公告本

申請日期	87.3.31
案號	87105148
類別	C07K 16/28 C12N 5/10 5/18 15/13 A61K 39/395

A4
C4

526205

（以上各欄由本局填註）

發明 新型 專利說明書

一、發明 新型 名稱	中文	抗Fas抗體
	英文	ANTI-FAS ANTIBODIES
二、發明 創作 人	姓名	1.芹澤伸記　6.米原伸 2.市川公久　7.春山英幸 3.大隅潤　8.高橋亘 4.大槻昌彥　9.好田宏子 5.白石明郎
	國籍	1.-9.皆屬日本
	住、居所	1.東京都品川區廣町1丁目2番58號 三共株式會社內 2.3.4.5.皆同上 6.京都府京都市西京區松尾井戶町9-5 7.8.9.皆同上1.
三、申請人	姓名（名稱）	三共股份有限公司 （三共株式會社）
	國籍	日本
	住、居所（事務所）	東京都中央區日本橋3丁目5番1號
	代表人姓名	河村喜典

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 1 ）

發明領域

本發明為關於抗體及其斷片，特別為辨識Fas抗原之人類化抗體，編碼造成此類抗體所有部分之DNA，及包括此類抗體之藥劑，用於預防和／或治療Fas／Fas配位體系統異常所引起之狀況。

發明背景

細胞於自然過程結果中，於活有機體中之生理性死亡已知為細胞自滅，且其有別於細胞的病理性死亡，即壞死〔參見Kerr等。(1972), Br. J. Cancer, 26, 239參看以下〕。細胞自滅為一種經設定之細胞死亡例，其為某些細胞已事先被設定於自然過程結果中，如細胞被要求表現預定功能時，於活有機體中死亡。細胞自滅其特徵特別為形態之變化，如彎曲的細胞表面，濃縮的核染色質和斷片化的染色體DNA。

細胞自滅經由消除辨識自身抗原之細胞而在淋巴細胞(T 細胞和B 細胞)之分化中扮演一個角色。在此方面中，已被證明95%或以上與自體抗原反應之細胞，於T 淋巴細胞成熟期間之胸腺中被消除〔參見Shigekazu Nagata, Tanpakushitsu kakusan koso, (1993), 38,2208-2218〕。當此類細胞未被細胞自滅所消除時，則其相信此為由於系統中出現成熟、自體反應性淋巴細胞造成自體免疫疾病之原因〔參見Nakayama等，(1995), Mebio, 12(10), 76-86〕。

許多分子已被鑑定牽涉於細胞自滅，包括：Fas〔參

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ㄚ）

見 Yonehara, S.,等, (1989), J. Exp. Med.,169, 1747-1756〕；腫瘤壞死因子受器〔參見 Loetscher, H.,等, (1990), Cell, 61, 351-359〕；CD40〔參見 Tsubata, T.,等, (1993), Nature, 364, 645-648〕；和 perforin/granzyme A〔參見 Jenne, D. E.,等, (1988), Immunol. Rev. 103,53-71〕

Fas為一種穿透膜蛋白質，存在於細胞表面，並將其細胞外功能部位結合至一般已知為「Fas配位體」之蛋白質，並於其他細胞表面上表現，誘導表現Fas之細胞的細胞自滅。Fas／Fas配位體系統之異常，因無法以細胞自滅消除對體內平衡有害之細胞，或者因未按照維持體內平衡所必須之消除作用誘導細胞中的細胞自滅，而造成各種疾病。此類疾病於此處稱為Fas／Fas配位體系統異常所引起之狀況。

於Fas／Fas配位體異常所引起之疾病的發展、或進行中，通常之情況為，表現Fas但卻仍未消除（異常細胞）之異常細胞為攻擊正常組織或細胞，或者異常地增殖，因此造成組織或細胞之疾病，其依次導致各別的疾病症候群。於部分情況中，此些疾病可能由Fas於異常細胞上之表現所引起或者惡化，因而刺激正常組織或細胞中之細胞自滅。

歸因於Fas／Fas配位體系統異常之特殊疾病例為如下。

自體免疫疾病

已數度報導各種人類自體免疫疾病（橋本氏病，全身

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 7 ）

紅斑性狼瘡、謝格連氏症候群、惡性貧血、阿狄孫氏病、胰島素依賴性糖尿病、皮硬化、古德帕斯茄氏症候群、克隆氏病、自體免疫溶血性貧血、不孕症、重症肌無力、多發性硬化、巴塞杜氏症、血小板減少性紫癜病、風濕性關節炎）和Fas／Fas配位體系統異常間之關聯。

於鼠中，已知有各種Fas／Fas配位體系統之遺傳性異常，包括lpr（淋巴增殖）、gld（綜合性淋巴增殖性疾病），和lpr^{cy}（其中lpr基因補充gld基因）突變作用。具有此類遺傳性異常之鼠均表現出伴隨特徵性全身淋巴結腫脹之各種自體免疫症候群。

MRL-lpr／lpr鼠（一種自發性人類全身紅斑性狼瘡之鼠模型）顯示出淋巴結質量的顯著增加並且產生引起因形成免疫複合體造成腎炎之自體抗體。其被推測此鼠展現出此病理，乃為Fas基因突變之結果，其因Fas無法於末梢系統中誘發細胞自滅，且因經活化之自體反應性T細胞的長期蓄積，造成對於自體抗原缺乏免疫耐性〔參見Strasser, A.,Nature, 373,385(1995)〕。

於人類中，已報導數種病例，包括兩個含有淋巴結腫脹、γ-血內球蛋白過多和$CD4^-$ $CD8^-$ T細胞顯著增加之小兒科病例〔參見Sneller, MC.,等, (1992), J.Clin. Invest.,90,334〕。此些病例被指出為基於Fas基因之異常性〔參見Fisher, G.H.,等, (1995), Cell, 81,935.,和Rieux-Laucat, F.,等, (1995), Science, 268,1347〕，且被命名為自體免疫淋巴增殖症候群（ALPS）。基於此

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（4）

些發現，其被認為Fas所中介之誘發細胞自滅系統，不僅於鼠且於人類中均非常牽涉於自體耐性之建立和維持，且此系統之紊亂乃誘導出各種自體免疫疾病。

亦已知風濕性關節炎具有一種自體免疫要素，基於此事實，非常多數侵襲風濕性關節炎患者感染區域並且導致組織破壞的T細胞，表現Fas〔參見Hoa, T.T. M.,等,(1996), J. Rheumatol.,23,1332-1337〕。

胰島素依賴性糖尿病之許多病例為基於自體反應性T細胞破壞胰臟β細胞，引起嚴重的胰島素分泌短缺所造成。因此，於某些型式之胰島素依賴性糖尿病之放射治療中，將自體反應性T細胞消除乃極重要的。

於移植物對宿主疾病中，例如骨髓移植後所發生之疾病，於感染器官中Fas之表現增加，且在Fas表現之增加程度與標的器官之損傷間具有直接的相關〔參見Chu,J.L.,等(1995), J. Exp. Med.,181,393〕。因此，預防或治療此疾病之目的在於封阻標的器官細胞中之細胞自滅及在於降低侵略此標的器官之細胞數目。

過敏性疾病

過敏性疾病中所包含之發炎細胞通常為經活化且侵襲損傷處。發炎細胞局部蓄積在損傷處中，且可繼續長期作用，因為其存活乃因壓制細胞自滅而被延長。於鼠呼吸道導入嗜酸細胞發炎作用之實驗模型中，已被證實經由呼吸道投予具有誘道細胞自滅之抗-Fas抗體，乃造成令吸入變應原後一般於黏膜下所見到之嗜酸細胞之侵襲

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（5）

消失〔參見Tsuyuki. S.,等，1995), J. Clin. Invest., 96, 2924〕。因此其可能經由發炎細胞中誘發細胞自滅，而減輕過敏性發炎中之症狀。

風濕性關節炎

除了上述風濕性關節炎之自體免疫態樣以外，損傷處滑液細胞的異常增殖已知為表現出Fas〔參見Hoa, T. T. M.,等，(1996), J. Rheumatol.,23, 1332〕。由此類損傷處，以具有誘導細胞自滅活性之抗-Fas抗體刺激滑液細胞，則可誘導出細胞自滅〔參見Nakajima, T., 等，(1995), Arthr. Rheum.,38,485〕。換言之，Fas／Fas配位體系統並未集中在風濕性關節炎患者中正確地作用，且僅管均表現出Fas，其自體反應性T細胞及異常增殖之滑液細胞均未被消除。

動脈硬化

雖然在動脈硬化損傷處中心的細胞死亡之最後診斷為壞死，但已被報導細胞自滅乃牽涉其進行及變性過程〔參見Kenji Harada(1997), Gendai Iryou, 29,109〕。動脈硬化損傷處之電子顯微鏡示出平滑肌細胞以核濃縮為特徵的細胞自滅〔參見Isner, J. M.,等(1995), Circulation, 91, 2703〕。再者，已報導泡沫細胞（其為聚集在動脈內層且於早期動脈硬化損害處中混入脂質之巨噬細胞）表現出Fas且與天然存在之誘導細胞自滅抗-Fas抗體導致進行細胞自滅〔參見Richardson, B.C., 等，(1994),Eur. J. Immunol.,24, 2640〕。動脈硬化通常伴隨著淋巴細胞浸潤，此建議T細胞之Fas配位體與巨噬細胞之Fas為負責控制動脈硬化之可能性〔參見Kenji Harada(1997), Gendai Iryou, 29, 109〕。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 6 ）

心肌炎和心肌病

Fas／Fas配位體系統似為牽涉於自體免疫心臟疾病如缺血性心臟病，病毒性心臟病、舒張心肌病和慢性心肌病之發病性。心肌炎被認為係主要由病毒，如柯薩奇病毒所引起之心肌發炎，且其典型為在類似感冒症狀後之胸痛、節律不整、心臟衰竭或休克。心肌病雖然其病因亦被認為可能為病毒感染之結果，但其被定義為「不明病因之心肌疾病」。於鼠心肌炎模型之研究中，於病毒植入後，在鼠心臟觀察到心臟衰竭、細胞自滅性細胞（其由核之濃縮和／或斷片化而被證明）。於鼠心臟中亦觀察到Fas表現增加，其令人推測此狀態為由浸潤發炎細胞（優勢地淋巴細胞）所衍生之Fas配位體誘導出細胞自滅之結果〔參見Takehiko Yamada等，Gendai Iryou,(1997), 29, 119〕。已知經由缺血可於培養的大鼠心肌細胞中誘導出細胞自滅，同時令細胞中編碼Fas之mRNA增加〔參見Tanaka M.,等，(1994), Circ. Res. 75, 426〕。

腎疾病

於許多慢性腎疾病中，於血管球中的組織重建，造成細胞外受質蓄積之血管球中，因而促進血管球的硬化，造成過濾功能的病理性流失，且最終導致慢性腎衰竭。於進行性血管球硬化模型中，硬化區域於電子顯微鏡程度下展現出典型的細胞自滅外觀，且於血管球中觀察到細胞自滅的增加，與血管球細胞數目之減少一致且伴隨

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 7 ）

發展出硬化〔參見Sugiyama H.,等，(1996), Kidney Int.,49, 103〕。於急性血管球性腎炎中，已知此疾病經由細胞自滅降低異常增殖之腎小球細胞數目而被減輕〔參見Shimizu A.,等，(1995), Kidney Int.,47, 114和Baker A.J.,等,(1994), J. Clin. Invest.,94, 2105)〕。於如腎炎紫癜病和腎炎狼瘡之疾病中，已報導出在血管球中細胞表現Fas顯著增加〔參見Takemura T.,等(1995), Kidney Int.,48,1886〕。

發育不全貧血

於具有發育不全貧血患者之造血前驅細胞之表面上，Fas之表現顯著高於正常個體，此建議Fas關連於此些患者造血幹細胞之減少〔參見Macie jewski, J. P.,等，(1995), Br. J. Haematol.,91,245〕。

肝炎

於暴發性肝炎中，已知於許多肝細胞中誘導出細胞自滅。對鼠腹膜內投予抗-Fas抗體JO2時，觀察到類似於暴發性肝炎中所見的肝細胞廣泛性死亡。因此，認為暴發性肝炎之發病與Fas所誘導之肝細胞的細胞自滅有關〔參見Kamogawa, Y.,等(1996), Molecular Medicine, 33, 1284；和Ogasawara, J.,等，(1993), Nature,364, 806〕。於免疫組織化學研究中，於顯示出高程度肝

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 8 ）

細胞壞死之區域，如慢性肝炎受損處之肝細胞胞漿中及肝病如脂肪肝受損處之肝細胞的細胞膜上，觀察到Fas表現增強〔參見Hiramatsu, N.,等, (1994), Hepatology, 19,1354和Takatani, M.,等, (1996), International Hepatology Commun.,4, 334〕。

此外，Fas為在慢性持續C型肝炎和慢性主動肝炎中表現，其兩者均在被浸潤的淋巴細胞（其顯然為細胞毒性T細胞）所包圍的肝細胞顯示出分散染色〔參見Mita, E.,等(1994), Biochem. Biophys. Res. Commun.,204, 468〕。細胞毒性T細胞具有經由其表面上所表現之Fas配位體，於感染細胞中誘導細胞自滅之功能。其對於位於附近之正常細胞類似地誘導細胞自滅。此對於局部、正常細胞之感染，稱為旁觀者疾病(bystander disorder)，此基於體中許多細胞於其本身感染後或者鄰近細胞感染後表現Fas之事實。於慢性肝炎病例中，當C型肝炎病毒所衍生之RNA實質上為在投予干擾素後降低時，其肝組織中的Fas表現乃顯著降低。

具有急性肝衰竭之患者的肝細胞，於細胞表面上具有增加份量的Fas，且當曝露於誘導細胞自滅之抗-Fas抗體時，則進行細胞自滅。又，於醇毒性肝炎中，Fas配位體為在假腺胞中之肝細胞本身上表現〔參見Galle, P.P.,等(1995), J. Exp. Med.,182, 1223〕。於研究Fas配位體基因於原位雜交表現中，於肝浸潤淋巴細胞（於急性肝衰竭之情形）及醇毒性肝硬變之情形中之假腺

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（9）

胞本身之肝細胞中均發現其表現（如上述）。因此，假設細胞自滅於病毒性肝硬變和醇毒性肝硬變中為由不同的機制所誘導，但於兩者病例中Fas／Fas配位體系統為異常。於肝炎鼠模型中，已知肝病為經由投予可抑制Fas配位體結合至Fas之受質而被抑制〔參見Kondo, T 等, (1997), Nature Medicine, 3, 409〕。

後天免疫不全病候群

以人類免疫不全病毒(HIV)所感染患者中之免疫不全至少部分為基於未經HIV感染之多數免疫細胞的細胞自滅性細胞死亡。由於來自助手T 細胞之生長因子為抑制細胞毒性T 細胞中細胞自滅所必須的，故耗盡助手T 細胞乃造成細胞毒性T 細胞的細胞自滅。基於觀察到HIV感染患者之末梢血液淋巴細胞中的Fas表現，與疾病的發病進展具有良好的相互關係，故亦認為HIV感染患者免疫細胞之細胞自滅為起因於Fas／Fas配位體系統之異常性〔參見Dhein, J.,等(1995), Behring Inst. Mitt.,96,13和McCloskey, T.W.,等(1995), Cytometry ,22,111〕。來自未感染個體之Fas陽性末梢血液淋巴細胞並不經由Fas刺激而輕易地進行細胞自滅，而來自感染患者之末梢血液淋巴細胞則在短時間內進行Fas所誘導之細胞自滅〔參見Owen- Schaub, L.B.,等(1992), Cell Immunol.,140, 197〕。

器官移植後的排斥

器官移植後的排斥與自體免疫共有某些類似性，除了

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（10）

移植器官為受到來自供體之細胞毒性T細胞所攻擊以外。因此，若可抑制細胞毒性T細胞之功能，則可期待令症狀減輕。

對於上述所列疾病，對其治療之有效方式為消除異常細胞（如，自體免疫疾病中的自體反應性T細胞、動脈硬化中的泡沫細胞、急性血管球腎炎中的腎小球細胞、病毒感染中的感染細胞、和風濕性關節炎中的滑液細胞）和／或保護正常組織或細胞。

其問題在於僅可誘導Fas所中介之細胞自滅之藥劑，即使消除異常細胞，亦高度傾向於正常細胞中導致疾病。另一方面，僅可抑制Fas所中介之細胞自滅之藥劑，即使其可保護正常細胞，但亦無法消除異常細胞。例如，抗鼠Fas單株抗體JO2具有誘導細胞自滅之活性，但在鼠中卻引起暴發性肝炎〔參見Ogasawara, J.等，(1993), Nature, 364, 806-809〕。

直到目前，可用於治療和／或預防上述任何疾病，但不會伴隨任何不欲副作用之抗Fas抗體仍為未知。

免疫球蛋白G(IgG)為由兩個輕的多肽鏈（L鏈），各具有分子量約23,000 kD，及兩個重的多肽鏈（H鏈），各具有分子量約50,000 kD所組成。H和L鏈均由重覆的約110殘基所構成之保守胺基酸區域所組成。此區域於此稱為「功能部位」，且其構成IgG的基礎三維構造單位。H和L鏈分別由四個及兩個連續的功能部位所組成。

當比較抗體胺基酸序列時，發現H和L鏈的胺基終端

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（11）

功能部位為較其他功能部位更為多變化。因此，稱其為「可變」功能部位（V功能部位）。H和L鏈之V功能部位經由其在IgG分子之胺基終端中形成可變區之互補性質而彼此組合。其他功能部位組合形成恆定區。恆定區序列為指定種類之特徵。例如，鼠IgG之恆定區異於人類IgG，而鼠IgG分子為被人類免疫系統辨識為外來蛋白質。將鼠IgG投予至人類個體則造成產生人類抗鼠抗體（此後稱為「HAMA」）反應〔Schroff等，(1985)，Cancer Res.,45，879-885〕。依此，鼠抗體無法重覆地投予至人類個體。為了有效投予，此抗體必須被修飾成避免誘發HAMA反應，同時保持抗體專一性。

來自X射線結晶學分析之數據顯示免疫球蛋白通常摺疊形成一種長圓筒狀構造，其包括兩層反平行之β-層，各由三或四個β-鏈所組成。於可變區中，來自H和L鏈之各V功能部位的三個環共同群集形成一個抗原結合部位。此些環各稱為互補決定區域（CDR）。CDR於胺基酸序列中具有最高的可變性。可變區之部分中不屬於CDR之部分稱為「骨架區」（「FR」區）且其通常扮演維持CDR構造的角色。

Kabat及其共同工作者根據序列保守性，比較許多H和L鏈可變區之初級序列並且鑑定出假定性CDR或骨架區（E.A. Kabat等，Sequences of immunologyical interest，第5版，NIH出版，No.91-3242）。再者，其將骨架區分類成數個共有相同胺基酸序列之亞群。其亦鑑定出相

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（12）

當於鼠和人類序列間的骨架區。

對於IgG分子之構造性特徵之研究，引領開發出如下述不會誘發HAMA反應之人類化抗體之製造方法。

最初的建議為直接朝向經由令鼠抗體之可變區連接至人類源之恆定區，製備嵌合型抗體〔Morrison, S. L., 等(1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855頁〕。然而，此類嵌合型抗體仍含有許多非人類胺基殘基。且因此可導致HAMA反應，特別是當長期投予時〔Begent等，(1990), Br. J. Cancer, 62,487頁，參考以下〕。

其後，提出僅令CDR部分移植至人類抗體中，用以再降低引起HAMA反應之非人類胺基酸序列之數目〔Jones, P. T.等(1986), Nature, 321, 522-525〕。然而，一般發現僅移植CDR部分，則不足以保持免疫球蛋白對抗抗原之活性。

根據X-射線結晶學之數據，Chothia及其共同工作者〔Chothia等，(1987), J. Mol. Biol.,196, 901-917〕決定出：

1) CDR具有一個關連於抗原結合之區域及一個關連於保持CDR本身構造之區域。CDR之可能的三維構造可被分類成數個具有特徵性型式（標準構造）之類別；和

2)標準構造之類別不僅由CDR序列，且亦由骨架區中特定位置中之胺基酸性質所決定。

結果，提議CDR移植技術亦應包含將來自骨架區之某

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（13）

些胺基酸殘基，移植至人類抗體脊骨〔Queen等，國際專利公報No.WO 90／07861〕。

就上述此點而論，來自取得CDR用於移植之非人類哺乳動物之抗體於此後稱為「供體」分子。CDR移植至其中的人類抗體於此後稱為「受體」分子。

於表現CDR-移植中，CDR區域的構造應理想地保守且應保持免疫球蛋白分子之活性。因此，下列因素乃有關係的：

1）受體之亞群；和

2）由供體骨架區所轉移之胺基酸殘基的性質。

Queen等〔國際專利公報No.WO 90／07861〕提出一種決定來自供體FR之胺基酸殘基是否將與CDR序列共同移植之方法。依據此方法，若殘基符合下列至少一個標準，則將來自FR區域之胺基酸殘基與CDR序列共同移植至受體上：

1）受體之人類骨架區中的胺基酸極少於受體之該位置上發現，而供體中的對應胺基酸則一般於受體之該位置上發現

2）胺基酸為緊密位於一個CDR；和

3）胺基酸具有一個於近約3Å CDR中之側鏈原子（以免疫球蛋白之三維模型判定），且為潛在可與抗原或人類化抗體之CDR相互作用。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（14）

然而，沒有一個成功取得具有誘導細胞自滅活性之人類化、抗Fas、IgG型抗體。

發明之目的

本發明之目的為提供一種於人類Fas相關疾病狀況之動物模型中可被評估之抗Fas抗體、或類似分子。

本發明之再一目的為提供一種可用於治療和／或預防Fas／Fas配位體系統異常所引起狀況之人類化抗-Fas抗體、或類似分子。

發明概要

因此，於第一態樣中，本發明提供一種具有對於Fas抗原決定基為結合區域專一之分子，此抗原決定基在靈長類和非靈長類動物間被保留。

於第二態樣中，本發明提供一種具有對於普通、哺乳動物、Fas抗原決定基為結合區域專一之分子。

本發明再提供由登記編號FERM BP-5828之融合瘤HFE7A所產生之抗體，及具有至少六個抗體CDR，且此抗體為對於人類Fas專一，其中此CDR為同於登記編號FERM BP-5828之融合瘤HFE7A所產生之抗體的CDR。

本發明之其他目的、目標、態樣和具體例將於下文中變得顯明。

圖式之簡單說明

第1圖為說明構築phFas-AIC2之圖示。

第2圖為說明構築pME-H和pME-L之圖示。

第3圖為示出測定HFE7A抗體所辨識之抗原決定基之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（15）

ELISA結果圖。

第4圖為示出測定HFE7A抗體所辨識之競爭性分析之結果圖。

第5圖為示出HFE7A毒性試驗之結果圖。

第6圖為示出以暴發性肝炎模型測試之結果圖。

第7圖為示出測試預防膠原所誘導之關節炎之結果圖。

第8圖為製造VHH-DNA之第一步驟PCR之概要。

第9圖為製造VHH-DNA之第二步驟PCR之概要。

第10圖為製造VHH-DNA之第三步驟PCR之概要。

第11圖為載有VHH-DNA斷片之表現質體的構築概要。

第12圖為製造VHM-DNA之第一步驟PCR之概要。

第13圖為製造VHM-DNA之第二步驟PCR之概要。

第14圖為載有VHH-DNA斷片之表現質體的構築概要。

第15圖為製造VMM-DNA之第一步驟PCR之概要。

第16圖為製造VMM-DNA之第二步驟PCR之概要。

第17圖為製造VMM-DNA之第三步驟PCR之概要。

第18圖為載有VMM-DNA斷片之表現質體的構築概要。

第19圖示出輕鏈定序引子所結合之位置。

第20圖為製造VD-DNA之第一步驟PCR之概要。

第21圖為製造VD-DNA之第二步驟PCR之概要。

第22圖為製造VD-DNA之第三步驟PCR之概要。

第23圖為載有VD-DNA斷片之表現質體的構築概要。

第24圖為包括人類IgG1之CH1區及插入序列之DNA(IG5'-DNA)斷片的構築概要。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（16）

第25圖為包括人類IgG1之絞鏈區、CH_2區、CH_3區和插入序列之基因組DNA(IG3'-DNA)斷片的構築概要。

第26圖為表現質體pEg7AH-H的構築概要。

第27圖示出重鏈定序引子所結合之位置。

第28圖為說明人型化抗-Fas抗體對人類Fas融合蛋白質之結合活性的圖示。

第29圖示出HEE7A與人型化抗-Fas抗體對於人類Fas融合蛋白質的競爭性抑制作用。

第30圖示出人型化HFE7A對於WR19L12a之細胞毒性。

第31圖示出製造LPDHH-DNA之第一階段PCR的大綱。

第32圖示出製造LPDHH-DNA之第二階段PCR的大綱。

第33圖示出製造LPDHH-DNA之第三階段PCR的大綱。

第34圖示出載有LPDHH-DNA斷片之表現質體的構築大綱。

第35圖示出製造LPDHM-DNA之第一階段PCR的大綱。

第36圖示出製造LPDHM-DNA之第二階段PCR的大綱。

第37圖示出製造LPDHM-DNA之第三階段PCR的大綱。

第38圖示出載有LPDHM-DNA斷片之質體的構築大綱。

第39圖示出製造HPD1.2-DNA之第一階段PCR之大綱。

第40圖示出製造HPD1.2-DNA之第二階段PCR之大綱。

第41圖示出載有HPD1.2-DNA斷片之質體的構築。

第42圖示出引子定序pEgPDHV3-21之結合處。

第43圖示出人型化輕鏈之高程度表現載體之構築。

第44圖示出人型化重鏈之高程度表現載體之構築。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（17）

第45圖示出人類Fas融合蛋白質對於實施例12上清液之結合活性。

第46圖示出HFE7A抗體經由實施例12上清液之競爭抑制作用之結果。

第47圖示出經由實施例12培養上清液體於T細胞中誘導細胞自滅之結果。

發明之詳細描述

本發明之HFE7A抗體的令人驚訝之優點在於，其不僅可於異常細胞中誘導細胞自滅表現Fas，且亦可抑制正常細胞中的細胞自滅。此優點大概地延伸出本發明之人型化抗-Fas抗體。

未有已知的結合人類Fas且具有誘導細胞自滅活性之單株抗體，可結合鼠Fas。結合至鼠Fas之單株抗體為已知，但於其中並無結合人類Fas。因此，未有已知的抗-Fas抗體可於疾病模型鼠中評價。相對地，HFE7A抗體為可於疾病模型鼠中評估，因此通常提供確保製藥效力之方式且亦建立一種用於調查Fas角色之模型。

其相信本發明抗體之優點造成其辨識Fas抗原上保留之抗原決定基的能力。Fas為一種共通分子，但於種類間為不同。雖然未被理論所確定，但其相信至少有一個Fas之保留區域（其為所有哺乳動物所共通）且為誘導Fas細胞自滅功能所需。本發明之分子辨識Fas保留的抗原決定基。就此方面，例如當比較鼠科動物和人類Fas時，所討論之抗原決定基並非必須於兩分子中絕對相同，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（18）

只要分子之抗原決定基結合區能辨識兩者即可。然而，通常其抗原決定基需要完全相同。

已知許多直接對抗Fas之抗體，包括可誘導細胞自滅，但未事先取得結合任何種類的交感序列者。本發明之抗體，相對地，確實結合一個交感序列。依此，如理論所詳述，本發明之抗體作用於Fas活性部位，代表僅概括結合至Fas所造成之不適當或者干擾（其為具有危險和不可預測之效果，如JO2於鼠之暴發性肝炎（前文）），因此其為模倣天然的配位體，而非僅非專一地結合Fas抗原。

若正常的實驗室老鼠，如BALB／c鼠，被人類Fas所免疫，則於通常的消除自體反應性抗體過程中，結合人類Fas和鼠Fas之抗體產生細胞將於胸腺中被消滅。因此，為了取得直接針對人類與鼠間所保留之抗原決定基且因而結合至人類Fas和鼠Fas兩者之鼠單株抗體，則需要使用一種部分或完全無此類消除能力之鼠。

已被推測Fas／Fas配位體系統為被牽涉於此胸腺中自體反應性T細胞之消除過程〔參見Shin Yonehara (1994) Nikke; Scince Bessatsu, 110, 66-77〕。因此經由免疫一種具有Fas／Fas配位體系統突變作用之鼠（此類鼠於其後稱為「Fas無效鼠」或「Fas／Fas配位體缺失鼠」），例如無法表現編碼Fas之基因者，則可取得結合鼠及人類Fas兩者之抗體。

因此，再提供一種取得本發明抗體、或分子之方法，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（19）

其包括對非人類動物且其至少於自體反應性T細胞之細胞自滅消除作用中為部分缺失，投予免疫性有效量之含有異種Fas免疫性抗原決定基之物質，並且由其後之動物選取抗體。

載有Fas抗原決定基之物質可能為Fas本身，或者可能為另外的適當物質，如融合蛋白質。

選取適當抗體在此技藝人士之技術範圍中，且於下列舉說明。特別地，較佳使用本發明方法之免疫化動物，取得至少一個易於使用此技術人士所熟知之方法所得之單株抗體。

亦已承認為了易於操作，較佳令該非人類動物為一種鼠，雖然其他齧齒類種類如兔及其他哺乳動物，適當如山羊和短尾猿亦可使用，但此類系統不如鼠被充分特性化。雖然亦已承認用於投予之Fas較佳為人類，但若意欲，本發明之抗體可由其他哺乳動物取得。然而，由於共同擁有一個共通的抗原決定基，故其通常面臨本發明之抗體具有普遍性的應用。

使用上述方法，製備一種融合瘤，其產生結合人類和鼠Fas的新穎抗-Fas單株抗體。令Fas無效鼠以鼠Fas免疫且其後將脾細胞與鼠骨髓細胞瘤融合，並由培養上清液精製出單株抗體。

由此回收之新穎的抗-Fas單株抗體被證實有效於減輕自體免疫疾病模型鼠症狀之嚴重性。再者，已被證明此抗-Fas單株抗體並不會誘導出肝病（此先前為一問題）。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 20 ）

亦選殖並定序出此新抗體之兩個鏈的各基因，用以取得CDR's之基因。構築出包括重和輕鏈各基因之表現載體，用以產生重組抗-Fas抗體。由共同轉移感染此些載體之動物細胞培養上清液中所取得之此重組抗體，已被證明與Fas反應。

由此所得之抗-Fas抗體、及其重組抗體選殖株，可保護肝臟免受Fas所誘導之暴發性肝炎所害，且亦可有效預防各治療風濕性關節炎。

依此，現今證實已可提供可經由Fas而於異常細胞中誘導出細胞自滅且可於正常細胞中抑制Fas所誘導之細胞自滅之抗體，且因此，其有效於防止、治療和／或預防歸因於Fas／Fas配位體系統異常之疾病。

將鼠所衍生之抗-Fas單株抗體的CDR胺基酸序列移植至人類抗體中，則可成功取得對於人體無免疫性但仍具有Fas結合活性之重組抗體。

本發明容許構築出具有最小誘導HAMA反應之危險性且仍具有有效的抗體效應物功能之人型化抗體。

如此處所用，關於抗體之術語「人類」和「人型化」為指任何於人類個體中期待誘出少量或者無免疫性反應之抗體，而所討論之個體為個人或者一群。

通常較佳令來自指定抗體之所有CDR移植至受體抗體中，用以保存Fas抗原決定基之結合區、或者此處所通指之抗原決定基結合區。然而，其有時適於或欲於將少於總量之CDR移至其供體，且其為包含於本發明。亦需明

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（21）

瞭移植通常需要將一個胺基或區域以殘基對殘基，彼此取代。然而，特別於轉移一個區域時，有時視需要加入或者省略一個或以上之殘基，且此類刪除及插入、及適當的取代和逆位，為在此藝之技術中。

本發明之抗原決定基結合區為一種對應於抗體之抗原決定基結合部位之分子區。此抗原決定基結合區不需由任何特定之抗體、或抗體配對所直接衍生，且可能不類似於任何特定的抗原決定基結合區。只要求此抗原決定基結合區在其結合至抗原之範圍中，類似於抗體之辨識部位，於此例中，為Fas抗原決定基。即使抗原決定基結合區可使用已知抗體之CDR設計而成，若將其移植至人類抗體中，則所得之抗原決定基結合區並不需類似於已知抗體，雖然由保持結合專一性之觀點而言，欲其為大程度類似。

吾等特佳令來自非人類抗體之所有CDR移植至人類抗體中。又，吾等較欲令骨架區的某些區域混入受體抗體（其於此處亦稱為人類抗體）中，用以保持非人類結合部位的三維構造。此類骨架區之區域典型包括依據下列網領選擇表示其重要性的特有胺基酸殘基（顯著性殘基）。特別地，以人類中少有但為關連人類抗體中所共同的殘基，及與抗原決定基或辨識部位具有高直接相互作用或然率之殘基，為較佳與CDR共同移植。

當將CDR移植至人類抗體時，通常非人類CDR於其全體中取代關連之人類CDR，特別於兩者為相同長度時。然

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（22）

而，其亦可能僅部分的人類CDR被取代，或者僅部分的非人類CDR被移植，且此兩者通常聯合進行。

亦察覺到來自非人類抗體之CDR一般應用於取代人類抗體中之對應的CDR。於使用人類骨架之輕或重鏈之狀況中（其僅具有CDR之插入位置，而非事實上具有CDR），則運用類似的考慮。

亦需明瞭，人類重和輕鏈並不需要來自相同的人類抗體，且亦不需來自相同種類。其重要為令所選擇之配合抗體之序列儘可能接近於非人類抗體之序列。兩個鏈（輕／輕或重／重）之配對重點在於，令所得之抗體應儘可能具有接近類似於原始非人類抗體之抗原決定基結合區，以確保最佳的結合。因此，本發明亦包含使用不可能為最接近之配對之可能性，只要其為可理解的期待，所得之重組抗體將適於所需之目的。

本發明之分子較佳為抗體，但此並非必須，只要其抗原決定基結合區結合至Fas之抗原決定基。因此，令結合部位單離和安定化，例如可將其附著至親和性純化柱載體，或者投予方法可例如包括一種佐劑載體分子，令本發明之抗原決定基結合區附著其上。為了易於說明，本發明之分子於此處通常稱為抗體，但此類說明包含本發明之所有分子，除非另外指明。

當本發明之分子為抗體時，其可察覺到任何適當的抗體類型可被模倣或使用，如IgG、IgA、IgE和IgM，以IgG一般為較佳。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（27）

於此處所討論之分子和抗體，亦需明瞭對於編碼造成其之任何核酸，視需要可準用類似考慮。

本發明之某些較佳具體例為如下。

較佳令本發明之抗體結合一種包括序列表之SEQ ID No.1之胺基酸序列之胜肽。

抗體較佳為IgG，且更佳包括一種輕鏈多胜肽蛋白質

獨立選自序列表之SEQ ID No.50之胺基酸序列1至218、SEQ ID No.52之胺基酸序列1至218、SEQ ID No.54之胺基酸序列1至218、SEQ ID No.107之胺基酸序列1至218、及SEQ ID No.109之胺基酸序列1至218，且其中重鏈多胜肽蛋白質較佳包括序列表之SEQ ID No.89之胺基酸序列1至451或SEQ ID No.117之胺基酸序列1至451。

於較佳具有例中，本發明之抗體具有輕鏈和重鏈，且重鏈為具有下式（I）：

$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4-$（I）

其中FRH_1為任何由18至30個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_1$為如序列表之SEQ ID No.2所定義之序列，FRH_2為任何由14個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_2$為如序列表之SEQ ID No.3所定義之序列，FRH_3為任何由32個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_3$為如序列表之SEQ ID No.4所定義之序列，FRH_4為任何由11個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合，而輕鏈具有下式（II）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（24）

$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4-$ (II)

其中FRL_1為任何由23個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRL_1$為如序列表之SEQ ID No.5所定義之序列，FRL_2為任何由15個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRL_2$為如序列表之SEQ ID No.6所定義之序列，FRL_3為任何由32個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRL_3$為如序列表之SEQ ID No.7所定義之序列，FRL_4為任何由10個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合。

本發明亦提供編碼造成上述任何輕或重鏈多胜肽蛋白質之一的DNA和RNA。更佳為DNA其包括序列表之SEQ ID No.49之核甘酸序列100至753、DNA其包括序列表之SEQ ID No.51之核甘酸序列100至753、DNA其包括序列表之SEQ ID No.53之核甘酸序列100至753和／或DNA其包括序列表之SEQ ID No.88之核甘酸序列84至2042。

本發明再提供包括上述定義之DNA的重組DNA載體、及以此類載體所轉形之宿主細胞。宿主較佳以分開的載體轉形各編碼的重和輕鏈，因此通常轉含有兩個載體，但本發明亦包括僅以一個編碼造成所有將被表現序列之表現載體轉形宿主。此類宿主細胞較佳為哺乳動物。

E. coli pHSGMM6 SANK73697 (FERM BP-6071), E. coli pHSGHM17 SANK73597 (FERM BP-6072), E. coli pHSGHH7 SANK73497(FERM BP-6073), E. coli pHSHM2 SANK 70198及E. coli pHSHH5 SANK 70398 (FERM BP-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（25）

6272), E. coli pgHSL7A62 (FERM BP-6274) SANK73397 (FERM BP-6074) 及 E. coli pgHPDHV3 SANK 70298 (FERM BP-6273)各為本發明之較佳具體例。

本發明亦提供一種生產人型化抗-Fas抗體之方法，其包括培養上述宿主細胞，其後由培養液回收人型化抗-Fas抗體。

再提供一種用於預防或治療歸因於Fas-Fas配位體系統異常疾病之藥劑，其包括以本發明之抗體作為活性成分，特別於疾病為如上述時。標的疾病為自體免疫疾病(全身紅斑性狼瘡、橋本氏病、風濕性關節炎、移植物物對宿主疾病、謝格連氏症候群、惡性貧血、阿狹孫氏病、皮硬化、克德帕斯茄氏症候群、克隆氏病、自體免疫溶血性貧血、不孕症、重症肌無力、多發性硬化、巴塞杜氏症、血小板減少性紫癜病、或胰島素依賴性糖尿病)。分類之製劑亦用於：過敏；風濕性關節炎；動脈硬化；心肌炎或心肌病；血管球腎炎；發育不全貧血；肝炎(暴發性肝炎、慢性肝炎、病毒性肝炎(C型肝炎、B型肝炎、D型肝炎)或醇毒性肝炎)；及器官移植後之排斥。

FR為存在於免疫球蛋白分子之H或L鏈次單位之可變區。例如，FRH_1意指位於H鏈次單位可變區中最N終端位置的骨架區，且FRH_4意指L鏈次單位之可變區N終端的第四個骨架區。類似地，$CDRH_1$，例如意指存在於H鏈次單位之可變區的最N終端位置之CDR，且$CDRL_3$

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（26）

意指L鏈次單位之可變區N終端的第三個CDR。FR於任何輕或重鏈中側面相接於CDR區域。

於一具體例中，適於製備本發明人型化抗-Fas抗體之抗-Fas單株抗體，可經由培養令Fas無效鼠以人類Fas免疫化且續令鼠之脾細胞與鼠骨髓瘤細胞融合所取得之適當的融合瘤而得到。

單株抗體之製備典型包括下列步驟：

a）純化生物大分子，用於作為免疫抗原；

b）首先使用注射抗原令適當的動物免疫化、由動物取血並分析抗體效價，用以決定何時移出脾後，製備抗體產生細胞；

c）製備骨髓瘤細胞；

d）將抗體產生細胞與骨髓瘤細胞融合；

e）選出所欲的產生抗體之融合瘤；

f）製備單一細胞選殖株（選殖）；

g）選擇性地，培養融合瘤細胞、或令植入融合瘤細胞之動物生長，以大規模製造單株抗體；和

h）測試如此製得之單株抗體的生物活性和專一性、或分析標記試劑性質。

於下列更詳細描述製備抗-Fas單株抗體所依循之一般步驟，依據上述步驟之順序。然而，需明瞭下列描述之方法僅代表製備適當抗體之一個方式，且視需要可進行其他步驟，例如使用脾細胞以外之抗體產生細胞及使用骨髓瘤以外之細胞株。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 27 ）

a） 抗原之製備

有效作為Fas抗原之重組蛋白質（其後稱為「重組人類Fas」）可藉由令猴細胞株COS-1以表現載體pME185-mFas-AIC（其編碼造成一種包含人類Fas之細胞外功能部位和鼠間白素-3受體之細胞外功能部位〔IL3R-參見Nishimura, Y.,等，（1995），J. Immunol.,154, 4395-4403〕之融合蛋白質）予以轉移感染，並收集和部分純化此表現產物而取得。質體phFas-AIC2為由編碼造成人類Fas和鼠IL3R融合蛋白質之DNA插入動物細胞之表現載體pME18s而取得。如上所述，所使用之物質如編碼造成Fas之DNA、載體及宿主並不限於所提及者。

所得之人類Fas和IL3R融合蛋白質，於此處稱為人類Fas，其為由所轉形之COS-1細胞的培養上清液所收集，可經由適當之方法，如使用Resource Q 柱（商品名；Pharmacia）之離子交換層析予以部分精製。

適當的替換法為可使用取自人類細胞株之細胞膜的經精製Fas作為抗原。又，由於Fas的初級構造為已知〔參見Itoh, N.,等（1991），Cell, 66, 233-243〕，故包括人類Fas胺基酸序列之適當部分的胜肽，如序列表之SEQ ID No.1 可依任何適當的方法予以化學合成且可使用作為抗原。

b） 抗體產生細胞之製備

令實驗動物以適當混合佐劑如芙洛因德氏完全、或不完全佐劑和攀土之步驟a）中所製得之免疫原予以免疫。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ㄐ）

於本例中，適當的實驗動物為Fas無效鼠，其可依Senju等之方法作成〔Senju, S.,等(1996), International Immunology, 8, 423〕。

將鼠免疫的適當投予途徑包括皮下、腹膜內、靜脈內、穿皮和肌肉內注射途徑，且以皮下和腹膜內注射為較佳。

可以單一劑量或更佳於適當間隔（較佳為1至5週）以數個重覆劑量進行免疫接種。於血漿中偵測免疫鼠之抗-Fas抗體活性，並且將具有充分高的抗體效價之動物選出作為抗體產生細胞之動物源。選取具有高效價之動物乃令後續步驟更有效率。用於後續融合之細胞，通常為在最終免疫3至5天後由動物中收集。

分析抗體效價之方法包括各種熟知之技術，如放射免疫分析(RIA)、固相酵素免疫分析(ELISA)、螢光抗體分析和被動血球凝集作用分析，且以RIA和ELISA因偵測靈敏度、快速、正確和自動化潛力之理由而為較佳。

抗體效價可例如下列以ELISA予以測定。首先，令精製或部分精製之Fas吸附至固相如96孔穴ELISA平板之表面上，其後以與抗原無關連之蛋白質如胎牛血清白蛋白(BSA)，將Fas未結合之任何剩餘表面予以封阻。清洗後，令孔穴表面與欲測試之抗體製劑（例如，鼠血清）的連續稀釋樣品接觸，使得樣品中之抗-Fas抗體結合至抗原。加入酵素標識之抗鼠抗體作為第二抗體，用以結合鼠抗體。清洗後，加入酵素之受質，且經由測定適當之變

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（29）

化，如顯色所引起之吸光度改變，則可分析抗-Fas結合活性。

c）骨髓瘤細胞之製備

通常，由鼠細胞株所建立之細胞被使用作為骨髓瘤細胞之來源。適當的細胞株包括：8-氮鳥嘌呤耐性鼠（由BALB／c所衍生）骨髓瘤細胞株，p3×63Ag8U.1(P3-U1)[Yelton, D.E.等，Current Topics in Microbiology及Immunology, 81, 1-7, (1978)]，P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1)〔Kohler, G.,等。European J. Immunology, 6, 511-519(1976)〕，Sp2/0-Ag14(SP-2)〔Shulman, M.,等Nature, 276, 269-270(1978)〕，P3×63Ag8.653(653)〔Kearney, J.F.,等，J. Immunology, 123,1548-1550(1979)〕和P3×63Ag8（×63)[Horibata, K.和Harris, A.W.,Nature, 256, 495-497(1975)]。將所選出的細胞株連續移轉至適當的培養基，如8-氮鳥嘌呤培養基〔RPMI-1640培養基添加以麩胺醯胺、2-氫硫基乙醇、健他黴素、新生牛血清（FCS)、和8-氮鳥嘌呤〕、衣索可夫氏修飾杜貝克氏培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium IMDM)或杜貝克氏修飾衣格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)。其後將細胞於融合前3至4天，移轉至普通培養基如含有10% w/v FCS之ASF104培養基（味之素，K.K.），以確保在融合當日可獲得至少2×10^7個細胞。

d）細胞融合

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（20）

融合中所使用之抗體產生細胞為質體細胞及其前驅體細胞、淋巴細胞，其可由動物的任何適當部位取得。代表性部位為脾、淋巴結、末梢血液、或其任何適當的組合，且以脾細胞為最普遍使用。

於最後追加注射後，由具有預定抗體效價之鼠，移出抗體產生細胞所存在之組織如脾，以製得抗體產生細胞。目前令脾細胞與步驟c)所製備之骨髓瘤細胞融合之愛用技術為使用聚乙二醇，其具有相對低的細胞毒性且使用其之融合步驟簡單。

