人類輸鐵蛋白 20 至 698 個氨基酸之 DNA 之間能完全融合在一起，製備了兩個中等的質體。首先，將完整的人類輸鐵蛋白 cDNA 以 PstI 部分切割的方式由 Tfr27A 中切出。一個內含人類輸鐵蛋白之 2.3 kb 的片段與經 PstI 切割之 pBSIISK+ (Stratagene, La Jolla, CA) 互相連接。將連接混合物轉化至 E. coli 並分離含有此單一插入之 2.3 kb 的輸鐵蛋白片段的轉殖體，並命名為 pBSIITF。之後，以 EcoRI 和 SacI



五、發明說明 ()

切割 pBSIITF 以產生一相當於輸鐵蛋白 cDNA 序列之 1.4 kb 的片段。以凝膠純化此片段，並將其連接到以 EcoRI 和 SacI 切割之 pLdLR2 上。將連接混合物轉化至 E. Coli，並分離含有此單一插入之 1.4 kb 片段的轉殖體，在此片段中 EcoRI 的位置上連接輸鐵蛋白 cDNA 與低密度脂蛋白受體之氨基酸序列，並將其命名為 pLT1.5。以凝膠純化以 EcoRI 和 BamHI 切割的 Tfr27A 以獲得一輸鐵蛋白 cDNA 之 574 bp 的片段。此片段與 734 bp 之低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白融合片段（如上所述以 EcoRI 和 BamHI 切割 PCR 之產物而得）均被連接在以 EcoRI 切割之 pLT1.5 上。將連接混合物轉化至 E. Coli，並分離含有編碼人類低密度脂蛋白受體最先的 395 個氨基酸（成熟蛋白質的 374 個氨基酸與 21 個氨基酸的訊號肽）與完整的成熟輸鐵蛋白的密碼序列（氨基酸序列 20 至 698）融合之單一轉殖體。將此質體定名為 pLDLrTF1。

為了構築一可在哺乳類動物細胞中表現此雜混性蛋白質之質體，由質體 pLDLrTF1 中分離此雜混性蛋白質的密碼序列並以 SmaI 和 EcoNI 切割。以 E. Coli DNA 聚合酶之 klenow 片段使得由 EcoNI 切割得到之黏性末端變成鈍端。將切割之 DNA 以 1% 低融點的凝膠進行電泳分析，並萃取出相當於此雜混性蛋白質之 3.4 kb 的

五、發明說明()

DNA 片段。將此片段連接在已經凝膠純化並以 XbaI 切割及以 klenow 處理過的質體 pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res. 18:5322 (1990)) 上。質體 pEF-BOS 係利用來自延長因子 -1 α (EF-1 α) 的啟動子序列，以此連接混合物來轉化 E.coli 相容細胞，且以限制酶分析來篩選轉形細胞，並分離出一株在 pEF-BOS 質體上具有所須方向性的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之融合基因 (編碼序列的方向乃是由延長因子 -1 α 啟動子的 3' 端開始) 並定名為 pEFBOS/LDLrTF1.S (圖 2)。圖 3 顯示在質體 pEFBOS/LDLrTF1.S 中完整的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白融合基因的核苷酸序列。

實例 2 融合人類低密度脂蛋白受體氨基酸序列 1-710 與人類輸鐵蛋白氨基酸序列 20-698 之編碼低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的質體之構築

此實例所描述的是含有成熟人類低密度脂蛋白受體氨基酸序列 1-710 與人類輸鐵蛋白氨基酸序列 20-698 融合之編碼低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的基因之組合。在此低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之雜混性蛋白質的實例中，進行融合的位置乃緊跟在成熟低密度脂蛋白受體多肽，第 731 位置的纈氨酸密碼子之後。

五、發明說明 ()

由 ATCC 所獲得的 pLDLR2 質體 (ATCC #39966) 含有人類低密度脂蛋白受體之 cDNA 序列。以下列步驟將此 cDNA 序列插入 pBS質體中 (Stratagene, La Jolla, CA) 以促進此雜混性基因的構築。pLDLR2係以 EcoNI切割並以 E.coli DNA聚合酶之 Klenow片斷處理使其末端成為鈍端，處理過的 DNA接著以 BglIII切割，含有低密度脂蛋白受體 cDNA 5' 端的 1,721 bp 以及 5' 端未轉譯側翼序列之 1,735bp EcoNI-BglIII片斷被分離出來。在以 BglIII和 NaeI切割 pLDLR2後，一個含有 cDNA其他 925 bp 及 3' 端未轉譯側翼序列之 976bp DNA片斷被分離出來，質體 pBS 經 EcoRV 切割後呈線型 DNA，並且藉著將所分離的低密度脂蛋白受體 5' 端 1,735 bp 和低密度脂蛋白受體第 3' 端 976 bp 以 T4 DNA連接酶使之連接而使 LDLR cDNA序列再組合。以連接混合物轉化 E. Coli相容細胞之後，以限制酶分析每一個細菌轉殖體。將其中一個帶有適當組合的低密度脂蛋白受體 cDNA 的轉殖體稱為 pBSL-1。