令脾和骨髓瘤細胞以無血清培養基（如RPMI 1640)或磷酸鹽緩衝食鹽水（PBS)予以充分清洗後混合，使得脾細胞對骨髓瘤細胞之數目比例約在5：1至10：1之間，且其後離心。丟棄上清液後並將丸狀細胞以逐滴混合加入適量，通常為1毫升內含50%聚乙二醇（m.w. 1,000至4,000)之無血清培養基充分鬆開。後續緩慢加入10毫升之無血清培養基並且將混合物離心。再度丟棄上清液，並將丸狀細胞懸浮於適量的HAT培養基〔一種次黃嘌呤、胺基蝶呤和胸甘（此三種化合物共同亦為已知的「HAT」和鼠間白素-2(IL-2)之溶液〕。其後將懸浮液分配至培養平板（亦於此後簡稱為「平板」)之孔穴中並於5% v/v CO_2 存在之37℃下培養約2週，適當補充添加HAT培養基。

e) 融合瘤之選取

當所使用之骨髓瘤細胞株對8-氮鳥嘌呤為耐性時，即

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（21）

其缺乏次黃嘌呤鳥嘌呤轉磷酸核糖基酶（HGPRT）酵素，則任何未融合之骨髓瘤細胞和任何之骨髓瘤細胞-骨髓瘤細胞融合者並無法於HAT培養基中生存。另一方面，抗體產生細胞彼此之融合、及抗體產生細胞與骨髓瘤細胞之融合瘤則可生存，而前者僅具有有限的生命。依此，於HAT培養基中繼續培養則僅選取出所欲的融合瘤。

其後令所得之融合瘤於缺乏胺基蝶呤之HAT培養基（HT培養基）中生長成菌落。其後，移出培養上清液之整分試樣例如以ELISA予以測定抗-Fas抗體效價。當使用上述重組人類Fas融合蛋白質作為ELISA抗原時，其亦需要移除產生專一性結合鼠IL3受體之細胞外功能部位抗體之選殖株。此類選殖株之存在與否，可例如經由使用鼠IL3受體、或其細胞外功能部位作為抗原之ELISA予以證實。

雖然上述選取過程舉例使用8-氮鳥嘌呤耐性細胞株，但需知可使用具有適當的選擇標記及對所使用之培養基具有適當修飾之其他細胞株。

f）選殖

將使用類似步驟b)所述方法測定抗體效價，顯示出產生抗-Fas專一抗體之融合瘤轉移至另一用於選殖之平板中。適當的選殖方法包括：限度稀釋法，其中將融合瘤稀釋至每平板孔穴含有1個細胞且其後培養；軟洋菜法，其中菌落為在軟洋菜培養基中培養後回收；使用分離培養用單一細胞之微操作裝置；和「sort-a-clone」，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（22）

其中以細胞分類器分離單一細胞。限度稀釋法通常為最簡單且被常用。

將所選的任何選殖步驟，對於各孔穴重覆證明抗體效價2至4次，並選出具有適當之抗體效價的選殖株，作為產生抗-Fas單株抗體之融合瘤。將產生抗鼠Fas抗體之融合瘤以類似方法選取，可得產生抗-Fas單株抗體之細胞株。於此目的中所使用之適當的鼠Fas例如為由表現載體pME18S-mFas-AIC轉移感染之經培養的動物細胞所表現的融合蛋白質。此質體具有編碼造成包含鼠Fas細胞外功能部位和鼠IL3受體細胞外功能部位之融合蛋白質的DNA〔參見Nishimura, Y.等(1995), J. Immunol., 154,4395-4403, 於此併入參考〕。其他鼠科Fas之來源包括純化的鼠Fas和於其表面上表現鼠Fas之細胞。

鼠-鼠融合瘤HFE7A為依上述方法選出。其詳細的製法述於後述實施例中。HFE7A為一種產生抗-Fas單株抗體之細胞株，為適於作為製備本發明人型化抗-Fas抗體之來源，且已依據布達佩斯條約，於1997年2月19日寄存於工業技術院生命工學工業技術研究所，並被給與登記號碼FERM BP-5828。依此，當使用鼠-鼠融合瘤HFE7A製備抗體時，乃省略上述步驟a)至f)，由下列步驟g)開始之步驟進行。

g) 培養融合瘤用以製備單株抗體

依前述步驟所得之融合瘤其後於普通培養基中培養，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ㄍㄍ）

而非HT培養基。經由使用大培養瓶之滾筒瓶培養、或以螺漿培養進行大規模培養。其後收集大規模培養物之上清液並依適當方法，如此藝熟知之膠過濾予以精製，取得抗-Fas單株抗體。融合瘤亦可於同基因鼠如BALB／c鼠或Nu/Nu鼠中腹膜內地生長，大量取得內含抗-Fas單株抗體之腹水。市售可得之單株抗體精製套件（例如，MAbTrap GII Kit；Pharmacia)可便利地使用於精製所收集之抗體。

上述所製備且被選擇對於人和鼠Fas為專一性之單株抗體，對於人類如鼠Fas具有高的專一性。

h）單株抗體之分析

由此所得之單株抗體之同功型和亞類的測定，為如下進行。適當的鑑定方法包括Ouchterlony法、ELISA和RIA。Ouchterlony法為簡單，但當單株抗體濃度低時需要濃縮溶液。相對地，當使用ELISA或RIA時，培養上清液可直接與吸附在固相上之抗原及對於各種免疫球蛋白同功型和亞類具有專一性之第二抗體反應，可鑑定出單株抗體之同功型和亞類。然而，通常較佳使用市售的鑑定套件，如Mouse Typer Kit(商品名：BioRad)。

蛋白質之定量可依據Folin-Lowry法進行，例如以280nm下之吸光度為基準算出〔1.4(OD_{28})＝免疫球蛋白1毫克／毫升〕。

單株抗體所辨識之Fas抗原決定基的鑑定為如下進行。首先，製備各種部分的Fas構造。此些部分構造可由合成製備，如以寡胜肽合成，或者可經由使用一種適當宿主

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（24）

如大腸桿菌（其已被混有編碼所欲斷片之DNA之適當載體所轉形），而予以生體內製備。兩種方法經常組合用於鑑定抗原決定基結合區所辨識之抗原決定基。例如，由抗原蛋白質之-C或N-終端運作之一系列具有適當縮短長度之多肽類，可依據此藝人士所熟知之遺傳工程技術予以製備。經由建立出與抗體反應之斷片，則可取得近似理想的抗原決定性部位。

抗原決定基可經由合成出對應於抗體所辨識之胜肽或突變物、或胜肽之各種較小的寡胜肽而被更加接近地鑑定。寡胜肽合成為通常使用於製備此些較小斷片。抗原決定基之鑑定可例如經由結合研究或於ELISA中與重組人類Fas融合蛋白質之競爭性抑制研究而確定。市售可得之套件，如SPOTs Kit(Genosys Biotechnologies, Inc.)和一系列基於multipin合成法之multipin胜肽合成套件(Chiron Corp.)可利於取得大為不同的寡胜肽。

編碼上述製得之抗-Fas單株抗體重和輕鏈之DNA，可經由融合瘤細胞所產生之抗-Fas單株抗體製備mRNA、以逆轉錄作用時mRNA轉換成cDNA，且其後分別單離編碼造成抗體之重或輕鏈之DNA。此DNA可用於產生本發明之人型化抗-Fas抗體。

mRNA之萃取可例如依硫氰酸胍-熱苯酚法或依硫氰酸胍-氯化銫法而進行，但以硫氰酸胍-氯化銫法為較佳。由細胞製備mRNA一般首先為製得全RNA且其後使用聚(A)$^+$ RNA精製基質如寡(dT)纖維素和寡(dT)乳膠珠粒，由全RNA精製出mRNA。另外地，可使用此類基質由細胞

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）
裝
訂
線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（35）

溶胞產物直接製備 mRNA。製備全RNA之方法包括：鹼性蔗糖密度梯度離心〔參見Dougherty, W.G.和Hiebert, E.,(1980), Virology, 101,466-474〕；硫氰酸胍-苯酚法；硫氰酸胍-三氟化銫法；和苯酚-SDS法。目前較佳之方法為使用硫氰酸胍和氯化銫〔參見Chirgwin, J. M.,等(1979), Biochemistry, 18, 5294-5299〕。

由此所得之聚(A)$^+$ RNA於逆轉逆酶反應中，可使用作為模板，用以製備單股cDNA〔(ss)cDNA〕。如上述使用逆轉錄酶所得之cDNA，其後可被轉變成雙股(ds)cDNA。取得cDNA之適當方法包括S1核酸酶法〔參見Efstraidis, A.,等(1976), Cell, 7,279-288〕、Gubler-Hoffman法〔參見Gubler, U.和Hoffman, B.J.,(1983), Gene,25, 263-269〕和Okayama-Berg法〔參見Okayama, H.和Berg, P.,(1982), Mol.Cell. Biol.,2,161-170〕。然而，目前較佳之方法包括使用單股cDNA作為模板之聚合酶鏈反應〔PCR-參見Saiki, R. K.等，(1988), Science, 239, 487-491，於此併入參考〕。因此將此較佳步驟標為「RT-PCR」，因其包括逆轉錄作用和PCR。

上述所得之ds cDNA其後可嵌入選殖載體中，且所得之重組載體可用於轉形適當的微生物，如大腸桿菌。轉形體可使用標準方法予以選出，如經由選取重組載體所編碼之四環黴素耐性或安比西林耐性。若使用大腸桿菌，則可使用Hanahan法進行轉形〔參見Hanahan, D., (1983), J.Mol. Biol.,166, 557-580，於此併入參考〕

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 26 ）

。另外地，可將重組載體導入由共同曝露至氯化鈣和另外之氯化鎂或氯化銣所製得之受容細胞中。若質體為使用作為載體，則其高度欲令質體承載一種耐藥基因，如上述，以便於選擇。雖可進行猛力選取，但為不佳。雖然為討論質體，但其他選殖載體如λ噬菌體亦可使用。

於選擇載有編碼造成所欲抗人類Fas次單位cDNA之轉形體中，可使用如下所述之各種方法，當所欲之cDNA以RT-PCR專一性地放大時，則可省略此些步驟。

(1) 以聚合酶鏈反應予以篩選

若所欲蛋白質之所有或部分的胺基酸序列已被闡明，則可合成對應於各非連續部分胺基酸序列之意義和反意義寡核甘酸引子。此引子於其後可被用於聚合酶鏈反應技術〔參見Saiki, R. K.,等(1998), Science, 239, 487-491〕，以放大編碼鼠抗-人類Fas單株抗體次單元之所欲的DNA斷片。PCR中所使用之模板DNA例如可為由產生抗人類Fas單株抗體HFE7A(FERM BP-5828)之融合瘤的mRNA以逆轉錄作用所合成之cDNA。

由此合成之DNA斷片可使用市售套件、或以例如^{32}P、^{35}S或生物素標識直接混入質體載體中，且其後可使用作為菌落雜交或噬菌斑雜交之探針，取得所欲的選殖株。

由上述所得之適當轉形體，收集編碼造成抗-人類Fas單株抗體各次單位之DNA，可依據已知技術如Maniatis等所述之技術進行〔「Molecular Cloning A Laboratory Manual」冷泉港實驗室，NY, (1982)，於此併入參考〕。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（77）

例如，編碼所欲次單位之DNA區域，可由已被測定具有所需質體之轉形體，於分離對應於載體DNA之部分後，由質體DNA切出。

(2) 使用合成之寡核甘酸探針予以篩選。

若所欲蛋白質之所有或部分的胺基酸序列已被闡明，則可使用短的連續序列（其亦為代表性之所欲蛋白質）構築寡核甘酸探針。此探針編碼造成胺基酸序列，但因遺傳性密碼之簡併，故可製備大量之探針。因此，通常可選出僅被有限數量之寡核甘酸所編碼造成之胺基酸序列。需要產生之寡核甘酸數目可再以任何四個普通鹼基可使用之肌甘予以降低。其後將探針如以^{32}P、^{35}S或生物素予以適當地標幟，且以變性予以雜交，以來自轉形體之已被固定化於硝基纖維素濾紙之DNA予以轉形。經由偵測探針上之標幟而找出陽性株。

適當時，DNA序列可依各種些技藝熟知之方法予以定序列，例如，Maxam-Gilbert 化學修飾技術〔參見Maxam, A.M. 和 Gilbert, W.(1980)於「Methods in Enzymology」65, 499-276〕和使用MB噬菌體之雙脫氧鏈終法〔參見Messing, J. 和 Vieira, J.(1982), Gene, 19, 269-276〕。近年來，已廣泛接受另一種定出DNA序列之方法，其包括於雙脫氧法中使用產氟染料代替傳統的放射性同位素。全部過程為被電腦化，包括電泳後核甘酸序列之讀取。此過程之合適機器例如為Perkin-Elmer Sequence robot「CATALYST 800」和Perkin-Elmer373A型DNA Sequencer。使用此技術可令DNA核甘酸序列之決定更為

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 9 ）

便利安全。

經由使用如上述之技術，則可有效且安定地進行DNA序列之決定。基於由此所決定之本發明DNA之各核苷酸序列和重及輕鏈之各N-終端胺基酸序列之資料，則可決定出本發明單株抗體之重及輕鏈的全部胺基酸序列。

例如，本發明之HFE7A單株抗體（其為適於提供移植至本發明人型化抗體之CDR）為一種免疫球蛋白G1（IgG1）且為由γ1重鏈和K 輕鏈次單位所組成之複合物。決定此些次單位之部分胺基酸序列的較佳方法包括例如，以適當技術如電泳或柱層析單離出各次單位，且其後使用例如自動化之蛋白質序列機（例如，PPSQ-10，島津製作所，K.K.）分析各次單位之N-終端胺基酸序列。

免疫球蛋白之重和輕鏈各由可變區和恆定區所組成，而各鏈之可變區再由三個CDR和四個側接CDR之骨架區所組成。

恆定區之胺基酸不論所辨識之抗原，於任何可指定的亞類中為恆定的。另一方面，可變區之胺基酸序列，至少CDR為對於各抗體為專一的。然而，由使用各種抗體胺基酸序列數據之比較研究確立出，在屬於相同亞群之抗體次單位中，CDR之位置和骨架序列之長度兩者均很少類似〔參見Kabat, E.A.等（1991），於「Sequence of Proteins of Immunological Interest 第II冊」U.S. Department of Health and Human Services，於此併入參考〕。因此，經由令抗-Fas單株抗體HFE7A之重和

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（77）

輕鏈之胺基酸序列與已知的胺基酸序列資料比較，則可確立出上述所測定之各胺基酸序列中的例如CDR和骨架區、及恆定區之位置。

FRH_1，即重鏈的N-終端骨架區，經常被發現短於30個胺基酸之正常長度。例如，如HFE7A相同亞型之鼠IgG1中已知最短的FRH_1僅為18個胺基酸〔參見Kabat等，ibid)。依此，於本發明之抗體中，可察見全部分子對應於FRH_1之部分的長度可為適當的長度，典型為18至30個胺基酸之間，但較佳為約30個胺基酸，只要其不會流失所需的Fas結合活性。

Fas結合區之三維構造主要由可變區中之序列所決定，且具有由恆定區所提供之支撐。骨架區對於化學性且結構性與抗原交互作用之CDR提供構造。依此，辨識Fas以外抗原之現存的抗體或其部分，可依據上述綱領經由適當改變CDR而將其選取並修飾成辨識Fas(例如，參見美國專利公報No.5,331,573)。為了儘可能保留結合活性，通常較欲選擇最類似於供體鏈之受體鏈。經此修飾之此類修飾胜肽可用於本發明，例如用於預防或治療歸因於Fas／Fas配位體系統異常之疾病。

構築胺基酸序列中之一個或以上胺基酸缺失之突變株，例如可依據卡匣突作用(cassette mutagenesis)予以進行(參見Toshimitsu kishimoto,「Shin-Seikagaku Jikken Kouza 2: kakusan III Kumikae DNA Gijutsu」, 242-251)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（40）

DNA序列可經由任何的適當方法予以製備，且許多為已知。適當的方法（特別對於較短序列）為使用傳統方法如亞磷酸三酯法之化學合成〔參見Hunkapiller, M.等, (1984), Nature, 310, 105-111〕。任何胺基酸密碼組之選取，例如可由任何對應於所欲胺基酸之辨識密碼組選出，且此類選取為任意的，或考慮宿主中所指定密碼子之頻率，或者因為其可能經由適當選取造出一個限制部位，故可不需改變胺基酸序列。核甘酸序列之部分修飾可經由使用編碼所欲修飾於合成寡核甘酸引子，進行位置專一突變〔參見Mark, D.F. 等(1984), Pooc. Natl. Acad. Sci, USA, 81, 5662-5666〕，依據傳統技術而完成。

DNA與編碼造成本發明抗Fas單株抗體重或輕鏈之DNA的雜交作用，例如可經由使用如以（α-^{32}P）dCTP標幟之本發明DNA的適當斷片作為探針之無規引子法〔參見Feinberg, A. P.和Vogelstein, B. (1983), Anal. Biochem.,132, 6-13〕或缺口轉譯法〔參見Maniatis, T. 等, (1982), 於「Molecular Cloning A Laboratory Manual」冷泉港實驗室, NY〕予以測定。適當的技術如下。

首先，令潛在雜交之DNA吸附至硝基纖維素或尼龍膜上（若需要，則先令以鹼處理）且其後以加熱或UV照射予以固定。於較佳方法中，其次則令此膜浸於內含6× SSC（1× SSC為0.15 NaCl和0.015M檸檬酸三鈉之水溶液）、

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（41）

5% v/v Denhardt溶液和0.1% v/v 十二烷基硫酸鈉(SDS)之預雜交溶液中，並於55℃下培養4小時或以上。其次，將事先製備之探針溶於類似的預雜交溶液中，使呈1×10^6 cpm/ml之最終比活性，其後於60℃下培養過夜。後續，令膜於室溫下，以6×SSC重覆清洗5分鐘並再以2×SSC清洗20分鐘，其後令以放射自顯法。

經由使用此類方法，可由任何cDNA庫或基因庫，單離出可與編碼抗-Fas單株抗體重或輕鏈之DNA雜交之可用作為本發明人型化抗-Fas抗體基礎之DNA〔參見Maniatis, T. 等，(1982)，於「Molecular Cloning A Laboratory Manual」冷泉港實驗室，NY〕。此類DNA被包括在本發明之範疇中，雜交之基本特徵為6×SSC及55℃，較佳為60℃且更佳為70℃。

令由此所得之本發明DNA嵌入表現載體，則可轉形原核或真核宿主細胞。此類表現載體典型上含有適當的啓動基因、複製部位和基因表現所關連之序列，使得DNA可在宿主細胞中表現。

適當的原核宿主細胞例如包括大腸桿菌和枯草桿菌。為了令所欲基因於此類宿主細胞中表現，可將此些宿主細胞以內含衍生自與宿主相容種類之複製子（典型為具有複製起點和啓動基因序列如lac UV5)之質體載體予以轉形。此些載體較佳為具有可對轉形細胞賦與選擇性表現型之序列。

大腸桿菌之適當菌株為衍生自大腸桿菌K12之菌株JM

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（42）

109。適當載體包括pBR322和pUC系列質體。適當的啓動基因包括乳糖啓動基因（lac）、色胺酸乳糖啓動基因（trc）、色胺酸（trp）啓動基因、脂蛋白（lpp）啓動基因、衍生自噬菌體λ之λPL啓動基因、及多肽鏈延長因子Tu（tufB）啓動基因。通常，本發明並不限定於使用此處所列舉之此類宿主、載體、啓動基因等，且任何適當的系統可視需要使用。

枯草桿菌之適當的較佳菌株為菌株207-25，且較佳載體為pTUB228〔參見Ohmura，K.，等，（1984），J. Biochem.，95，87-93〕。適當的啓動基因為枯草桿菌a-澱粉酶基因之調節序列。若需要，可將編碼造成α-澱粉酶訊號胜肽序列之DNA序列連接至本發明之DNA，令其可以細胞外分泌。

真核宿主包括由脊椎動物類和酵母類所衍生之細胞宿主。所使用之脊椎動物細胞例為猴COS-1細胞株〔參見Gluzman，Y.，（1981），Cell，23，175-182〕。適當的酵母細胞宿主包括麵包酵母（Saccharomyces cerevisiae）、methylotrophic酵母（Pichia pastoris）和分裂酵母（Schizosaccharomyces pombe）。視需要亦可使用其他宿主。

通常，對於適合脊椎動物細胞之表現載體乃要求其包括：啓動基因，通常為在欲表現基因之上游；RNA接合部位；聚腺甘酸化部位；和轉錄終止序列，及其所需的官能性，如複製起點。適當的質體為內含SV40早期啓動

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（47）

基因之pSV2dhfr〔參見Subramani, S.等人(1981), Mol. Cell. Biol.,1, 854-884〕，其他許多者為此藝所熟知。

適當的真核微生物為酵母，如釀酒酵母，且酵母之適當的表現載體包括pAH301、pAH82和YEp51。適當的載體例如包含酒精脫氫酶基因之啓動基因〔參見Bennetzen, J.L. 和Hall, B.D.,(1982), J. Biol. Chem.,257,3018-3025〕或羧肽酶YGAL10啓動基因〔參見Ichikawa, K., 等(1993), Biosci. Biotech. Biochem.,57, 1686-1690〕。若需要，可將編碼造成羧肽酶Y訊號胜肽序列之DNA序列連接至欲表現之DNA，令其可以細胞外分泌。

當使用COS細胞作為宿主時，其載體適當包括SV40複製起點使其可自主之的複製、轉錄啓動基因、轉錄終止訊號和RNA接合部位。可使用表現載體以任何適當方法，如DEAE、葡聚糖法〔參見Luthman, H,和Magnu sson, G.(1983), Nucleic Acids Res.,11, 1295-1308〕、磷酸鈣-DNA共同沈澱法〔參見Graham, F.L. 和Van der Eb, A, J.,(1973), Virology, 52, 456-457〕和電脈衝電穿孔法〔參見Neumann, E 等, (1982), EMBO J.,1,841-845〕。

於較佳具體例中，COS細胞為被共同轉移感染兩種不同的表現載體一其一者為內含編碼造成含有至少HFE7A抗體重鏈可變區蛋白質之DNA，較佳為成為全部人型化重鏈之一部分，及一者為內含編碼造成含有至少HFE7A抗體輕鏈可變區蛋白質之DNA，較佳為成為全部人型化

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（44）

輕鏈之一部分，此些載體為同時表現產生一種人型化重組抗-人類Fas抗體。

本發明之轉形體可使用傳統方法培養，且所欲之蛋白質可於細胞內或細胞外地表現。適當的培養基包括各種常用之培養基，且通常為依據所選擇之宿主而選定。例如，對於COS細胞之適當培養基包括RPMI-1640和杜貝克氏修飾衣格爾最小需求培養基(Dulbecco's Modified Eagle Minimum Essential Medium, DMEM)，其視需要可補充胎牛血清(FBS)。

培養溫度可為任何不會顯著降低細胞之蛋白質合成能力之適當溫度，且較佳為在32至42℃之範圍，最佳為37℃，特別為對於哺乳細胞。若需要，可在內含1至10%(v/v)二氧化碳之氛圍中進行培養。

分別用於製備本發明人型化抗-Fas抗體之各被轉形以一於動物細胞中表現編碼造成抗-Fas單株抗體之重和輕鏈DNA之重組DNA載體的轉形體菌株大腸桿菌pME-H和大腸桿菌pME-L,已於1997年3月12日依據布達佩斯條約寄存於工業技術 院生命工學工業技術研究所，且分別以登記號碼FERM BP-5868和BP-5867將其記錄。因此，經由寄存菌株所單離之重組載體轉形培養之動物細胞如COS-1，並且培養轉形體細胞，則可於培養物中產生重組抗-Fas抗體。

由本發明轉形體所表現之蛋白質，不論此蛋白質為細胞內或細胞外地表現，均可依各種已知的分離方法予以

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（45）

單離及精製，且其可考慮蛋白質之物理和化學性質而定。適當的特殊分離方法包括：以蛋白質常用之沈澱試劑處理；各種層析方法如超過濾、分子篩層析（膠過濾）、吸附層析、離子交換層析、親和性層析和高表現液體層析（HPLC）；透析；和其組合。

經由使用上述此類方法，則可以高產率和高純度輕易取得所欲的蛋白質。

於此例中，為了最理想地人型化，乃將抗Fas單株抗體較佳令可變區移植至人類抗體中，至少使得各CDR之全部為偶合至人類抗體中，且較佳亦使得FR序列之主要殘基移植至人類抗體中，使得儘可能保持結合部位之構造。此可依下列三種方法之任一種而達成：

1）使用來自相同已知人類抗體之重和輕鏈；或

2）使用衍生自不同人類抗體之重和輕鏈，其與供體鏈具有高序列同質性、或者分擔交感序列，同時保持受體鏈亞群之組合；或

3）由人類抗體之初級序列庫選出與供體之FR具有最高同質性之FR的重和輕鏈，而不管其亞群之組合。

此類僅基於序列同質性之選擇方法（無其他限制），使得供體和受體於FR部分具有至少70%胺基酸相同性。經由採用此方法，可較已知方法減少由供體所移植之胺基酸數目，且因此將HAMA反應之誘發降至最低。

此處所使用之術語「胺基酸序列同質性」意指兩個不同多肽或蛋白質間之胺基酸序列的類似性。胺基酸序列

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（4b）

同質性可以任何一種方法評價，通常使用序列數據鹼基之電腦化搜索。此些方法為此藝人士所熟知。吾等較欲以骨架區長度評價其同質性。

需知於供體亞群中極少出現的胺基酸殘基角色並無法完全定義，因為由其初級序列預測抗體分子之三維構造之技術（此後稱為「分子塑型」）具有限度的正確性。已知之方法如Queen及其共同工作者的方法（Queen等，同前）並未指出於此類位置中是否應由供體或由受體選出胺基酸殘基。僅基於序列同質性選擇受體分子，可顯著降低作此類選擇之需要。

此外，吾等發現經由規定額外的選擇步驟，確認來自供體FR之胺基酸序列（其對於保持供體CDR區之構造和功能乃為重要的）則可更改善此方法。

一旦對於指定鏈選出人類受體分子，則欲由供體FR移植之胺基酸殘基的選定，可如下進行。

將供體和受體之胺基酸序列排成一列。若排成直列之FR胺基酸殘基於任何位置不同，則需決定應選擇之殘基。所選出之殘基應不與衍生自供體之CDR的三維構造交互作用或對其僅具有最低之影響。

Queen等（國際專利公報No.WO 90/07861，於此併入參考）提出一種決定來自供體FR之胺基酸殘基是否與CDR序列共同移植之方法。依據此方法，若殘基符合下列至少一個標準，則將來自FR區之胺基酸殘基與CDR序列共同移植至受體：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（47）

1）於受體人類骨架區中之胺基酸極少於受體的位置中發現，而供體中對應的胺基酸則在受體之位置中普遍發現；

2）胺基酸為緊密位於一個CDR；和

3）胺基酸在近約CDR之3Å中具有側鏈原子（由免疫球蛋白之三維塑型所判定）且潛在可與人型化抗體之抗原或cDR交互作用。

由上述標準（2）所確認之殘基通常表現出標準（3）之特徵。因此，於本發明中，省略標準（2）並且引入兩個新標準。依此，於本發明中，若殘基符合下列至少一個標準，則將來自供體FR之殘基與CDR共同移植：

a）受體人類骨架區中之胺基酸極少於受體之位置中發現，而供體中對應的胺基酸則在受體之位置中普遍發現；

b）胺基酸在近約CDR之3Å中具有側鏈原子（由免疫球蛋白之三維塑型所判定）且潛在可與人型化抗體之抗原或CDR交互作用；

c）於位置中所發現之胺基酸殘基為關連於決定CDR標準類別之構造；

d）胺基酸之位置被發現為在於重和輕鏈的接觸表面。

關於標準（a），當於相同亞類之90%或以上之抗體中發現此胺基酸時則定義為「普遍」（kabat等，前文）。當於相同亞類之10%以下抗體中發現此胺基酸時則定義為「極少」。

關於標準（c），決定因素殘基之標準類別位置，可依

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（48）

據Chothia和其共同工作者Chothia等，前文）所提供之資料明白地測定。

關於標準(b)和(d)，其需要事先進行抗體可變區之分子塑型。雖然可使用任何市售可得之分子塑型軟體，但吾等較欲使用AbM軟體〔Oxford Molecular Limited, Inc.〕。

以分子塑型所作之預測具有長度的正確性。因此，於本發明中，令分子塑型所預測取得之構造，與各種抗體可變區所得之X-射線結晶學數據相比較進行評估。

當使用分子塑型產生構造模型時，兩個原子間之距離少於其范德瓦耳斯半徑加上0.5Å之總和時，則預測此兩個原子經由范德瓦耳斯力量彼此接觸。當主鏈和側鏈之極性分子如醯胺氮和羰基氧間的距離為短於2.9Å(氫鍵平均長度)加上0.5Å時，則預測出現氫鍵。再者，當兩個相對帶電原子間的距離為短於2.85Å加上0.5Å時，則預測其形成離子配對。

FR中經常接觸CDR之胺基酸位置，為基於由各種抗體之可變區所得之X-射線結晶學數據而確認。不考慮其亞群，決定此些位置。於輕鏈，其為在位置1、2、3、4、5、23、35、36、46、48、49、58、69、71和88，而於重鏈其為在位置2、4、27、28、29、30、36、38、46、47、48、49、66、67、69、71、73、78、92、93、94、和103。上述胺基酸之計數為依前文之Kabat等之定義。其後依據此計數系統。當以分子塑型分析相同數據時，則可檢視到此些位置之胺基酸殘基於2/3之抗體可變區

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（49）

中，與CDR之胺基酸殘基接觸。

此些發現為用於定義上述標準（b）。詳言之，若FR中之胺基酸位置為以分子塑型預則接觸CDR且以X-射線結晶學分析經常發明實驗性地接觸CDR，則可優先進行供體之胺基酸殘基的移植。於其他任何情況中，並不考慮標準（b）。

類似地，關於標準（d），來自許多抗體可變區之X-射線結晶學數據指出輕鏈中之位置36、38、43、44、46、49、87和98、及重鏈中之位置37、39、45、47、91、103和104之胺基酸殘基為經常牽涉於重及輕鏈間的接觸。若以分子塑型預測此些胺基酸為牽涉於輕及重鏈之接觸，則優先進行供體胺基酸殘基之移植。於其他任何情況中，並不考慮標準（d）。

編碼造成本發明人型化抗-人類Fas抗體之H和L鏈可變區的DNA，可以許多方式製備。

於一個方法中，可合成代表所欲DNA之部分核甘酸序列之長度在60至70核甘酸之間的聚核甘酸斷片。將合成過程安排成令意義股之斷片終端與反意義股交替。所得之聚核甘酸斷片可彼此黏接且以DNA連接酶予以連接。以此方式，可取得編碼造成人型化抗-人類Fas抗體之H和L鏈可變區的DNA斷片。

另外地，可由人類淋巴細胞單離出編碼受體整段可變區之DNA。例如，可使用部位直接突變（Site directed mutagenesis）將限制部位導入編碼造成供體CDR之區域

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（50）

中。其後可使用相關的限制酶由受體切出CDR。其後可合成編碼造成供體CDR之DNA並且使用DNA連接酶連接至受體分子中。

吾等較欲令編碼造成所欲的人型化抗-人類Fas抗體之重和輕鏈可變區之DNA，為由重疊延伸PCR技術取得〔Horton，等（1989），Gene，77,61-68，於此併入參考〕。

重疊延伸PCR令兩個各編碼所欲胺基酸序列之DNA斷片結合。為了舉例，此處將此兩個斷片稱為（A)和（B)。合成意義引子之20至40個核甘酸（C)(其與（A)之5'-區黏接），及與（B)之3'-區黏接之意義引子（D)之20至40個核甘酸。需要再兩個引子。首先，為一種嵌合型意義引子，其包括來自（A)之3'-區的20至30個核甘酸結合來自（B)之5'-區的20至30個核甘酸。其次，需要一種反意義引子（F)，其互補於意義引子。

使用引子（C)和（F)，組合內含斷片A之DNA模板，可進行PCR反應。此令所產生之DNA產物為包括結合至（A)之3'終端之（B)5'-區的20至30個核甘酸。將此斷片稱為斷片（G)。

類似地，可使用引子（D)和（E)，組合內含斷片B之DNA模板，進行PCR反應。此令所產生之DNA為包括結合至（B)之5'終端之（A)3'-區的20至30個核甘酸。將此斷片稱為斷片（H)。

此（G)和（H)斷片分別具有（G)之3'-區中的40至60個核甘酸及（H)之5'-區中的40至60個核甘酸之互補序列。可

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（51）

使用（G）和（H）斷片之混合物作為模板進行PCR反應。於第一個變性步驟中，DNA變成單股。於後續的黏接步驟中，大部分的DNA恢復成原來之型式。然而，由於（G）和（H）斷片於序列重疊區中之黏接，故部分的DNA形成異質的DNA二倍體。於後續的延伸步驟中，突出的單股部分為配對產生（A）和（B）連接所代表之嵌合型DNA。此DNA斷片於其後稱為（I）。斷片（I）可使用引子（C）和引子（D）予以放大。

於本發明之具體例中，斷片（A）和（B）代表編碼造成鼠人型化抗-人類Fas單株抗體之H和L鏈CDR區之DNA、編碼人類IgG之FR區之DNA、或編碼人類IgG分泌訊號之DNA。

對應於所欲胺基酸之密碼子或密碼組為已知。當設計生產蛋白質之DNA序列時，可選擇任何適當的密碼子。例如，可依宿主所使用之密碼子為基準選出密碼子。核甘酸序列的部分修飾，例如可依據利用編碼造成所欲修飾之合成的寡核甘酸引子之部位直接突變之標準技術予以完成〔Mark, D. F.等，(1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666〕。經由使用選定之引子導出特定點突變作用，則可取得編碼任何所欲的人型化抗-人類Fas抗體之H和L鏈可變區之DNA。

將由此所得之本發明DNA嵌入表現載體中，用以進行原核或真核宿主細胞之轉形作用。此類表現載體典型含有適當的啓動基因，複製位置和基因表現中所牽涉之序列，令DNA於宿主細胞中表現。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（57）

於表現Fas之T細胞中誘導細胞自滅活性，可經由已投予本發明人型化抗-Fas抗體（此後亦稱為「抗體」）之鼠中移出胸腺、將胸腺分散並令所得之細胞接觸T細胞及對鼠Fas專一之抗體、並以流動細胞計測量兩個抗體所結合之細胞比例進行分析。

MRL gld/gld鼠自體免疫症狀之減輕

將抗體腹膜內投予至MRL gld/gld鼠。此些鼠於編碼Fas配位體之基因中帶有突變且展現出類似自體免疫疾病之症狀〔參見Shin Yonehara(1994)；Nikkei Science Bessatsu, 110, 66-77)。此抗體於許多實例中，可預防或至少減輕手足腫脹（此為類似自體免疫疾病症狀之一）。

無法誘導肝疾病

由投予抗體之BALB/c鼠抽取末梢血並且與分析儀試劑（例如轉胺酶-HRII；Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)使用自動分析儀（例如，7250型；Hitachi Seisakusyo, K.K.)測量酵素麩草轉胺酶(GOP)和麩丙轉胺酶(GPT)之血液濃度。無法引起GOT和GPT血液濃度提高意指該抗體於生體內投予時不會誘導肝疾病。

對暴發性肝炎之治療或預防功效。

經投予抗-鼠Fas單株抗體JO2，於鼠中誘導出暴發性肝炎之實驗系統中，可檢視上述抗體與JO2同時投予或於JO2投予後進行投予之功效。本發明之抗體可大程度預防JO2於鼠中之所有影響，因而證明於肝中的保護功效。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（54）

對膠原開始誘導關節炎之預防功效。

檢視抗體對鼠投予包括膠原和弗洛因總完全佐劑之乳劑所激起之風濕性關節炎的投予功效。此抗體具有預防性質。

於來自風濕性關節炎患者之滑液細胞中誘導細胞自滅。

將取自具有風濕性關節炎患者之感染區的滑液細胞培養，並且檢視當培養基含有上述抗體時之細胞生存能力。令人驚訝地，滑液細胞之增殖乃受到抑制。

因此，本發明抗體不類似先前已知之抗-Fas單株抗體，不僅可保護正常細胞且亦可殺死異常細胞。依此，其可用於作為歸因於Fas／Fas配位體系統異常之疾病的預防和治療藥劑。

本發明蛋白質誘導細胞自滅的能力，例如可經由令細胞如人類淋巴細胞株HPB-ALL(Morikawa, S.,等(1978), Int. J. Cancer, 21, 166-170)或Jurkat (American Type Culture No. TIB-1520)於已加入或將加入試驗樣品之培養基中培養而確立。其後，可依據MTT分析〔Green, L.M.等, (1984), J. Immunological Methods, 70, 257-568〕測定存活率。

本發明之抗體可被使用於各種關連於如上述Fas／Fas配位體系統異常之疾病狀況之各種製藥製劑中。

此類預防或治療藥劑可以任何不同型式投予。適當的投予型式包括經口投予，如以藥片、膠囊、顆粒、粉末和糖漿、或經腸投予，如以任何適當的注射型式包括靜

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（55）

脈內、肌肉內和經皮，及酊劑和栓劑。因此，本發明亦提供治療上述狀況之方法及治療組成物。此類組成物典型包括治療有效量之本發明蛋白質摻混以製藥容許載體，且可以任何適當方式投予如非經腸、靜脈內、皮下或局部投予。

特別地，當欲治療之狀況為在局部的，則其較佳令蛋白質儘可能接近投予至該部位。例如，於主要關節中可能習慣感到嚴重的風濕痛，而可在此類局部投予此蛋白質。

全身性投予本發明蛋白質為特佳以無熱原、治療地且特別為非經腸地可容許水溶液型式進行投予。此類製藥容許蛋白質溶液之製備，關於如pH、等張性、安定性等方面為此技藝人士所熟知。此外，本發明組成物可再包括如被認為適當之成分，如細胞生長阻礙劑及其他醫藥品。

需知其劑量雖依據因素，如患者狀況、年齡和體重而異，但通常對成人經口投予之劑量為在每天約0.1毫克至1,000毫克之範圍，其可以單一劑量或以數個分開劑量進行投予。非經腸投予之劑量典型在0.1毫克至1,000毫克之間，其可經由皮下，肌肉內或靜脈注射（或注射）投予。

本發明人型化抗-Fas抗體之適當的經口投予型式為作成無菌溶液或懸浮於水中或製藥容許溶液中之安瓿。另外地，可將無菌粉末（較佳為由人型化抗-Fas抗體之冷

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（56）

凍乾燥製備）充填至安瓿中，其後以製藥容許溶液稀釋供使用。

由於用於人類治療之本發明抗體已被人型化之事實，故其毒性為非常低。

現將參考下列實施例更詳細說明本發明，但此實施例為用於說明，但非用於限制本發明。此實施例代表本發明之特殊具體例。

任何方法、製法、溶液及未詳細定義者均可查見「Molecular cloning-A laboratory Hand book」（前文，於此併入參考）。所有溶液均為水狀且於無菌去離水中作成，除非另外指明。

參考例1

Fas抗原之製備

為了取得缺乏穿透膜功能部位之人類Fas可溶部分，構築表現載體。將此載體設計成編碼造成一種融合蛋白質（「Fas融合蛋白質」）其包括融合至鼠間白素3(IL3)受體細胞外功能部位〔參見Gorman, D.M.等(1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87,5459-5463〕之人類Fas細胞外功能部位。以PCR由此載體製備編碼造成人類Fas融合蛋白質之DNA。載體之構築及DNA之製備為如下。

a)模板

築構編碼造成融合蛋白質插入物之PCR用模板為兩個質體。第一個質體pME 18S-mFas-AIC〔參見Nishimura, Y. 等(1995), J. Immunol. 154, 4395-4403〕為編碼

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（57）

造成融合蛋白質之DNA表現質體載體，其包括鼠Fas之細胞外功能部位和鼠IL3受體之細胞外功能部位。第二個質體pCEV4〔參見Itoh, N.等，(1991), Cell. 66,233-243〕，載有編碼造成人類Fas之cDNA。

b) PCR引子

合成下列寡核甘酸引子：

5'-GGGGAATTCC AGTACGGAGT TGGGGAAGCT CTTT-3'

(N1：序列表之SEQ ID No.12)；

5'-GTTTCTTCTG CCTCTGTCAC CAAGTTAGAT CTGGA-3'

(C3N：序列表之SEQ ID No.13)；

5'-TCCAGATCTA ACTTGGTGAC AGAGGCAGAA GAAAC-3'

(N3N：序列表之SEQ ID No.14)；和

5'-CCCTCTAGAC GCGTCACGTG GGCATCAC-3'

(CTN2：序列表之SEQ ID No.15)。

除非特別指明，此些實施例中的所有寡核甘酸為依據手冊所附之指示〔參見Matteucci, M.D.和Caruthers, M.H.,(1981), J. Am. Chem. Soc.,103, 3185-3191〕使用自動DNA合成儀(380 B型；Perkin Elmer Japan, Biosystems Division)予以合成。合成後，將各寡核甘酸(引子)由載體移出、脫保護，並將此溶液冷凍乾燥取得一粉末。其後將此粉末溶於蒸餾水並於-20℃下貯存直到所需。

c) PCR之第一階段

i) 命名為HFAS且編碼造成人類Fas之細胞外功能部位的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（58）

DNA 斷片為如下製備。使用LA(Long and Accurate)PCR套件(Takara Shuzo Co.,Ltd.,Japan)進行PCR。

PCR反應溶液之組成：

模板pCEV4 DNA, 20ng；

引子N1, 0.5μg；

引子C3N, 0.5μg；

10倍濃縮之LA PCR緩衝液（套件所提供）, 25μl；

dNTP's(由套件所提供）, 25μl；和

LA Taq聚合酶（由套件所提供）, 12.5單位。

於溶液中加入無菌蒸餾水使得總量為250μl。除非特別指明，否則dNTP's為以dATP、dCTP、dGTP和dTTP等莫耳混合物形式提供。

如下進行PCR反應。溶液先於94℃下加熱2分鐘，其後進行重覆30次循環之加熱至94℃ 1分鐘，55℃ 1分鐘及72℃ 2分鐘之循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃下加熱10分鐘（於參考例所述之所有的PCR反應中，溫度為使用GeneAmp PCR 9600系統；Perkin Elmer, Japan）予以調節。

ii) 命名為MAIC且編碼造成鼠IL3受體之細胞外功能部位的DNA斷片為如下製備。

PCR反應溶液之組成：

模板pME18S-mFas-AIC DNA, 20ng；

引子N3N, 0.5μg；

引子CTN2, 0.5μg；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（59）

10倍濃縮之LA PCR緩衝液，25μl；

dNTP's，25μl；

LA Taq聚合酶，12.5單位；和

無菌蒸餾水加至總量250μl。

PCR反應為如上進行。

由此所得之放大的HFAS和MAIC DNA斷片先令以苯酚萃取分離、其後以酒精沈澱〔此兩過程於下列實施例2(2)3)a)中說明〕，其後將精製之斷片於5% w/v聚丙烯醯胺膠上進行電泳。此膠以1μg/ml之溴化乙錠染色，以於UV光下出現DNA。使用剃刀刀片切出內含所欲DNA斷片之帶並且使用裝設有離心管型超過濾裝置Centricon-10之Amicon Centriruter (Amicon)將DNA由其中電溶離。電溶離作用後，丟棄內含Centricon-10單位溶離物並且於7,500×g下離心約1小時，濃縮DNA。將DNA以酒精予以沈澱並且溶於20微升之蒸餾水中。

d) PCR之第二階段

編碼造成人類Fas融合蛋白質（人類Fas／鼠科IL3受體）之FASAIC DNA斷片為如下製備。

PCR反應溶液之組成：

模板DNA溶液HFAS，20μl；

模板DNA溶液MAIC，20μl；

引子N1，0.5μg；

引子CTN2，0.5μg；

10倍濃縮之LA PCR緩衝液，25μl；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（60）

dNTP's, 25μl;

LA Taq聚合酶，12.5單位；和

無菌蒸餾水加至總量250μl。

PCR反應為如上述c)進行。

由此所得之放大的FASAIC DNA斷片先以苯酚萃取、其後以酒精沈澱，令於1% w/v聚丙烯醯胺膠上進行電泳。此膠以1μg/ml之溴化乙錠染色，以於UV光下出現DNA。使用剃刀刀片切出內含所欲DNA斷片之帶並且使用如上述裝設以Centricon-10裝置之Amicon Centriruter將DNA由其中電溶離。電溶離作用後，移除內含Centricon-10單位之溶離物並於7,500×g下離心約1小時，濃縮DNA，且其後以酒精沈澱此DNA並最後溶於50μl之蒸餾水中。

e) 構築載體

令上述d)所得之FASAIC DNA全體以限制酶EcoRI和XbaI切開，以苯酚／氯仿混合物（50% v/v苯酚以水飽和、48% v/v氯仿、2% v/v異戊醇）萃取後，以酒精沈澱。令所得之沈澱物懸浮於2μl之無菌去離子水中。