由 ATCC #53106，Tfr27A 之細胞株中分離出人類輸鐵蛋白 cDNA 的序列。此 2.3 kb 之人類輸鐵蛋白 cDNA 序列藉由 Pst I 所進行的切割由 Tfr27A 中切出並將其插入 pBSIISK+ (Stratagene) 質體中 Pst I 的位置，所得之質體定名為 pBSIITF。

88. 2. 08 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

製備一含有低密度脂蛋白受體氨基酸 731 (氨基酸序列乃相對於成熟蛋白質而言) 與輸鐵蛋白氨基酸 20 之間的融合片段, 使用 LDLRTF710-1, -2, -3 和 -4 的寡核苷酸序列於聚合酶鏈反應中。

LDLRTF710-1 :

5' TGCACACCAT CTCACAGTTT TATCAGGGAC
GACCTTTAGC CTGACGGT (序列號碼 : 9)

LDLRTF710-2 :

5' TCAGTGGCCC AATGGCATC (序列號碼 : 10)

LDLRTF710-3 :

5' CAGGAGACAT CCACCGTCAG GCTAAAGGTC
GTCCCTGATA AAAGTGTGAC (序列號碼 : 11)

LDLRTF710-4 :

5' CTTCCCATGA GGAGAGCT (序列號碼 : 12)

在準備 PCR 反應過程中, 以 SalI 和 pBSL1 及 NotI 切割 pBSIITF 使質體之模版 DNA 呈線狀。製造含有融合密碼序列之片段以下列兩步驟進行。第一步驟

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

88. 2. 08 修正
年 月 日 補充^{A7}_{B7}

五、發明說明 ()

包含將 10 μ l 之 DNA 聚合酶 (New England Biolabs, Beverly, MA) , 各 1 ng 之 pBSIITF 及 pBSL1 線狀 DNA , 12 μ l 之 2.5 mM 的 dNTP's , 0.3 μ l 之 LDLRTF710-2 與 LDLRTF710-4 , 1 μ l 之 LDLRTF710-1 與 LDLRTF710-3 , 及水混合並將總體積調至 100 μ l 。 由此 PCR 放大反應中所得之 1.4 kb 片段再以寡核苷酸 LDLRTF710-2 及 LDLRTF710-4 加以放大。將所放大之 1.4 kb 片段以凝膠純化並以 Eco 此片段含有由 pBSL1 而來之低密度脂蛋白受體序列, 由 pBSIITF 而來之 EcoRI-XbaI 片段 (內含輸鐵蛋白 cDNA 之序列) 及以 SalI-XbaI 切割之 pBSIISK (Stratagene, La Jolla, CA) 。 以此連結混合物來轉化 E. coli 。 將其中一個帶有此經四個連接步驟正確組合的連接片段 cDNA 之菌落定名為 pLDLRTF-710 。

欲在哺乳類動物細胞中表現此一雜混性蛋白質 cDNA , 須先將 pLDLRTF-710 中此雜混性蛋白質 cDNA 次轉殖到利用延長因子 -1 α (EF-1 α) 基因作為啟動子之質體 pEF-BOS 中 (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990)) 。

以 XbaI 切割 pEF-BOS 以將 450 bp 之填充片段移

88.2.08 修正
補充

五、發明說明 ()

去。藉著添加一個 XbaI 連接子於 pBSIISK+ 與 PLDLRTF-710 中低密度脂蛋白受體序列中間之連接位置上來改良 SalI 的位置。以 XbaI 來切割此段改良後的片段可得一 4.4 kb 內含低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白融合基因的 XbaI 片段。將此 4.4 kb 的片段純化並連接至以 XbaI 切割的 pEF-BOS 上。以此連結混合物來轉化 E. coli 相容細胞。將其中一個於質體 pEF-BOS 中帶有正確方向（密碼序列之方向性乃是由 EF-1 α 啟動子 3'端開始延伸）之低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白融合基因的 XbaI 片段之轉殖體定名為 pEFBOS-LDLR/TF-710（圖 4）。質體 pEFBOS-LDLR/TF-710 中完整的低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白融合基因的核苷酸序列顯示於圖 5。

實例 3 以含有低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白融合基因的雜混性蛋白質質體來對哺乳類動物細胞作轉移感染並鑑別能表現此低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白融合基因的菌株。

A. 在一級之人類皮膚纖維母細胞中的轉移感染

在此實例中，將衍生自正常人類新生兒之皮膚細胞培養在含 DMEM（Cellgro 50-013），15% 小牛血清（hyclone），各 25 units/ml 之盤尼西林和