令2μg之質體pME18S-mFas-AIC以限制酶EcoRI和XbaI切開並且脫磷酸化〔脫磷酸化過程於下列實施例2(2)3)a)中說明〕。所得之DNA斷片其後使用連接套件（Takara Shuzo Co.,Lted.)與上述所得之限制切開的FASAIC DNA連接。其後將連接產物如Hanahan所述〔Hanahan, P., (1983), J. Mol. Biol.,166, 557-580〕用於轉形大腸

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ㄐ）

桿菌DH5α（Gibco BRL）。以鹼性-SDS法〔參見Maniatis，T.等（1989），於Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版），冷泉港實驗室，NY〕由轉形之大腸桿菌取得質體。將由此所得之質體命名為phFas-AIC2。

此質體其次使用大規模質體製備套件（Maxi Prep DNA精製系統，Promega）予以再精製。令20μg精製之質體DNA以酒精沈澱並且將沈澱物溶於20μl之無菌杜貝克氏BPS(-)培養基（此後稱為PBS；Nissui Pharmaceutical Co.,Ltd.）。

f) 表現

令COS-1細胞（American Type Culture Collection No. CRL-1650）於內含加有10% v/v胎牛血清（FCS；Gibco）之杜貝克氏修飾衣格爾培養基（DMEM；Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.,Japan）之培養燒瓶（培養面積：225cm^2；Sumitomo Bakelite, K.K.）中，於37℃ 5% v/v CO_2氣體之氛圍氣下生長至半匯聚。將生長培養基丟棄，並於燒瓶中加入3毫升之5克／升胰蛋白酶及2克／升乙二胺四醋酸（胰蛋白酶-EDTA溶液；Sigma Chemical Co.）之水溶液，其後於37℃下培養3分鐘，令細胞由燒瓶剝離。

將收集的細胞懸浮於PBS中，以PBS清洗兩次，並以PBS調整為6×10^{7}細胞／毫升。令所得之20μl細胞懸浮液（1.2×10^{6}細胞）與上述製備之20μl質體溶液混合，並將混合液導入具有以2mm分開設置電極之室中（Shimadzu

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（67）

Seisakusyo, K.K.)。其次將此室放入基因轉移感染裝置(GTE-1; Shimadzu Seisakusyo, K.K.)並施以600V脈衝、持續30μsec兩次，分隔1秒鐘。其後將室中之細胞-DNA混合液導入加有10% v/v FCS之10毫升DMEM中，並於培養燒瓶(培養面積：75cm²)中，7.5%v/v CO_2 37℃下培養24小時。於此時間後，丟棄培養上清液並以無血清DMEM清洗細胞。其後，於清洗之細胞中加入10毫升無血清之DMEM並再於7.5% v/v CO_2 37℃下培養24小時，其後回收上清液。

將回收之上清液於透析管(排除m.w.12,000-14,000; Gibco BRL)中對10mM Tris-HCl(pH8.0)透析，並於下列條件下使用Pharmacia FPLC裝置，將人類Fas融合蛋白質再部分精製：

柱：Resource Q column(商品名：φ 6.4× 30mm, Pharmacia)；

溶離液：10mM Tris-HCl(pH8.0)；

流速：5 毫升／分

溶離：NaCl 0.1M-0.3M，直線梯度以30分鐘中。

以5毫升分級收集溶離物且以後述之ELISA(酵素連接免疫吸附分析)分析Fas基因表現產物。首先，將各部分之100μl分開放入96孔穴微平板(Costar)之孔穴中，並於37℃培養1小時。其後，將孔穴中的溶液吸除，並以100μl/孔穴之內含0.1 Tween 20之PBS(PBS-Tween)清洗平板3次。清洗後，以100μl／孔穴之份量加入內含

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（67）

2% w/v牛血清白蛋白（「BSA」）之PBS，並令平板於37℃下培養1小時。

其後，孔穴再以100μl／孔穴之以PBS-Tween清洗3次後，於各孔穴加入100μl／孔穴之以PBS-Tween稀釋100倍之抗-鼠IL-3受體β次單位單株抗體HC(1mg/ml；Igaku Seibutsugaku Kenkyujo, K.K.)溶液，並令平板再於37℃下培養1小時。孔穴其後以100μl／孔穴之PBS清洗3次後，於各孔穴加入100μl／孔穴之以PBS-Tween稀釋2000倍之洋芥過氧化酶-標幟抗-鼠免疫球蛋白抗體(Amersham)，且令平板於37℃下再培養1小時後，各孔穴再以100μl PBS-Tween清洗3次。加入100μl/孔穴份量之洋芥過氧化酶受質(BioRad)且放置5分鐘。其後，以微平板讀數計(450型；BioRad)於415nm下測量吸光度。將此波長下具有高吸光值之包括第19至23個部分收集，用以製備粗製之人類Fas融合蛋白質樣品。

參考例2

鼠之免疫作用及融合瘤之製備

(2-1) 免疫作用

取出1毫升上述參考例1所得之粗製人類Fas融合蛋白質溶液樣品(總蛋白質：100μg)，加入25μl之2N HCl、250μl之9% w/v鉀礬(終濃度：1.1% w/v)及25μl之2N NaOH。令所得混合液加入約120μl之10%碳酸氫鈉水溶液將pH調整至約6.5至7.0之間，並於室溫下靜置30分鐘。其後，於混合液中加入200μl死亡的百日咳博

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（64）

代氏菌（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.，1.2×11^{11}細胞／毫升）用以活化T細胞，並將此混合液腹膜內搜予至Fas無效鼠。所使用之鼠為依據Senju等所述方法處理〔參見Senju, S.等，(1996), International Immunology, 8, 423〕。於2星期後，僅令鼠腹膜內追加注射粗製的人類Fas融合蛋白質（20μg蛋白質／鼠）。

(2-2) 細胞融合

追加注射後第三天，由鼠移出脾並且放入內含20mM HEPES緩衝液（pH7.3）、350mg/ml碳酸氫鈉、0.05mM β-氫硫基乙醇、50單位／ml青黴素、50μg/ml鏈黴素和300μg/ml L-麩胺酸之10毫升無血清RPMI 1640培養基中（10.4克／升 RPMI 1640「Nussui」1；Nissui Pharmaceutical Co.,Ltd.）並以器官使用刮勺過篩（Cell Strainer；Falcon）弄碎。令所得之細胞懸浮液離心使得脾細胞丸狀化，且其後以無血清RPMI培養基清洗兩次。將清洗的細胞懸浮於無血清RPMI 培養基中並且計數。

同時，令骨髓瘤細胞NS1細胞（American Type Culture Collection TIB-18）於內含10% v/v FCS（Gibco BRL）之ASF 104培養基（Ajinomoto, K.K.）中，37℃ 5% v/v CO_2下生長至不超過1×10^8細胞／毫升之細胞密度，並令其弄碎，清洗、懸浮及計數。

將計算至內含3×10^7細胞之NS1細胞懸浮液份量，與計算至內含3×10^8細胞之脾細胞懸浮液份量混合。令

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（65）

此混合液離心並且丟棄上清液。進行下列細胞融合步驟，且所有時間均令內含丸狀物之塑膠管保持於37℃之溫水燒杯中。

於試管中慢慢加入1ml之50%（w/v)聚乙二醇1500(Boehringer Manheim)，所有攪拌均使用移液管尖端攪拌丸狀物。其後，將預熱至37℃之1毫升無血清PRMI培養基分成2份緩慢加入，其後再加入7ml之無血清RPMI培養基。其後將混合液離心，丟棄上清液並於移液管尖溫和攪拌下加入10ml內含10% v／v FCS之次黃嘌呤胺基蝶呤胸甘培養基（「HAT培養」；Boehringer Manheim)。再加入20ml內含10% v／v FCS之HAT培養基，並將懸浮液以100μl/孔穴分配至96孔穴細胞培養微平板中，並於37℃ 5% v/v CO_2 下培養。7或8天後，於任何呈現黃色之孔穴中將培養基更換成新鮮的HAT培養基。來自此些孔穴之融合細胞依下述之限度稀釋予以篩選。

(2-3)限度稀釋

由4至10週齡之BALB／c母鼠（來自Japan SLC, Inc.)移出胸腺，並於上述之篩(Cell Strainer; Falcon)上弄碎，且將弄碎的細胞以內含10% v/v FCS之次黃嘌呤胸甘培養基（「HT培養基」；Boehringer Manheim)清洗兩次。令來自一隻鼠之胸腺細胞份量懸浮於30ml內含10% v/v FCS之HT培養基，以製備飼養細胞懸浮液。將上述(2-2)製得之融合細胞製劑以此飼養細胞懸浮液稀釋成10至100倍，再以飼養細胞懸浮液系列稀釋至懸浮

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（66）

液具有5、1和0.5細胞／毫升之融合細胞密度。令由此製備之樣品以100微升／孔穴分配至96孔穴細胞培養微平板之孔穴中，並於37℃ 5% v/v CO_2 下培養5天。

(2-4)篩選

令WR19L12a細胞〔參見Iton, N.等(1991), Cell, 66, 233-243〕於內含10% v/v FCS之RPMI 1640培養基中，於37℃ 5% v/v CO_2 下培養繁殖。WR19L12a細胞為由鼠T淋巴瘤WR19L細胞(American Type Culture Collection TIB-52)衍生且被修飾成表現出編碼人類Fas之基因。將繁殖的WR19L12a細胞懸浮液調整至1×10^7細胞／毫升之細胞密度並將50μl/孔穴之等分試樣分配至19孔穴微平板之各孔穴中(此孔穴具有U型底部(Nunc))且將平板離心(90×g, 4℃, 10分鐘)。丟棄上清液並將上述2-3中培養之融合細胞所得之培養上清液50μl/孔穴，以混合加入孔穴中。

令所得之混合液於冰上靜置1小時後離心(90×g, 4℃, 10分鐘)，並移除上清液。將丸狀物各以100μl/孔穴之流動細胞緩衝液〔內含5% v/v FCS和0.04% (w/v)疊氮化鈉之PBS〕清洗兩次。於清洗細胞中加入第二抗體〔稀釋至500倍之50μl螢光素-5-異硫氰酸酯(FITC)標幟山羊抗-鼠IgG抗體IgG部分(Organon Technika)，並於冰上靜置1小時。再離心後(90×g, 4℃, 10分鐘)，移除上清液，將丸狀物以100μl/孔穴之流動細胞緩衝液清洗兩次，並加入50μl之3.7% v/v 甲醛溶液且

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（67）

於冰上放置10分鐘，令細胞固定。離心後（90× g，4℃，10分鐘）並移除上清液，將丸狀物再以100μl/孔穴之流動細胞緩衝液清洗，並懸浮於100μl/孔穴之流動細胞緩衝液，製備流動細胞樣品。

各樣品中的細胞FITC螢光濃度為以流動細胞計（Epics Elite; Coulter; 激發波長：488nm；偵測波長：530nm）測量，並由樣品中選出FITC螢光濃度顯著高於（約100至1,000之FITC螢光濃度）未加入融合細胞上清液之對照組WR19L12a細胞（約0.3之FITC螢光濃度）之融合細胞。

(2-5) 選殖

對於(2-4)中所選出之細胞重覆5次上述(2-3)和(2-4)所述之步驟，藉此選出數個融合瘤選殖株，其各產生結合至WR19L12a但不結合至WR19L之單一抗體。此些抗體對鼠Fas之結合為使用類似上述(2-4)之分析，但以L5178YA1細胞予以檢視。L5178YA1細胞株表現出鼠科Fas。L5178YA1為一種由L5178Y細胞經鼠Fas表現載體轉移感染所產生之細胞株。L5178Y細胞（Amercian Type Culture Collection No. CRL-1722）幾乎不表現Fas。

此選擇步驟之結果取得被命名HFE7A之鼠-鼠融合瘤，其產生結合至L5178YA1細胞，但不結合至L5178Y細胞之抗體。此融合瘤HFE7A於1997年2月20日，依布達佩斯條約之微生物寄存，寄存於工業技術院生命工學工業技術研究所，且被指定以登記號碼FERM BP-5828。

由鼠-鼠融合瘤HFE7A（此後簡稱為「HFE7A」）所產生

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（68）

之抗體的亞類，以單株抗體同功類型套件（Pierce）測試後，證明其為IgG1、K。

參考例3

HFE7A單株抗體之精製

令參考例2所得之鼠-鼠融合瘤HFE7A（FERM BP-5828）於1公升內含5% v/v FCS之ASF培養基中，37℃ 5% v/v CO_2 下培養生長至1×10^6細胞／毫升之細胞密度。其後將培養液離心（1,000 r.p.m. 2分鐘）並且丟棄上清液。細胞丸狀物以無血清ASF培養基清洗一次，懸浮於1公升之無血清ASF培養基中並於37℃ 5% v/v CO_2 下培養48小時。於其後，將培養物離心（1,000 r.p.m. 2分鐘）回收上清液。將上清液放入透析管中（排除分子量：12,000-14,000；Gibco BRL），並對10倍體積之10mM磷酸鈉緩衝液（pH8.0）透析。於下列條件下使用高效能液體層析裝置（FPLC系統；Pharmacia）由內層溶液取得部分精製的IgG；

柱：DEAE-Sepharose CL-6B柱（柱大小10ml；Pharmacia）；

溶離液：10mM 磷酸鈉緩衝液（pH8.0）；

流速：1毫升／分；

溶離：1M NaCl之直線梯度（0至50%，180分鐘）。

以5毫升分級收集溶離物並將各部分以使用上述製備之人類Fas融合蛋白質之ELISA，分析抗-Fas抗體效價。

首先，將參考例1所製得之100μl/孔穴之粗製人類Fas融合蛋白質溶液導入96孔穴ELISA微平板之孔穴中。於37℃培養1小時後，丟棄溶液並將孔穴各以100μl/孔穴之PBS-Tween清洗3次。其次，加入100μl/孔穴內含2% BSA之PBS並於37℃培養1小時。其後，以100μl/孔穴之PBS-Tween清洗細胞3次，且於孔穴中加入

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（69）

100μl欲分析之樣品部分，且於37℃培養1小時。其次，各孔穴以100μl/孔穴之PBS-Tween清洗3次後，加入以PBS-Tween稀釋2000倍之100μl/孔穴的洋芥過氧化酶標幟抗-鼠免疫球蛋白抗體（Amersham)並於37℃培養1小時。其後，各孔穴以100μl/孔穴之PBS-Tween清洗3次。加入100μl/孔穴份量之洋芥過氧化酶受質(BioRad)且於以微平板讀數計於415nm下讀數各孔穴之吸光度前放置5分鐘。

將具有高吸光值之第21至30個部分(內含)混合並加至兩個抗體親和性精製柱(High Trap Protein G column, 柱體積5毫升；Pharmacia)。以平衡緩衝液〔20mM磷酸鈉緩衝液(pH7.0)，25ml／柱〕清洗此柱，抗體為以15ml/柱之溶離緩衝液(0.1M 甘胺酸-HCl(pH2.7))溶離。於各內含1.125ml之1M Tris-HCl(pH9.0)之管中收集溶離物並於溶離後立即於離心管型超過濾裝置(CentriPrep 10；Grace Japan,K.K.)之頂端中3,000×g 4℃下離心2小時。將裝置底部所回收之部分丟棄，並於頂端加入15ml PBS且再於3,000×g 4℃下離心2小時。當頂端所剩溶液之體積達到0.5ml時，停止第5次離心，並將其保留作為HFE7A樣品。

參考例4

cDNA選殖

(4-1) 聚(A)$^+$-RNA之製備

令參考例2所得之鼠-鼠融合瘤HFE7A(FERM BP-5828)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（7）

細胞於加入10% v/v FCS之1公升ASF培養基中，37℃ 5% v/v CO_2 下生長至1×10^6 細胞／毫升之細胞密度。離心收集此些細胞並於硫氰酸胍溶液〔4M 硫氰酸胍、1% v/v Sarcosyl。20mM EDTA、25mM檸檬酸鈉（pH7.0）、100mM 2-氫硫基乙醇、0.1% v/v Antiform A〕存在中溶胞並且回收溶胞物。聚（A）$^+$ RNA之單離主要如〔Molecular Cloning A Laboratory Manual」所述進行〔參見Maniatis, T.等（1982），196-198〕。更詳言之，其步驟如下。

將回收之細胞溶胞物以裝設21號針頭之10毫升注射筒抽吸數次。將細胞溶胞物於RPS-40T旋轉機（Hitachi Seisakusyo, K.K.）之吊桶用polyallomer離心管中覆蓋3毫升之5.7M 氯化銫水溶液、0.1M EDTA溶液（pH7.5）。其後於30,000 r.p.m. 20℃下將溶胞物離心18小時。且令所得之丸狀物溶於400μl之蒸餾水中且令以酒精沈澱。令沈澱物再溶於400μl之蒸餾水中，與等量之氯仿和1-丁醇（4：1，v/v）混合液混合，於5000 r.p.m.離心10分鐘後回收水層。此水層再以酒精沈澱並令沈澱物溶於600μl蒸餾水中。所得之溶液保留作為全RNA樣品。

聚（A）$^+$ RNA為由上述所得之600μg（乾重）全RNA樣品，以寡（dT）纖維素層析予以精製。

更詳言之，令全RNA溶於200μl之吸附緩衝液〔0.5M NaCl。20mM Tris-HCl（pH7.5）、1mM EDTA、0.1% v/v 十二烷基硫酸鈉（SDS）〕，其後於65℃下加熱5分鐘，並加至已裝有吸附緩衝液之寡（dT）纖維素（第7型；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（71）

Pharmacia)柱中。使用溶離緩衝液〔10mM Tris-HCl(pH 7.5)、1mM EDTA、0.05% v/v SDS〕由柱中溶離並回收聚(A)+ RNA。以此步驟全部取得100μg之聚(A)+ RNA部分。

(4-2)HFE7A之重和輕鏈之N-終端胺基酸序列之決定

將參考例3所得之內含抗-人類Fas抗體HFE7A之溶液10μl，令以SDS-聚丙烯醯胺膠電泳（「SDS-PAGE」），其使用12% w/v之膠濃度、100V固定電壓120分鐘。電泳後，令膠浸於轉移緩衝液〔25mM Tris-HCl(pH9.5)，20%甲醇，0.02% v/v SDS〕5分鐘。於此時間後，將膠之蛋白質部分使用點漬裝置(KS-8451；Marysol)於10V固定電壓、4℃下14小時，轉移至預浸濕於轉移緩衝液之聚偏氟乙烯膜（「PVDF膜」；孔徑0.45μm；Millipore，Japan)。

其後，令PVDF膜以清洗緩衝液〔25mM NaCl，10mM硼酸鈉緩衝液(pH8.0)〕清洗後，於染色溶液(50% v/v甲醇，20% v/v醋酸和0.05% w/v克麥西亮藍)中染色5分鐘找出蛋白質帶。PVF膜其後以90%甲醇水溶液脫染色，並將對應於事先於PVDF膜上所找出之重鏈帶(具有較低移動性之帶)及輕鏈帶(具有較高移動性之帶)切出並且以去離子水清洗。

重和輕鏈之N-終端胺基酸序列現可依愛得曼自動法〔參見Edman，P.等(1967)，Eur. J. Biochem.,1,80〕使用氣相蛋白質序列儀(PPSQ-10；Shimadzu Seisakusyo

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 7 ）

，K.K.）予以決定。

對應於重鏈帶之N-終端胺基酸序列被測定為：Gln-Xaa-Gln-Leu-Gln-Gln-Pro-Gly-Ala-Glu-Leu（序列表之SEQ ID No.16）；

且對應於輕鏈帶之N-終端胺基酸序列被測定為：Ssp-Ile-Val-Leu-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ala-Val-Ser-Leu-Gly-Gln-Arg-Ala-Thr-Ile-Ser（序列表之SEQ ID No.17）。

令此些胺基酸序列與Kabat等所製得之胺基酸序列的資料鹼基〔參見Kabat E.A.等（1991），於「Sequence of Proteins of Immunological Interest Vol. II」U.S. Department of Health and Human Services〕相比較得知HFE7A之重鏈（γ 1鏈）和輕鏈（K 鏈）為分別屬於亞類型2b和3。基於此些發現，合成出可期待與屬於鼠亞類型基因之5'-未轉譯區及正好為3'-轉譯區終端部分〔參見Kabat等。同處；Matti Kartinen等（1988），25，859-865；和Hein rich，G.，等（1984），J.Exp. Med.，159，417-435〕雜交之寡核甘酸引子；

5'-GACCTCACCA TGGGATGGA-3'（H1：序列表之SEQ ID No.18）；

5'-TTTACCAGGA GAGTGGGAGA-3'（H2：序列表之SEQ ID No.19）；

5'-AAGAAGCATC CTCTCATCTA-3'（L1：序列表之SEQ ID No.20）；和

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（77）

5'-ACACTCATTC CTGTTGAAGC-3'（L2：序列表之SEQ ID No.21）。

（4-3）cDNA選殖

編碼造成鼠抗-人類Fas單株抗體HFE7A之重和輕鏈之cDNA，可由組合逆轉錄作用和PCR（「RT-PCR」）而選殖。對於得自產生HFE7A之融合瘤細胞的聚（A）$^+$ RNA部分，如上述（4-1）進行放大作用。使用RNA PCR kit（AMV）Version 2（Takara Shuzo Co.,Ltd.）進行RT-PCR反應。

a）逆轉錄酶反應

上述（4-2）所合成之寡核甘酸引子組（5'-終端和3'-終端引子）為被用於重和輕鏈之RT-PCR反應之引子對。

反應溶液之組成：

聚（A）$^+$ RNA（重或輕鏈，視所需），1μg；

3'-引子（H2或L2），0.3μg；

Tris-HCl（pH8.3），10mM；

氯化鉀，50mM；

dNTP's，1 mM；

氯化鎂，5mM；

RNase抑制劑（由套件所提供），0.5單位；

逆轉錄酶（由套件所提供），0.25單位；和

再蒸餾水至總量20μl。

反應溶液以55℃下30分鐘、99℃下5分鐘及5℃下5分鐘進行培養。經此處理之RT溶液其後使用於下列PCR階段中。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（74）

b） PCR

PCR反應溶液之組成：

逆轉錄酶反應溶液，20μl；

10倍濃縮之RNA PCR緩衝液（由套件所提供），10μl；

氯化鎂溶液（由套件所提供），10μl；

Taq聚合酶（由套件所提供），2.5單位；

5'-引子（H1或L1），終濃度0.2μM；和

無菌去離水至總量100μl。

令PCR反應溶液於94℃加熱2分鐘後，重覆28次循環之94℃ 30秒，60℃ 30秒和72℃ 1.5分鐘之循環。

PCR反應後，將反應溶液的等分試樣於1.5% w/v瓊脂糖膠上進行電泳。於反應溶液中查見約1.4kbp和約0.7kbp之帶被放大，其分別使用重鏈和輕鏈用之引子。此確定編碼造成重和輕鏈之cDNA視所欲被放大。依此，此放大之PCR反應溶液可使用於下列利用TA Cloning 套件(Invitrogen)放大之cDNA的選殖。其如下進行。

令相關之PCR反應溶液，與50ng之PCRII載體（由TA Clonig套件所提供）於1μl之10X連接酶反應緩衝液〔6mM Tris-HCl(pH7.5)、6mM氯化鎂、5mM氯化鈉、7mM β-氫硫基乙醇、0.1mM ATP、2mM DTT、1mM亞精胺、和0.1mg/ml牛血清白蛋白〕中混合，並於其中加入4單位之T_4 DNA連接酶（1μl）。將混合液之總量以無菌去離子水調整至10μl，並令所得之連接酶溶液於14℃下培養15小時。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（75）

其後，將2μl之連接酶反應溶液加至50μl之受容大腸桿菌株TOP10F'(由TA Cloning套件所提供且依據套件指示手冊作成受容)且於其中已加入2μl之0.5M β-氫硫基乙醇，令所得混合液於冰上保持30分鐘，其後於42℃ 30秒，並再於冰上5分鐘。其次，對培養物加入500μl之SOC培養基(2% v/v胰蛋白胨、0.5% w/v酵母萃取物、0.05% w/v氯化鈉、2.5mM氯化鉀、1mM氯化鎂、和20mM葡萄糖)，並於37℃下振盪培養1小時。

其後，將培養物塗布於內含100μg/ml安比西林之L-肉汁洋菜平板上(1% v/v胰蛋白胨、0.5% w/v酵母萃取物、0.5% w/v氯化鈉、0.1% w/v葡萄糖、和0.6% w/v bacto-agar(Difco)〕，且於37℃下培養過夜。選出平板上出現之單一安比西林耐性菌落並以白金耳刮出且培養於內含100μg/ml安比西林之L-肉汁培養基中，於37℃、200 r.p.m.振盪培養過夜。培養後，離心收集細胞，並依鹼法由其中製備質體DNA。將如此所得之質體命名為質體pCR-H(載有編碼造成HFE7A重鏈之cDNA之質體)或pCR-L(載有編碼造成HFE7A輕鏈之cDNA之質體)。

(4-4) 核甘酸序列分析

令上述(4-3)中所得之質體pCR-H和pCR-L所載有之編碼造成HFE7A重鏈之cDNA之核甘酸序列(1.4kbp)及HFE7A輕鏈之cDNA之核甘酸序列(0.7kbp)，使用基因序列分析儀(310型Genetic Analyzer; Perkin Elmer,Japan)依雙脫氧法予以決定〔參見Sanger, F.S.等(1977), Proc.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（76）

Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467〕。

由此所測定之HFE7A之重和輕鏈之cDNA核甘酸序列於序列表中分別列為SEQ ID Nos.8 和10。由cDNA所編碼之HFE7A重和輕鏈之附隨之完整胺基酸序列，分別於序列表之SEQ ID Nos.9和11中列出。上述(4-1)所確立之HFE7A重鏈的N-終端序列序列(序列表之SEQ ID No.16)除了一個不確定之殘基以外，乃與SEQ ID No.9之胺基酸Nos.1至11之序列完美地配對。HFE7A輕鏈之N-終端胺基酸序列(序列表之SEQ ID No.17)為與SEQ ID No.11之胺基酸Nos.1 至22之序列正確地配對。因此，證明HFE7A之成熟重和輕鏈蛋白質之N-終端分別為SEQ ID Nos.9 和11中的胺基酸Nos.1 至11和Nos.1至22。

再者，當重和輕鏈之胺基酸序列與抗體之胺基酸序列的資料鹼基〔Kabat E.A.,等(1991)，於「Sequence of Proteins of Immunological Interest Vol.II」U.S. Department of Health and Human Service」相比較時，確立對於重鏈，SEQ ID No.9 之胺基酸Nos.1至121構成可變區，而胺基酸Nos.122至445構成恆定區。對於輕鏈，SEQ ID No.11之胺基酸Nos.1 至111構成可變區，而胺基酸Nos.112至218構成恆定區。

如上所測定之HFE7A重和輕鏈之可變區胺基酸序列中的CDR位置和序列，亦可經由比較與抗體之胺基酸序列的相同資料鹼基之同質性而得知〔參見Kabat E.A.等，(1991)，同處〕。由此公報，可確立相同亞類型之不同

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（77）

抗體間，可變區的骨架區長度為實質上相同，且胺基酸序列具有共同的特性。CDR為位於骨架區間的獨特序列。因此，經由令HFE7A之重和輕鏈的胺基酸序列與Kabat技術中相同亞類型者相比較，則可鑑定出HFE7A的CDR。

依此，於HFE7A之重鏈中（序列表中之SEQ ID No.9）確立出胺基酸Nos.31至35形成$CDRH_1$、胺基酸Nos.50至66形成$CDRH_2$且胺基酸Nos.99至110形成$CDRH_3$。HFE7A之輕鏈中（序列表中之SEQ ID No.11）的CDR被鑑定為胺基酸Nos.24至28（$CDRL_1$）、胺基酸Nos.54至60（$CDRL_2$）、和胺基酸Nos.93至101（$CDRL_3$）。

參考例5

重組抗體之製備

(5-1) 表現質體之構築

動物細胞之重組表現載體為經由令編碼造成HFE7A重和輕鏈之cDNA（於參考例4中選殖），插入表現載體pMS18S〔參見Hara, T.等（1992）, EMBO J.,11, 1875〕而構築。其為如下進行。

首先，合成寡核甘酸引子：

5'-GGGGAATTCG ACCTCACCAT GGGATGGA-3'（H3：序列表之SEQ ID No.22）和

5'-GGGTCTAGAC TATTTACCAG GAGAGTGGGA GA-3'（H4：序列表之SEQ ID No.23）

令此些引子分別用於導入限制酶EcoRI辨識部位、導入限制酶XbaI之辨識部位、及在質體pCR-H所承載之重鏈

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（78）

cDNA之5'-終端及3'-終端導入終止密碼子。

亦合成寡核甘酸引子：

5'-GGGGAATTCA AGAAGCATCC TCTCATCTA-3'(L3：序列表之SEQ ID No.24)和

5'-GGGGCGGCCG CTTACTAACA CTCATTCCTG TTGAAGC-3'

(L4：序列表之SEQ ID No.25)

令此些引子分別用於導入限制酶EcoRI辨識部位、導入限制酶NotI之辨識部位及在質體pCR-L所承載之輕鏈cDNA之5'-終端及3'-終端導入終止密碼子。

使用此些重和輕鏈之各引子，如下進行PCR。

反應溶液之組成：

模板（pCR-H或pCR-L），1μg；

5'-引子（H3或L3），40 pmol；

3'-引子（H4或L4），40 pmol；

Tris-HCl(pH8.0)，20mM；

氯化鉀，10mM；

硫酸銨，6 mM；

氯化鎂，2 mM；

Triton X-100，0.1%；

牛血清白蛋白，無核酸酶，10μg/ml；

dNTP's，0.25mM；

天然Pfu DNA聚合酶（Stratagene），5單位；和

無菌蒸餾水至總量100μl。

CPR加熱條件：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（79）

令反應溶液最初於94℃下加熱2分鐘，其後重覆94℃ 30秒、60℃ 30秒及75℃ 1.5分之加熱循環28次。

令所得之放大的DNA以限制酶EcoRI和XbaI(於重鏈)或EcoRI和NotI(於輕鏈)切開，且其後與已經以限制酶EcoRI和XbaI(於重鏈)或EcoRI和Not I(於輕鏈)切開且使用CIP脫磷酸化〔如下列實施例2(2)3)c)所述〕之動物細胞表現質體pME18S〔參見Hara. T.,等(1992), EMBO J.,11, 1875〕混合。於8μl之混合液中加入1μl之44單位的T4 DNA連接酶，並亦加入1μl之10x連接酶反應緩衝液〔6mM Tris-HCl(pH7.5)、6mM氯化鎂、5mM氯化鈉、7mM β-氫硫基乙醇、0.1mM ATP、2mM DTT、1mM亞精胺、和0.1 mg/ml牛血清白蛋白〕，其後於14℃下培養15小時。

其後，令2μl之經培養的連接酶反應溶液與50μl細胞密度1-2×10^9細胞／毫升之受容大腸桿菌株JM109(Takara Shuzo Co.,Ltd.)混合且於冰上保持30分鐘，其後於42℃ 30秒，並再於冰上5分鐘。其次，加入500μl之SOC培養基(2% v/v胰蛋白胨、0.5% w/v酵母萃取物、0.05% w/v氯化鈉、2.5mM w/v氯化鉀、1mM氯化鎂、和20mM葡萄糖)其再以振盪培養1小時。其後單離出轉形體菌株，並依據參考例4 (4-3)所述方法，由菌株製備質體DNA。

將所得之質體命名為pME-H(載有編碼造成HFE7A之重鏈之cDNA的表現質體載體)和pME-L(載有編碼造成HFE7A之輕鏈之cDNA的表現質體載體)。將具有此些質體之轉形

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（80）

體大腸桿菌株，命名為大腸桿菌pME-H和大腸桿菌pME-L，於1997年3月12日依據布達佩斯條約之微生物寄存、寄存於工業技術院生命工學工業技術研究所，且分別以登記號碼FERM BP-5868和FERM BP-5867將其記錄。

(5-2) 於COS-7細胞中之表現

COS-7細胞以上述(5-1)所得之表現質體pME-H和pME-L予以轉移感染，為依據使用基因轉移感染裝置(ECM600；BTX)之電穿孔作用予以進行。

令COS-7細胞(American Type Culture Collection No. CRL-1651)於內含加入10% v/v FCS之DMEM之培養燒瓶(培養面積：225cm^2；Sumitomo Bakelite, K.K.)中生長至半匯聚。後續，丟棄培養基並於細胞中加入3ml之胰蛋白酶-EDTA溶液(Sigma Chemicals Co.)後，於37℃培養3分鐘。收集此步驟所剝離之細胞，以PBS清洗兩次並以PBS調整至5×10^{6}細胞／毫升之細胞密度。

同時，令各20μg使用大規模質體製備套件(MaxiPrep DNA Purification System; Promega)所製備之質體pME-H和pME-L，分別以酒精沈澱並各溶於20μl之無菌BPS。令COS-7細胞以此兩種質體(各使用20μg之質體且共同溶於20μl之無菌PBS中)予以共同轉移感染。

將上述製備之細胞懸浮液20μl(1.2×10^{6}細胞)及20μl相關的質體溶液混合並移轉至以2mm分開距離設置電極之室(BTX)。將此室放於基因轉移感染裝置中並且於150V下提供10msec之單一脈衝，產生900μF總電荷。將室中的細胞-DNA混合液加至40ml加入10 v/v FCS之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（81）

DMEM中並且於5% v/v CO_2 37℃下，塑膠細胞培養皿中培養24小時。其後，丟棄培養上清液並以無血清DMEM培養基清洗細胞。其後，於各塑膠皿中加入40ml無血清DMEM並令細胞於5% v/v CO_2 37℃再培養72小時後回收上清液。

使用上述方法，取得被轉移感染以一種或兩種質體（如下所示）之COS-7細胞，且回收各轉形體之上清液：

（A）：僅pME-H；

（B）：僅pME-L；和

（C）：pME-H和pME-L之共同轉移感染。

(5-3)側測轉形體培養上清液中之抗-Fas抗體

於上述(5-2)所得之培養上清液中抗-Fas抗體之表現，為以類似參考例3所述方式以ELISA測定，且使用人類Fas融合蛋白質作為抗原。其確定與人類Fas抗原融合蛋白質反應於培養上清液中產生抗體，僅當使用pME-H和pME-L共同轉移感染COS-7細胞才會發生〔5-2(c)〕。

參考例6

抗原決定基之測定

(6-1) ELISA

使用自動胜肽合成儀（430A型；Perkin Elmer, Japan, Applied Biosystem Division)以Fmoc固相合成法（參見Carpino, L.A. 和Han, G.Y.,(1970), J.Am. Chem. Soc.,92, 5748-5749)合成下列胜肽：

Arg-Leu-Ser-Ser-Lys-Ser-Val-Asn-Ala-Gln-Val-Thr-Asp-Ile-Asn-Ser-Lys-Gly-Leu（P1：序列表之SEQ ID No.26）；

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

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）

裝 訂 線

五、發明說明（47）

Val-Thr-Asp-Ile-Asn-Ser-Lys-Gly-Leu-Glu-Leu-Arg-Lys-Thr-Val-Thr-Thr-Val-Glu（P2：序列表之SEQ ID No.27）；
Glu-Leu-Arg-Lys-Thr-Val-Thr-Thr-Val-Glu-Thr-Gln-Asn-Leu-Glu-Gly-Leu-His-His-Asp（P3：序列表之SEQ ID No.28）；
Thr-Gln-Asn-Leu-Glu-Gly-Leu-His-His-Asp-Gly-Gln-Phe-Cys-His-Lys-Pro-Cys-Pro-Pro（P4：序列表之SEQ ID No.29）；
Gly-Gln-Phe-Cys-His-Lys-Pro-Cys-Pro-Pro-Gly-Glu-Arg-Lys-Ala-Arg-Asp-Cys-Thr-Val（P5：序列表之SEQ ID No.30）；
Gly-Glu-Arg-Lys-Ala-Arg-Asp-Cys-Thr-Val-Asn-Gly-Asp-Glu-Pro-Asp-Cys-Val-Pro-Cys-Gln（P6：序列表之SEQ ID No.31）；
Asn-Gly-Asp-Glu-Pro-Asp-Cys-Val-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly-Lys-Glu-Tyr-Thr-Asp-Lys-Ala（P7：序列表之SEQ ID No.32）；
Glu-Gly-Lys-Glu-Tyr-Thr-Asp-Lys-Ala-His-Phe-Ser-Ser-Lys-Cys-Arg-Arg-Cys-Arg（P8：序列表之SEQ ID No.33）；
His-Phe-Ser-Ser-Lys-Cys-Arg-Arg-Cys-Arg-Leu-Cys-Asp-Glu-Gly-His-Gly-Leu-Glu-Val（P9：序列表之SEQ ID No.34）；
Leu-Cys-Asp-Glu-Gly-His-Gly-Leu-Glu-Val-Glu-Ile-Asn-Cys-Thr-Arg-Thr-Gln-Asn-Thr（P10：序列表之SEQ ID No.35）；
Glu-Ile-Asn-Cys-Thr-Arg-Thr-Gln-Asn-Thr-Lys-Cys-Arg-Cys-Lys-Pro-Asn-Phe-Phe-Cys（P11：序列表之SEQ ID No.36）；
Lys-Cys-Arg-Cys-Lys-Pro-Asn-Phe-Phe-Cys-Asn-Ser-Thr-Val-Cys-Glu-His-Cys-Asp-Pro（P12：序列表之SEQ ID No.37）；
Asn-Ser-Thr-Val-Cys-Glu-His-Cys-Asp-Pro-Cys-Thr-Lys-Cys-Glu-His-Gly-Ile-Ile-Lys（P13：序列表之SEQ ID No.38）；
Cys-Thr-Lys-Cys-Glu-His-Gly-Ile-Ile-Lys-Glu-Cys-Thr-Leu-Thr-Ser-Asn-Thr-Lys-Cys（P14：序列表之SEQ ID No.39）；
Glu-Cys-Thr-Leu-Thr-Ser-Asn-Thr-Lys-Cys-Lys-Glu-Glu-Gly-Ser-Arg-Ser-Asn（P15：序列表之SEQ ID No.40）；和
Ser-Ser-Gly-Lys-Tyr-Glu-Gly-Gly-Asn-Ile-Tyr-Thr-Lys-Lys-Glu-Ala-Phe-Asn-Val-Glu（P16：序列表之SEQ ID No.41）；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（87）

P1至P15為人類Fas細胞外功能部位之胺基酸序列Nos. 1至157之部分序列，具有9至11個胺基酸殘基為彼此重疊。P16為與人類Fas不具有同質性之天然對照。

P1至P16分別完全溶於48μl之二甲基亞碸(DMSO)且各以加入752μl之內含1mM β-氫硫基乙醇之PBS調整至總量0.8ml。

上述胜肽各對應於人類Fas分子之部分的細胞外功能部位，但於C-終端加入羧基。各胜肽以0.05M碳酸鹽-重碳酸鹽緩衝液(pH9.6)稀釋至50μg/ml，並將其各50μl導入96孔穴ELISA微平板(Nunc)之孔穴中。令平板於4℃下靜置過夜。令胜肽吸附至孔穴表面。

其後，丟棄孔穴中之溶液並將各孔穴以PBS-Tween清洗4次。其次，於各孔穴加入100μl內含1%(w/v)牛血清白蛋白(A3803；Sigma Chemicals Co.)之PBS並於37℃下培養1小時。孔穴再以PBS-Tween清洗4次，並於各孔穴加入50μl調整至5μg/ml PBS之HFE7A或CH11。其後令平板於37℃下培養1小時，並再以PBS-Tween清洗孔穴4次。清洗後，於每孔穴加入以PBS稀釋至1000倍之50μl洋芥過氧化酶標幟山羊抗-鼠免疫球蛋白抗體(Amersham)，且再於37℃培養1小時後，令孔穴以PBS-Tween清洗4次。加入100μl／孔穴份量之洋芥過氧化酶受質(BioRad)並令平板於使用微平板讀數計(Corna)於415nm下讀數各孔穴吸光度前，於室溫下放置15分鐘。於陽性對照，使用參考例1製備之人類Fas融合蛋白質代替合成胜肽。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（84）

使用上述方法，確定僅有吸附P11之孔穴顯示出高吸光值，證明HFE7A專一地結合 P11中所內含之胺基酸序列（第3圖）。

(6-2)以競爭性分析鑑定P11中HFE7A所辨識之抗原決定基合成下列胜肽：

His-Gly-Leu-Glu-Val-Glu-Ile-Asn-Cys-Thr

（P95：序列表之SEQ ID No.42）

Glu-Ile-Asn-Cys-Thr-Arg-Thr-Gln-Asn-Thr

（P100：序列表之SEQ ID No.43）

Arg-Thr-Gln-Asn-Thr-Lys-Cys-Arg-Cys-Lys

（P105：序列表之SEQ ID No. 1）

Lys-Cys-Arg-Cys-Lys-Pro-Asn-Phe-Phe-Cys

（P110：序列表之SEQ ID No.44）

Pro-Asn-Phe-Phe-Cys-Asn-Ser-Thr-Val-Cys-Glu-His-Cys-Asp

（P115L：序列表之SEQ ID No.45）和

Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Asn-Asp-Asn

（D355-364：序列表之SEQ ID No.46）

P95、P100、P105和P110為於人類Fas細胞外功能部位中對應於P11之胺基酸序列側接區（對應於人類Fas細胞外功能部位之胺基酸95至128）之各為10個部分序列殘基，各具有5個胺基酸殘基與下一個重覆。

所欲的胜肽P115，

Pro-Asn-Phe-Phe-Cys-Asn-Ser-Thr-Val-Cys

（P115：序列表之SEQ ID No.45之胺基酸Nos.1至10）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（85）

具有5個殘基與10個殘基之胜肽P110重疊，但具有弱的安定性，因此於P115之C-終端加入4個額外的殘基製得P115L。

使用D355-364作為陰性對照，此胜肽與人類Fas不具有同質性。

令各胜肽（除了P115L以外）完全溶解於16μl DMSO且各加入780μl內含1mM 2-氫硫基乙醇之PBS，將其調整至總量0.8ml。令P115L完全溶解於48μl之DMSO中且加入內含1mM 2-氫硫基乙醇之PBS調整至總量0.8ml。

將上述各胜肽溶液（對應於200μg胜肽）於微試管中與0.25μg之HFE7A混合並以內含1mM 2-氫硫基乙醇PBS調整至總量100μl。令混合液於37℃、10至20r.p.m.攪拌下培養2小時後，加入FCS至5%終濃度，取得胜肽-抗體混合液。

令WR19L12a細胞依類似參考例2之方法繁殖。以離心回收細胞並以無血清RPMI培養基調整至1×10^7細胞／毫升之細胞濃度。將細胞懸浮液以10μl／孔穴分配至具有U型底部之96孔穴平板之孔穴中，並使用微試管用之搖擺式旋轉子於4℃、1,000r.p.m.下離心3分鐘，其後丟棄上清液。其次，於各丸狀物中加入100μl之胜肽-抗體混合液並如上述抽吸混合數次。其後令平板於4℃靜置30分鐘，其後離心並丟棄上清液。丸狀物以流動細胞緩衝液清洗3次，且其後於各孔穴加入50μl FITC-標幟山羊抗-鼠IgG抗體（Kappel）（以流動細胞緩衝液稀

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（86）

釋至250倍），其後輕輕抽吸混合孔穴之內含物。

令平板於暗室中4℃下放置30分鐘後，離心並丟棄上清液。將丸狀物以內含10% v/v中性緩衝之甲醛溶液(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)用於固定組織之流動細胞緩衝液，此溶液以PBS稀釋至10倍並加入50μl／孔穴且輕輕抽吸混合清洗3次。其次，令平板於暗室中4℃下放置至少12小時，令細胞固定。

其後，令細胞懸浮於100μl／孔穴之流動細胞緩衝液並且離心，移除上清液。令丸狀物以流動細胞緩衝液清洗3次並且懸浮於500μl／孔穴之流動細胞緩衝液，且以流動細胞計(Cytoace-150; Nippon Bunko, k.k.激發波長：488nm; 偵測波長：530nm)分析此懸浮液，計算每細胞之FITC螢光的平均濃度。各樣品之FITC螢光平均濃度為由令無胜肽-抗體混合液之值視為0%，且內含D355-364之樣品值視為100%而計算。

由上述步驟，確定P105可強力抑制HFE7A和WR19L12a細胞間的結合，而各與P105重疊50%胺基酸序列的P100和P110，則分別以約50%至60%抑制HFE7A與WR19L12a細胞間的結合。於P95和P115L未觀察到抑制作用，其亦不具有與P105共同重疊之部分（第4圖）。由此些結果，可確定P105代表可抑制HFE7A與人類Fas之間結合之胺基酸序列，且HFE7A之抗原決定基必定位於P105所產生之胺基酸序列間。此抗原決定基胺基酸序列為在人類Fas間保留之區域。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（87）

參考例7

HFE7A結合至猿猴Fas

進行下列試驗，以確定HFE7A是否可結合至來自不同靈長類之Fas抗原。

首先，由黑猩猩(Sanwa Kagaku Kenkyujo Kumamoto Primates Park, 40ml)採集末梢血樣品，由日本猴(Macaca fuscata)或由食野生酸蘋果猴(Macaca irus)採集20毫升且由小猴（Hapalide屬）採集3毫升末梢血樣品。於血樣品中加入1ml肝素(Novoheparin;Novo)並將樣品慢慢舖於等量Ficol Paque溶液上〔(Pharmacia)比重：1.077，除了食野生酸蘋果猴為以1.072比重以外〕並於1,700 r.p.m.下離心30分鐘，取得末梢血單核細胞部分。此單核細胞部分以Hanks'平衡之鹽溶液清洗兩次且懸浮於具有10% v/v FCS之RPMI 1640培養基中，以1×10^6細胞/ml之細胞密度。於懸浮液中加入終濃度5μg/ml之植物血球凝集素-P(Sigma Chemicals, Co.)並於37℃ 5% v/v CO_2下培養24小時。其後，離心回收細胞，以內含10% v/v FCS之RPMI 1640培養基清洗且再懸浮。其次，於懸浮液中加入10單位／ml終濃度之間白素-2(Amersham)，並將其於37% 5% v/v CO_2下培養72小時，使回收之細胞活化。

將計算出內含1×10^6活化之淋巴細胞之活化製劑量，放入試管中並懸浮於50μl含20μg／ml HFE7A之PBS中或僅於50μl之PBS中。令此懸浮液於冰上靜置1小時後

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（88）

，以500μl等分試樣之PBS之清洗細胞並懸浮於50μl含20μg／ml FITC-標幟抗-鼠IgG抗體（Bioresource)之PBS中。將此懸浮液置於冰上30分鐘，並以500μl等分試樣之PBS清洗3次。使用懸浮於500μl PBS中之細胞作為對照，並且使用流動細胞計（Cytoace; Nippon Bunko, K.K.）測量螢光密度。

以螢光濃度取得細胞數目分布並計算染色細胞數目對於全部細胞數之比例。結果，於不具有HFE7A之樣品中，所有種類之染色細胞組成少於3%。然而，於以HFE7A處理之樣品中，至少17%之細胞被染色，且最大為82%。依此，HFE7A可結合至不同於原始製備HFE7A包括人類的廣泛範圍之靈長類Fas。

參考例8

於生體內HFE7A對於鼠科T細胞上之細胞自滅誘導活性

將500μl PBS單獨、或0.05或0.1mg之HFE7A單株抗體（於500μl PBS中）腹膜內投予至三群6週齡C3H／HeJ母鼠（來自Japan Clea)。於投予42小時後，將鼠以乙醚麻醉，並移出胸腺。此些胸腺以內含10% v/v FCS之RPMI培養基清洗後，使用刮勺於篩上弄碎（Cell Strainer; Falcon)。弄碎之細胞（其已通過篩孔）以內含10% v/v FCS之RPMI 1640培養基清洗兩次。

需知於此處任何實施例中所指之清洗一次以上，乃於各次清洗時更換成新鮮的培養基進行清洗，除非另外指

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（89）

明。

計數上述所得之清洗細胞並於50μl內含10% v/v FCS之RPMI 1640培養基中調整至1×10⁶細胞。令所得之懸浮液各分配至96孔穴微平板之孔穴中（此孔穴具有U型底部）(Nunc)且其後將平板離心（90×g，4℃，10分鐘）。

丟棄上清洗並以下列兩種於PBS之螢光標幟抗體溶液(a)或(b)之一清洗各孔穴：

(a) 10μl之0.5mg／ml FITC-標幟抗-CD95(Fas)抗體(J02；PharMingen)、和10μl之0.5mg/ml藻紅蛋白(PE)標幟抗-鼠CD90抗體(Thy-1.2；Cedarlane；CD90為僅在T細胞上表現的細胞表面抗原)；

(b) 10μl之0.5mg／ml FITC-標幟抗-鼠CD4抗體(L3T4；PharMingen)，和10μl之0.2mg／ml PE-標幟抗-鼠CD8抗體(Ly-2；PharMingen)。

加入抗體混合液後，令平板振盪混合孔穴之內容物且於離心（90×g，4℃，10分鐘）前於冰上放置1小時。丟棄上清液並以100μl/孔穴之流動細胞緩衝液清洗孔穴兩次後，加入50μl/孔穴之3.7% v/v甲醇溶液固定細胞並於冰上放置10分鐘。再離心（90×g，4℃，10分鐘）移除上清液後，將細胞丸狀物再以100μl/孔穴之流動細胞緩衝液清洗而並且懸浮於100μl/孔穴之流動細胞緩衝液中。使用由各孔穴所得之細胞懸浮液作為樣品，測量1×10⁴細胞樣品之螢光，使用流動細胞計(Epics Elite：Coulter)，於下列條件下：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（90）

激發波長：488nm；

偵測波長：530nm(FITC)或600nm(PE)。

其後可製備各樣品之細胞群的FITC和PE之螢光分布。對於加入抗體混合液(a)之樣品，計算加上Fas和CD90(此後稱為「Fas^+ $CD90^+$」)之細胞數目相對於總細胞數之比例。類似地，對於加入抗體混合液(b)之樣品，計算加上CD4和CD8(此後稱為「$CD4^+$ $CD8^+$」)或加上CD4但減CD8(此後稱為「$CD4^+$ $CD8^-$」)之細胞數目相對於總細胞數之比例。

結果以百分比示於下表1

細胞	Fas^+ $CD90^+$	CD^+ $CD8^+$	CD^+ $CD8^-$
僅PBS	76.2	62.6	11.7
HFE7A 0.05mg	2.3	1.9	1.2
HFE7A 0.1mg	1.7	2.8	0.7

與僅投予PBS之群相比較，來自投予HFE7A群之鼠胸腺中表現Fas之T細胞比例(Fas^+ $CD90^+$)為在兩劑量下顯著降低。又，CD^+ $CD8^+$和CD^+ $CD8^-$細胞群(已知實質上

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（91）

為Fas表現）亦於HFE7A投予後，較僅投予PBS群顯著降低。

依此，可推論抗-Fas單株抗體HFE7A於生體內，於表現Fas之T細胞上具有細胞自滅誘導活性。

參考例9

HFE7A於自體免疫模型上之功效

使用MRL gld/gld鼠檢視抗-Fas單株 抗體HFE7A對於自體免疫疾病症狀之投予功效。此些鼠帶有Fas配位體基因之突變且可作為類似全身性紅斑性狼瘡自體免疫疾病之動物模型。

各試驗鼠為被偵測其踝之腫脹，視為自體免疫疾病之症狀。對各群經時評估且記錄腫脹之程度〔參見Shin Yonehara,(1994), Nikkei Science Bessatsu, 110,66-77〕。觀察到踝腫脹之程度於投予HFE7A後顯著減少。

由試驗鼠移出胸腺並如上述參考例8所述之方法測定胸腺中表現Fas之T細胞比例。依據參考例8之結果，其結果顯示出胸腺中表現Fas之T細胞數目於投予HFE7A後顯著降低。

參考例10

肝毒性試驗

對BALB／c鼠腹膜內投予下列之單一劑量之一：

i) 0.2mg HFE7A／500μl PBS；

ii) 0.5mg HFE7A／500μl PBS；

iii) 0.1mg J02(PharMingen)／500μl PBS；和

iv) 僅500μl PBS。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（92）

上述，J02為一種具有細胞自滅誘導活性之已知的抗-鼠Fas抗體。於投予8小時。24小時或72小時後，由鼠之後主動脈抽血。對J02處理鼠於其仍活著時，由投予3小時採血。所有抽血為在輕微乙醚麻醉下進行。使用自動分析儀（7250型；Hitachi Seisakusyo, K.K.)與適當的分析儀試劑（Transaminase-HRII；Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)共同測量各血樣品之麩草轉胺酶（GOT)和麩丙轉胺酶（GPT)之血液濃度。結果，J02-處理群於3小時後顯示出GOT和GPT值的快速增加，而以HFE7A處理群之對應值為如僅以PBS處理群顯示出少許變化（第5圖）。由此些結果，可確定HFE7A並不會誘發急性的肝疾病。

參考例11

對於暴發性肝炎模型之功效

已知，抗-鼠Fas抗體J02之腹膜內投予令鼠發展出暴發性肝炎且於數小時中死亡〔參見Ogasawara, J.等（1993), Nature, 364, 806〕。依此，為了評估HFE7A對於J02所誘發之肝病之功效，乃令HFE7A與J02同時，或於J02投予後續地進行投予，測試鼠之存活能力。

令6週齡BALB／c母鼠（每群三隻；取自Japan SLC)接受腹膜內投予下列抗體製劑：

(A) 0.1mg J02/0.5ml PBS；

(B) 0.01mg J02/0.5ml PBS；

(C) 0.1mg J02和0.5mg HFE7A/0.5ml PBS(同時投予)；

(D) 0.1mg J02和0.05mg HFE7A/0.5ml PBS(同時投予)；和

(E) 0.01mg J02／0.2mg PBS，於20分鐘後投予0.1mg

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

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）

裝 訂 線

五、發明說明（9ㄅ）

HFE7A/0.2ml PBS；

其後經時觀察鼠。結果示於第6圖。

當僅投予JO2時，所有鼠於9小時內死亡，不論其是否投予0.1mg或0.01mg JO2／鼠，即上述(A)和(B)群鼠於投予9小時內全部死亡。相對地，當HFE7A與JO2同時投予時（0.5mg/鼠及0.05mg/鼠兩者），即上述(C)和(D)群，則即使在投予數週後無顯示出疾病，證明投予HFE7A可阻止暴發性肝炎之發展。再者，即使當HFE7A為在投予JO2 20分鐘後進行投予，鼠仍呈正常，並無發展出外表症狀。

因此，HFE7A於肝及其他器官中，對於Fas／Fas配位體系統所中介之正常組織紊亂所造成之各種疾病，具有預防性和治療性功效。

參考例12

對於風濕性關節炎之功效

1）對於膠原所誘發之關節炎之發展上的預防功效

將BALB/c母鼠和DBA／1J公鼠（CD1F1鼠、6週齡、母鼠、取自japan Charles River, K.K.)交配所得之F1鼠馴服1星期。其後，令鼠以膠原處理使其誘發關節炎。

更詳之，此方法為根據文獻所述之方法〔參見Phadke, K.,(1985), Immunopharmacol.,10,51-60〕。於此方法中，將0.3% w/v 牛膠原第II型溶液（Collagen Gijutsu kensyukai, 供應於50mM醋酸溶液中）再以50mM醋酸稀釋至0.2%（2mg/ml)且其後與等量之弗洛因德完全佐劑

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（94）

(Difco)乳化。其後令此乳劑以100μl份量（對應於100μg牛膠原第II型）使用裝設有結核菌素針之1ml塑膠注射筒，對固定於靜脈注射裝置之接近尾部分經皮投予。於最初挑釁後1星期，於類似條件下投予相同的追加劑量。

於追加注射之同時，於腹膜內投予注射100μg之HFE7A或對照之鼠IgG／0.5ml PBS（每群6隻）。於最初挑釁5星期後，肉眼檢視手足之腫脹。手足關節腫脹之程度根據Wood, F.D.等方法評分〔Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.,(1969), 35, 456-467〕。依此，使用下列標準計算各手足之分數：

分數

0：無症狀；

1：僅在一個小關節如腳趾腫脹且變紅；

2：於2個或以上小關節、或一個相當大關節如踝腫脹且變紅；和

3：於其全部手足腫脹且變紅。

依此，一隻動物之最高分數為在當4個手足腫脹時，且為12。於4個手足全部評分至少為1之動物則稱為「感染鼠」。結果示於第7圖。

於給予非專一鼠IgG之對照群中，所有動物最初挑釁第7星期後被感染，而於投予HFE7A之群中，一半的鼠於高達第8星期亦於任何關節均未顯示出變紅（第7A圖）。此外，HFE7A處理群較對照群具有較佳的平均分數（第7B圖）。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（95）

2）由風濕患者之滑液細胞中誘發細胞自滅

評估HFE7A對於來自風濕性關節炎患者滑液細胞存活能力之功效。方法為如下述，使用降低能力之粒線體作為指標。

將取自風濕性關節炎患者感染區之滑液組織，於加入10% v/v FCS(Summit)之杜貝克氏修飾衣格爾培養基(Gibco)中，以刀片切成小片。移除脂肪並加入5μg/ml終濃度之膠原酶(Sigma Chemical Co.)並於37℃ 5% v/v CO_2 下培養90分鐘。所得之培養細胞於剩餘實驗中作為滑液細胞。

令如此所得之滑液細胞以0.05% w/v胰蛋白酶水溶液，於37%處理2分鐘分離成單一細胞，其後以1×10^5 /ml之細胞密度懸浮於內含10% v/v FCS之杜貝克氏修飾衣格爾培養基中。其後將此細胞懸浮液以2×10^4細胞/200μl/孔穴分配至96孔穴平板中，並於37℃ 5% v/v CO_2 下培養6天。丟棄培養上清液並以Hank's緩衝液(Gibco)清洗細胞3次。清洗後，於各孔穴中加入200μl內含10% v/v FCS之杜貝克氏修飾衣格爾培養基及10至1,000ng/ml之間的HFE7A(10倍之序列稀釋)並於37℃ 5% v/v CO_2 下再培養20小時。其次，於各孔穴加入50μl之1mg/ml XTT(2,3-雙〔2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基〕-2H-四唑鎓-5-羧醯苯胺內鹽；Sigma Chemical Co.)和25μM PMS(吩哄甲磺酸鹽；Sigma Chemical Co.)之水溶液(終濃度：250μg/ml XTT和5μM PMS)。再於37℃ 5% v/v CO_2

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（96）

下培養4小時，於450nm下讀取各孔穴之吸光度。

各孔穴中之細胞存活性為依下式計算：

存活性（%）＝100×（a-b）／（c-b），

其中「a」為試驗孔穴之吸光度，「b」為不具有細胞之孔穴的吸光度、且「c」為未加入抗體之孔穴的吸光度。

結果示於表2。HFE7A以劑量依賴方式抑制風濕性患者之滑液細胞的存活。

表 2

HFE7A濃度（ng/ml）	平均存活性（%）
0	100
10	91
100	77
1000	42

實施例1

HFE7A抗體之人型化設計

(1) HFE7A可變區之分子塑型

HFE7A可變區之分子塑型為依一般已知的同質性塑型予以進行「參見Methods in Enzymology, 203, 121-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（97）

153, (1991)〕。

將蛋白質資料庫（此後稱為「PDB」；Chemistry Department, Building 555, Brookhaven National Laboratory, P.O. Box 5000, Upton, NY 11973-5000, USA)登記之人類免疫球蛋白可變區之初級序列（對其已進行X-射線結晶分析）與上述決定之HFE7A骨架區相比較。結果，分別選出對於輕和重鏈骨架區之三維構造具有最高同質性之1GGI和2HFL。經由組合1GGI和2HFL性質且如下計算HFE7A區性質產生骨架區之三維構造，取得「骨架模型」。

使用Chothia等所述之分類，HFE7A之CDR可如下分類：$CDRL_2$、$CDRL_3$和$CDRH_1$所有屬於標準類別1，而$CDRL_1$、$CDRH_2$和$CDRH_3$目前不屬於任何特別的標準類別。$CDRL_2$、$CDRL_3$和$CDRH_1$之CDR環被認為係承接其各標準類別之構型，且併入骨架模型中。依據Thornton等之分類，$CDRL_1$為指定團簇15B之構型〔參見J.Mol. Biol., 263,800-815(1996)〕。對於$CDRH_2$和$CDRH_3$，由PDB選出具有高同質性序列之構型且其後將此與能量計算結果合併。其後將具有最高或然率之CDR環之構型選出並且組合至骨架模型中。

最後，進行能量計算以消除不適當原子間（就能量而言）不欲的接觸，用以取得HFE7A全部的分子模型。上述步驟可使用市售所得之普通分子塑型系統，AbM(Oxford Molecular Limited, Inc.)進行，但亦可使用任何其他

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（98）

適當的系統。

對於得之分子模型，使用軟體PROCHECK〔J.Appl. Cryst.,(1993), 26, 283-291〕再評估構造之正確性，並且計算各殘基表面暴露之程度，用以決定何種表面之原子和群體為交互作用。

(2) 受體之選擇

HFE7A之輕和重鏈之亞群，經由與人類抗體之各亞群的交感序列相比較，其與亞群kIV具有79%之相同性，且亦與亞群I具有79%相同性。然而，並無組合kIV輕和亞群I重鏈之人類抗體。因此，選出具有亞群kIII輕鏈和亞群I重鏈之8E10'CL(其分別與HFE7A之輕和重鏈具有72%和77%之序列相同性)作為具有輕和重鏈且兩者與HFE7A之輕和重鏈具有大於70%相同性之單一人類抗體。

(3) 選出將移植至受體上之供體殘基

使用軟體Cameleon (Oxford Molecular Limited,Inc.)，將HFE7A之各輕和重鏈之胺基酸序列與8E10'CL之相關鏈排成直線，並依據上述a)至e)所示之一般網領，如下列實施例所示作成可變區之人型化序列。構築可作為重組載體之質體，其包括有編碼造造人型化抗-人類Fas抗體之DNA核甘酸序列。

實施例2

製備編碼造成人型化輕鏈之DNA

(1) 編碼造成人類輕鏈全長度(k鏈)之cDNA之選殖

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（99）

於令鼠抗-人類Fas抗體HFE7A之輕鏈胺基酸序列人型化前，先進行包括恆定區之人類免疫球蛋白輕鏈的cDNA選殖。

1）合成引子

以PCR進行編碼造成人類輕鏈之cDNA之分離。於PCR，合成下列兩個引子：

5'-GCGAATTCTG CCTTGACTGA TCAGAGTTTC CTCA-3'

（HVKII5-4：序列表之SEQ ID No.47）；和

5'-GCTCTAGATG AGGTGAAAGA TGAGCTGGAG GA-3'

（HKCL3-3：序列表之SEQ ID No.48）。

2）構築內含人類免疫球蛋白輕鏈cDNA之質體

以PCR製備編碼造成人類免疫球蛋白輕鏈全長度之cDNA，插入質體中並且選殖至大腸桿菌中。

編碼造成人類免疫球蛋白輕鏈全長度之HL-DNA斷片，可於下列條件下製備：

PCR反應溶液之組成：

人類淋巴細胞cDNA庫（Life Technologies），25ng；

寡核苷酸引子HVKII5-4，50 pmol；

寡核苷酸引子HKCL3-3，50 pmol；

25mM dNTP調和物，10μl；

100mM Tris-HCl緩衝液（pH8.5），10μl；

1M氯化鉀〔KCl〕，5μl；

25mM氯化鎂〔$MgCl_2$〕，10μl；

Taq DNA聚合酶（Perkin Elmer Japan），1單位；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（四）

再蒸餾水至總量100μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

令如此製備之HL-DNA(人類輕鏈DNA)斷片使用真核細胞TA Cloning Kit(Invitrogen)，依據製造商方法，插入質體pCR3DNA，並導入套件中所含之受容大腸桿菌TOP10F'(且依據套件中之指示。由此取得載有HL-DNA斷片，即人類免疫球蛋白輕鏈之cDNA，之質體pHL15-27。

(2) 構築人型化HFE7A輕鏈之表現質體載體

鼠抗-人類Fas抗體HFE7A輕鏈胺基酸序列之人型化，需要令輕鏈胺基酸序列之N終端(此後稱為「I區」)第47個胺基酸(脯胺酸)和第49個胺基酸(離胺酸)分別以丙胺酸和精胺酸取代。丙胺酸(47)和精胺酸(49)為於人類輕鏈(k鏈)中被保留。亦進行進一步人型化，且需要將第80個胺基酸(組胺酸)、第81個胺基酸(脯胺酸)、第82個胺基酸(纈胺酸)、第84個胺基酸(麩胺酸)、第85個胺基酸(麩胺酸)、第87個胺基酸(丙胺酸)和第89個胺基酸(蘇胺酸)(其後稱為「II區」)分別以絲胺酸、精胺酸、白胺酸、脯胺酸、丙胺酸、苯基丙胺酸和纈胺酸，此些於人類輕鏈(k鏈)中亦被保留。

於I和II區均被人型化時，將此序列命名為「HH型」。

於僅I區被人型化時，將此序列命名為「HM型」。

於任何區未被人型化時，將此序列命名為「MM型」。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（101）

分別載有此三種來自抗-人類Fas抗體 HFE7A之人型化輕鏈胺基酸序列之表現質體，為如下構築。

2）合成製備人型化HFE7A輕鏈可變區和恆定區之引子

使用PCR構築下列DNA序列，各包括一個上述之HH、HM或MM序列，及人類免疫球蛋白輕鏈（k 鏈）之恆定區：

編碼造成HH型多肽鏈（序列表之SEQ ID No.50）之DNA（序列表之SEQ ID No.49）；

編碼造成HM型多肽鏈（序列表之SEQ ID No.52）之DNA（序列表之SEQ ID No.51）；

編碼造成MM型多肽鏈（序列表之SEQ ID No.54）之DNA（序列表之SEQ ID No.53）；

合成下列13個寡核甘酸PCR引子：

5'-CCCAAGCTTA AGAAGCATCC TCTCATCTAG TTCT-3'
(7AL1P; SEQ ID No. 55);
5'-GAGAGGGTGG CCCTCTCCCC TGGAGACAGA GACAAAGTAC CTGG-3'
(7AL1N; SEQ ID No. 56);
5'-CCAGGTACTT TGTCTCTGTC TCCAGGGGAG AGGGCCACCC TCTC-3'
(7AL2P; SEQ ID No. 57);
5'-GATTCGAGAT TGGATGCAGC ATAGATGAGG AGTCTGGGTG CCTG-3'
(7AL2N; SEQ ID No. 58);
5'-GCTGCATCCA ATCTCGAATC TGGGATCCCA GACAGGTTTA GTGGC-3'
(7AL3PA; SEQ ID No. 59);
5'-AAAATCCGCC GGCTCCAGAC GAGAGATGGT GAGGGTGAAG TCTGTCCCAG AC-3'
(7AL3N; SEQ ID No. 60);
5'-CTCGTCTGGA GCCGGCGGAT TTTGCAGTCT ATTACTGTCA GCAAAGTAAT GAGGATCC-3'

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（102）

(7AL4P; SEQ ID No. 61);
5'-TGAAGACAGA TGGTGCAGCC ACAGTCCGTT TGATTTCCAG CCTGGTGCCT TGACC-3'
(7AL4N; SEQ ID No. 62);
5'-GGTCAAGGCA CCAGGCTGGA AATCAAACGG ACTGTGGCTG CACCATCTGT CTTCA-3'
(7ALC2; SEQ ID No. 63);
5'-CCCGAATTCT TACTAACACT CTCCCCTGTT GAAGCTCTTT GTGAC-3'
(7ALCN; SEQ ID No. 64);
5'-TCTGTCCCAG ACCCACTGCC ACTAAACCTG TCTGGGATCC CAGATTCGAG ATTGG-3'
(M7AL2N; SEQ ID No. 65);
5'-GTTTAGTGGC AGTGGGTCTG GGACAGACTT CACCTCTACC ATCCATCCTG TGGAG-3'
(M7AL3PA; SEQ ID No. 66); 和
5'-ATGGTGCAGC CACAGTCCGT TTGATTTCCA GCCTGGTGCC TTGACCGAAC GTCCG-3'
(7AL4NA; SEQ ID No. 67).

3) 質體p7AL-HH(人型化HH型HFE7A輕鏈之表現質體)之構築

編碼造成序列表SEQ ID No.50之胺基酸序列的VHH-DNA斷片(序列表之SEQ ID No.49)為以進行三階段PCR而製備，且其後插入質體載體中並且選殖至大腸桿菌。

a) 第一階段PCR

產生VHH-DNA之第一階段PCR的大綱為示於第8圖。

編碼造成分泌訊號序列且部分的FRL_1區改變成於5'-終端含有HindIII限制酶切割部位之L7A1-DNA斷片，為如下製備。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（103）

PCR反應溶液之組成；

質體pME-L DNA，200ng

寡核苷酸引子7AL1P，80 pmol；

寡核苷酸引子7AL1N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶（Stratagene），10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備編碼造成部分FRL_1、$CDRL_1$、FRL_2和部分$CDRL_2$區之L7A2-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成；

質體pME-L DNA，200ng

寡核苷酸引子7AL2P，80 pmol；

寡核苷酸引子M7AL2N 80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（104）

如下製備編碼造成部分CDRL$_2$和部分FRL$_3$之L7A3-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成；

質體pME-L DNA，200ng

寡核甘酸引子 7AL3pA 80 pmol；

寡核甘酸引子7AL3N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備編碼造成部分FRL$_3$、CDRL$_3$、FRL$_4$和部分恆定區之L7A4-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成；

質體pME-L DNA，200ng

寡核甘酸引子7AL4P，80 pmol；

寡核甘酸引子7AL4N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（105）

重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備編碼造成部分FRL4且恆定區改變成於3'-終端具有EcoRI限制酶切割部位之L7A5-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成；

質體pHL15-27 DNA, 200ng

寡核苷酸引子7ALCP, 80 pmol;

寡核苷酸引子7ALCN, 80 pmol;

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

於各200μl之PCR產物，加入等量之苯酚-氯仿（50% v/v苯酚以水飽和、48% v/v氯仿、2% v/v異戊醇），並劇烈混合1分鐘。其後，於10,000× g離心並回收水層且與等量之氯仿-異戊醇（96% v/v氯仿和4% v/v異戊醇）混合，再劇烈混合1分鐘。令混合液於10,000× g離心並回收水層（於此段中所述之步驟系列，於此處稱為「苯酚萃取」）。

其後於回收之水層上進行酒精沈澱。此處所使用及所稱之「酒精沈澱」為由對欲處理溶液，加入、混合1/10

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（10b）

體積之3M醋酸鈉（pH5.2）和2.5倍體積之100%酒精，且使用乾冰冷混合液冷凍。其後於10,000× g下離心此混合液，回收DNA沈澱。

苯酚萃取和酒精沈澱後，將所得之DNA沈澱真空乾燥，溶於最小量之再蒸餾水中，並以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳將其分離。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色以於UV光下偵測DNA。使用剃刀刀片切出對應於L7A1-DNA、L7A2-DNA、L7A3-DNA、L7A4-DNA和L7A5-DNA之DNA帶並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。其後令溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮後、進行酒精沈澱、並於最終溶於50μl蒸餾水中。

b）第二階段PCR

產生VHH-DNA之第二階段PCR的大綱為示於第9圖。

如下製備L7A1.2-DNA，其中上述的L7A1-DNA和L7A2-DNA斷片為融合。

PCR反應溶液之組成；

第一階段PCR中製備之L7A1-DNA溶液，10μl；

第一階段PCR中製備之L7A2-DNA溶液，10μl；

寡核甘酸引子7AL1P，80 pmol；

寡核甘酸引子7AL2N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（107）

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備L7A4.5-DNA，其中上述的L7A4-DNA和L7A5-DNA斷片為融合。

反應溶液之組成；

第一階段PCR中製備之L7A4-DNA溶液，10μl；

第一階段PCR中製備之L7A5-DNA溶液，10μl；

寡核甘酸引子7AL4P，80 pmol；

寡核甘酸引子7ALCN，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

首先，對於放大之PCR L7A1.2-DNA和L7A4.5-DNA斷片進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA首先於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（10）

c）第三階段PCR

產生VHH-DNA之第三階段PCR的大綱為示於第10圖。

如下製備VHH-DNA斷片，其中上述之L7A1.2-DNA和L7A4.5-DNA斷片和L7A3-DNA為融合。

PCR反應溶液之組成；

第二階段PCR中製備之L7A1.2-DNA溶液，10μl；

第二階段PCR中製備之L7A4.5-DNA溶液，10μl；

第一階段PCR中製備之L7A3 -DNA溶液，10μl；

寡核甘酸引子7AL1P，80 pmol；

寡核甘酸引子7ALCN，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

令放大之PCR VHH-DNA斷片於以5% w/v聚丙烯醯胺電泳膠上分離前，先進行苯酚萃取且其後為酒精沈澱。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA首先於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，且最終溶於50μl之蒸餾水中。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（109）

載有VHH-DNA斷片之表現質體的構築為略述於第11圖。

上述所得之VHH-DNA斷片再以苯酚萃取後進行酒精沈澱，且其後以限制酶Hind III和EcoRI切開。

令1μg之選殖質體pHSG399 DNA(Takara Shuzo Co., Ltd.)以限制酶Hind III和EcoRI切開，且其後以鹼性磷酸酯酶（衍生自牛腸；此後縮寫為CIP)予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化質體pHSG399 DNA和切開之VHH-DNA斷片使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd.)依製造商手冊進行連接。

連接之DNA以酒精沈澱回收，溶於再蒸餾水5μl中，並與大腸桿菌JM109 Electro-Cell(Takara Shuzo Co.,Ltd.)混合。將混合液移至Gene Pulser/E. coli Pulser Cuvette, 0.1cm(BioRad)並將此連接混合液使用Gene Pulser II (BioRad)依據製造商指示轉形大腸桿菌JM109(此段中之步驟系列於此處稱為「轉形」)。

轉形後，將細胞塗布於內含1mM終濃度IPTG(異丙硫基-β-D-半乳糖甘；Takara Shuzo Co.,Ltd.)、0.1% w/v X-Gal(5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-半乳糖甘；Takara Shuzo Co.,Ltd.)和50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基上〔Bacto-trypton (Difco)10克、Bacto-yeast extract (Difco)5克、NaCl 10克、Bacto-agar(Difco)15克；溶於蒸餾水調整至1升〕，並於37℃下培養過夜，取得大腸桿菌轉形體。

將所得之任何白色轉形體於2ml LB液體培養基中培養

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（110）

過夜，並由所得之培養物以鹼性-SDS法萃取質體DNA〔Sambrook，J.等（1989），於「Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第2版)」，冷泉港實驗室付印〕。

令所得之萃取質體DNA以限制酶Hind III和EcoRI切開，並以1% w/v瓊脂糖膠電泳選出載有VHH-DNA斷片之選殖株。

依此取得載有人型化HH型HFE7A輕鏈與編碼造成人類免疫球蛋白k鏈恆定區DNA之融合斷片的質體pHSGHH7。具有質體pHSGHH7之轉形體大腸桿菌pHSGHH7 SANK 73497於1997年8月22日，依據布達佩斯條約寄存於工業技術院生命工學工業技術研究所，且以登記號碼FERM BP-6073予以記錄。

使用上述質體pHSGHH7，則可構築表現載體質體p7AL-HH，其載有序列表之SEQ ID No.49之DNA且編碼造成序列表之SEQ ID No.50之人型化HH型HFE7A輕鏈。

令1μg之pEE.12.1 DNA(Lonza)(哺乳動物之表現載體)以限制酶Hind III和EcoRI切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之切開、脫磷酸化之質體DNA(100ng)與10μg亦已被Hind III和EcoRI切開之pHSGHH7 DNA斷片，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd)予以連接。其後將連接混合液轉形至大腸桿菌JM109(如上述)，其後塗布於含有50μg/ml安比西林之LB洋菜平板上。

令此方法所得之轉形體於內含50μg/ml安比西林之2ml

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（111）

LB液體培養基中37℃下培養過夜，並由所得培養物依鹼性-SDS洗萃取出質體DNA。

此萃取之質體DNA以Hind III和EcoRI切開，且含以1% w/v 瓊脂糖膠電泳，確認所欲插入物是否存在。此可單離出質體p7AL-HH，其內含具有人型化HH型HFE7A輕鏈及編碼造成人類免疫球蛋白k 鏈恆定區DNA之融合斷片。發現此融合斷片為以正確方向位於巨細胞病毒（CMV）啓動基因之下游。

4）構築質體p7AL-HM（人型化HM型HFE7A輕鏈之表現質體

進行三階段PCR製備編碼造成序列表SEQ ID No.52胺基酸序列之序列表SEQ ID No.51的VHH-DNA斷片，插入質體載體並選殖至大腸桿菌。

a）第一階段PCR

生產VHM-DNA 斷片之第一階段PCR的大綱示於第12圖。

L7A1-DNA 斷片（編碼造成分泌訊號序列且於5'-終端具有加入Hind III限制酶切割部位之部分FRL_1）、L7A2-DNA 斷片（編碼造成部分的FRL_1、$CDRL_1$、FRL_2和部分的$CDRL_2$）、和L7A5-DNA 斷片（編碼造成部分的FRL_4且於3'-終端具有加入EcoRI部位之恆定區）為使用於此步驟，並使用上述2)中製備VHH-DNA 斷片所取得者。

如下製備編碼造成$CDRL_2$、FRL_3、$CDRL_3$、FRL_4和部分恆定區之ML7A3-DNA 斷片。

PCR反應溶液之組成：

質體pME-L DNA，200ng；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（117）

寡核甘酸引子7AL3PA，80 pmol；

寡核甘酸引子7AL4NA，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

將PCR產物先令以苯酚萃取且其後令以酒精沈澱，且於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離。電泳後，將膠以1μg/ml之溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA首先於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

b) 第二階段PCR

產生VHM-DNA之第二階段PCR的大綱為示於第13圖。

如下製備包括L7A1.2-DNA、L7A3-DNA和L7A5-DNA斷片之VHH-DNA為融合斷片。

PCR反應溶液之組成；

第二階段PCR中製備之L7A1.2-DNA溶液，10μl；

第一階段PCR中製備之ML7A3-DNA溶液，10μl；

第一階段PCR中製備之L7A5-DNA溶液，10μl；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（113）

寡核甘酸引子7AL1P，80 pmol；

寡核甘酸引子7ALCN，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

令所得之放大的VHM-DNA斷片首先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離。電泳後，將膠以1μg/ml之溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之VHM-DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

構築載有VHM-DNA斷片之表現質體為概述於第14圖。

令上述所得之VHM-DNA再以苯酚萃取後以酒精沈澱予以精製，且其後以限制酶Hind III和EcoRI切開。

令1μg之選殖質體pHSG399 DNA(Takara Shuzo Co., Ltd.)以限制酶Hind III和EcoRI切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化質體pHSG399 DNA與亦已被Hind III和EcoRI切開之VHH-DNA，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd.)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（114）

予以連接。其後將大腸桿菌JM109以連接之DNA轉形並且塗布於含有終濃度1mM IPTG、0.1% w/v X-Gal和50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基上。所得的白色轉形體於2ml內含50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基中37℃下培養過夜，並以鹼性-SDS法由所得之培養物萃取出質體DNA。其後將此萃取質體DNA以Hind III和EcoRI切開，並使用1% w/v 瓊脂糖膠電泳選出載有VHM-DNA 斷片之選殖體。

依此，取得載有人型化HM型HFE7A輕鏈可變區與編碼造成人類Igk鏈恆定區DNA之融合斷片的質體pHSGHM17。具有質體pHSGHM17之轉形體大腸桿菌pHSGHM17 SANK 73597於1997年8月22日，依據布達佩斯條約寄存於工業技術院生命工學工業技術研究所，且以登記號碼FERM BP-6072予以記錄。

使用上述質體pHSGHM17，則可構築表現載體質體p7AL-HM，其載有序列表之SEQ ID No.51之DNA且編碼造成序列表之SEQ ID No.52之人型化HM型HFE7A輕鏈。

令1μg之pEE.12.1 DNA(Lonza)(哺乳動物之表現載體)以限制酶Hind III和EcoRI切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之切開、脫磷酸化之質體DNA(100ng)與10μg亦已被Hind III和EcoRI切開之pHSGHM17 DNA 斷片，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd)予以連接。其後將連接混合液轉形至大腸桿菌JM109(如上述)，其後塗布於含有50μg/ml安比西林之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（115）

LB洋菜平板上。

令此方法所得之轉形體於內含50μg/ml安比西林之2ml LB液體培養基中37℃下培養過夜，並由所得培養物依鹼性-SDS法萃取出質體DNA。

此萃取之質體DNA以Hind III和EcoRI切開，且令以1% w/v瓊脂糖膠電泳，確認所欲插入物是否存在。此可單離出質體p7AL-HM，其內含具有人型化HM型HFE7A輕鏈及編碼造成人類免疫球蛋白k鏈恆定區DNA之融合斷片。發現此融合斷片為以正確方向位於巨細胞病毒（CMV）啓動基因之下游。

5）構築質體p7AL-MM（人型化MM型HFE7A輕鏈之表現質體

進行三階段PCR製備編碼造成序列表SEQ ID No.54胺基酸序列之序列表SEQ ID No.53的VMM-DNA斷片，插入質體載體並選殖至大腸桿菌。

a）第一階段PCR

生產VMM-DNA斷片之第一階段PCR大綱為示於第15圖。

L7A1-DNA斷片（編碼造成分泌訊號序列與部分FRL_1且於5'-終端具有加入Hind III限制酶切割部位）、和L7A5-DNA斷片（編碼造成部分FRL_4與於3'-終端具有加入EcoRI部位之恆定區）為由上述（2）之VHH-DNA斷片製備中取得。此些斷片為使用於VMM-DNA之第一階段PCR構築。

如下製備編碼造成部分FRL_1、$CDRL_1$、FRL_2、$CDRL_2$和部分FRL_3之ML7A2M-DNA斷片。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（116）

PCR反應溶液之組成：

質體pME-L DNA，200ng；

寡核苷酸引子7AL2P，80 pmol；

寡核苷酸引子M7AL2N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備編碼造成部分FRL_3、$CDRL_3$、FRL_4和部分恒定區之ML7A3M-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

質體pME-L DNA，200ng；

寡核苷酸引子M7AL3PA，80 pmol；

寡核苷酸引子7AL4NA，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

將PCR產物先令以苯酚萃取且其後令以酒精沈澱，且於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離。電泳後，將膠以1μg/ml之溴化乙錠染色並將UV光下偵測之對應於

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（117）

ML7A2M-DNA和ML7A3M-DNA，使用剃刀刀片切出並且使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

b）第二階段PCR

產生VMM-DNA之第二階段PCR的大綱為示於第16圖。

如下製備包括ML7A1-DNA和ML7A2M-DNA斷片融合物之ML7A1.2-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

第一階段PCR中製備之L7A1-DNA溶液，10μl；

第一階段PCR中製備之ML7A2M-DNA溶液，10μl；

寡核甘酸引子7AL1P，80 pmol；

寡核甘酸引子7AL2N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

令所得之放大的ML7A1.2-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml之溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之融合DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（118）

之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500×g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

c）第三階段PCR

產生VMM-DNA之第三階段PCR的大綱為示於第17圖。

如下製備包括上述ML7A1.2-DNA、ML7A3M-DNA和L7A5-DNA斷片融合物之VMM-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

第二階段PCR中製備之ML7A1.2-DNA溶液，10μl；

第二階段PCR中製備之ML7A3M-DNA溶液，10μl；

第一階段PCR中製備之L7A5-DNA溶液，10μl；

寡核甘酸引子7AL1P，80 pmol；

寡核甘酸引子7ALCN，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10×Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

令所得之放大的VMM-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之VMM-DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（119）

述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

構築載有VMM-DNA斷片之表現質體為概述於第18圖。

令上述所得之VMM-DNA再以苯酚萃取後以酒精沈澱予以精製，且其後以限制酶Hind III和EcoRI切開。

令1μg之選殖質體pHSG399 DNA(Takara Shuzo Co., Ltd.)以限制酶Hind III和EcoRI切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化質體pHSG399 DNA與亦已被Hind III和EcoRI切開之VMM-DNA，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接。其後將大腸桿菌JM109以連接之DNA轉形並且塗布於含有終濃度1mM IPTG、0.1% w/v X-Gal和50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基上。所得的白色轉形體於2ml內含50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基中37℃下培養過夜，並以鹼性-SDS法由所得之培養物萃取出質體DNA。其後將此萃取質體DNA以Hind III和EcoRI切開，並使用1% w/v 瓊脂糖膠電泳選出載有VMM-DNA斷片之選殖體。

依此，取得載有MM型HFE7A輕鏈可變區與編碼造成人類免疫球蛋白k鏈恆定區DNA之融合斷片的質體pHSGMM6。具有質體pHSGMM6之轉形體大腸桿菌pHSGMM6 SANK 73697於1997年8月22日，依據布達佩斯條約寄存於工業技術院生命工學工業技術研究所，且以登記號碼FERM BP-6071

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（120）

予以記錄。

表現載體質體p7AL-MM為使用上述質體pHSGMM6、及載有編碼造成序列表SEQ ID No.54之MM型HFE7A輕鏈多肽之序列表之SEQ ID No.53 DNA而構築。

令1μg之pEE.12.1 DNA(Lonza)(哺乳動物之表現載體)以限制酶Hind III和EcoRI切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之切開、脫磷酸化之質體DNA(100ng)與10μg亦已被Hind III和EcoRI切開之pHSGM6-DNA斷片，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd)予以連接。其後將連接混合液轉形至大腸桿菌JM109(如上述)，其後塗布於含有50μg/ml安比西林之LB洋菜平板上。

令此方法所得之轉形體於內含50μg/ml安比西林之2ml LB液體培養基中37℃下培養過夜，並由所得培養物依鹼性-SDS洗萃取出質體DNA。

此萃取之質體DNA以Hind III和EcoRI切開，且令以1% w/v瓊脂糖膠電泳，確認所欲插入物是否存在。此可單離出質體p7AL-MM，其內含具有MM型HFE7A輕鏈及編碼造成人類免疫球蛋白k鏈恆定區DNA之融合斷片。發現此融合斷片為以正確方向位於巨細胞病毒(CMV)啓動基因之下游。

6) 核甘酸序列之確認

為確認質體p7AL-HH、p7AL-HM和p7AL-MM之DNA插入物具有所欲的核甘酸序列，分析此DNA插入物並決定其核

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（14）

甘酸序列。用於核甘酸定序所製備之寡核甘酸引子為如下；

5'-CCCAAGCTTA AGAAGCATCC-3' (SP1; SEQ ID No. 68);
5'-ATCTATGCTG CATCCAATCT-3' (SP2; SEQ ID No. 69);
5'-GTTGTGTGCC TGCTGAATAA-3' (SP3; SEQ ID No. 70);
5'-CCCGAATTCT TACTAACACT-3' (SP4; SEQ ID No. 71);
5'-TTATTCAGCA GGCACACAAC-3' (SP5; SEQ ID No. 72); 和
5'-AGATTGGATG CAGCATAGAT-3' (SP6; SEQ ID No. 73).

各引子所結合之位置於第19圖。核甘酸序列之決定為使用雙脫氧核甘酸鏈終止法進行〔Sanger, F.S.等(1977), Pro. Natl. Acad. Sci.,USA, 74, 5463〕。所使用之模板為分別由鹼性-SDS法和氯化銫法所精製之質體DNA〔兩種方法參見Sambrook, J.等(1989),「Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版」冷泉港實驗室付印〕。

更詳言之，令3μg精製質體DNA溶於13μl之再蒸餾水中，其後加入各2μl之2mM EDTA和2N NaOH，並令混合液於室溫下靜置5分鐘。其次，加入4μl之10M醋酸銨溶液和100μl之100%酒精並於其中混合，且置於乾冰上10分鐘。其後，以15,000×g離心並將所得之丸狀物以80% v/v含水酒精清洗並且真空乾燥。令所得之乾燥DNA溶入7μl再蒸餾水中並用於核甘酸定序。

核甘酸定序反應為使用7-Deaza-Sequenase, Version 2.0 Kit(於dCTP; Amersham)進行。作成7μl上述質體溶液、1pmol事先合成之引子、及1μl反應緩衝液(由套

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（122）

件提供）之混合液，並令此混合物於65℃培養2分鐘。其後，緩慢冷卻至室溫，令DNA與引子黏接後，以〔α-32 P〕dCTP(Amersham)予以標識。將反應產物令於含有8M尿素／1× TBE緩衝液（100mM Tris，100mM硼酸，1mM EDTA，pH8.3）之5% w/v聚丙烯醯胺膠上進行膠電泳。乾燥後，以放射自顯術讀取膠上之序列。如此處所使用，所有的核甘酸序列為如上進行，除非另外指定。

結果，確立質體p7AL-HH、p7AL-HM和p7AL-MM之DNA插入物具有預期的核甘酸序列，即：

序列表之編碼造成SEQ ID No.50多肽序列之SEQ ID No.49；

序列表之編碼造成SEQ ID No.52多肽序列之SEQ ID No.51；

序列表之編碼造成SEQ ID No.54多肽序列之SEQ ID No.53。

實施例3

構築HFE7A抗體人型化版重鏈之表現載體

（1）構築載有人型化HFE7A重鏈可變區DNA之質體

1）合成製備人型化重鏈可變區之引子

編碼造成一種包括人型化抗-Fas抗體HFE7A重鏈可變區及包括IgG-CH1區之N終端5個胺基酸殘基（序列表之SEQ ID No.75）之多肽鏈的DNA，為使用PCR之組合而合成。

如上述合成下列8個PCR引子：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（12）

5'-GGGAAGCTTG GCTTGACCTC ACCATGGGAT GGAGCTGTAT-3'
(7AH1P; SEQ ID No. 76);
5'-TGAAGCCCCA GGCTTCTTGA CCTCAGCCCC AGACTGCACC AGTTGGAC-3'
(7AH1NNEW; SEQ ID No. 77);
5'-TCCACTCAAG CCTCTGTCCA GGGGCCTGTT TTACCC-3'
(7AH2N; SEQ ID No. 78);
5'-GTCTGGGGCT GAGGTCAAGA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCCTGCA AG-3'
(7AH2PNEW; SEQ ID No. 79);
5'-CAGGCCCCTG GACAGAGGCT TGAGTGGATG GGAGAGATT-3'
(7AH3P; SEQ ID No. 80);
5'-TCAGATCTCA GGCTGCTGAG CTCCATGTAG GCTGTGCTAG CGGATGTGTC-3'
(7AH3N; SEQ ID No. 81);
5'-TGGAGCTCAG CAGCCTGAGA TCTGAGGACA CGGCGGTCTA TTAC-3'
(7AH4P; SEQ ID No. 82); 和
5'-GATGGGCCCT TGGTGGAGGC TGAGGAGACG GTGACCAGGG TCCCTTCGCC CCAGT-3'
(7AH4N; SEQ ID No. 83).