88. 2. 08 修正
 年 月 日 補充

五、發明說明 ()

鏈黴素 streptomycin (Gibco 15070-014) , 及 2.25% Hepes 緩衝液 (Bibco 15630-15) 中。將成長之細胞以進行電穿透之緩衝液清洗 (137 mM NaCl, 6 mM glucose, 5 mM KCl, 0.7 mM Na₂ HPO₄ , 1mg/ml acetylated BSA (Sigma B-2518), 20 mM hepes buffer, pH 7.3) , 再以每毫升六百萬之細胞的濃度將其重新懸浮於進行電穿透之緩衝液中。將質體 DNA (100 μ g 總重) 以少於 50 μ l 之體積添加至進行電穿透之石英管中 (BIO-RAD 萬) 。

內含等量帶有此雜混性蛋白質 DNA 之質體 (在此實例中為 61.2 μ g 之 pEFBOS/LDLrTF1.S (8.66 kb) , 見實例 1) 與帶有一可選擇之抗藥性標示物之質體 , 在此實例中為 38.8 μ g 之 pSV2neo 之質體 (5.50 kb; ATCC # 37149) 。基於其對藥品 G418 之抵抗性 , pSV2neo 質體可提供正面的篩選具安定轉移感染細胞之方法。

將石英管施以一電流脈衝 (250 伏特 , 電容量設定為 960 μ Farad) , 使足量之 DNA 能進入細胞。將細胞稀釋後培養在除了相同生長基之外 , 另含 0.4mg/ml 之 G418 (GESETICIN, Gibco 860-1811) 的組織培養盤中。只有具有安定轉移感染之 pSV2neo 或

88. 2. 08 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

pSV2neo 及 pEFBOS/LDLrTF1.S 兩者之細胞能在此培養基中形成聚落。無法將 pSV2neo 併入其基因庫中之細胞會被此藥品殺死而無法行成聚落。其它同時被轉移之質粒能確保細胞會使用此可選擇之抗藥性。

在 2 至 3 週的培養之後，以肉眼鑑別能抗 -G418 之細胞株並將其轉移至多孔洞之培養皿在含有藥物的培養基中作進一步的培養。分離具有抗藥性的細胞並篩選能表現並分泌此雜混性蛋白質之細胞，雜混性蛋白質乃衍生自含有此雜混性蛋白質之質體，在此實例中為 pEFBOS/LDLrTF1.S。

欲鑑定能表現此雜混性蛋白質之細胞聚落，測試每一聚落之培養基是否含有此雜混性蛋白質，在此實例中所本持的方法乃是偵測細胞受體之配體區域，在此實例中乃是人類輸鐵蛋白。一種測定人類輸鐵蛋白之三明治式的酵素免疫分析 (TF-FLISA，見實例 6) 被用來測定培養基中之雜混性蛋白質。將能表現低密度脂蛋白受體 / 輸鐵蛋白之細胞分開來培養並定量分析其所表現之雜混性蛋白質之量。

在一實驗中，藉選殖環之助將生長於含 0.4 mg/ml 之培養基中的 206 個細胞聚落加以分離並轉移至 96

六、申請專利範圍

1. 一種含有一個功能性區域與一個攜帶性區域的雜混性蛋白質，其中該功能性區域係包含第一受體的配體結合區域，該第一受體係選自低密度脂蛋白 (LDL) 受體，乙醯化 LDL 受體，腫瘤壞死因子 α 受體，轉化生長因子 β 受體，細胞激素受體，免疫球蛋白 Fc 受體，荷爾蒙受體，葡萄糖受體，糖脂受體，以及聚葡萄糖胺受體所組成之族群中；以及該攜帶性區域包含可與除了第一受體以外的哺乳動物細胞表面受體結合之糖化或非糖化的氨基酸序列，其中 (a) 該氨基酸序列係由除了第一受體以外之蛋白質而來，且 (b) 該哺乳動物細胞表面受體係選自低密度脂蛋白受體 (LDLR)，輸鐵蛋白受體，無涎糖蛋白受體，腺病毒受體，反轉錄病毒受體，CD4，脂蛋白 (a) 受體，類似低密度脂蛋白 (LRP) 受體，乙醯化低密度脂蛋白 (LDL) 受體，甘露糖受體，和甘露糖 6-磷酸受體；其限制條件為當該雜混性蛋白質與一細胞上的哺乳動物細胞表面受體結合時，該哺乳動物細胞表面受體會運送該雜混性蛋白質進入該細胞中。