2) 構築質體 pBL7A27

進行三階段PCR製備編碼造成序列表SEQ ID No.75胺基酸序列之VD-DNA斷片（序列表SEQ ID No.74），插入質體載體並選殖至大腸桿菌。

a) 第一階段PCR

生長VD-DNA之第一階段PCR的大綱為示於第20圖。

如下製備編碼造成分泌訊號序列及FRH1之N終端部分且於5'-終端具有加入Hind III限制酶切割部位之H7A1-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（124）

質體 pME-H DNA，200ng；

寡核苷酸引子 7AH1P，80 pmol；

寡核苷酸引子 7AH1NNEW，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備編碼造成部分 FRL_1、$CDRL_1$、和部分 FRH_2 之 H7A3-DNA 斷片。

PCR反應溶液之組成：

質體 pME-H DNA，200ng；

寡核苷酸引子 7AH2N，80 pmol；

寡核苷酸引子 7AH2PNEW，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備編碼造成部分 FRH_2、$CDRH_2$ 和部分 FRH_3 之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（125）

H7A3-DNA 斷片。

PCR反應溶液之組成：

質體 pME-H DNA, 200ng；

寡核甘酸引子 7AH3P, 80 pmol；

寡核甘酸引子 7AH3N, 80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備編碼造成部分 FRH_3、$CDRH_3$、FRH_4 和 CH1 區之5個N終端胺基酸殘基之H7A4-DNA斷片。

將各PCR產物先令以苯酚萃取且其後令以酒精沈澱，且於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離。電泳後，將膠以1μg/ml之溴化乙錠染色並將UV光下偵測之對應於H7A1-DNA、H7A2-DNA、H7A3-DNA和H7A4-DNA之DNA帶，使用剃刀刀片切出並且使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

b) 第二階段PCR

產生VD-DNA之第二階段PCR的大綱為示於第21圖。

如下製備融合上述H7A1-DNA和H7A2-DNA斷片之H7A1.2

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（126）

-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

第一階段PCR中製備之H7A1-DNA溶液，10μl；

第一階段PCR中製備之H7A2M-DNA溶液，10μl；

寡核甘酸引子7AH1P，80 pmol；

寡核甘酸引子7AH2N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備融合上述H7A3-DNA和H7A4-DNA斷片之H7A3.4-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

第一階段PCR中製備之H7A3-DNA溶液，10μl；

第一階段PCR中製備之H7A4-DNA溶液，10μl；

寡核甘酸引子7AH3P，80 pmol；

寡核甘酸引子7AH4N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（127）

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

令所得之放大的H7A1.2-DNA和H7A3.4-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml之溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之相關帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

c) 第三階段PCR

產生VD-DNA之第三階段PCR的大綱為示於第22圖。

如下製備VD-DNA斷片，其中上述之H7A1.2-DNA和H7A3.4-DNA斷片為融合。

PCR反應溶液之組成：

第二階段PCR中製備之H7A1.2-DNA溶液，10μl；

第二階段PCR中製備之H7A3.4-DNA溶液，10μl；

寡核甘酸引子7AH1P，80 pmol；

寡核甘酸引子7AH4N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（128）

重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

令所得之放大的VD-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之VD-DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500×g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

構築載有VD-DNA斷片之表現質體為概述於第23圖。

令上述所得之VD-DNA再以苯酚萃取後以酒精沈澱予以精製，且其後以限制酶Hind III和ApaI切開。

令1μg之選殖質體pBLUESCRIPT-II SK+DNA(Stratagene)以限制酶Hind III和ApaI切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化質體DNA與亦已被Hind III和ApaI切開之VD-DNA，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接。其後將大腸桿菌JM109以連接之DNA轉形並且塗布於含有終濃度1mM IPTG、0.1% w/v X-Gal和50μg/ml安比西林之LB洋菜培養基上。所得的白色轉形體於2ml內含50μg/ml安比西林之LB洋菜培養基中37℃下培養過夜，並以鹼性-SDS法由所得之培養物萃取出質體DNA。其後將此萃取質體DNA以Hind III和ApaI切開，並使用瓊脂糖膠電泳確認所欲插入物之存在與否。依此，取得具有VD-DNA插入物

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（129）

之質體pBL7A27。

（2）構築載有人類IgG1恆定區基因組DNA之質體

1）合成製備5'-終端人類IgG1基因組DNA斷片之引子

以PCR合成5'-終端人類IgG1基因組DNA斷片。於此，製備下列兩個寡核甘酸引子：

5'-GGGAAGCTTC CGCGGTCACA TGGCACCACC TCTCTTGCA-3'

(5'-Hind：序列表之SEQ ID No.84)；和

5'-GCTCTGCAGA GAGAAGATTG GGAGTTACTG GAATC-3'

(IGGCPSTN：序列表之SEQ ID No.85)。

2）構築質體pIG5'03

使用人類基因組DNA作為模板，以PCR分離並放大包括人類IgG1之CH1區且於Hind III切割序列後具有插入序列之基因組DNA，且其後插入質體pHSG399(Takar Shuzo Co.,Ltd.)並選殖至大腸桿菌。此DNA(其後稱為「IG 5'-DNA」)之製備略述於第24圖。

如下製備IG5'-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

人類基因組DNA(Clonetech)，2μg；

寡核甘酸引子5'Hind，80 pmol；

寡核甘酸引子IGGCPSTN，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（130）

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

令所得之放大的IG5'-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml之溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之IG5'-DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500×g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

令由此所得之IG5'-DNA再以苯酚萃取後以酒精沈澱予以精製，且其後以限制酶Hind III和Pst I切開。

令1μg之選殖質體pHSG399 DNA(Takara Shuzo Co., Ltd.)以限制酶Hind III和Pst I切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化質體DNA與亦已被Hind III和Pst I切開之IG5'-DNA，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接。其後將大腸桿菌JM109以連接之DNA轉形並且塗布於含有終濃度1mM IPTG、0.1% w/v X-Gal和50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基上。所得的白色轉形體於2ml內含50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基中37℃下培養過夜，並以鹼性-SDS法由所得之培養物萃取出質體DNA。其後將此萃取質體DNA以Hind III和Pst I切開，並使用瓊脂糖膠電泳確認所欲插入物存在與否。依此，取得內含IG5'-DNA斷片插入物之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（132）

質體pIG5'03。

（3）構築載有人類IgG1恆定區基因組DNA之質體

1）合成製備3'-終端人類IgG1基因組DNA斷片之引子

以PCR合成3'-終端人類IgG1基因組DNA斷片。於此，製備下列兩個寡核甘酸引子：

5'-TCTCTGCAGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCAC-3'

(IGGCPSTP：序列表之SEQ ID No.86)；和

5'-GGGGAATTCG GGAGCGGGGC TTGCCGGCCG TCGCACTCA-3'

(Eco3'：序列表之SEQ ID No.87)。

2）構築質體pIG3'08

包括序列；來自人類IgG1之插入序列；絞鏈區；來自人類IgG1插入序列；CH2區；來自人類IgG1插入序列；CH3區；和EcoRI切割序列之DNA，為由使用人類基因組DNA作為模板之PCR予以分離並放大，且其後插入質體pHSG399 (Takara Shuzo Co.,Ltd.)並選殖至大腸桿菌。上述DNA(此後稱為「IG3'-DNA」)之製備為略述於第25圖。

如下製備IG3'-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

人類基因組DNA(Clonetech)，2μg；

寡核甘酸引子IGGCPSTP，80 pmol；

寡核甘酸引子Eco3'，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（132）

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

令所得之放大的IG3'-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml之溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之IG3'-DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

令由此所得之IG3'-DNA再以苯酚萃取後以酒精沈澱予以精製，且其後以限制酶EcoRI和Pst I切開。

令1μg之選殖質體pHSG399 DNA(Takara Shuzo Co., Ltd.)以限制酶EcoRI和Pst I切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化質體DNA與亦已被EcoRI和Pst I切開之IG3'-DNA，使用DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接。其後將大腸桿菌JM109以連接之DNA轉形並且塗布於含有終濃度1mM IPTG、0.1% w/v X-Gal和50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基上。選出任何白色菌落並取得內含IG3'-DNA插入物之質體pIG3'08。

（4）構築人型化HFE7A重鏈之表現載體質體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（133）

使用上述質體pBL7A27、pIG5'03和pIG3'08構築載有序列表SEQ ID No.88 DNA且編碼造成序列表SEQ ID No.89之人型化HFE7A重鏈多肽之表現質體載體pEg7AH-H。此步驟概述於第26圖。

令10μg包括人類IgG1重鏈和插入序列之CH1區的質體pIG5'03 DNA，以限制酶Apa I和Kpn I切開。此外，將上述之pBL7A27 DNA 1μg亦以限制酶Apa I和Kpn I切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化pBL7A27 DNA(100ng)與切開並脫磷酸化之pIG5'03 DNA 10μg，使用DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接。其後將連接混合液用於轉形大腸桿菌JM109，並塗布於內含50μg/ml安比西林之LB培養基上。將所得之轉形體於內含50μg/ml安比西林之2ml LB液體培養基中37℃下培養過夜，並由所得培養物依鹼性-SDS洗萃取出質體DNA。將質體以Apa I和Kpn I、或以Hind III和Pst I切開，以1% w/v瓊脂糖膠電泳確認所欲插入物是否存在。由此，可取得含有人型化HFE7A之VD-DNA斷片連接IG5'-DNA斷片之質體pBL7AF184。

其次，令如此所得之質體pBL7AF 184 10μg以限制酶Hind III和Pst I切開，且將上述質體pIG3'08 DNA類似地以Hind III和Pst I切開，並使用CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化pIG3'08 DNA (100ng)與10μg之切開pBL7AF184 DNA，使用DNA Ligation Kit Version 2.0

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（134）

(Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接。其後將連接混合液用於轉形大腸桿菌JM109，並塗布於內含50μg/ml安比西林之LB培養基上。將所得之任何轉形體於內含50μg/ml安比西林之2ml LB液體培養基中37℃下培養過夜，並由所得培養物依鹼性-SDS洗萃取出質體DNA。將質體以Hind III和Pst I、或Hind III和EcoRI切開，以1% w/v 瓊脂糖膠電泳確認所欲插入物是否存在。

取得內含人型化HFE7A之VD-DNA斷片連接編碼造成人類IgG1恆定區之基因組DNA斷片之質體pgHSL7A62。具有質體pgHSL7A62之轉形體大腸桿菌pgHSL7A62之SANK 73397於1997年8月22日，依據布達佩斯條約寄存於工業技術院生命工學工業技術研究所，且以登記號碼FERM BP-6074將其記錄。

令如此所得之質體pgHSL7A62 DNA 10μg以限制酶Hind III和EcoRI切開，且將表現質體pEE.6.1. DNA 1μg類似地以Hind III和EcoRI切開，並使用CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化pEE.6.1. DNA (100ng)與10μg之切開pgHSL7A62 DNA，使用DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接。其後將連接混合液用於轉形大腸桿菌JM109，並塗布於內含50μg/ml安比西林之LB培養基上。將所得之任何轉形體於內含50μg/ml安比西林之2ml LB液體培養基上培養過夜，並由所得培養物依鹼性-SDS法萃取出質體DNA。將質體以Hind III和EcoRI切開，以1% w/v 瓊脂糖膠電泳確認所欲插入物是否存在。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（137）

所得之質體pEg7AH-H含有一個融合斷片，其包括人型化HFE7A之VD-DNA斷片和連接編碼造成人類IgG1恆定區之基因組DNA斷片，且其以正確的方向插入CWV啓動基因之下游。

（5）確認核甘酸序列

為了確認pEg7AH-H之DNA插入物具有所欲的核甘酸序列，分析此DNA插入物並決定其核甘酸序列。於此，合成下列引子：

5'-ACAGCCGGGA AGGTGTGCAC-3' (IG01: SEQ ID No. 90);
5'-AGACACCCTC CCTCCCTGTG-3' (IG02: SEQ ID No. 91);
5'-GTGCAGGGCC TGGGTTAGGG-3' (IG03: SEQ ID No. 92);
5'-GCACGGTGGG CATGTGTGAG-3' (IG04: SEQ ID No. 93);
5'-GTTTTGGGGG GAAGAGGAAG-3' (IG05: SEQ ID No. 94);
5'-CCAGTCCTGG TGCAGGACGG-3' (IG06: SEQ ID No. 95);
5'-CCTGTGGTTC TCGGGGCTGC-3' (IG07: SEQ ID No. 96);
5'-CGTGGTCTTG TAGTTGTTCT-3' (IG08: SEQ ID No. 97);
5'-CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC-3' (IGP5: SEQ ID No. 98);
5'-CCGTCCTGCA CCAGGACTGG-3' (IGP6: SEQ ID No. 99);
5'-GCAGCCCCGA GAACCACAGG-3' (IGP7: SEQ ID No. 100);
5'-AGAACAACTA CAAGACCACG-3' (IGP8: SEQ ID No. 101);
5'-GCCTGACATC TGAGGACTC-3' (H5+: SEQ ID No. 102);
5'-GAGTCCTCAG ATGTCAGGC-3' (H5-: SEQ ID No. 103);
5'-GAGCAGTACT CGTTGCTGCC GCGCGCGCCA CCAG-3'
(PEEF: SEQ ID No. 104); 和
5'-GGTATGGCTG ATTAATGATC AATG-3' (PEEB: SEQ ID No. 105)。

各引子所結合之位置示於第27圖。核甘酸序列之決定為由使用鹼性-SDS法和氯化銫法（同處）所精製之各質體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（136）

，作為模板之雙脫氧核甘酸鏈終止法（同處）予以進行。確認pEg7AH-H具有序列表之SEQ ID No.88之核甘酸序列，其編碼造成序列表之SEQ ID No.89之多肽。

實施例4

於COS-1細胞中表現

令COS-1細胞（衍生自猴腎）以上述所得之人型化HFE7A重鏈表現質體及各人型化HFE7A輕鏈表現質體予以轉移感染。轉移感染為由使用裝設有2mm分開電極之FCT-13室（Shimadzu Seisakusyo,K.K.）之基因轉移感染裝置GTE-1（Shimadzu Seisakusyo,K.K.）進行電穿孔作用而完成。

令COS-1細胞（American Type Culture Collection No. CRL-1650）於含有添加10% v/v FCS（Moregate）之最少需要α培養基（「α（+）MEM」；Gibco BRL）之培養燒瓶（培養面積：225cm^2；Sumitomo Bakelite）生長至半匯聚。其後，丟棄培養基並以3ml胰蛋白酶-EDTA溶液（Sigma Chemicals Co.）於37℃處理3分鐘，令COS-1細胞由燒瓶剝落。其後於800r.p.m.下離心2分鐘收集剝落之細胞，丟棄上清液並以磷酸鹽緩衝液（0.02% w/v氯化鉀〔KCl〕、0.02% w/v磷酸二氫鉀[KH_2PO_4]、0.8% w/v氯化鈉〔NaCl〕、1.15% w/v磷酸氫二鈉[Na_2HPO_4]；此後稱為「PBS(-)緩衝液」；Nissui Pharmaceutical Co.,Ltd.）清洗兩次。其後將清洗之COS-1細胞以1×10^{8}細胞/ml之細胞密度懸浮於PBS(-)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（127）

緩衝液中。

同時，令4μg之人型化HFE7A重鏈表現質體DNA與4μg之人型化HFE7A輕鏈表現質體DNA混合，其各經鹼性-SDS法和氯化銫密度梯度離心予以精製。將所得之混合液令以酒精沈澱且其後懸浮於20μl之PBS(-)緩衝液中。此些混合、沈澱和再懸浮步驟均在相同試管中進行。將全部所得之質體懸浮液（20μl)與20μl先前製備之COS-1細胞懸浮液（2×10^6細胞）混合並將此混合液移至裝設於基因轉移感染裝置GTE-1（Shimadzu Seisakusyo,K.K.）之具有電極分開2mm之FCT-13電穿孔室中（Shimadzu Seisakusyo,K.K.)。於1秒鐘間隔投予兩次600V脈衝，每次各50μF，令COS-1細胞以質體DNA轉形。電穿孔後，將室中之細胞-DNA混合物懸浮於20μl添加10% v/v FCS之α(+)MEM中，並移至培養燒瓶（培養面積75cm^2；Sumitomo Bakelite)。於5% v/v CO_2 37℃下培養72小時後，回收細胞上清液，並對上清液進行分析，測定存在何種表現產物。

使用上述方法，但視需要加以修飾，將COS-1細胞以下列各質體或質體組合不同地轉移感染：

(A)：無質體DNA

(B)：以pEg7AH-H和P7AL-MM共同轉移感染

(C)：以pEg7AH-H和P7AL-HM共同轉移感染

(D)：以pEg7AH-H和P7AL-HH共同轉移感染

實施例5

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（137）

以ELISA定量表現產物

以ELISA，使用抗-人類IgG抗體，進行實施例4中所製備之培養上清液中之人型化抗體表現產物之表現的確認及定量分析。

令山羊抗-人類IgG Fc專一多株抗體（Kappel）以1μg/ml終濃度溶於吸附緩衝液（0.05M碳酸氫鈉，0.02 w/v疊氮化鈉，pH9.6）且將100μl之等分試樣加至96孔穴平板之各孔穴中（MaxiSorb, Nunc），且於37℃下培養平板2小時，以助於抗體吸附。其次，各孔穴以350μl PBS-T〔PBS(-)內含0.05% w/v Tween-20(BioRad)〕清洗四次。清洗後，將含有10% v/v FCS之α(+)MEM所稀釋之培養上清液加至孔穴，且於37℃再培養平板2小時。

其次，孔穴再以PBS-T清洗四次，且其後於各孔穴加入100μl以PBS-T稀釋5,000倍之鹼性磷酸酯酶-標幟山羊抗-人類IgG Fc專一多株抗體（Caltag Lab.），並於37℃下培養平板2小時。各孔穴再以BPS-T清洗四次，並於各孔穴加入1mg/ml於10% v/v 二乙醇胺（pH9.8）中所製得之對硝苯基磷酸酯。於37℃培養0.5至1小時後，於405nm下測量吸光度。

於本試驗中，以內含10% v/v FCS之α(+)MEM將人類血漿IgG亞類（IgG1；Biopure AG）稀釋至某所欲濃度，使用作為提供培養上清液中所含人型化HFE7A抗體之參考樣品濃度。

如所預期的，轉形體（B）、（C）和（D）之各上清液以抗

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（139）

-人類IgG抗體偵測可測出表現人類抗體。陰性對照（A）則未表現人類抗體。

實施例6

Fas-結合活性分析

如下以ELISA分析實施例4所製備之細胞培養上清液中之Fas-結合活性。

令上述參考例1所得之表現人類Fas融合蛋白質之COS-1細胞的培養上清液，以吸附緩衝液稀釋5倍，且以50μl/孔穴分配至96孔穴平板之孔穴中（MaxiSorb;Nunc），並於4℃下培養過夜，令人類Fas融合蛋白質吸附至孔穴之表面。其次，各孔穴以350μl之PBS-T清洗4次。清洗後，於孔穴中加入50μl／孔穴之內含5% v/v BSA（牛血清白蛋白；Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）之PBS-T且於37℃培養1小時，令各孔穴剩餘之表面封阻。孔穴其後再以PBS-T清洗四次。

令實施例4所得之培養上清液，調整至於內含10% v/v FCS之α（+）MEM中，所欲產物之終濃度為100ng/ml。濃度為依據實施例5所述方法予以估計。其次令所得之各100ng/ml溶液，使用於以內含10% v/v FCS之α（+）MEM以連續二倍稀釋，作成連續稀釋液。其次，將50μl各表現產物之各連續稀釋液，加至上述製備之孔穴中，且於37℃培養平板2小時，令其反應。

其後，孔穴再以PBS-T清洗四次，其後將50μl經PBS-T稀釋成10,000倍之鹼性磷酸酯酶標幟山羊抗-人類IgG

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（140）

Fc專一多株抗體（Caltag Lab.）分配至各孔穴，且令反應於37℃下進行2小時。

使用由鼠融合瘤HFE7A所精製之HFE7A作為對照（IgG1），並使用經PBS-T稀釋5,000倍之鹼性磷酸酯酶-標幟山羊抗鼠IgG+IgA+IgM（Gibco BRL）代替鹼性磷酸酯酶-標幟山羊抗-人類IgG Fc專一多株抗體。

孔穴再以PBS-T清洗四次，其後將50μl之受質溶液〔1mg/ml對-硝苯基磷酸酯，於10% v/v 二乙醇胺中（pH9.8）〕分配至各孔穴且於37℃下培養平板0.5至1小時。各培養上清液中所含之表現產物與人類Fas融合蛋白質之結合活性為由讀取各孔穴於405nm下之吸光度而予以評估。

如所預期的，於上述上清液（B）、（C）和（D）乃證實對人類Fas融合蛋白質具結合活性。

實施例7

HFE7A對Fas之競爭地抑制結合

實施例之人型化抗-Fas抗體應該抑制HFE7A結合至Fas，因為實施例之抗體為衍生自HFE7A。因此，測定實施例4所得之表現產物，競爭地抑制HFE7A結合至人類Fas融合蛋白質之能力。

將1mg之參考例3所得之精製的單株抗體HFE7A，使用市售取得之鹼性磷酸酯酶標幟套件（Immuno-Link AP和APL Labeling Kit; Genosis），依套件所提供指示，進行標幟。此處亦將所得之經標幟抗體稱為「AP-HFE7A」。

令參考例1所得之內含人類Fas融合蛋白質之COS-1細

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（141）

胞培養上清液以吸附緩衝液稀釋5倍，並以50μl／孔穴分配至96孔穴平板之各孔穴中，用以偵測發光(Luminescent Solid Assay Plate, 高結合性質；Costar)。其後令平板於4℃下培養過夜，令人類Fas融合蛋白質吸附至孔穴表面。

其後，各孔穴以350μl之PBS-T清洗四次，並於各孔穴加入100μl內含5% v/v BSA之PBS-T且於37℃下培養1小時，令各孔穴剩餘的表面封阻。孔穴再以PBS-T清洗四次。

令實施例4所得之培養上清液，依實施例5之方法以內含10% v/v FCS之α(+)MEM調整至1μg/ml之抗體終濃度。將各表現產物之溶液使用內含10% v/v FCS之α(+)MEM以連續二倍稀釋，作成連續稀釋液。再以PBS-T清洗四次後，將100μl之CDP-star緩衝液(9.58ml二乙醇胺、0.2克氯化鎂、0.25克疊氮化鈉、pH8.5)分配至各孔穴中且令平板於室溫下靜置10分鐘。其後，丟棄CDP-Star緩衝液並加入50μl/孔穴之CDP-Star受質〔1.2ml sapphire II(Tropix)、200μl CDP-Star(Tropix)，以CDP-star緩衝液調整至12ml〕，並令平板於室溫下再靜置40分鐘。

實施例4之表現產物對於HFE7A結合至人類Fas融合蛋白質之競爭性抑制作用，為經由以Luminoscan(Titertech)測量發光強度而予以評估。

結果，證實實施例4所製備之表現產物專一地抑制

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（142）

HFE7A結合至人類Fas融合蛋白質（第29圖）。

實施例8

細胞自滅誘發活性

使用WR19L12a細胞（參見Itoh, N.等，同處）檢視實施例4之COS-1細胞培養上清液的細胞自滅誘導活性。

令WR19L12a細胞於具有10% v/v FCS(Gibco BRL)之RPMI 1640培養基中37℃ 5% v/v CO_2下培養3天，並將所得之培養物50μl(1× 10^5細胞)分配至96孔穴微平板之各孔穴(Sumitomo Bakelite)。將實施例4所得之培養上清液於含有10% v/v FCS之RPMI 1640培養基中調整至抗體終濃度100ng/ml。依實施例5之方法評估濃度。將各調整之表現產物溶液使用內含10% v/v FCS之RPMI 1640以連續2倍稀釋，作成序列稀釋。將各表現產物溶液之稀釋液加至各孔穴，以50μl／孔穴，並於37℃下培養平板1小時。其後，各孔穴之細胞以內含10% v/v FCS之RPMI 1640清洗四次且其後令清洗細胞以75μl／孔穴懸浮於內含10% v/v FCS之RPMI 1640中。

其後，將75μl之1.25μg/ml山羊抗-人類IgG Fc專一多株抗體(Kappel)／內含10% v/v FCS之RPMI 1640培養基加至各孔穴，作為第二抗體。令平板於37℃靜置12小時，且其後加入50μl之25μM PMS(吩啉甲硫酸酯；Sigma Chemicals Co.,其內含1mg/ml XTT〔2,3-雙(2-甲氧基-4-硝基-5-硫苯基)-2H-四唑鎓-5-羧醯苯胺內鹽；Sigma Chemical Co.〕)，使得XTT終濃度為250μg/ml

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（147）

且PMS為5μM。其後將平板於37℃下培養3小時，並於450nm下測定各孔穴之吸光度，使用粒線體之還原能力作為指標，計算細胞存活性。

各孔穴中之細胞存活性為依下式計算：

存活性（%）＝100×（a-b）/（c-b）

其中「a」為試驗孔穴之吸光度，「b」為不具有細胞之孔穴的吸光度，且「c」為未加入抗體之孔穴的吸光度。

如所預期的，實施例4之各表現產物（B）、（C）和（D）被證明於表現人類Fas抗原之T細胞中誘導細胞自滅（第30圖）。

實施例9

製備編碼造成人型化型輕鏈之DNA

（1）構築HFE7A抗體人型化型輕鏈之載體

為了令鼠-抗人類Fas抗體HFE7A之輕鏈胺基酸序列人型化，乃將HH型輕鏈之N終端胺基酸序列的第1個胺基酸（天冬胺酸）、第85個胺基酸（丙胺酸）和第107個胺基酸（精胺酸），分別以麩胺酸、麩胺酸和離胺酸取代。此些取代殘基於人類輕鏈（k鏈）中被保留。將所得之序列命名為「PDHH型」。對於HM輕鏈序列，將N終端胺基酸序列之第1個胺基酸（天冬胺酸）和第107個胺基酸（精胺酸），分別以保留之麩胺酸和離胺酸殘基取代。將所得之序列命名為「PDHM型」。

分別載有二種人型化輕鏈胺基酸序列（PDHH和PFHM）之表現質體為如下構築。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（144）

1）合成製備人型化HFE7A輕鏈可變和恆定區之引子

依PCR製備編碼造成PDHH型多肽鏈（序列表之SEQ ID No.107）之DNA（序列表之SEQ ID No.106）及編碼造成PDHM型多肽鏈（序列表之SEQ ID No.109）之DNA（序列表之SEQ ID No.108）。此些序列為一種HFE7A輕鏈可變區人型化型與人類Ig輕鏈（k鏈）恆定區之融合物。

7AL1P（SEQ ID No.55）和7ALCN（SEQ ID No.64）為已合成〔上述實施例2(2)2)〕，且亦合成下列寡核甘酸引子用於PCR：

5'- GGTGAGATTG TGCTCACCCA ATCTCCAGG -3'
(LPD1P; SEQ ID No. 110);
5'- CCTGGAGATT GGGTGAGCAC AATCTCACC -3'
(LPD1N; SEQ ID No. 111);
5'- CCATCTCTCG TCTGGAGCCG GAGGATTTTG C -3'
(LPD2P; SEQ ID No. 112);
5'- GCAAAATCCT CCGGCTCCAG ACGAGAGATG G -3'
(LPD2N; SEQ ID No. 113);
5'- CAAGGCACCA AGCTGGAAAT CAAACGGACT G -3'
(LPD3P; SEQ ID No. 114); 和
5'- CAGTCCGTTT GATTTCCAGC TTGGTGCCTT G -3'
(LPD3N; SEQ ID No. 115).

2）構築質體pLPDHH75（人型化PDHH型HFE7A輕鏈之表現質體）

LPDHH-DNA（輕鏈恆定區與PDHH DNA融合）為如序列表之SEQ ID No.106中所定義，且編碼造成序列表之SEQ ID No.107之胺基酸序列，為以進行三階段PCR而製備，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (145)

並插入質體載體中並且選殖至大腸桿菌。

a) 第一階段PCR

生長LPDHH-DNA之第一階段PCR的大綱為示於第31圖。

編碼造成分泌訊號序列和部分的FRL_1區，但於5'-終端含有Hind III限制酶切割部位之LPD1-DNA斷片，為如下製備。

PCR反應溶液之組成：

質體pHSGHH7 DNA, 200ng;

寡核甘酸引子7AL1P, 80 pmol;

寡核甘酸引子LPD1N, 80 pmol;

dNTP調和物，20μl;

10× Pfu緩衝液，20μl;

Pfu DNA聚合酶(Stratagene), 10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備編碼造成部分FRL_1、$CDRL_1$、FRL_2、$CDRL_2$和部分FRL_3區之LPDHH1-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

質體pHSGHH7 DNA, 200ng;

寡核甘酸引子LPD1P, 80 pmol;

寡核甘酸引子LPD2N, 80 pmol;

dNTP調和物，20μl;

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（146）

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備編碼造成部分FRL$_3$、CDRL$_3$和FRL$_4$之LPDHH2-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

質體pHSGHH7 DNA，200ng；

寡核苷酸引子LPD2P，80 pmol；

寡核苷酸引子LPD3N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備編碼造成部分FRL$_4$和HFE7A輕鏈恆定區，但於3'-終端具有EcoRI限制酶切割部位之LPDC-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

質體pHSGHH7 DNA，200ng；

寡核苷酸引子LPD3P，80 pmol；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（147）

寡核苷酸引子7ALCN，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

PCR後，令放大之DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

b) 第二階段PCR

產生LPDHH-DNA之第二階段PCR的大綱為示於第32圖。

如下製備LPDHH-DNA斷片，其中上述之LPD1-DNA、LPDHH1-DNA和LPDHH2-DNA斷片為融合。

PCR反應溶液之組成：

LPD1-DNA溶液（來自第一階段PCR），10μl；

LPDHH1-DNA溶液（來自第一階段PCR），10μl；

LPDHH2-DNA溶液（來自第一階段PCR），10μl；

寡核苷酸引子7AL1P，80 pmol；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（148）

寡核苷酸引子LPD3N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

PCR後，令放大之LPDHH1.2斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之融合DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

c) 第三階段PCR

產生LPDHH-DNA之第三階段PCR的大綱為示於第33圖。

如下製備LPDHH-DNA斷片，其中上述之LPDHH1.2-DNA和LPDC-DNA斷片為融合。

PCR反應溶液之組成：

LPDHH1.2-DNA溶液（來自第二階段PCR），10μl；

LPDC-DNA溶液（來自第一階段PCR），10μl；

寡核苷酸引子7AL1P，80 pmol；

寡核苷酸引子7ALCN，80 pmol；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（149）

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

PCR後，令放大之LPDHH-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

構築載有LPDHH-DNA斷片之表現質體為概述於第34圖。

令上述所得之LPDHH-DNA再以苯酚萃取後以酒精沈澱予以精製，且其後以限制酶Hind III和EcoRI切開。

令1μg之選殖質體pHSG399 DNA以限制酶Hind III和EcoRI切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化質體pHSG399 DNA與亦已被Hind III和EcoRI切開之LPDHH-DNA，使用DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接。其後將大腸桿菌JM109以連接之DNA轉形並且塗布於含有終濃度1mM IPTG、0.1% w/v X-Gal和50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (1494)

上。所得的任何白色轉形體於2ml內含50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基中37℃下培養過夜，並以鹼性-SDS法由所得之培養物萃取出質體DNA。其後將此萃取質體DNA以Hind III和EcoRI切開，並使用1% w/v瓊脂糖膠電泳選出載有LPDHH-DNA斷片之選殖體。

依此，取得載有包括人型化LPDHH DNA之可變區與編碼造成人類Igk鏈恆定區DNA之融合斷片的質體pHSHH5。具有質體pHSHH5之轉形體大腸桿菌pHSHH5 SANK 70398於1998年3月26日，依據布達佩斯條約寄存於工業技術院生命工學工業技術研究所，且以登記號碼FERM BP-6274予以記錄。

使用質體pHSHH5，則可構築表現載體質體pLPDHH75，其載有序列表之SEQ ID No.106之DNA斷片且編碼造成序列表之SEQ ID No.107之人型化PDHH型HFE7A輕鏈多肽。

令1μg之pEE.12.1 DNA(Lonza)(哺乳動物之表現載體以限制酶Hind III和EcoRI切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之切開、脫磷酸化之質體DNA(100ng)與10μg亦已被Hind III和EcoRI切開之pHSHH5 DNA斷片，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd)予以連接。其後將連接混合液轉形至大腸桿菌JM109(如上述)，其後塗布於含有50μg/ml安比西林之LB洋菜平板上。

令此方法所得之轉形體於內含50μg/ml安比西林之2ml LB液體培養基中37℃下培養過夜，並由所得培養物依鹼

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（150）

性-SDS法萃取出質體DNA。

此萃取之質體DNA以Hind III和EcoRI切開，且含以1% w/v瓊脂糖膠電泳，確認所欲插入物是否存在。此可單離出質體pLPDHH75，其內含具有人型化PDHH型HFE7A輕鏈及編碼造成人類免疫球蛋白k鏈恆定區DNA之融合斷片。發現此融合斷片為以正確方向位於巨細胞病毒（CMV）啓動基因之下游。

3）構築質體pLPDHM32（人型化PDHM型HFE7A輕鏈之表現質體）

進行三階段PCR製備編碼造成序列表SEQ ID No.52胺基酸序列之LPDHM-DNA斷片（序列表之SEQ ID No.108），插入質體載體並選殖至大腸桿菌。

a）第一階段PCR

生產LPDHM-DNA之第一階段PCR大綱為示於第35圖。

LPD1-DNA斷片（編碼造成分泌訊號序列與部分FRL_1且於5'-終端具有加入Hind III限制酶切割部位）、和LPDC-DNA斷片（編碼造成部分FRL_4與於3'-終端具有加入EcoRI限制部位之恆定區）為於LPDHH-DNA斷片之製備中取得〔參見「2)構築質體pLPDHH75(人型化PDHH型HFE7A輕鏈之表現質體)」和「a)第一階段PCR」〕。

如下製備編碼造成部分$CDRL_1$、FRL_2、$CDRL_2$、FRL_3、$CDRL_3$和FRL_4之LPDHM1-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

質體pHSGHM17 DNA，200ng；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（151）

寡核苷酸引子LPD1P，80 pmol；

寡核苷酸引子LPD3N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

PCR後，令放大之LPD1、LPDHM1和LPDC-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之融合DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

b) 第二階段PCR

產生PDHM-DNA之第二階段PCR的大綱為示於第36圖。

如下製備LPDHM1.2-DNA斷片，其中上述之LPD1-DNA和LPDHM1-DNA斷片為融合。

PCR反應溶液之組成：

LPD1-DNA溶液（來自第一階段PCR），10μl；

LPDHM1-DNA溶液（來自第一階段PCR），10μl；

寡核苷酸引子7AL1P，80 pmol；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（152）

寡核苷酸引子LPD3N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

PCR後，令放大之LPDHM1.2-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

c) 第三階段PCR

產生LPDHM-DNA之第三階段PCR的大綱為示於第37圖。

如下製備LPDHM-DNA斷片，其包括LPDHM1.2-DNA和LPDC-DNA斷片之融合物。

PCR反應溶液之組成：

LPDHM1.2-DNA溶液（來自第二階段PCR），10μl；

LPDC-DNA溶液（來自第一階段PCR），10μl；

寡核苷酸引子7AL1P，80 pmol；

寡核苷酸引子7ALCN，80 pmol；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（15）

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

PCR後，令放大之LPDHM-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

構築載有LPDHM-DNA斷片之表現質體為概述於第38圖。

令上述所得之LPDHM-DNA再以苯酚萃取後以酒精沈澱予以精製，且其後以限制酶Hind III和EcoRI切開。

令1μg之選殖質體pHSG399 DNA以限制酶Hind III和EcoRI切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化質體pHSG399 DNA與亦已被Hind III和EcoRI切開之LPDHM-DNA，使用DNA Ligation Kit Version 2.0 (Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接。其後將大腸桿菌JM109以連接之DNA轉形並且塗布於含有終濃度1mM IPTG、0.1% w/v X-Gal和50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（154）

上。所得的任何白色轉形體於2ml內含50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基中37℃下培養過夜，並以鹼性-SDS法由所得之培養物萃取出質體DNA。其後將此萃取質體DNA以Hind III和EcoRI切開，並使用1% w/v瓊脂糖膠電泳選出載有LPDHM-DNA斷片之選殖體。

此步驟結果，取得載有包括人型化PDMM型HFE7A輕鏈可變區與編碼造成人類Igk鏈恆定區DNA之融合插入物的質體pHSHM2。具有質體pHSHM2之轉形體大腸桿菌pHSHM2 SANK 70198於1998年2月26日，依據布達佩斯條約寄存於工業技術院生命工學工業技術研究所，且以登記號碼FERM BP-6272予以記錄。

使用上述質體pHSHM2，則可構築表現載體質體pLPDHM32，其載有序列表之SEQ ID No.108之DNA且編碼造成序列表之SEQ ID No.109之人型化PDHM型HFE7A輕鏈多肽。

令1μg之pEE.12.1 DNA(Lonza)(哺乳動物之表現載體)以限制酶Hind III和EcoRI切開，且其後使用CIP予以脫磷酸化。將所得之切開、脫磷酸化之質體DNA(100ng)與10μg亦已被Hind III和EcoRI切開之pHSHM2 DNA斷片，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd)予以連接。其後將連接混合液轉形至大腸桿菌JM109(如上述)，其後塗布於含有50μg/ml安比西林之LB洋菜平板上。

令此方法所得之轉形體於內含50μg/ml安比西林之2ml LB液體培養基中37℃下培養過夜，並由所得培養物依鹼

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（157）

性-SDS法萃取出質體DNA。

此萃取之質體DNA以Hind III和EcoRI切開，且含以1% w/v 瓊脂糖膠電泳，確認所欲插入物是否存在。此可單離出質體pLPDHM32，其內含具有人型化PDHM型HFE7A輕鏈之可變區及編碼造成人類免疫球蛋白k鏈恆定區DNA之融合斷片。發現此融合斷片為以正確方向位於巨細胞病毒（CMV）啓動基因之下游。

（4）確認核甘酸序列

為了確認質體pLPDHH75和pLPDHM32之DNA插入物具有所欲的核甘酸序列，分析此DNA插入物並決定其核甘酸序列。核甘酸定序所使用之寡核甘酸引子為SP1（SEQ ID No.68）、SP2（SEQ ID No.69）、SP3（SEQ ID No.70）、SP4（SEQ ID No.71）、SP5（SEQ ID No.72）和SP6（SEQ ID No.73）。

各引子所結合之位置示於第19圖。核甘酸序列之決定為由鹼性-SDS法和氯化銫法所精製之含有欲確定序列之質體，作為模板之雙脫氧核甘酸鏈終止法予以進行。如所預期的，確認pLPDHH75具有序列表之SEQ ID No.106核甘酸序列，編碼造成SEQ ID No.107之多肽，且pLPDHM32具有序列表之SEQ ID No.108核甘酸序列，編碼造成SEQ ID No.109之多肽。

實施例10

製備編碼造成人型化重鏈之DNA

（1）構築HFE7A抗體人型化型重鏈之載體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（156）

為了進一步令序列表之SEQ ID No.75胺基酸序列（鼠抗人類Fas抗體HFE7A之人型化重鏈）人型化，將SEQ ID No.75之胺基酸序列中的第44個胺基酸（精胺酸）和第76個胺基酸（丙胺酸）分別以已被保留於人類重鏈中之甘胺酸和蘇胺酸予以取代。將所得之序列命名為「HV型」

載有抗-人類Fas抗體HFE7A之HV型人型化重鏈胺基酸序列之表現質體為如下構築。

(1) 合成製備人型化重鏈可變區之引子

編碼造成人型化抗-Fas抗體HFE7A重鏈（序列表之SEQ ID No.117)之DNA(序列表之SEQ ID No.116)為使用組合之PCR步驟予以合成。

加上7AH1P(上述SEQ ID No.76)，合成下列三個引子用於PCR：

5'- CAGGCCCCTG GACAGGGCCT TGAGTGGATG -3'
(HPD1P; SEQ ID No. 118);
5'- CATCCACTCA AGGCCCTGTC CAGGGGCCTG -3'
(HPD1N; SEQ ID No. 119); 和
5'- GCTGAGCTCC ATGTAGGCTG TGCTAGTGGA TGTGTCTAC -3'
(HPD2N; SEQ ID No.120)。

2) 構築質體pgHPDHV3

編碼造成序列表SEQ ID No.117胺基酸No's-19-+84之HPD1.2-DNA斷片，為以進行二階段PCR而製備，插入質體並於其後選殖至大腸桿菌。

a) 第一階段PCR

產生HPD1.2-DNA之第一階段PCR的大綱為示於第39圖。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（57）

如下製備編碼造成分泌訊號序列和FRH_1、$CDRH_1$和部分FRH_2且於5'-終端具有加入Hind III限制酶切割部位之HPD1-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

質體pgHSL7A62 DNA，200ng；

寡核苷酸引子7AH1P，80 pmol；

寡核苷酸引子HPD1N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

如下製備編碼造成部分FRH_2、$CDRH_3$和部分FRH_3之HPD2-DNA斷片。

PCR反應溶液之組成：

質體pgHSL7A62 DNA，200ng；

寡核苷酸引子HPD1P，80 pmol；

寡核苷酸引子HPD2N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（58）

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

PCR後，令放大之HPD1和HPD2-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

b) 第二階段PCR

產生HPD1.2-DNA之第二階段PCR的大綱為示於第40圖。

如下製備HPD1.2-DNA斷片，其中上述之HPD1-DNA和HPD2-DNA斷片為融合。

PCR反應溶液之組成：

HPD1-DNA溶液（來自第一階段PCR），10μl；

HPD2-DNA溶液（來自第一階段PCR），10μl；

寡核甘酸引子7AH1P，80 pmol；

寡核甘酸引子HPD2N，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（159）

重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

PCR後，令放大之HPD1.2-DNA斷片先進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500×g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

構築載有HPD1.2-DNA斷片之質體為概述於第41圖。

令上述所得之HPD1.2-DNA再以苯酚萃取後以酒精沈澱予以精製，且其後以限制酶Hind III和Sac I切開。

其次，令10μg之質體pgHSL7A62 DNA以限制酶Hind III和Sac I切開，且使用CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化pgHSL7A62 DNA(100ng)與亦已被Hind III和Sac I切開之HPD1.2-DNA 10μg，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接並將連接之混合物選殖至大腸桿菌JM109，將所得之任何轉形體於2ml內含50μg/ml氯黴素之LB洋菜培養基中37℃下培養過夜，並以鹼性-SDS法由培養物萃取出質體DNA。

其後將此萃取質體DNA以Hind III和Sac I切開，並使用1% w/v 瓊脂糖膠電泳確認所欲插入物是否存在。由此，取得載有包括編碼造成人型化HV型HFE7A重鏈可變區之DNA斷片與編碼造成人類IgG1重鏈恆定區之基因組

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（160）

DNA斷片之融合插入物的質體pgHPDHV3。具有質體pgHPDHV3之轉形體大腸桿菌pgHPDHV3 SANK 70298於1998年2月26日，依據布達佩斯條約之微生物寄存，寄存於工業技術院生命工學工業技術研究所，且以登記號碼FERM BP-6273予以記錄。

令由此所得之質體pgHPDHV3 DNA 10μg以限制酶Hind III及EcoRI切開。同時，將1μg之哺乳動物表現質體pEE.6.1以Hind III和EcoRI切開，且以CIP予以脫磷酸化。將此脫磷酸化pEE.6.1 DNA(100ng)與10μg切開之pgHPDHV3 DNA使用連接套件Version 2.0 (Takara Shuzo Co.,Ltd)予以連接。並且選殖至大腸桿菌JM109中。將任何所得之轉形體於2ml內含50μg/ml安比西林之LB液體培養基中37℃下培養過夜，並以鹼性-SDS法由培養物萃取出質體DNA。此質體以Hind III和EcoRI切開，使用1% w/v 瓊脂糖膠電泳確認所欲插入物是否存在。由此，取得內含包括編碼造成人型化HV型HFE7A重鏈之DNA斷片與編碼造成CMV啓動基因人類IgG1重鏈下游恆定區之基因組DNA斷片之融合插入物的質體pEgPDHV3-21，且以正確方向。

(3) 確認核甘酸序列

為了確認質體pEgPDHV3-21之DNA插入物具有所欲的核甘酸序列，乃分析DNA插入物並決定核甘酸序列。於此定序中，使用引子PEEF(SEQ ID No.104)、HPD1P(SEQ ID No.118)、HPD1N(SEQ ID No.119)和HPD2N(SEQ ID

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（161）

No.120）。

引子結合之位置示於第42圖。核甘酸序列之決定為由使用鹼性-SDS法和氯化銫法所精製之內含欲確認序列之質體作為模板之雙脫氧核甘酸鏈終止法予以進行。

如所預期的，證實pEgPDHV3-21具有序列表之SEQ ID No.116之核甘酸序列，其編碼造成SEQ ID No.117之多肽。

實施例11

構築最適於COS-1細胞之高程度表現載體

使用上述載體p7AL-HH、p7AL-HM、p7AL-MM、pLPDHH75、pLPDHM32、pEg7AH-H和pEgPDHV3-21，構築最適於COS-1細胞之高程度表現載體。

（1）人型化輕鏈之高程度表現載體

人型化輕鏈高程度表現載體之構築為概述於第43圖。

1）合成製備SR α啟動基因DNA斷片之引子

使用PCR合成用於插入人型化輕鏈表現載體中之SR α啓動基因DNA斷片。

合成下列一個寡核甘酸引子用於PCR：

5'-TGCACGCGTG GCTGTGGAAT GTGTGTCAGT TAG-3'

(MLUA: SEQ ID No.121)；和

5'-TCCGAAGCTT TTAGAGCAGA AGTAACACTT C-3'

(HINDB: SEQ ID No.122)。

2）構築質體

合成後，將SR α啓動基因DNA斷片插入載體p7AL-HH、

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（162）

p7AL-HM、p7AL-MM、pLPDHH75或pLPDHM32且其後選殖至大腸桿菌。

如下製備LSR α-DNA斷片，其包括於5'-終端具有加入MulI限制酶切割部位且於3'-終端具有加入Hind III限制酶切割部位之SR α啓動基因。

PCR反應溶液之組成：

質體pME18S DNA，200ng；

寡核苷酸引子MLUA，80 pmol；

寡核苷酸引子HINDB，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

PCR後，令放大之LSR α-DNA斷片進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml之溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

令1μg之質體p7AL-HH、p7AL-HM、p7AL-MM、pLPDHH75

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（167）

或pLPDHM32 DNA以限制酶MulI和Hind III切開，且其後以CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化質體DNA(100ng)與內含事先以MulI和Hind III切開之LSR α-DNA斷片之10μl溶液，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接。其後將大腸桿菌JM109以連接混合物轉形並且塗布於內含50μg/ml安比西林之LB洋菜培養基上。將所得之轉形體於2ml內含50μg/ml安比西林之LB液體培養基中37℃下培養過夜，並以鹼性-SDS法由所得之培養物萃取出質體DNA。將此萃取之質體DNA以MulI和Hind III切開，並使用1% w/v 瓊脂糖膠電泳選出載有L5R α-DNA斷片之選殖體。

依據上述步驟，取得高程度表現載體質體pSRHH(HH型)、pSRHM(HM型)、pSRMM(MM型)、pSRPDHH(PDHH型)和pSRPDHM(PDHM型)。

(2) 人型化重鏈之高程度表現載體

人型化重鏈高程度表現載體之構築為概述於第44圖。

1) 合成製備SR α啟動基因DNA斷片之引子

使用PCR合成用於插入人型化重鏈表現載體中之SR α啓動基因DNA斷片。

加上HINDB(SEQ ID No.122)，合成下列寡核甘酸引子用於PCR：

5'-AAAGCGGCCG CTGCTAGCTT GGCTGTGGAA TGTGTG-3'

(NOTA: SEQ ID No.123)。

2) 構築質體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（164）

使用PCR合成SR α啓動基因DNA斷片、插入上述載體pEg7AH-H或pEgPDHV3-21，且其後選殖至大腸桿菌中。

如下製備HSR α-DNA斷片，其包括於5'-終端具有加入NotI限制酶切割部位且於3'-終端具有加入Hind III限制酶切割部位之SR α啓動基因。

PCR反應溶液之組成：

質體pME18S DNA，200ng；

寡核甘酸引子NOTA，80 pmol；

寡核甘酸引子HINDB，80 pmol；

dNTP調和物，20μl；

10× Pfu緩衝液，20μl；

Pfu DNA聚合酶，10單位；和

再蒸餾水至總量200μl。

PCR反應為如下進行。溶液先於94℃加熱2分鐘後，重覆30次94℃ 1分鐘、55℃ 1分鐘和72℃ 2分鐘之加熱循環。此步驟完成後，令反應溶液於72℃加熱10分鐘。

PCR後，令放大之HSR α-DNA斷片進行苯酚萃取及酒精沈澱，並於其後以5% w/v聚丙烯醯胺膠電泳分離此些斷片。電泳後，將膠以1μg/ml之溴化乙錠染色，並將UV光下偵測之DNA帶，使用剃刀刀片切出並使用如上述之Centriruter和Centricon-10由膠溶離。將溶離之DNA於7,500× g下離心濃縮，其後進行酒精沈澱，並溶於50μl之蒸餾水中。

令1μg之質體pEg7AH-H或pEgPDHV3-21 DNA其後以限

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（165）

制酶NotI和Hind III切開，且其後以CIP予以脫磷酸化。將所得之脫磷酸化質體DNA(100ng)與含有事先以NotI和Hind III切開之HSR α-DNA斷片溶液，使用DNA Ligation Kit Version 2.0(Takara Shuzo Co.,Ltd.)予以連接。其後將大腸桿菌JM109以連接之混合物轉形並且塗布於含有終濃度1mM IPTG、0.1% w/v X-Gal和50μg/ml安比西林之LB洋菜培養基上。所得的白色轉形體於2ml內含50μg/ml安比西林之LB洋菜培養基中37℃下培養過夜，並以鹼性-SDS法由所得之培養物萃取出質體DNA。其後將此萃取質體DNA以NotI和Hind III切開，並使用1% w/v 瓊脂糖膠電泳選出載有HSR α-DNA斷片之選殖體。

依據上述步驟，取得高程度表現載體質體pSRg7AH和pSRgPDH(HV型)

實施例12

於COS-1細胞中表現

以類似實施例4所述方式，經由電穿孔進行令COS-1細胞轉移感染以對於上述所得各人型化HFE7A重鏈和各人型化HFE7A輕鏈之高程度表現質體。

令COS-1細胞於含有添加10% v/v FCS之α(+) MEM之培養燒瓶(培養面積：225cm²)生長至半匯聚。其後，丟棄培養基並以3ml胰蛋白酶-EDTA溶液(Sigma Chemicals Co.)於37℃處理3分鐘，令COS-1細胞由燒瓶剝落。其後於800r.p.m.下離心2分鐘收集剝落之細胞且以PBS(-)緩衝液清洗兩次。其後將清洗之COS-1細胞以PBS(-)緩衝

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（166）

液調整至1×10^8細胞/毫升，產生COS-1細胞懸浮液。

同時，令4μg之人型化HFE7A重鏈表現質體DNA與4μg之人型化HFE7A輕鏈表現質體DNA(其各經鹼性-SDS法和氯化銫密度梯度離心予以精製)混合且其後於懸浮在20μl之PBS(-)緩衝液前，令以酒精沈澱，此所有操作均在相同試管中進行。將全部所得之質體懸浮液（20μl）與20μl先前製備之COS-1細胞懸浮液（2×10^6細胞）混合並將此混合液移至裝設於基因轉移感染裝置GTE-1(Shimadzu Seisakusyo,K.K.)之具有電極分開2mm之FCT-13電穿孔室中(Shimadzu Seisakusyo,K.K.)。於1秒鐘間隔投予兩次600V脈衝，每次各50μF，令COS-1細胞以所欲之質體DNA轉形。電穿孔後，將室中之細胞-DNA混合物懸浮於20μl添加10% v/v FCS之α(+)MEM中，並移至培養燒瓶(培養面積75cm^2；Sumitomo Bakelite)。並於5% v/v CO_2 37℃下培養72小時。其後，回收細胞上清液，並對表現產物進行分析。

依據上述方法，取得以下列各質體組合所轉移感染之COS-1細胞：

(A)：無質體DNA

(B)：以pSRgPDH 和pSRPDHH之共同轉移感染；

(C)：以pSRgPDH 和pSRPDHM之共同轉移感染；

(D)：以pSRg7AH 和pSRHH之共同轉移感染；

(E)：以pSRg7AH 和pSRHM之共同轉移感染；

(F)：以pSRg7AH 和pSRMM之共同轉移感染；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（167）

實施例13

Fas-結合活性分析

如下以ELISA分析實施例12所製備之細胞培養上清液中之Fas-結合活性。

令上述參考例1所得之表現人類Fas融合蛋白質之COS-1細胞的培養上清液，以吸附緩衝液稀釋5倍，且以50μl/孔穴分配至96孔穴平板之孔穴中（MaxiSorb; Nunc），並於4℃下培養過夜，令人類Fas融合蛋白質吸附至孔穴之表面。其次，各孔穴以350μl之PBS-T清洗4次。清洗後，於孔穴中加入50μl／孔穴之內含5% v/v BSA（牛血清白蛋白；Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）之PBS-T且於37℃培養1小時，令各孔穴剩餘之表面封阻。孔穴其後再以PBS-T清洗四次。

令實施例4所得之培養上清液，調整至於內含10% v/v FCS之α(+)MEM中，所欲產物之終濃度為100ng/ml。濃度為依據實施例5所述方法予以估計。其次令所得之各100ng/ml溶液，使用於以內含10% v/v FCS之α(+)MEM以連續二倍稀釋，作成連續稀釋液。其次，將50μl各表現產物之各連續稀釋液，加至上述製備之孔穴中，且於37℃培養平板2小時，令其反應。

其後，孔穴再以PBS-T清洗四次，其後將50μl經PBS-T稀釋成10,000倍之鹼性磷酸酯酶標幟山羊抗-人類IgG Fc專一多株抗體（Caltag Lab.）分配至各孔穴，且令反應於37℃下進行2小時。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（168）

使用由鼠融合瘤HFE7A所精製之HFE7A作為對照（IgG1），並使用經PBS-T稀釋5,000倍之鹼性磷酸酯酶-標幟山羊抗鼠IgG+IgA+IgM(Gibco BRL)代替鹼性磷酸酯酶-標幟山羊抗-人類IgG Fc專一多株抗體。

孔穴再以PBS-T清洗四次，其後將50μl之受質溶液〔1mg/ml對-硝苯基磷酸酯，於10% v/v 二乙醇胺中(pH9.8)〕分配至各孔穴且於37℃下培養平板0.5至1小時。各培養上清液中所含之表現產物與人類Fas融合蛋白質之結合活性為由讀取各孔穴於405nm下之吸光度而予以評估。

如所預期的，證明於上述實施例12之(B)、(C)、(D)、(E)和(F)之上清液對於人類Fas融合蛋白質具結合活性，且示於第45圖。

實施例14

HFE7A對Fas結合活性的競爭抑制

實施例12所得之人型化抗-Fas抗體應該抑制HFE7A結合至Fas，因為實施例之抗體為衍生自HFE7A。因此，測定實施例12所得之表現產物，競爭地抑制HFE7A結合至人類Fas融合蛋白質之能力。

令參考例1所得之內含人類Fas融合蛋白質之COS-1細胞培養上清液以吸附緩衝液稀釋5倍，並以50μl／孔穴分配至96孔穴平板之各孔穴中，用以偵測發光(Luminescent Solid Assay Plate，高結合性質；(Costar)。其後令平板於4℃下培養過夜，令人類Fas融合蛋白質吸附至孔穴表面。

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）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（169）

其後，各孔穴以350μl之PBS-T清洗四次，並於各孔穴加入100μl內含5% v/v BSA之PBS-T且於37℃下培養1小時，令各孔穴剩餘的表面封阻。孔穴再以PBS-T清洗四次。

令實施例所得之培養上清液，依實施例5之方法以內含10% v/v FCS之α(+)MEM調整至1μg/ml之抗體終濃度。將各表現產物之溶液使用內含10% v/v FCS之α(+)MEM以連續二倍稀釋，作成連續稀釋液。將AP-HFE7A以內含10% v/v FCS之α(+)MEM稀釋至50ng/ml，並將25μl所得之溶液與等量之各連接稀釋液混合。

令各孔穴再以PBS-T清洗四次且其後將50μl之各抗體混合液加至各孔穴中，且令平板於室溫下靜置過夜。後續，再以PBS-T清洗各孔穴四次後，將100μl之CDP-star緩衝液（9.58ml二乙醇胺、0.2克氯化鎂、0.25克疊氮化鈉、pH8.5)分配至各孔穴中且令平板於室溫下靜置10分鐘。其後，丟棄CDP-Star緩衝液並加入50μl/孔穴之CDP-Star受質〔1.2ml sapphire II(Tropix)、200μl CDP-Star(Tropix)，以CDP-star緩衝液調整至12ml〕，並令平板於室溫下再靜置40分鐘。

實施例12之表現產物對於HFE7A結合至人類Fas融合蛋白質之競爭性抑制作用，為經由以Luminoscan(Titertech)測量發光強度而予以評估。

如所預期的，證明實施例12所得之各上清液(B)、(C)、(D)、(E)和(F)之表現產物為專一地抑制HFE7A抗體結

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（170）

合至人類Fas融合蛋白質。結果示於第46圖。

實施例15

細胞自滅誘發活性

實施例12所得之培養上清液中表現產物之細胞自滅誘發活性，為以類似於實施例8所述之方式予以檢視。

令WR19L12a細胞於具有10% v/v FCS(Gibco BRL)之RPMI 1640培養基中37℃ 5% v/v CO_2 下培養3天，並將所得之培養物50μl(1× 10^5 細胞)分配至96孔穴微平板之各孔穴(Sumitomo Bakelite)。將實施例12所得之培養上清液於含有10% v/v FCS之RPMI 1640培養基中調整至抗體終濃度100ng/ml。依實施例5之方法評估濃度。將各調整之表現產物溶液使用內含10% v/v FCS之RPMI 1640以連續2倍稀釋，作成序列稀釋。將各表現產物溶液之稀釋液加至各孔穴，以50μl／孔穴，並於37℃下培養平板1小時。其後，各孔穴之細胞以內含10% v/v FCS之RPMI 1640清洗一次且其後令清洗細胞以100μl／孔穴懸浮於0.5μg／ml山羊抗-人類IgG Fc專一多株抗體(Kappel)／內含10% v/v FCS之RPMI 1640中。

令平板於37℃下靜置12小時，且其後加入50μl之25μM PMS(吩吡甲硫酸鹽；Sigma Chemicals Co.)，其內含1mg/ml XTT〔2,3-雙(2-甲氧基-4-硝基-5-硫苯基)-2H-四唑鎓-5-羧醯苯胺內鹽；Sigma Chemical Co.〕)，使得XTT終濃度為333μg/ml且PMS為8.3μM。其後將

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（171）

平板於37℃下培養3小時，並於450nm下測量各孔穴之吸光度，使用粒線體之還原能力作為指標，計算細胞存活性。

各孔穴中之細胞存活性為依下式計算：

存活性（%）＝100×（a-b）/（c-b）

其中「a」為試驗孔穴之吸光度，「b」為不具有細胞之孔穴的吸光度，且「c」為未加入抗體之孔穴的吸光度。

如所預期的，證明上述實施例12所得之各培養上清液（B）、（C）、（D）、（E）和（F）之表現產物，於此表現人類Fas抗原之淋巴細胞株之T細胞中誘發細胞自滅（第47圖）。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（17）

序列編號：

SEQ ID No.1

長度：10

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg Cys Lys
1 5 10

SEQ ID No.2

長度：5

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

斷片類型：內部

序列描述：

Ser Tyr Trp Met Gln
1 5

SEQ ID No.3

長度：17

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（174）

斷片類型：內部

序列描述：

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

SEQ ID No.4

長度：12

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

斷片類型：內部

序列描述：

Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

SEQ ID No.5

長度：15

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

斷片類型：內部

序列描述：

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

SEQ ID No.6

長度：7

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（174）

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

斷片類型：內部

序列描述：

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

SEQ ID No.7

長度：9

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

斷片類型：內部

序列描述：

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr
1 5

SEQ ID No.8

長度：1392

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：cDNA至mRNA

假設：無

反意義：無

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（175）

來源：

生物：Mus肌

細胞類型：融合瘤

細胞株：HFE7A

特徵：

NAME/KEY: CDS

位置：1..1392

鑑定方法：相似

NAME/KEY: mat peptide

位置：58..1392

鑑定方法：相似

NAME/KEY: sig peptide

位置：1..57

鑑定方法：相似

序列描述：

```
ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT      48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-19             -15                 -10                 -5
GTC CAT TCT CAG GTC CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTT GTG AAG      96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
                1               5                   10
CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC     144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
     15                  20                  25
ACC AGC TAC TGG ATG CAG TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGC CTT     192
Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30                  35                  40                  45
GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAT AGC TAT ACT AAC TAC AAT     240
```


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）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（176）

```
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
                    50                  55                  60
CAA AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC ACA TCC TCC AGC    288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
                65                  70                  75
ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC    336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
            80                  85                  90
TAT TAC TGT GCA AGA AAT AGG GAC TAT AGT AAC AAC TGG TAC TTC GAT    384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp
        95                  100                 105
GTC TGG GGC ACA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCC AAA ACG ACA    432
Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
110                 115                 120                 125
CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG GCC CCT GGA TCT GCT GCC CAA ACT AAC    480
Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn
                130                 135                 140
TCC ATG GTG ACC CTG GGA TGC CTG GTC AAG GGC TAT TTC CCT GAG CCA    528
Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
            145                 150                 155
GTG ACA GTG ACC TGG AAC TCT GGA TCC CTG TCC AGC GGT GTG CAC ACC    576
Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
        160                 165                 170
TTC CCA GCT GTC CTG CAG TCT GAC CTC TAC ACT CTG AGC AGC TCA GTG    624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val
    175                 180                 185
ACT GTC CCC TCC AGC ACC TGG CCC AGC CAG ACC GTC ACC TGC AAC GTT    672
Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val
190                 195                 200                 205
GCC CAC CCG GCC AGC AGC ACC AAG GTG GAC AAG AAA ATT GTG CCC AGG    720
Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg
                210                 215                 220
GAT TGT GGT TGT AAG CCT TGC ATA TGT ACA GTC CCA GAA GTA TCA TCT    768
Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser
            225                 230                 235
GTC TTC ATC TTC CCC CCA AAG CCC AAG GAT GTG CTC ACC ATT ACT CTG    816
Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu
        240                 245                 250
ACT CCT AAG GTC ACG TGT GTT GTG GTA GAC ATC AGC AAG GAT GAT CCC    864
Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro
    255                 260                 265
GAG GTC CAG TTC AGC TGG TTT GTA GAT GAT GTG GAG GTG CAC ACA GCT    912
Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala
270                 275                 280                 285
CAG ACG CAA CCC CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACT TTC CGC TCA GTC    960
Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val
                290                 295                 300
AGT GAA CTT CCC ATC ATG CAC CAG AAC TGG CTC AAT GGC AAG GAG TTC   1008
Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asn Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe
            305                 310                 315
AAA TGC AGG GTC AAC AGT GCA GCT TTC CCT GCC CCC ATC GAG AAA ACC   1056
Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
        320                 325                 330
ATC TCC AAA ACC AAA GGC AGA CCG AAG GCT CCA CAG GTG TAC ACC ATT   1104
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile
    335                 340                 345
CCA CCT CCC AAG GAG CAG ATG GCC AAG GAT AAA GTC AGT CTG ACC TGC   1152
Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys
```

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（177）

```
350                 355                 360                 365
ATG ATA ACA GAC TTC TTC CCT GAA GAC ATT ACT GTG GAG TGG CAG TGG   1200
Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp
                370                 375                 380
AAT GGG CAG CCA GCG GAG AAC TAC AAG AAC ACT CAG CCC ATC ATG AAC   1248
Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn
            385                 390                 395
ACG AAT GGC TCT TAC TTC GTC TAC AGC AAG CTC AAT GTG CAG AAG AGC   1296
Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser
        400                 405                 410
AAC TGG GAG GCA GGA AAT ACT TTC ACC TGC TCT GTG TTA CAT GAG GGC   1344
Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly
    415                 420                 425
CTG CAC AAC CAC CAT ACT GAG AAG AGC CTC TCC CAC TCT CCT GGT AAA   1392
Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
430                 435                 440                 445
```

SEQ ID No.9

長度：464

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

序列描述：

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-19                 -15                 -10                  -5
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
                  1                   5                  10
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
     15                  20                  25
Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30                  35                  40                  45
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
                 50                  55                  60
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
               65                  70                  75
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
          80                  85                  90
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp
     95                 100                 105
Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
110                 115                 120                 125
Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn
                130                 135                 140
```

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（178）

```
Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
            145                 150                 155
Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
        160                 165                 170
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val
    175                 180                 185
Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val
190                 195                 200                 205
Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg
                210                 215                 220
Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser
            225                 230                 235
Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu
        240                 245                 250
Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro
    255                 260                 265
Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala
270                 275                 280                 285
Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val
                290                 295                 300
Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asn Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe
            305                 310                 315
Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
        320                 325                 330
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile
    335                 340                 345
Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys
350                 355                 360                 365
Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp
                370                 375                 380
Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn
            385                 390                 395
Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser
        400                 405                 410
Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly
    415                 420                 425
Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
430                 435                 440                 445
```

SEQ ID No.10

長度：714

類型：核酸

股性：雙股

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（179）

拓撲學：直線

分子類型：cDNA至mRNA

假設：無

反意義：無

來源：

生物：Mus肌

細胞類型：融合瘤

細胞株：HFE7A

特徵：

NAME/KEY：CDS

位置：1..714

鑑定方法：相似

NAME/KEY：mat peptide

位置：61..714

鑑定方法：相似

NAME/KEY：sig peptide

位置：1..60

鑑定方法：相似

序列描述：

```
ATG GAG ACA GAC ACA ATC CTG CTA TGG GTG ATG ATG CTC TGG ATT CCA     48
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Met Met Leu Trp Ile Pro
-20                 -15                 -10                 -5
GGC TCC ACT GGT GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT     96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
                 1               5                  10
GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT    144
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
         15                  20                  25
GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA    192
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（180）

```
     30                  35                  40
GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT    240
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 45                  50                  55                  60
GGG ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC    288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                 65                  70                  75
CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT    336
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
             80                  85                  90
CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG    384
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
         95                  100                 105
GAA ATC AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA    432
Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
    110                 115                 120
TCC AGT GAG CAG TTA ACA TCT GGA GGT GCC TCA GTC GTG TGC TTC TTG    480
Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
125                 130                 135                 140
AAC AAC TTC TAC CCC AAA GAC ATC AAT GTC AAG TGG AAG ATT GAT GGC    528
Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
                145                 150                 155
AGT GAA CGA CAA AAT GGC GTC CTG AAC AGT TGG ACT GAT CAG GAC AGC    576
Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
            160                 165                 170
AAA GAC AGC ACC TAC AGC ATG AGC AGC ACC CTC ACG TTG ACC AAG GAC    624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
        175                 180                 185
GAG TAT GAA CGA CAT AAC AGC TAT ACC TGT GAG GCC ACT CAC AAG ACA    672
Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
    190                 195                 200
TCA ACT TCA CCC ATT GTC AAG AGC TTC AAC AGG AAT GAG TGT             714
Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
205                 210                 215
```

SEQ ID No.11

長度：238

類型：胺基酸

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

序列描述：

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）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（181）

```
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Met Met Leu Trp Ile Pro
-20                 -15                 -10                  -5
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
                1                   5                  10
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
           15                  20                  25
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
       30                  35                  40
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
   45                  50                  55                  60
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
               65                  70                  75
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
           80                  85                  90
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
       95                 100                 105
Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
   110                 115                 120
Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
125                 130                 135                 140
Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
               145                 150                 155
Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
           160                 165                 170
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
       175                 180                 185
Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
   190                 195                 200
Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
205                 210                 215
```

SEQ ID No.12

長度：34

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（182）

序列描述：

GGGGAATTCC AGTACGGAGT TGGGGAAGCT CTTT 34

SEQ ID No.13

長度：35

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GTTTCTTCTG CCTCTGTCAC CAAGTTAGAT CTGGA 35

SEQ ID No.14

長度：35

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

TCCAGATCTA ACTTGGTGAC AGAGGCAGAA GAAAC 35

SEQ ID No.15

長度：28

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（83）

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CCCTCTAGAC GCGTCACGTG GGCATCAC 28

SEQ ID No.16

長度：11

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

斷片類型：N-終端

序列描述：

Gln Xaa Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu
1 5 10

SEQ ID No.17

長度：22

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

斷片類型：N-終端

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（184）

序列描述：

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser
20

SEQ ID No.18

長度：19

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GACCTCACCA TGGGATGGA 19

SEQ ID No.19

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

TTTACCAGGA GAGTGGGAGA 20

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（185）

SEQ ID No.20

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

AAGAAGCATC CTCTCATCTA 20

SEQ ID No.21

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

ACACTCATTC CTGTTGAAGC 20

SEQ ID No.22

長度：28

類型：核酸

股性：單股

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（186）

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GGGGAATTCG ACCTCACCAT GGGATGGA 28

SEQ ID No.23

長度：32

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GGGTCTAGAC TATTTACCAG GAGAGTGGGA GA 32

SEQ ID No.24

長度：29

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（187）

序列描述：

GGGGAATTCA AGAAGCATCC TCTCATCTA 29

SEQ ID No.25

長度：37

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GGGGCGGCCG CTTACTAACA CTCATTCCTG TTGAAGC 37

SEQ ID No.26

長度：19

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser
1 5 10 15
Lys Gly Leu

SEQ ID No.27

長度：19

類型：胺基酸

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（188）

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

Val Thr Asp Ile Asn Ser Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr
1 5 10 15
Thr Val Glu

SEQ ID No.28

長度：20

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn Leu Glu Gly
1 5 10 15
Leu His His Asp
20

SEQ ID No.29

長度：20

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

Thr Gln Asn Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys
1 5 10 15
Pro Cys Pro Pro
20

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（189）

SEQ ID No.30

長度：20

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg
1 5 10 15
Asp Cys Thr Val
20

SEQ ID No.31

長度：21

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro Asp
1 5 10 15
Cys Val Pro Cys Gln
20

SEQ ID No.32

長度：20

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（90）

序列描述：

Asn Gly Asp Glu Pro Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr
1 5 10 15
Thr Asp Lys Ala
20

SEQ ID No.33

長度：19

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His Phe Ser Ser Lys Cys Arg
1 5 10 15
Arg Cys Arg

SEQ ID No.34

長度：20

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

His Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His
1 5 10 15
Gly Leu Glu Val
20

SEQ ID No.35

長度：20

類型：胺基酸

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（191）

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

```
Leu Cys Asp Glu Gly His Gly Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg
  1               5                  10                  15
Thr Gln Asn Thr
            20
```

SEQ ID No.36

長度：20

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

```
Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg Cys Lys Pro
  1               5                  10                  15
Asn Phe Phe Cys
            20
```

SEQ ID No.37

長度：20

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

```
Lys Cys Arg Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu
  1               5                  10                  15
His Cys Asp Pro
            20
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（192）

SEQ ID No.38

長度：20

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

```
Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp Pro Cys Thr Lys Cys Glu His
  1               5                  10                  15
Gly Ile Ile Lys
            20
```

SEQ ID No.39

長度：20

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

```
Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr Ser
  1               5                  10                  15
Asn Thr Lys Cys
            20
```

SEQ ID No.40

長度：18

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（19）

序列描述：

Glu Cys Thr Leu Thr Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg
1 5 10 15
Ser Asn

SEQ ID No.41

長度：20

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

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

SEQ ID No.42

長度：10

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

His Gly Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr
1 5 10

SEQ ID No.43

長度：10

類型：胺基酸

股性：單股

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（194）

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

```
Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr
 1               5                  10
```

SEQ ID No.44

長度：10

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

```
Lys Cys Arg Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys
 1               5                  10
```

SEQ ID No.45

長度：14

類型：胺基酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

```
Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
 1               5                  10
```

SEQ ID No.46

長度：10

類型：胺基酸

股性：單股

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（195）

拓撲學：直線

分子類型：胜肽

序列描述：

Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn
1 5 10

SEQ ID No.47

長度：34

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GCGAATTCTG CCTTGACTGA TCAGAGTTTC CTCA 34

SEQ ID No.48

長度：32

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GCTCTAGATG AGGTGAAAGA TGAGCTGGAG GA 32

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（196）

SEQ ID No.49

長度：768

類型：核酸

股性：雙股

拓撲學：直線

分子類型：cDNA至mRNA

假設：無

反意義：無

特徵：

NAME/KEY: CDS

位置：40..753

NAME/KEY: mat peptide

位置：100..753

NAME/KEY: sig peptide

位置：40..99

序列描述：

```
CCCAAGCTTA AGAAGCATCC TCTCATCTAG TTCTCAGAG ATG GAG ACA GAC ACA      54
                                           Met Glu Thr Asp Thr
                                           -20
ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGC TCC ACT GGT GAC    102
Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp
-15                 -10                 -5                  1
ATT GTG CTC ACC CAA TCT CCA GGT ACT TTG TCT CTG TCT CCA GGG GAG    150
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
              5                  10                  15
AGG GCC ACC CTC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT    198
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
          20                  25                  30
GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG GCA CCC AGA    246
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（197）

```
     35                  40                  45
CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTC GAA TCT GGG ATC CCA GAC AGG     294
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 50                  55                  60                  65
TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATC TCT CGT     342
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
                 70                  75                  80
CTG GAG CCG GCG GAT TTT GCA GTC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG     390
Leu Glu Pro Ala Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu
             85                  90                  95
GAT CCT CGG ACG TTC GGT CAA GGC ACC AGG CTG GAA ATC AAA CGG ACT     438
Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr
        100                 105                 110
GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG     486
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
    115                 120                 125
AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC     534
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130                 135                 140                 145
AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT     582
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                150                 155                 160
AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC     630
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            165                 170                 175
AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC     678
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
        180                 185                 190
AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC     726
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    195                 200                 205
ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAGTAAGAAT TCGGG               768
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                 215
```

SEQ ID No.50

長度：238

類型：胺基酸

股性：單股

分子類型：蛋白質

序列描述：

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）
裝
訂
線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（198）

```
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20                 -15                 -10                  -5
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                  1                   5                  10
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
          15                  20                  25
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
      30                  35                  40
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 45                  50                  55                  60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                  65                  70                  75
Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Ala Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
              80                  85                  90
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu
          95                  100                 105
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
     110                 115                 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125                 130                 135                 140
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                  145                 150                 155
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
              160                 165                 170
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
          175                 180                 185
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
     190                 195                 200
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205                 210                 215
```

SEQ ID No.51

長度：768

類型：核酸

股性：雙股

拓撲學：直線

分子類型：cDNA至mRNA

假設：無

反意義：無

特徵：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（199）

NAME/KEY：CDS

位置：40..753

NAME/KEY：mat peptide

位置：100..753

NAME/KEY：sig peptide

位置：40..99

序列描述：

```
CCCAAGCTTA AGAAGCATCC TCTCATCTAG TTCTCAGAG ATG GAG ACA GAC ACA      54
                                          Met Glu Thr Asp Thr
                                          -20
ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGC TCC ACT GGT GAC    102
Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp
-15                 -10                 -5                  1
ATT GTG CTC ACC CAA TCT CCA GGT ACT TTG TCT CTG TCT CCA GGG GAG    150
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
             5                  10                  15
AGG GCC ACC CTC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT    198
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
         20                  25                  30
GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG GCA CCC AGA    246
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
     35                  40                  45
CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTC GAA TCT GGG ATC CCA GAC AGG    294
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 50                  55                  60                  65
TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATC CAT CCT    342
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His Pro
                 70                  75                  80
GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG    390
Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu
             85                  90                  95
GAT CCT CGG ACG TTC GGT CAA GGC ACC AGG CTG GAA ATC AAA CGG ACT    438
Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr
         100                 105                 110
GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG    486
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
     115                 120                 125
AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC    534
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130                 135                 140                 145
```


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）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（200）

```
AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT     582
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                150                 155                 160
AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC     630
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            165                 170                 175
AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC     678
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
        180                 185                 190
AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC     726
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    195                 200                 205
ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAGTAAGAAT TCGGG               768
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                 215
```

SEQ ID No.52

長度：238

類型：胺基酸

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

序列描述：

```
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20                 -15                 -10                  -5
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                  1                   5                  10
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
          15                  20                  25
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
      30                  35                  40
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
  45                  50                  55                  60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                  65                  70                  75
Leu Thr Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
              80                  85                  90
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu
          95                  100                 105
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
      110                 115                 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125                 130                 135                 140
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                  145                 150                 155
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
              160                 165                 170
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（201）

```
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        175                 180                 185
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    190                 195                 200
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205                 210                 215
```

SEQ ID No.53

長度：768

類型：核酸

股性：雙股

拓撲學：直線

分子類型：cDNA至mRNA

假設：無

反意義：無

特徵：

NAME/KEY: CDS

位置：40..753

NAME/KEY: mat peptide

位置：100..753

NAME/KEY: sig peptide

位置：40..99

序列描述：

```
CCCAAGCTTA AGAAGCATCC TCTCATCTAG TTCTCAGAG ATG GAG ACA GAC ACA      54
                                           Met Glu Thr Asp Thr
                                           -20
ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGC TCC ACT GGT GAC    102
Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp
-15                 -10                 -5                  1
ATT GTG CTC ACC CAA TCT CCA GGT ACT TTG TCT CTG TCT CCA GGG GAG    150
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
              5                  10                  15
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（202）

```
AGG GCC ACC CTC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT     198
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
          20                  25                  30
GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA     246
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
      35                  40                  45
CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTC GAA TCT GGG ATC CCA GAC AGG     294
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 50                  55                  60                  65
TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATC CAT CCT     342
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His Pro
                 70                  75                  80
GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG     390
Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu
             85                  90                  95
GAT CCT CGG ACG TTC GGT CAA GGC ACC AGG CTG GAA ATC AAA CGG ACT     438
Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr
         100                 105                 110
GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG     486
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
     115                 120                 125
AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC     534
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130                 135                 140                 145
AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT     582
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                150                 155                 160
AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC     630
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            165                 170                 175
AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC     678
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
        180                 185                 190

AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC     726
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    195                 200                 205
ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAGTAAGAAT TCGGG                768
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                 215
```

SEQ ID No.54

長度：238

類型：胺基酸

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）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（207）

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

序列描述：

```
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20                 -15                 -10                  -5
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                  1                   5                  10
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
          15                  20                  25
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
      30                  35                  40
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 45                  50                  55                  60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                 65                  70                  75
Leu Thr Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
             80                  85                  90
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu
          95                 100                 105
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
     110                 115                 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125                 130                 135                 140
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                145                 150                 155
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            160                 165                 170
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        175                 180                 185
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    190                 195                 200
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205                 210                 215
```

SEQ ID No.55

長度：34

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（204）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CCCAAGCTTA AGAAGCATCC TCTCATCTAG TTCT 34

SEQ ID No.56

長度：44

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GAGAGGGTGG CCCTCTCCCC TGGAGACAGA GACAAAGTAC CTGG 44

SEQ ID No.57

長度：44

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CCAGGTACTT TGTCTCTGTC TCCAGGGGAG AGGGCCACCC TCTC 44

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（205）

SEQ ID No.58

長度：44

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GATTCGAGAT TGGATGCAGC ATAGATGAGG AGTCTGGGTG CCTG 44

SEQ ID No.59

長度：45

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GCTGCATCCA ATCTCGAATC TGGGATCCCA GACAGGTTTA GTGGC 45

SEQ ID No.60

長度：52

類型：核酸

股性：單股

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（20b）

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

AAAATCCGCC GGCTCCAGAC GAGAGATGGT GAGGGTGAAG TCTGTCCCAG AC 52

SEQ ID No.61

長度：58

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CTCGTCTGGA GCCGGCGGAT TTTGCAGTCT ATTACTGTCA GCAAAGTAAT GAGGATCC 58

SEQ ID No.62

長度：55

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（207）

序列描述：

TGAAGACAGA TGGTGCAGCC ACAGTCCGTT TGATTTCCAG CCTGGTGCCT TGACC 55

SEQ ID No.63

長度：55

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GGTCAAGGCA CCAGGCTGGA AATCAAACGG ACTGTGGCTG CACCATCTGT CTTCA 55

SEQ ID No.64

長度：45

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CCCGAATTCT TACTAACACT CTCCCCTGTT GAAGCTCTTT GTGAC 45

SEQ ID No.65

長度：55

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（208）

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

TCTGTCCCAG ACCCACTGCC ACTAAACCTG TCTGGGATCC CAGATTCGAG ATTGG 55

SEQ ID No.66

長度：55

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GTTTAGTGGC AGTGGGTCTG GGACAGACTT CACCTCTACC ATCCATCCTG TGGAG 55

SEQ ID No.67

長度：55

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（209）

假設：無

反意義：無

序列描述：

ATGGTGCAGC CACAGTCCGT TTGATTTCCA GCCTGGTGCC TTGACCGAAC GTCCG 55

SEQ ID No.68

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CCCAAGCTTA AGAAGCATCC 20

SEQ ID No.69

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

ATCTATGCTG CATCCAATCT 20

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（210）

SEQ ID No.70

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GTTGTGTGCC TGCTGAATAA 20

SEQ ID No.71

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CCCGAATTCT TACTAACACT 20

SEQ ID No.72

長度：20

類型：核酸

股性：單股

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（211）

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

TTATTCAGCA GGCACACAAC 20

SEQ ID No.73

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

AGATTGGATG CAGCATAGAT 20

SEQ ID No.74

長度：457

類型：核酸

股性：雙股

拓撲學：直線

分子類型：cDNA至mRNA

假設：無

反意義：無

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（21）

特徵：

NAME/KEY: CDS

位置：21..455

NAME/KEY: mat_peptide

位置：78..455

NAME/KEY: sig_peptide

位置：21..77

序列描述：

```
AAGCTTGGCT TGACCTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG        50
                      Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu
                      -19             -15                 -10
GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCT CAG GTC CAA CTG GTG CAG TCT       98
Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser
                  -5                  1               5
GGG GCT GAG GTC AAG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG      146
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
         10                  15                  20
GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAG TGG GTA AAA CAG      194
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln
     25                  30                  35
GCC CCT GGA CAG AGG CTT GAG TGG ATG GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAT      242
Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp
 40                  45                  50                  55
AGC TAT ACT AAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT      290
Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
                 60                  65                  70
GTA GAC ACA TCC GCT AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC CTG AGA      338
Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
             75                  80                  85
TCT GAG GAC ACG GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA AAT AGG GAC TAT AGT      386
Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser
         90                  95                 100
AAC AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GAA GGG ACC CTG GTC ACC GTC      434
Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val
     105                 110                 115
TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CC                                      457
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
120                 125
```


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）
裝
訂
線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（213）

SEQ ID No.75

長度：145

類型：胺基酸

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

序列描述：

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-19             -15                 -10                 -5
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                1                   5                   10
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
     15                  20                  25
Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
 30                  35                  40                  45
Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
                50                  55                  60
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser
            65                  70                  75
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
        80                  85                  90
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp
     95                  100                 105
Val Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
110                 115                 120                 125
Gly
```

SEQ ID No.76

長度：40

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（214）

序列描述：

GGGAAGCTTG GCTTGACCTC ACCATGGGAT GGAGCTGTAT 40

SEQ ID No.77

長度：48

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

TGAAGCCCCA GGCTTCTTGA CCTCAGCCCC AGACTGCACC AGTTGGAC 48

SEQ ID No.78

長度：36

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

TCCACTCAAG CCTCTGTCCA GGGGCCTGTT TTACCC 36

SEQ ID No.79

長度：52

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（>15）

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GTCTGGGGCT GAGGTCAAGA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCCTGCA AG 52

SEQ ID No.80

長度：39

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CAGGCCCCTG GACAGAGGCT TGAGTGGATG GGAGAGATT 39

SEQ ID No.81

長度：50

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（16）

假設：無

反意義：無

序列描述：

TCAGATCTCA GGCTGCTGAG CTCCATGTAG GCTGTGCTAG CGGATGTGTC 50

SEQ ID No.82

長度：44

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

TGGAGCTCAG CAGCCTGAGA TCTGAGGACA CGGCGGTCTA TTAC 44

SEQ ID No.83

長度：55

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GATGGGCCCT TGGTGGAGGC TGAGGAGACG GTGACCAGGG TCCCTTCGCC CCAGT 55

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（17）

SEQ ID No.84

長度：39

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GGGAAGCTTC CGCGGTCACA TGGCACCACC TCTCTTGCA 39

SEQ ID No.85

長度：35

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GCTCTGCAGA GAGAAGATTG GGAGTTACTG GAATC 35

SEQ ID No.86

長度：35

類型：核酸

股性：單股

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（18）

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

TCTCTGCAGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCAC 35

SEQ ID No.87

長度：39

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GGGGAATTCG GGAGCGGGGC TTGCCGGCCG TCGCACTCA 39

SEQ ID No.88

長度：2077

類型：核酸

股性：雙股

拓撲學：直線

分子類型：DNA(基因組)

假設：無

反意義：無

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（>19）

特徵：

NAME/KEY: sig_peptide

位置：27..83

NAME/KEY: intron

位置：741..1131

NAME/KEY: intron

位置：1177..1294

NAME/KEY: intron

位置：1625..1721

NAME/KEY: exon

位置：27..740

NAME/KEY: exon

位置：1132..1176

NAME/KEY: exon

位置：1295..1624

NAME/KEY: exon

位置：1722..2077

NAME/KEY: mat_peptide

位置：join(84..740, 1132..1176, 1295..1624,
1722..2042)

NAME/KEY: CDS

位置：join(27..740, 1132..1176, 1295..1624,
1722..2042)

序列描述：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

A7
B7

五、發明說明（222）

```
GGGCGAAAGC TTGGCTTGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC     53
                             Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe
                            -19             -15
TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCT CAG GTC CAA CTG GTG CAG     101
Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln
-10                  -5                  1                   5
TCT GGG GCT GAG GTC AAG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC     149
Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys
            10                  15                  20
AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAG TGG GTA AAA     197
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys
        25                  30                  35
CAG GCC CCT GGA CAG AGG CTT GAG TGG ATG GGA GAG ATT GAT CCT TCT     245
Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser
    40                  45                  50
GAT AGC TAT ACT AAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG     293
Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
55                  60                  65                  70
ACT GTA GAC ACA TCC GCT AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC CTG     341
Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
                75                  80                  85
AGA TCT GAG GAC ACG GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA AAT AGG GAC TAT     389
Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr
            90                  95                  100
AGT AAC AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GAA GGG ACC CTG GTC ACC     437
Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr
        105                 110                 115
GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC     485
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
    120                 125                 130
TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC     533
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
135                 140                 145                 150
AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC     581
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
                155                 160                 165
CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA     629
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
            170                 175                 180
CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC     677
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
        185                 190                 195
```


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）
裝
訂
線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 111 ）

```
ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG     725
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
    200                 205                 210
GTG GAC AAG AGA GTT GGTGAGAGGC CAGCACAGGG AGGGAGGGTG TCTGCTGGAA    780
Val Asp Lys Arg Val
215
GCCAGGCTCA GCGCTCCTGC CTGGACGCAT CCCGGCTATG CAGTCCCAGT CCAGGGCAGC  840
AAGGCAGGCC CCGTCTGCCT CTTCACCCGG AGGCCTCTGC CCGCCCCACT CATGCTCAGG  900
GAGAGGGTCT TCTGGCTTTT TCCCCAGGCT CTGGGCAGGC ACAGGCTAGG TGCCCCTAAC  960
CCAGGCCCTG CACACAAAGG GGCAGGTGCT GGGCTCAGAC CTGCCAAGAG CCATATCCGG 1020
GAGGACCCTG CCCCTGACCT AAGCCCACCC CAAAGGCCAA ACTCTCCACT CCCTCAGCTC 1080
GGACACCTTC TCTCCTCCCA GATTCCAGTA ACTCCCAATC TTCTCTCTGC A GAG CCC  1137
                                                        Glu Pro
                                                        220
AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAGCCAG     1186
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            225                 230
CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG 1246
GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCCTCA GCA CCT GAA  1303
                                                    Ala Pro Glu
                                                    235
CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC   1351
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        240                 245                 250
ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC   1399
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    255                 260                 265
GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC   1447
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
270                 275                 280                 285
GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC   1495
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                290                 295                 300
AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG   1543
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            305                 310                 315
CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA   1591
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        320                 325                 330
GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG 1644
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
    335                 340
AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC 1704
CAACCTCTGT CCCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG    1754
                    Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                    345                 350                 355
CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC   1802
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
                360                 365                 370
CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC   1850
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
            375                 380                 385
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ㄍㄍㄍ）

```
AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC   1898
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
        390                 395                 400
TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC   1946
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
    405                 410                 415
AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT   1994
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420                 425                 430                 435
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA   2042
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                440                 445                 450
TGAGTGCGAC GGCCGGCAAG CCCCGCTCCC GAATT                         2077
```

SEQ ID No.89

長度：470

類型：胺基酸

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

序列描述：

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-19                 -15                 -10                  -5
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                 1                   5                  10
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
     15 .                20                  25
Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
 30                  35                  40                  45
Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
                50                  55                  60
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser
            65                  70                  75
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
        80                  85                  90
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp
    95                  100                 105
Val Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
110                 115                 120                 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
                130                 135                 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
            145                 150                 155
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
        160                 165                 170
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
    175                 180                 185
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（224）

```
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
190                 195                 200                 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
                210                 215                 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
            225                 230                 235
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        240                 245                 250
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    255                 260                 265
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
270                 275                 280                 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                290                 295                 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            305                 310                 315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        320                 325                 330
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    335                 340                 345
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
350                 355                 360                 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                370                 375                 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            385                 390                 395
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        400                 405                 410
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    415                 420                 425
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
430                 435                 440                 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                450
```