2. 如申請專利範圍第 1 項之雜混性蛋白質，其中該哺乳動物細胞表面受體係為人類細胞表面受體。

3. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該第一受體係為人類 LDL 受體。

六、申請專利範圍

4. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該第一受體係為人類乙醯化 LDL 受體。

5. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該第一受體係為人類腫瘤壞死因子 α 受體。

6. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該第一受體係為人類轉化生長因子 β 受體。

7. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該第一受體係為人類細胞激素受體。

8. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該第一受體係為人類免疫球蛋白 Fc 受體。

9. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該第一受體係為人類荷爾蒙受體。

10. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該第一受體係為人類葡萄糖受體。

11. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中

六、申請專利範圍

該第一受體係為人類糖脂受體。

12. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該第一受體係為人類聚葡萄糖胺受體。

13. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該人類細胞表面受體係為人類低密度脂蛋白受體。

14. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該人類細胞表面受體係為人類無涎醣蛋白受體。

15. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該人類細胞表面受體係為人類腺病毒受體。

16. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該人類細胞表面受體係為人類反轉錄病毒受體。

17. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該人類細胞表面受體係為人類 CD4。

18. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該人類細胞表面受體係為人類脂蛋白 (a) 受體。

六、申請專利範圍

19. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該人類細胞表面受體係為人類 LRP 受體。

20. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該人類細胞表面受體係為人類乙醯化 LDL 受體。

21. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該人類細胞表面受體係為人類甘露糖受體。

22. 如申請專利範圍第 2 項之雜混性蛋白質，其中該人類細胞表面受體係為人類甘露糖-6-磷酸受體。

23. 一種可編碼雜混性蛋白質之 DNA，該雜混性蛋白質含有一個功能性區域與一個攜帶性區域，其中該功能性區域係包含第一受體的配體結合區域，該第一受體係選自低密度脂蛋白 (LDL) 受體，乙醯化 LDL 受體，腫瘤壞死因子 α 受體，轉化生長因子 β 受體，細胞激素受體，免疫球蛋白 Fc 受體，荷爾蒙受體，葡萄糖受體，糖脂受體，以及聚葡萄糖胺受體所組成之族群中；以及該攜帶性區域包含與除了第一受體以外的哺乳動物細胞表面受體結合之糖化或非糖化的氨基酸序列，其中 (a) 該氨基酸序列係由除了第一受體以外之蛋白質而來，且 (b) 該哺乳動物細胞表面受體係選自低密度脂蛋白受體 (LDLR)，

六、申請專利範圍

輸鐵蛋白受體，無涎糖蛋白受體，腺病毒受體，反轉錄病毒受體，CD4，脂蛋白(a)受體，類似低密度脂蛋白(LRP)受體，乙醯化低密度脂蛋白(LDL)受體，甘露糖受體，和甘露糖6-磷酸受體；倘使當該雜混性蛋白質與一細胞上的哺乳動物細胞表面受體結合時，該哺乳動物細胞表面受體會運送該雜性蛋白質進入該細胞中。

24.如申請專利範圍第23項之DNA，其中該哺乳動物細胞表面受體係為人類細胞表面受體。

25.如申請專利範圍第24項之DNA，其中該人類細胞表面受體係為人類輸鐵蛋白受體。

26.如申請專利範圍第1至22項中任一項之雜混性蛋白質，其係用於將選定物質導入哺乳動物細胞中。

27.如申請專利範圍第1至22項中任一項之雜混性蛋白質，其係用於將選定物質導入人類細胞中。

28.如申請專利範圍第23至25項中任一項之DNA，其係用於將選定物質導入哺乳動物細胞中。

29.如申請專利範圍第23至25項中任一項之DNA，其

六、申請專利範圍

係用於將選定物質導入人類細胞中。

30.一種包含一個功能性區域與一個攜帶性區域的雜混性蛋白質，其中該功能性區域包含一個人類低密度脂蛋白受體的配體結合區域之胺基酸序列，其係與低密度脂蛋白膽固醇結合，且該攜帶性區域包含一個人類輸鐵蛋白之胺基酸序列，其係與人類輸鐵蛋白受體結合。

31.如申請專利範圍第30項之雜混性蛋白質，其係用於將低密度脂蛋白膽固醇導入哺乳動物細胞中。

32.如申請專利範圍第30項之雜混性蛋白質，其係用於將低密度脂蛋白膽固醇導入人類細胞中。

33.一種編碼雜混性蛋白質之DNA，該雜混性蛋白質包含一個功能性區域與一個攜帶性區域，其中該功能性區域包含一個人類低密度脂蛋白受體的配體結合區域之胺基酸序列，其係與低密度脂蛋白膽固醇結合，且該攜帶性區域包含一個人類輸鐵蛋白之胺基酸序列，其係與人類輸鐵蛋白受體結合。

34.如申請專利範圍第33項之DNA，其係用於將低密度脂蛋白膽固醇導入哺乳動物細胞中。

六、申請專利範圍

35. 如申請專利範圍第33項之DNA，其係用於將低密度脂蛋白膽固醇導入人類細胞中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

總