SEQ ID No.90

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（224）

反意義：無

序列描述：

ACAGCCGGGA AGGTGTGCAC 20

SEQ ID No.91

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

AGACACCCTC CCTCCCTGTG 20

SEQ ID No.92

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GTGCAGGGCC TGGGTTAGGG 20

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（24）

SEQ ID No.93

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GCACGGTGGG CATGTGTGAG 20

SEQ ID No.94

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GTTTTGGGGG GAAGAGGAAG 20

SEQ ID No.95

長度：20

類型：核酸

股性：單股

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（26）

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CCAGTCCTGG TGCAGGACGG 20

SEQ ID No.96

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CCTGTGGTTC TCGGGGCTGC 20

SEQ ID No.97

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（27）

序列描述：

CGTGGTCTTG TAGTTGTTCT 20

SEQ ID No.98

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC 20

SEQ ID No.99

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

CCGTCCTGCA CCAGGACTGG 20

SEQ ID No.100

長度：20

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（228）

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GCAGCCCCGA GAACCACAGG 20

SEQ ID No.101

長度：20

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

AGAACAACTA CAAGACCACG 20

SEQ ID No.102

長度：19

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（229）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GCCTGACATC TGAGGACTC 19

SEQ ID No.103

長度：19

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GAGTCCTCAG ATGTCAGGC 19

SEQ ID No.104

長度：34

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GAGCAGTACT CGTTGCTGCC GCGCGCGCCA CCAG 34

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（200）

SEQ ID No.105

長度：24

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸（合成DNA）

假設：無

反意義：無

序列描述：

GGTATGGCTG ATTAATGATC AATG 24

SEQ ID No.106

長度：768個鹼基配對

類型：核酸

股性：雙股

拓撲學：直線

分子類型：cDNA至mRNA

假設：無

反意義：無

特徵：

NAME/KEY: CDS

位置：40..753

NAME/KEY: mat_peptide

NAME/KEY: sig_peptide

位置：40..99

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

A7
B7

五、發明說明（211）

序列描述：

```
CCCAAGCTTA AGAAGCATCC TCTCATCTAG TTCTCAGAG ATG GAG ACA GAC ACA          54
                                           Met Glu Thr Asp Thr
                                           -20

ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGC TCC ACT GGT GAG        102
Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Glu
-15                 -10                 -5                   1

ATT GTG CTC ACC CAA TCT CCA GGT ACT TTG TCT CTG TCT CCA GGG GAG        150
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
              5                  10                  15

AGG GCC ACC CTC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT        198

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
          20                  25                  30

GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG GCA CCC AGA        246
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
      35                  40                  45

CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTC GAA TCT GGG ATC CCA GAC AGG        294
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 50                  55                  60                  65

TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATC TCT CGT        342
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
                 70                  75                  80

CTG GAG CCG GAG GAT TTT GCA GTC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG        390
Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu
             85                  90                  95

GAT CCT CGG ACG TTC GGT CAA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG ACT        438
Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
         100                 105                 110

GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG        486
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
     115                 120                 125

AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC        534
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130                 135                 140                 145

AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT        582
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                150                 155                 160
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（222）

```
AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC        630
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            165                 170                 175

AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC        678
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
        180                 185                 190

AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC        726
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    195                 200                 205

ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAGTAAGAAT TCGGG                   768
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                 215
```

SEQ ID No.107

長度：238個胺基酸

類型：胺基酸

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

序列描述：

```
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20                 -15                 -10                 -5

Gly Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                  1                   5                  10

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
          15                  20                  25

Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
      30                  35                  40

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
  45                  50                  55                  60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                  65                  70                  75

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
              80                  85                  90

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
          95                  100                 105
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ㄍㄍ）

```
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    110                 115                 120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125                 130                 135                 140

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                145                 150                 155

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            160                 165                 170

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        175                 180                 185

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    190                 195                 200

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205                 210                 215
```

SEQ ID No.108

長度：768個鹼基配對

類型：核酸

股性：雙股

拓撲學：直線

分子類型：cDNA至mRNA

假設：無

反意義：無

特徵：

NAME/KEY: CDS

位置：40..753

NAME/KEY: mat_peptide

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（24）

位置：100..753

NAME/KEY：sig_peptide

位置：40..99

序列描述：

```
CCCAAGCTTA AGAAGCATCC TCTCATCTAG TTCTCAGAG ATG GAG ACA GAC ACA          54
                                           Met Glu Thr Asp Thr
                                           -20

ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGC TCC ACT GGT GAG         102
Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Glu
-15                 -10                 -5                  1

ATT GTG CTC ACC CAA TCT CCA GGT ACT TTG TCT CTG TCT CCA GGG GAG         150
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
              5                  10                  15

AGG GCC ACC CTC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT         198
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
          20                  25                  30

GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG GCA CCC AGA         246
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
      35                  40                  45

CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTC GAA TCT GGG ATC CCA GAC AGG         294
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 50                  55                  60                  65

TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATC CAT CCT         342
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His Pro
                 70                  75                  80

GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG         390
Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu
             85                  90                  95

GAT CCT CGG ACG TTC GGT CAA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG ACT         438
Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
         100                 105                 110

GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG         486
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
     115                 120                 125
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（335）

```
AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC        534
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130                 135                 140                 145

AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT        582
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                150                 155                 160

AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC        630
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            165                 170                 175

AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC        678
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
        180                 185                 190

AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC        726
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    195                 200                 205

ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAGTAAGAAT TCGGG                   768
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                 215
```

SEQ ID No.109

長度：238個胺基酸

類型：胺基酸

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

序列描述：

```
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20                 -15                 -10                  -5

Gly Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                  1                   5                  10

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
          15                  20                  25

Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
      30                  35                  40

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 45                  50                  55                  60
```


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）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（22b）

```
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                  65                  70                  75

Leu Thr Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
             80                  85                  90

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
         95                 100                 105

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    110                 115                 120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125                 130                 135                 140

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                145                 150                 155

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            160                 165                 170

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        175                 180                 185

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    190                 195                 200

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205                 210                 215
```

SEQ ID No.110

長度：29個鹼基配對

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

序列描述：

GGTGAGATTG TGCTCACCCA ATCTCCAGG 29

（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
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（227）

SEQ ID No.111

長度：29個鹼基配對

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

序列描述：

CCTGGAGATT GGGTGAGCAC AATCTCACC 29

SEQ ID No.112

長度：31個鹼基配對

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

序列描述：

CCATCTCTCG TCTGGAGCCG GAGGATTTTG C 31

SEQ ID No.113

長度：31個鹼基配對

類型：核酸

股性：單股

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（118）

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

序列描述：

GCAAAATCCT CCGGCTCCAG ACGAGAGATG G 31

SEQ ID No.114

長度：31個鹼基配對

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

序列描述：

CAAGGCACCA AGCTGGAAAT CAAACGGACT G 31

SEQ ID No.115

長度：31個鹼基配對

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

（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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（239）

序列描述：

CAGTCCGTTT GATTTCCAGC TTGGTGCCTT G 31

SEQ ID No.116

長度：2071個鹼基配對

類型：核酸

股性：雙股

拓撲學：直線

分子類型：DNA(基因組)

假設：無

反意義：無

特徵：

NAME/KEY: sig_peptide

位置：21..77

NAME/KEY: intron

位置：741..1131

NAME/KEY: intron

位置：1177..1294

NAME/KEY: intron

位置：1619..1715

NAME/KEY: exon

位置：21..734

NAME/KEY: exon

位置：1126..1170

NAME/KEY: exon

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（40）

位置：1289..1618

NAME/KEY：exon

位置：1716..2071

NAME/KEY：mat_peptide

位置：join(78..734, 1126..1170, 1289..1618,
1716..2036)

NAME/KEY：CDS

位置：join(21..734, 1126..1170, 1289..1618,
1716..2036)

序列描述：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（241）

```
AAGCTTGGCT TGACCTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG          50
                      Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu
                      -19             -15                 -10

GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCT CAG GTC CAA CTG GTG CAG TCT         98
Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser
                  -5                  1               5

GGG GCT GAG GTC AAG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG        146
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
          10                  15                  20

GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAG TGG GTA AAA CAG        194
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln
      25                  30                  35

GCC CCT GGA CAG GGC CTT GAG TGG ATG GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAT        242
Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp
 40                  45                  50                  55

AGC TAT ACT AAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT        290
Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
                  60                  65                  70

GTA GAC ACA TCC ACT AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC CTG AGA        338
Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
          75                  80                  85

TCT GAG GAC ACG GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA AAT AGG GAC TAT AGT        386
Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser
      90                  95                  100

AAC AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GAA GGG ACC CTG GTC ACC GTC        434
Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val
  105                 110                 115

TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC        482
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
120                 125                 130                 135

TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG        530
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                140                 145                 150

GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG        578
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
            155                 160                 165

ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC        626
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
        170                 175                 180

TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC        674
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    185                 190                 195

CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG        722
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
```

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（242）

```
200                 205                 210                 215

GAC AAG AGA GTT GGTGAGAGGC CAGCACAGGG AGGGAGGGTG TCTGCTGGAA          774
Asp Lys Arg Val

GCCAGGCTCA GCGCTCCTGC CTGGACGCAT CCCGGCTATG CAGTCCCAGT CCAGGGCAGC    834

AAGGCAGGCC CCGTCTGCCT CTTCACCCGG AGGCCTCTGC CCGCCCCACT CATGCTCAGG    894

GAGAGGGTCT TCTGGCTTTT TCCCCAGGCT CTGGGCAGGC ACAGGCTAGG TGCCCCTAAC    954

CCAGGCCCTG CACACAAAGG GGCAGGTGCT GGGCTCAGAC CTGCCAAGAG CCATATCCGG   1014

GAGGACCCTG CCCCTGACCT AAGCCCACCC CAAAGGCCAA ACTCTCCACT CCCTCAGCTC   1074

GGACACCTTC TCTCCTCCCA GATTCCAGTA ACTCCCAATC TTCTCTCTGC A GAG CCC    1131
                                                        Glu Pro
                                                        220

AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAGCCAG      1180
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            225                 230

CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG   1240

GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCCTCA GCA CCT GAA    1297
                                                    Ala Pro Glu
                                                    235

CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC      1345
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        240                 245                 250

ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC      1393
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    255                 260                 265

GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC      1441
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
270                 275                 280                 285

GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC      1489
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                290                 295                 300

AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG      1537
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            305                 310                 315

CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA      1585
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        320                 325                 330

GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG    1638
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
    335                 340
```

（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

A7
B7

```
AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC    1698

CAACCTCTCT CCCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG       1749
                    Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                    345                 350                 355

CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC      1796
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
                360                 365                 370

CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC      1844
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
            375                 380                 385

AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC      1892
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
        390                 395                 400

TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC      1940
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
    405                 410                 415

AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT      1988
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420                 425                 430                 435

CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA      2036
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                440                 445                 450

TGAGTGCGAC GGCCGGCAAG CCCCGCTCCC GAATT                               2071
```

SEQ ID No.117

長度：470個胺基酸

類型：胺基酸

拓撲學：直線

分子類型：蛋白質

序列描述：

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-19                 -15                 -10                  -5

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                1                   5                  10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
     15                  20                  25

Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 30                  35                  40                  45

Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
                50                  55                  60

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
            65                  70                  75
```

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明（244）

```
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
          80                  85                  90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp
      95                 100                 105

Val Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
110                 115                 120                 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
                130                 135                 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
            145                 150                 155

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
          160                 165                 170

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
      175                 180                 185

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
190                 195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
                210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
            225                 230                 235

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
          240                 245                 250

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
      255                 260                 265

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
270                 275                 280                 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                290                 295                 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            305                 310                 315

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
          320                 325                 330

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
      335                 340                 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
350                 355                 360                 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                370                 375                 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
```

（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（245）

```
                385                 390                 395

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        400                 405                 410

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    415                 420                 425

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
430                 435                 440                 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                450
```

SEQ ID No.118

長度：30個鹼基配對

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

序列描述：

CAGGCCCCTG GACAGGGCCT TGAGTGGATG 30

SEQ ID No.119

長度：30個鹼基配對

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（46）

序列描述：

CATCCACTCA AGGCCCTGTC CAGGGGCCTG 30

SEQ ID No.120

長度：39個鹼基配對

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

序列描述：

GCTGAGCTCC ATGTAGGCTG TGCTAGTGGA TGTGTCTAC 39

SEQ ID No.121

長度：33個鹼基配對

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

序列描述：

TGCACGCGTG GCTGTGGAAT GTGTGTCAGT TAG 33

SEQ ID No.122

長度：31個鹼基配對

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（247）

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

序列描述：

TCCGAAGCTT TTAGAGCAGA AGTAACACTT C 31

SEQ ID No.123

長度：36個鹼基配對

類型：核酸

股性：單股

拓撲學：直線

分子類型：其他核酸

假設：無

反意義：無

序列描述：

AAAGCGGCCG CTGCTAGCTT GGCTGTGGAA TGTGTG 36

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：　　）

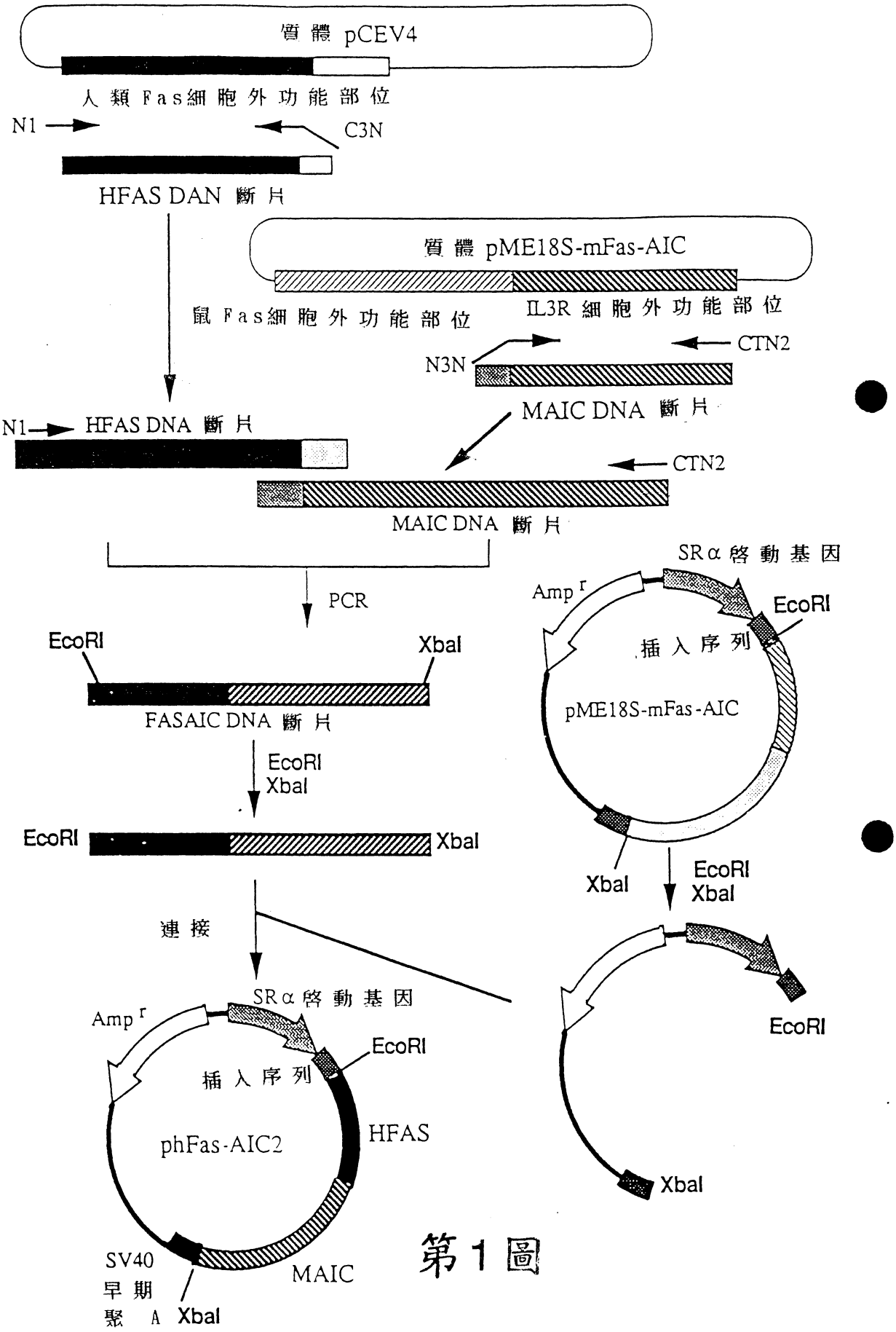
抗 Fas抗體

與鼠和人類Fas交叉反應之抗人類Fas抗體，為有用於治療歸因於Fas／Fas配位體系統異常之狀況。

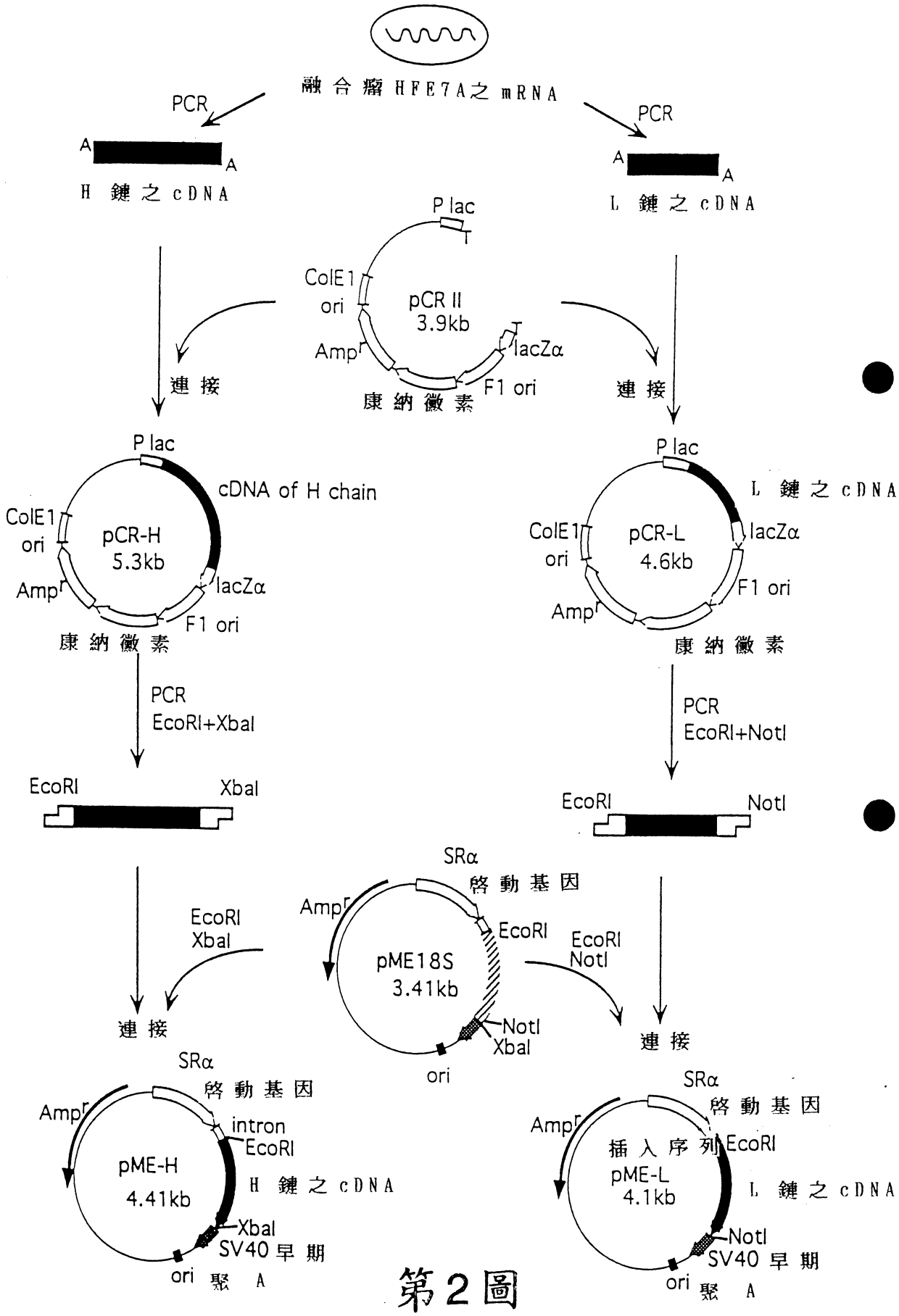
英文發明摘要（發明之名稱：　ANTI-FAS ANTIBODIES　）

Anti-human Fas antibodies which are cross-reactive with mouse and human Fas are useful in the treatment of conditions attributable to abnormalities in the Fas/Fas ligand system.

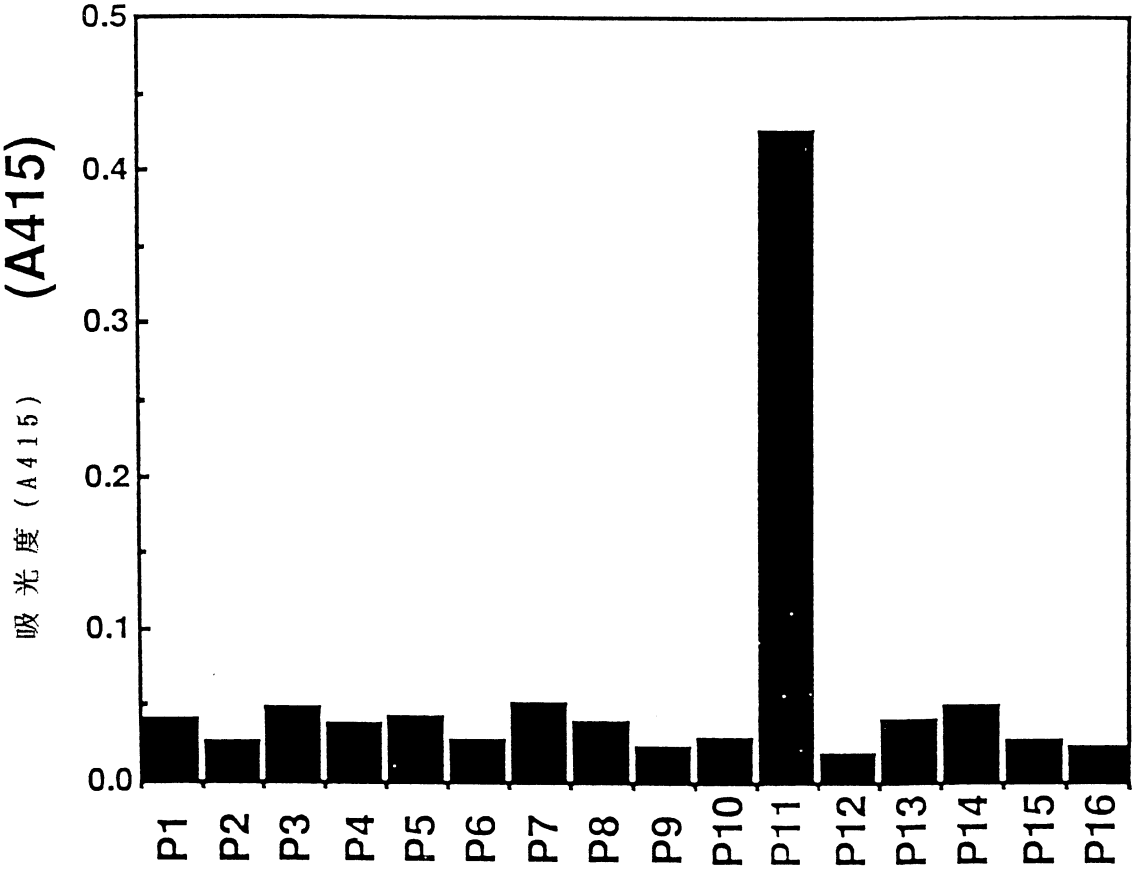
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）


質體 pCEV4
人類Fas細胞外功能部位
N1
C3N
HFAS DAN 斷片
質體 pME18S-mFas-AIC
鼠Fas細胞外功能部位
IL3R 細胞外功能部位
CTN2
N3N
MAIC DNA 斷片
N1
HFAS DNA 斷片
CTN2
MAIC DNA 斷片
PCR
EcoRI
XbaI
FASAIC DNA 斷片
EcoRI
XbaI
EcoRI
XbaI
連接
SRα啓動基因
Amp r
EcoRI
插入序列
phFas-AIC2
HFAS
SV40
早期
聚 A
XbaI
MAIC
SRα啓動基因
Amp r
EcoRI
插入序列
pME18S-mFas-AIC
XbaI
EcoRI
XbaI
EcoRI
XbaI

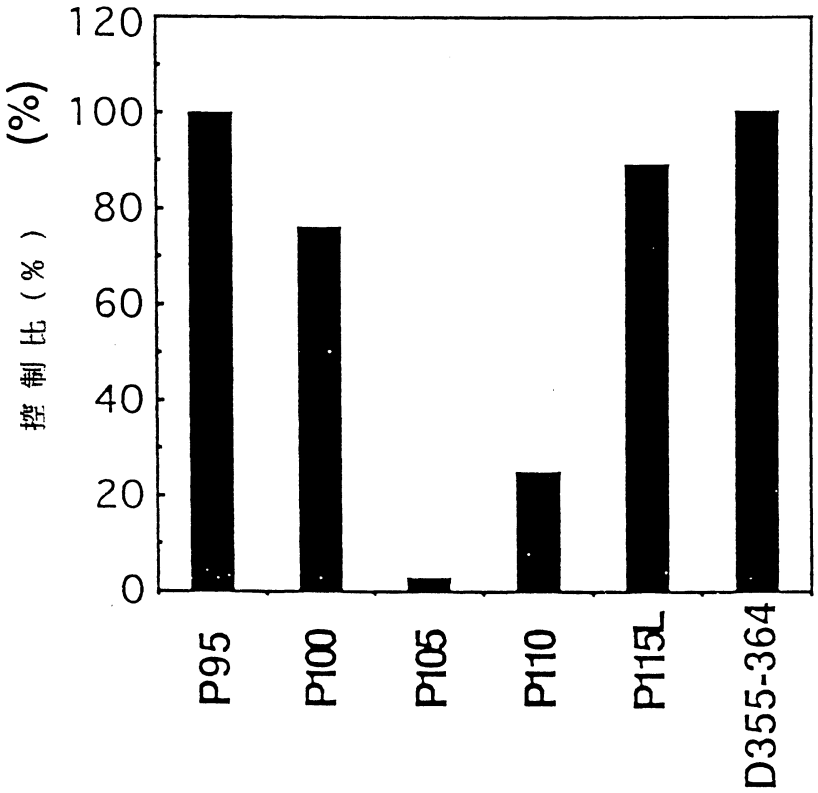
第1圖


融合瘤HFE7A之mRNA
PCR
PCR
A
A
H 鏈之cDNA
A
A
L 鏈之cDNA
P lac
ColE1 ori
pCR II 3.9kb
Amp
lacZα
F1 ori
康納黴素
連接
連接
P lac
cDNA of H chain
ColE1 ori
pCR-H 5.3kb
Amp
lacZα
F1 ori
康納黴素
P lac
L 鏈之cDNA
ColE1 ori
pCR-L 4.6kb
lacZα
F1 ori
Amp
康納黴素
PCR EcoRI+XbaI
PCR EcoRI+NotI
EcoRI
XbaI
EcoRI
NotI
SRα
啓動基因
Amp
EcoRI
pME18S 3.41kb
NotI
XbaI
ori
EcoRI XbaI
EcoRI NotI
連接
連接
SRα
啓動基因
Amp
intron
EcoRI
pME-H 4.41kb
H 鏈之cDNA
XbaI
SV40早期
ori
聚 A
SRα
啓動基因
Amp
插入序列
EcoRI
pME-L 4.1kb
L 鏈之cDNA
NotI
SV40早期
ori
聚 A

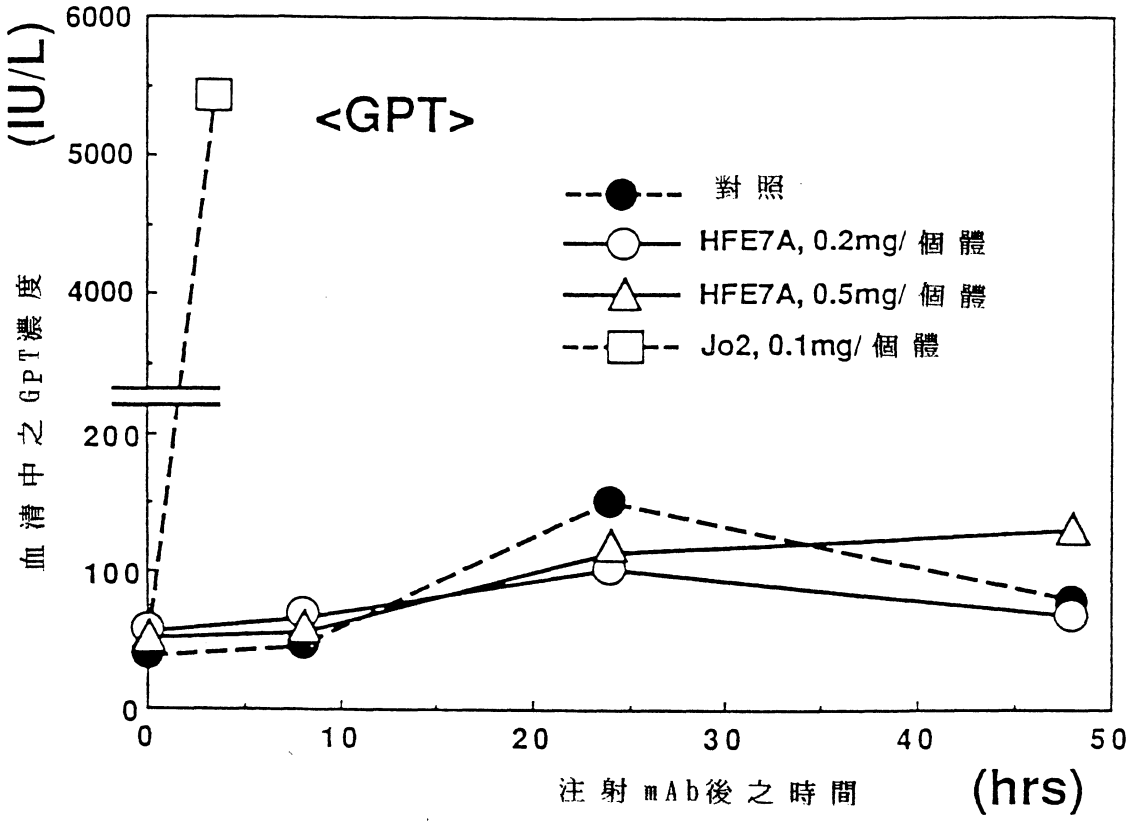
第2圖

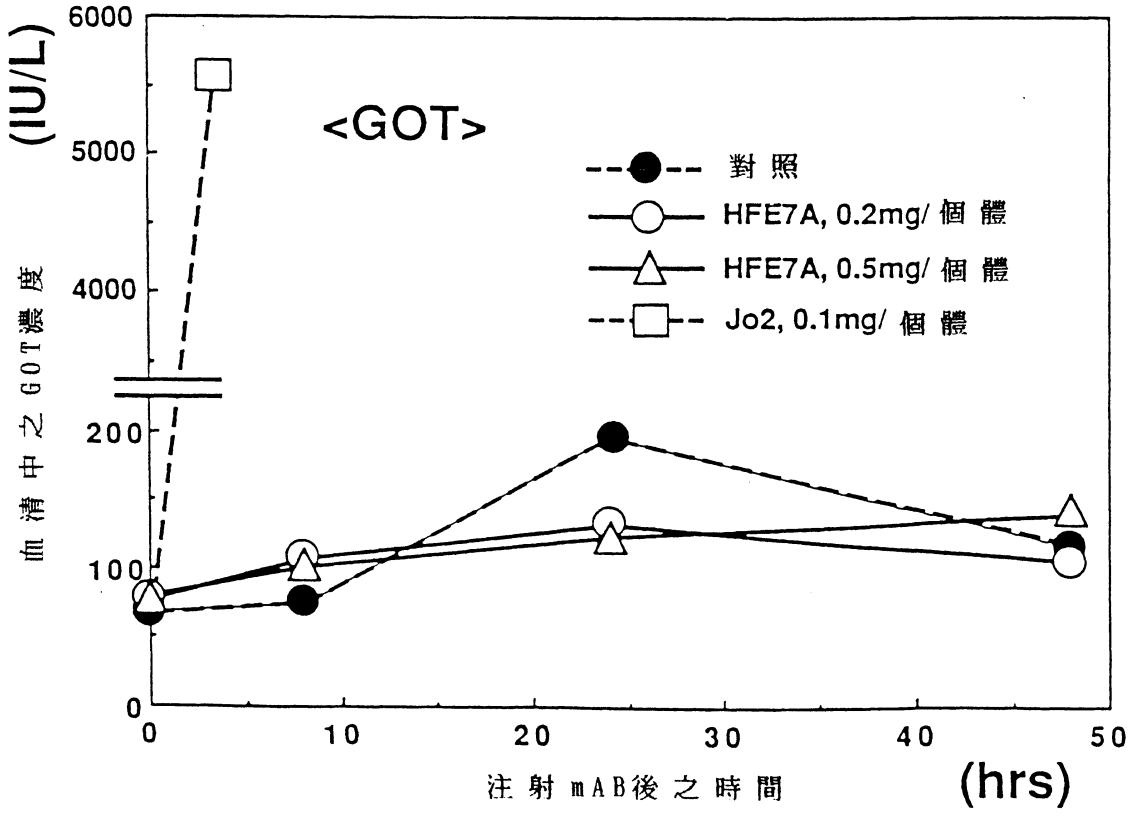

(A415)
吸光度（A415）
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
P1
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
P9
P10
P11
P12
P13
P14
P15
P16

第3圖

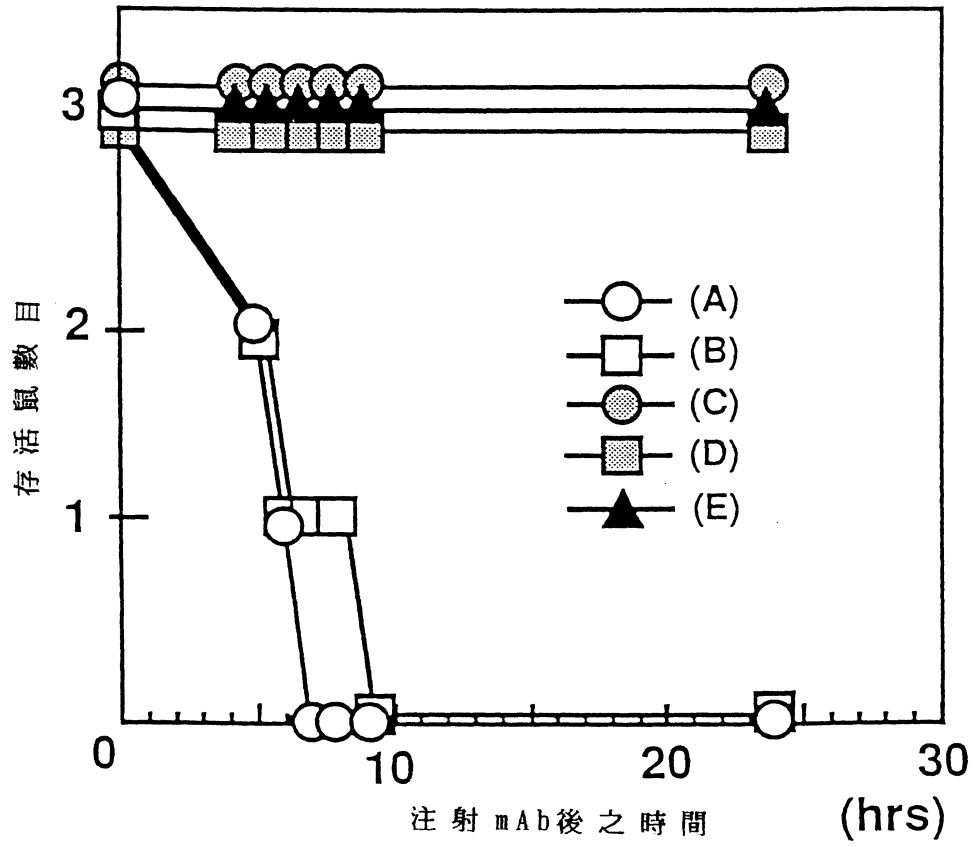


第4圖

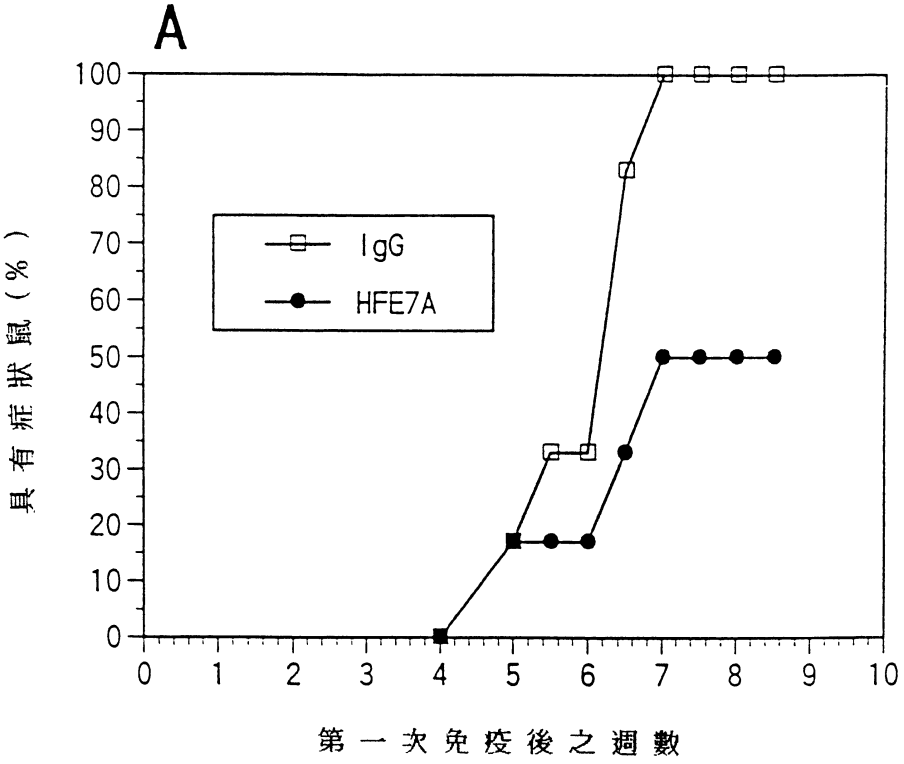

6000
5000
4000
200
100
0
(IU/L)
血清中之GPT濃度
<GPT>
對照
HFE7A, 0.2mg/個體
HFE7A, 0.5mg/個體
Jo2, 0.1mg/個體
0
10
20
30
40
50
注射mAb後之時間
(hrs)

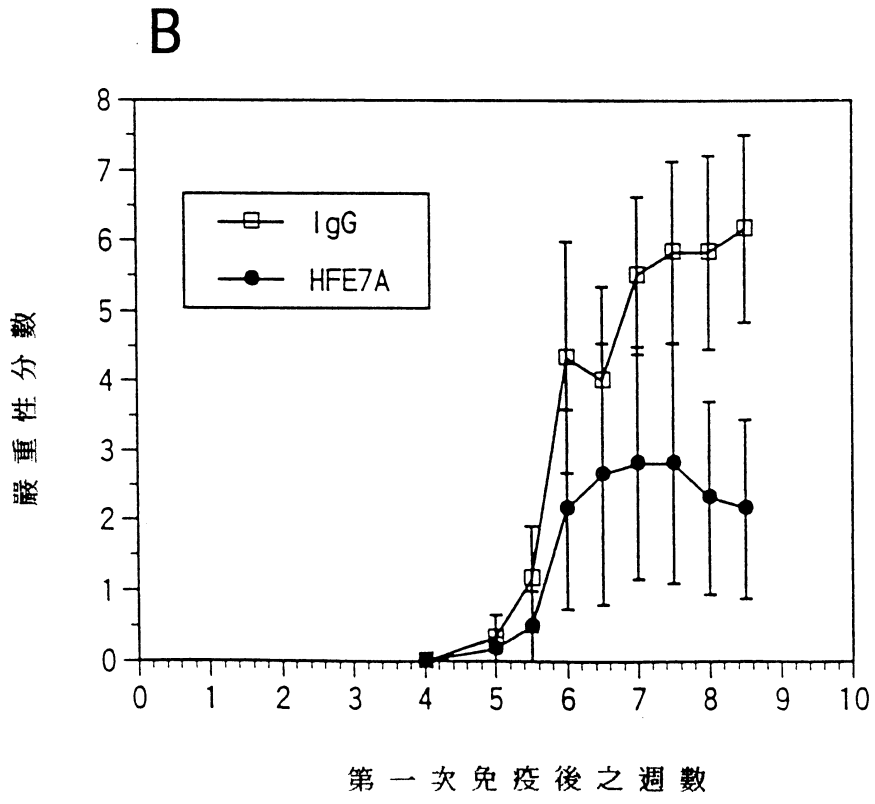

6000
5000
4000
200
100
0
(IU/L)
血清中之GOT濃度
<GOT>
對照
HFE7A, 0.2mg/個體
HFE7A, 0.5mg/個體
Jo2, 0.1mg/個體
0
10
20
30
40
50
注射mAB後之時間
(hrs)

第5圖

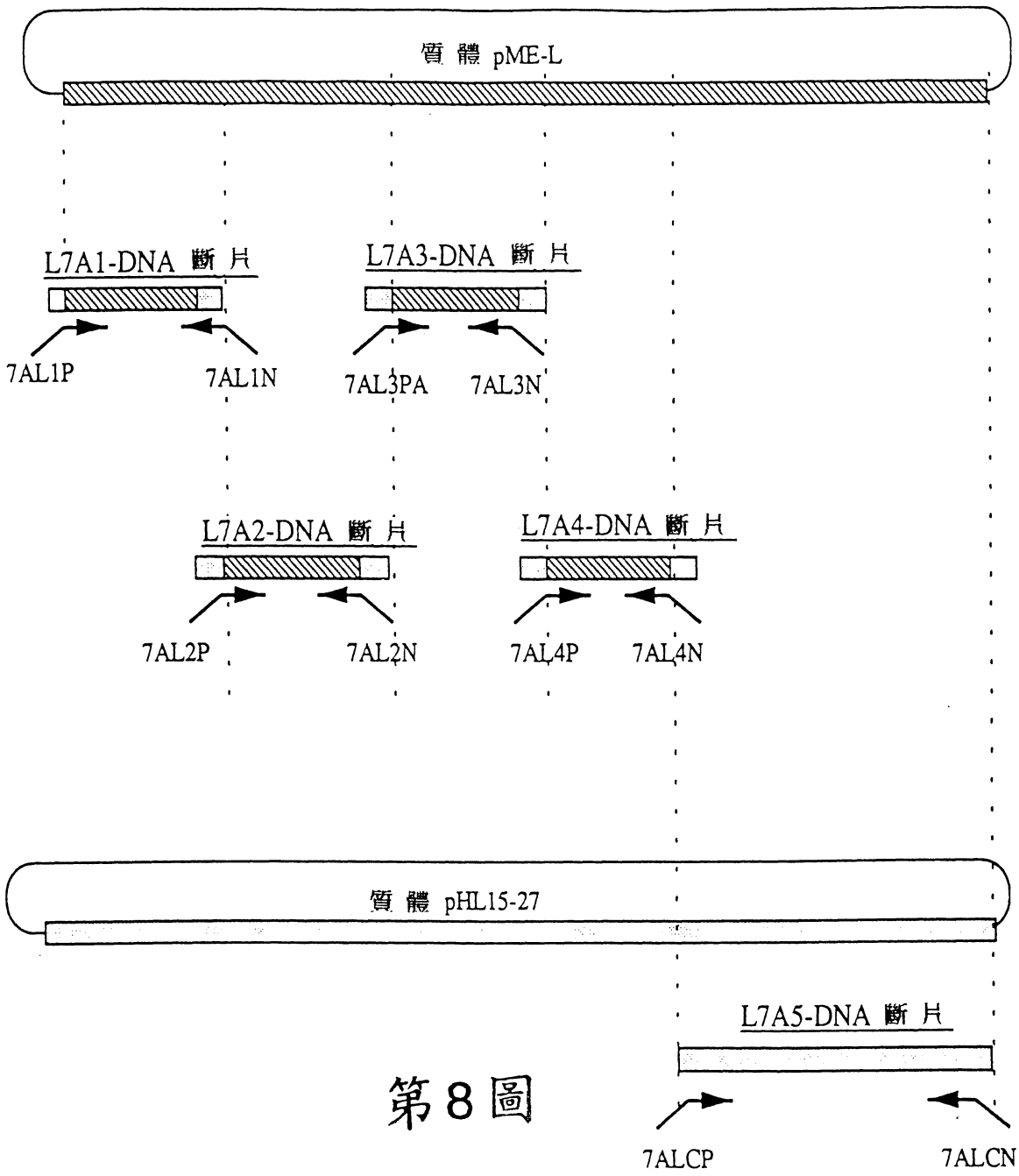


第6圖

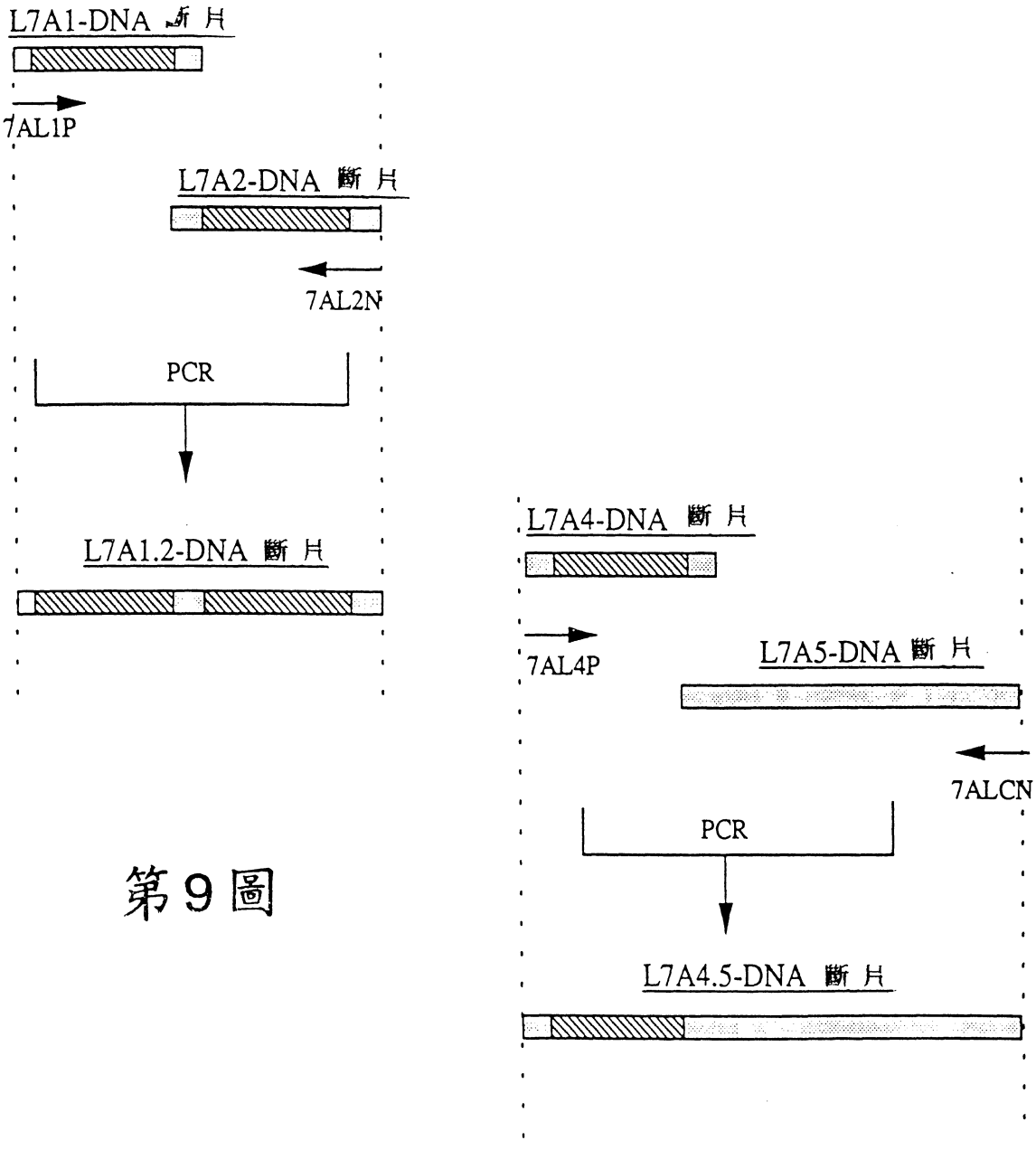

A
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
IgG
HFE7A
具有症狀鼠(%)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
第一次免疫後之週數


B
8
7
6
5
4
3
2
1
0
IgG
HFE7A
嚴重性分數
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
第一次免疫後之週數

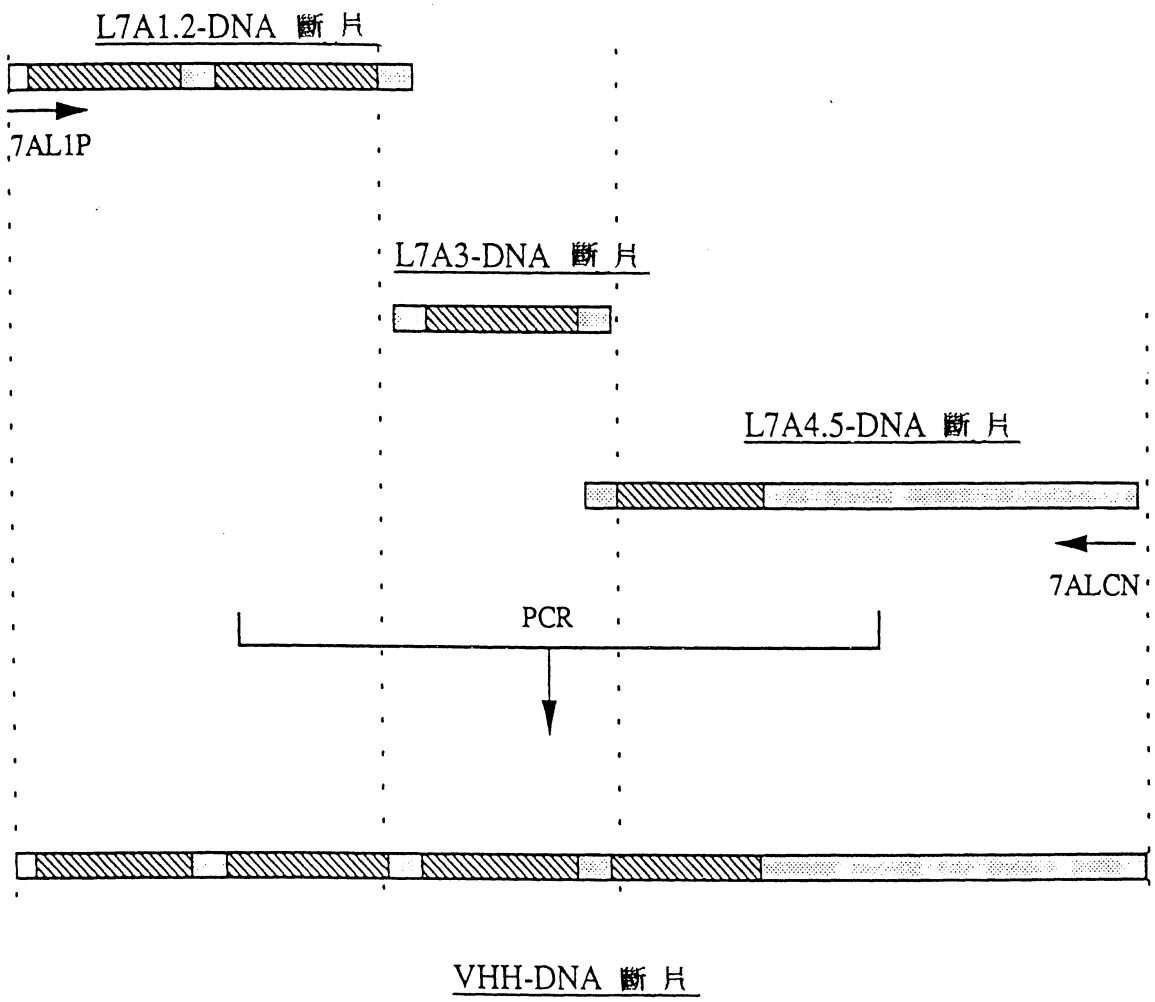
第7圖


質體 pME-L
L7A1-DNA 斷片
7AL1P
7AL1N
L7A3-DNA 斷片
7AL3PA
7AL3N
L7A2-DNA 斷片
7AL2P
7AL2N
L7A4-DNA 斷片
7AL4P
7AL4N
質體 pHL15-27
L7A5-DNA 斷片
7ALCP
7ALCN

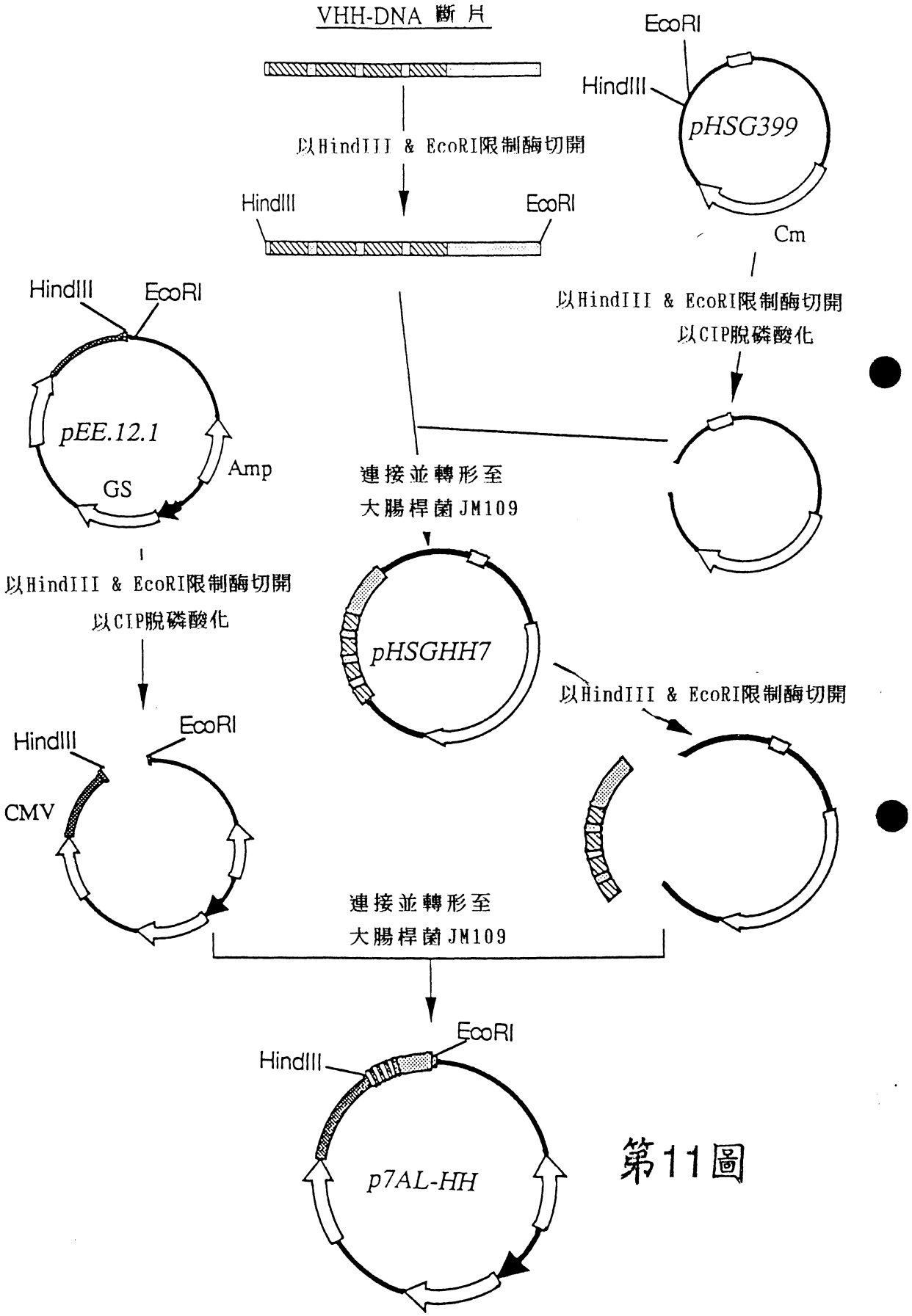
第8圖


L7A1-DNA 斷 片
7AL1P
L7A2-DNA 斷 片
7AL2N
PCR
L7A1.2-DNA 斷 片
L7A4-DNA 斷 片
7AL4P
L7A5-DNA 斷 片
7ALCN
PCR
L7A4.5-DNA 斷 片

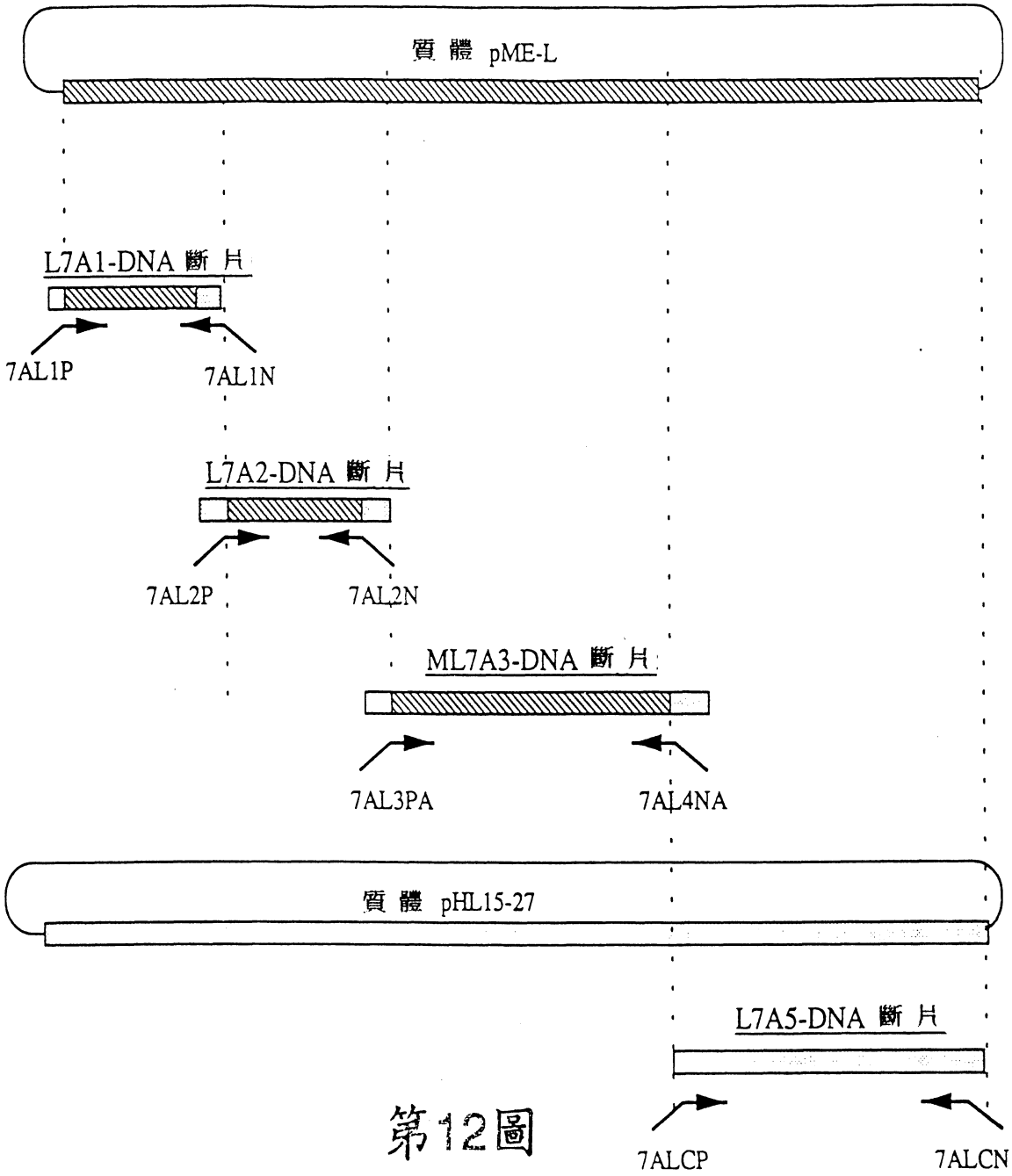
第9圖


L7A1.2-DNA 斷片
7AL1P
L7A3-DNA 斷片
L7A4.5-DNA 斷片
7ALCN
PCR
VHH-DNA 斷片

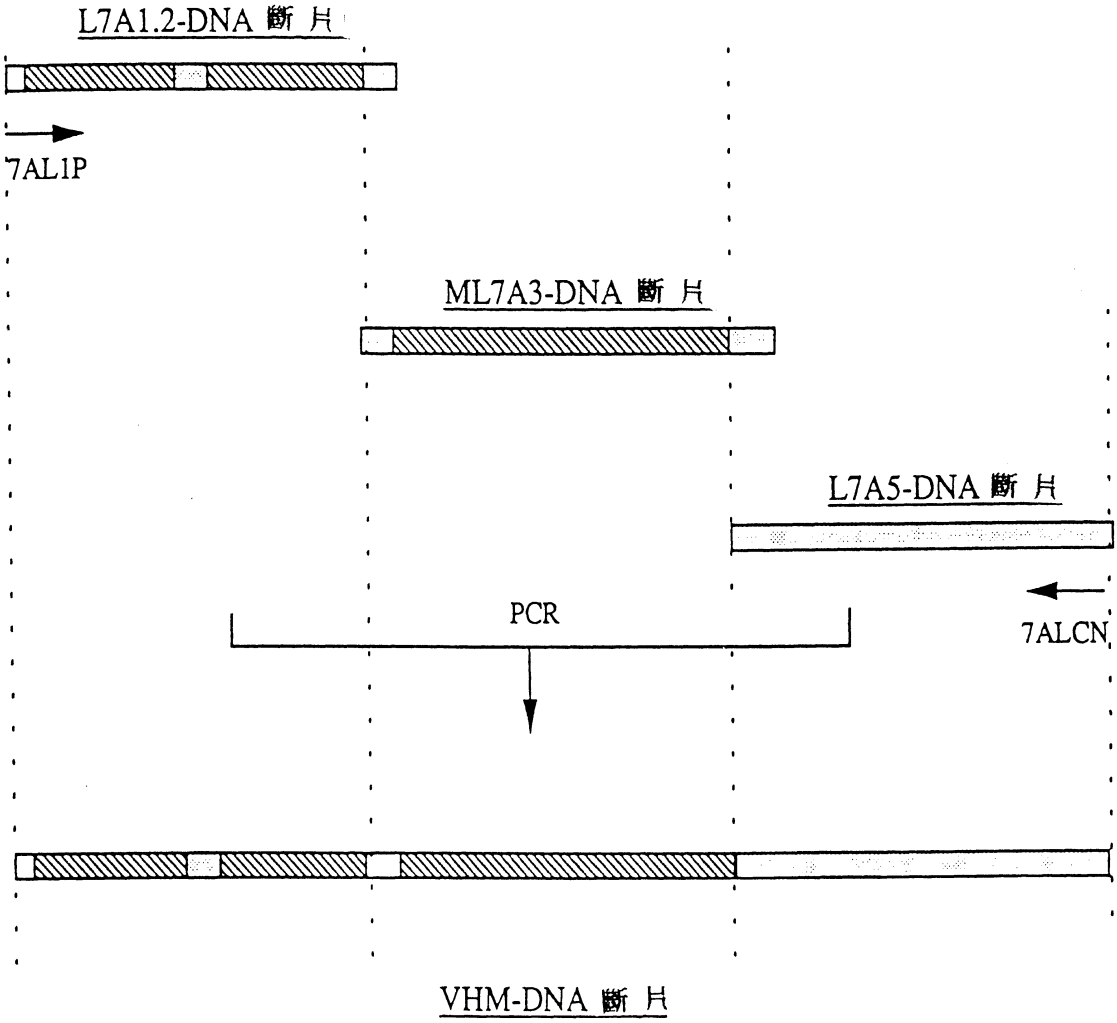
第10圖


VHH-DNA 斷片
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
EcoRI
EcoRI
HindIII
pHSG399
Cm
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以CIP脫磷酸化
HindIII
EcoRI
pEE.12.1
Amp
GS
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以CIP脫磷酸化
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
pHSGHH7
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
EcoRI
CMV
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
EcoRI
HindIII
p7AL-HH

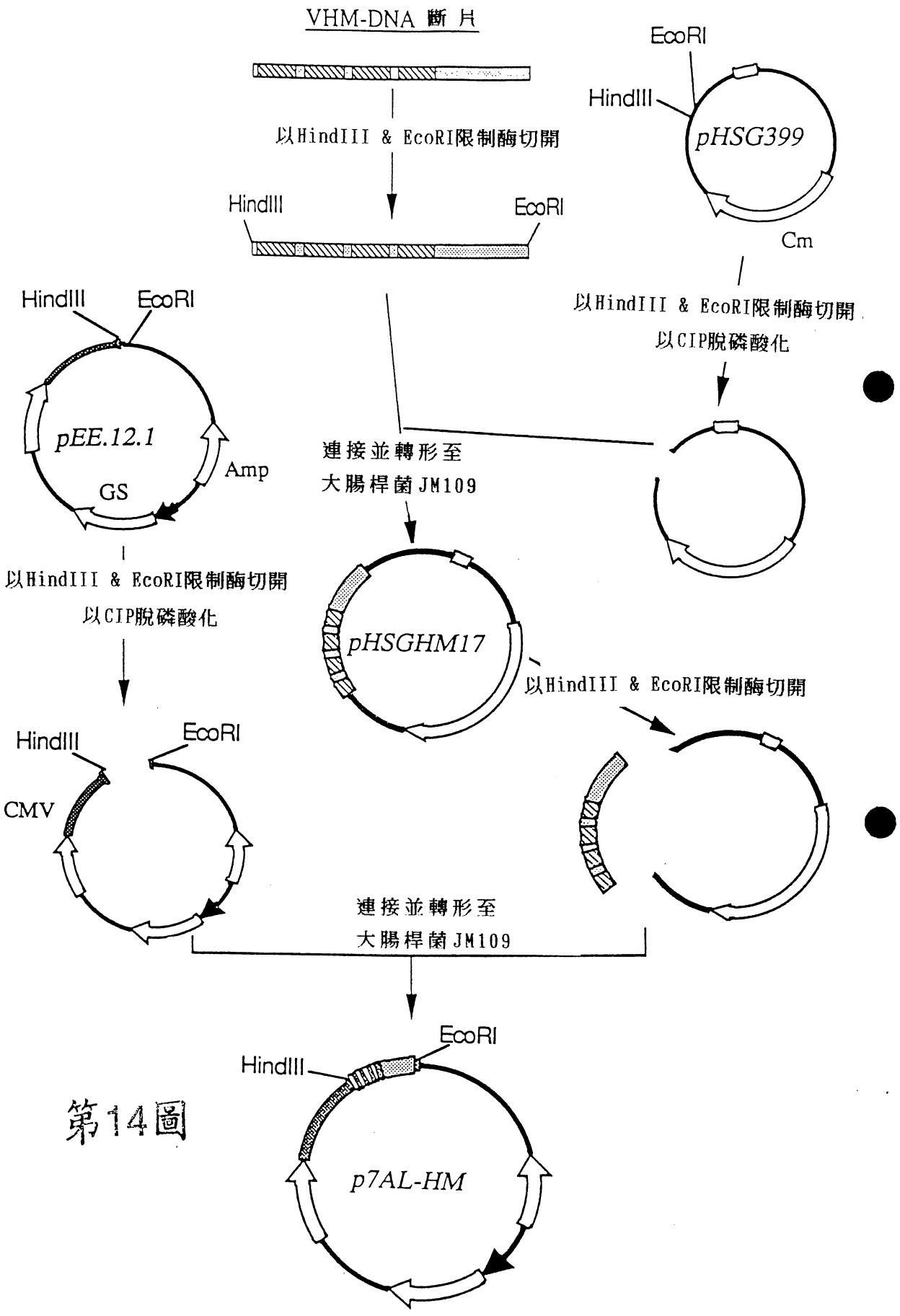
第11圖


質體 pME-L
L7A1-DNA 斷片
7AL1P
7AL1N
L7A2-DNA 斷片
7AL2P
7AL2N
ML7A3-DNA 斷片
7AL3PA
7AL4NA
質體 pHL15-27
L7A5-DNA 斷片
7ALCP
7ALCN

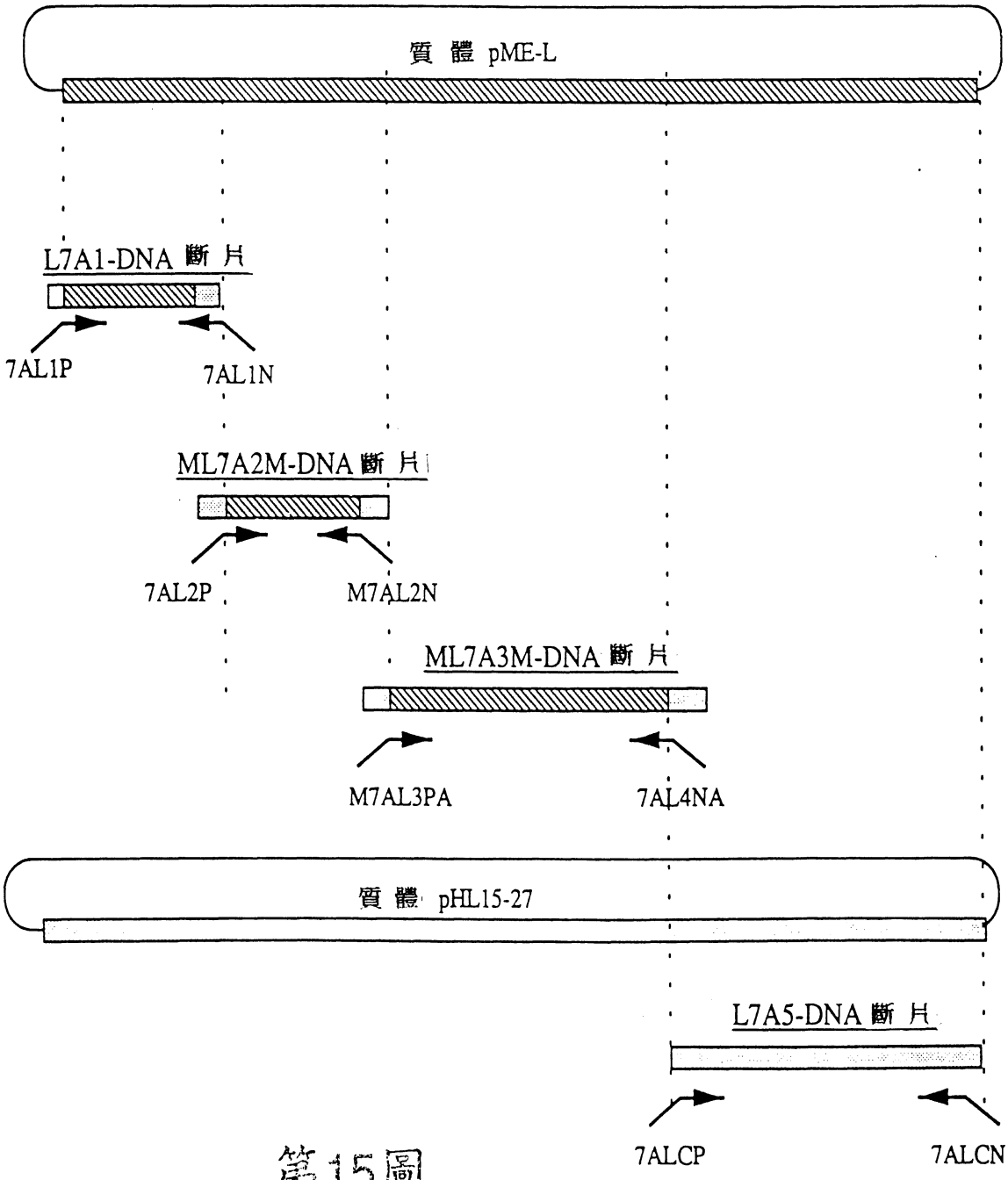
第12圖


L7A1.2-DNA 斷 片
7AL1P
ML7A3-DNA 斷 片
L7A5-DNA 斷 片
PCR
7ALCN
VHM-DNA 斷 片

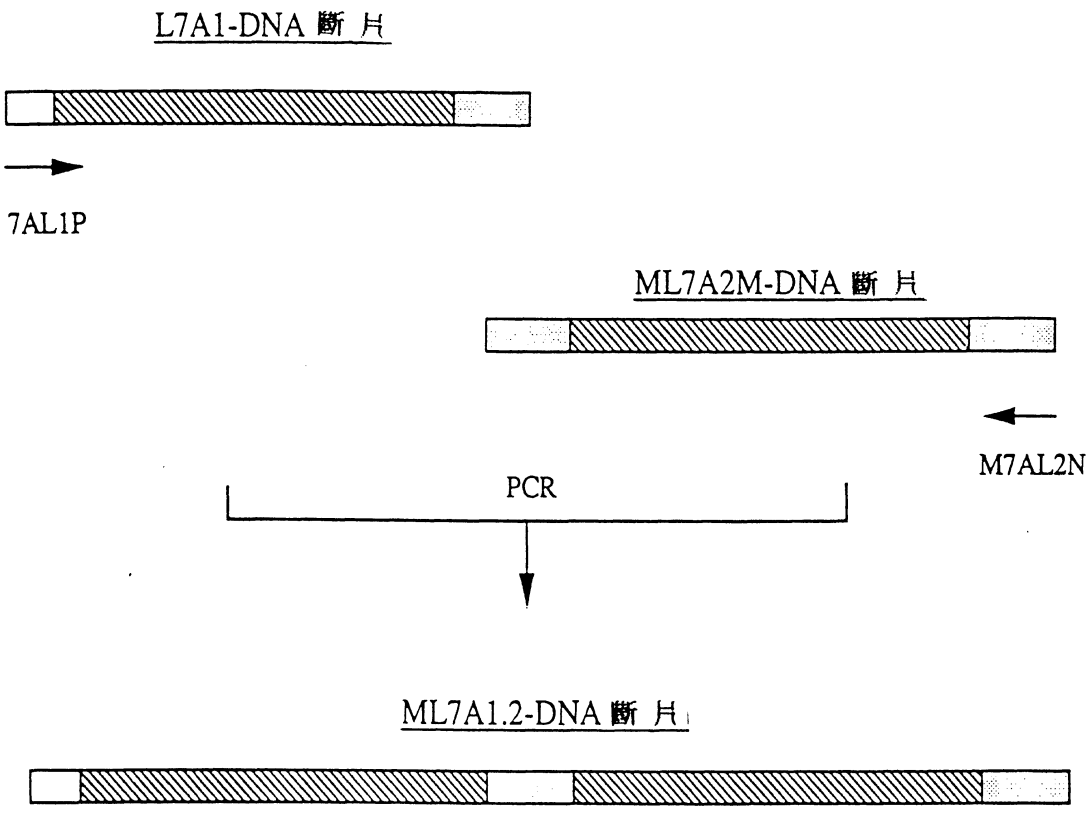
第13圖


VHM-DNA 斷 片
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
EcoRI
EcoRI
HindIII
pHSG399
Cm
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以CIP脫磷酸化
HindIII
EcoRI
pEE.12.1
Amp
GS
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以CIP脫磷酸化
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
pHSGHM17
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
EcoRI
CMV
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
EcoRI
HindIII
p7AL-HM

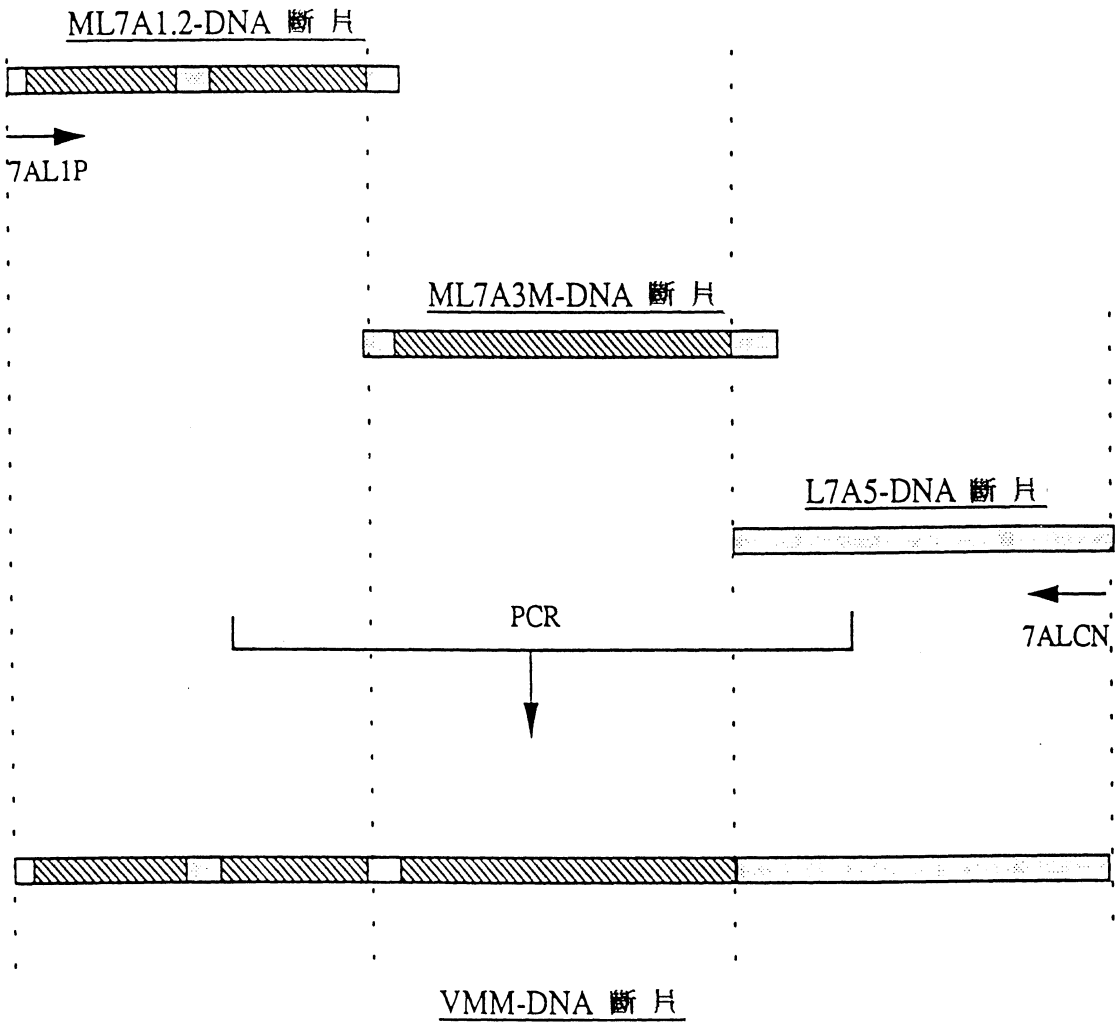
第14圖


質 體 pME-L
L7A1-DNA 斷 片
7AL1P
7AL1N
ML7A2M-DNA 斷 片
7AL2P
M7AL2N
ML7A3M-DNA 斷 片
M7AL3PA
7AL4NA
質 體 pHL15-27
L7A5-DNA 斷 片
7ALCP
7ALCN

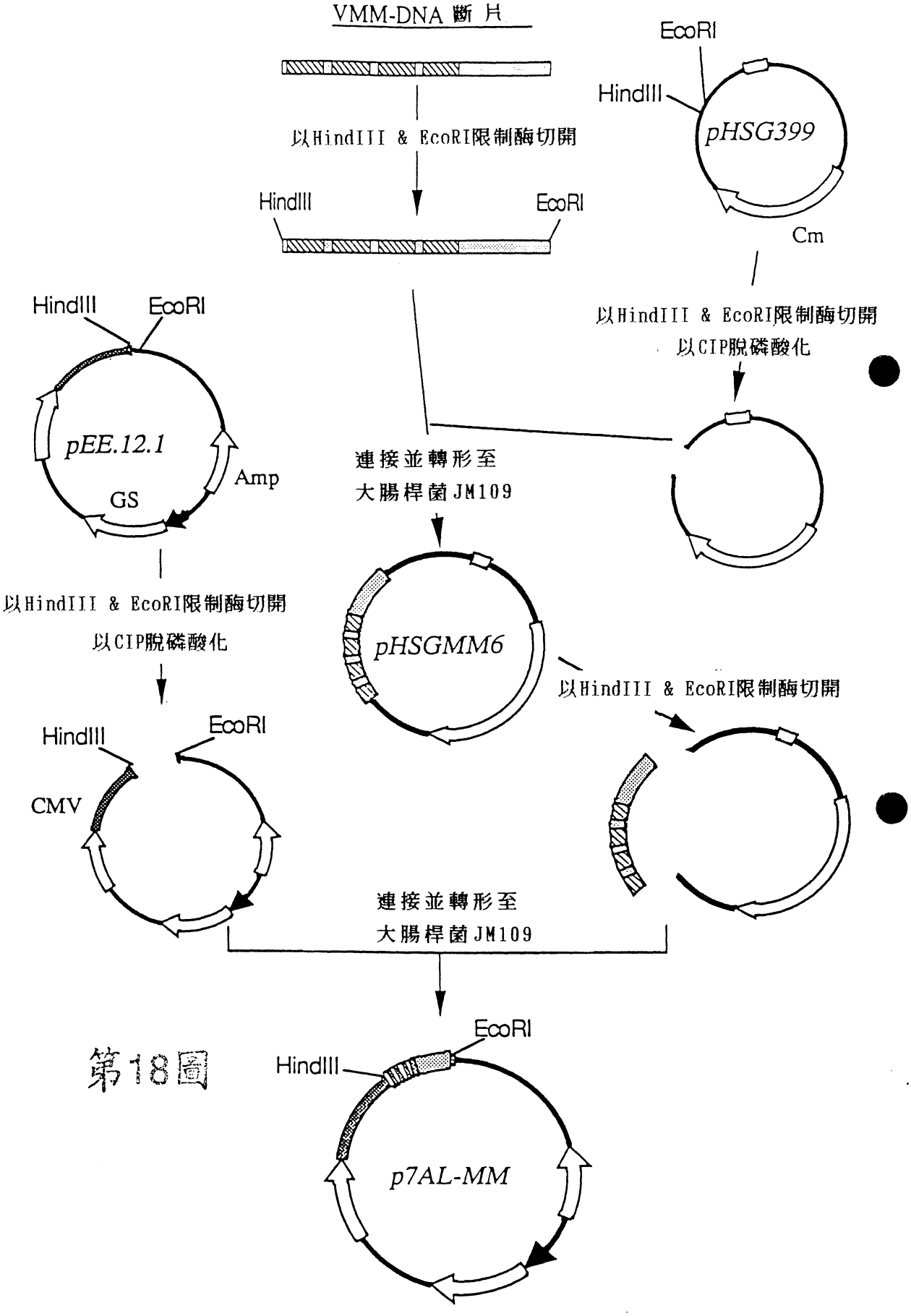
第15圖



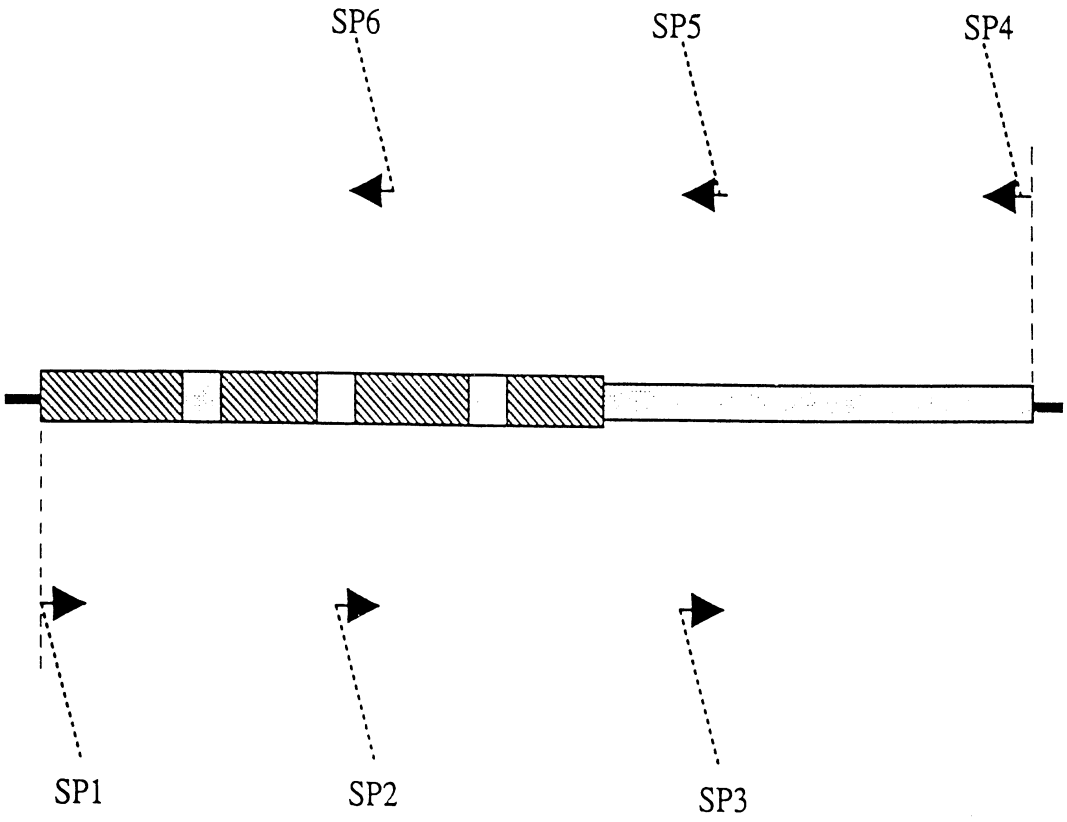
第16圖


ML7A1.2-DNA 斷 片
7AL1P
ML7A3M-DNA 斷 片
L7A5-DNA 斷 片
PCR
7ALCN
VMM-DNA 斷 片

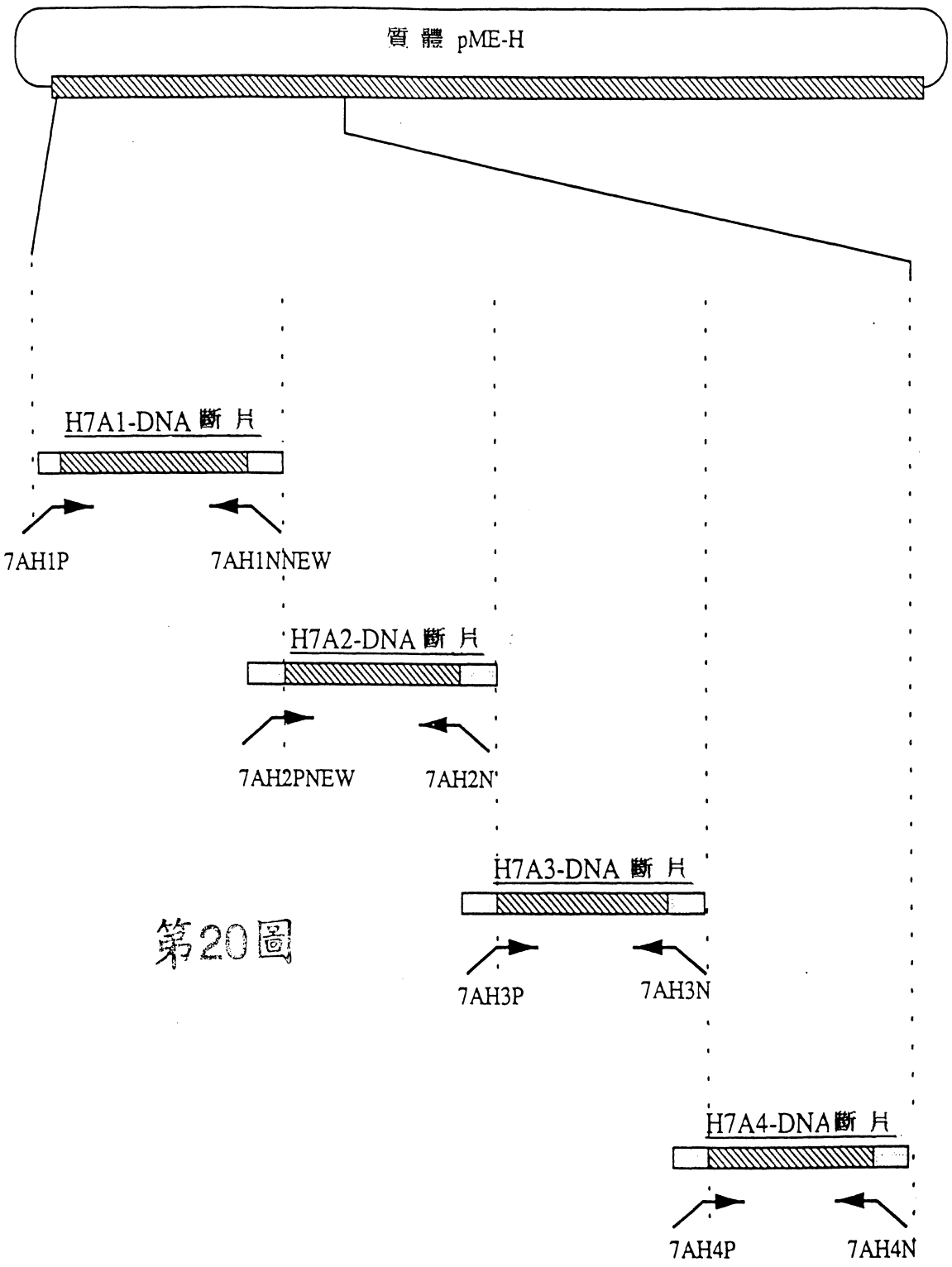
第17圖


VMM-DNA 斷 片
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
EcoRI
EcoRI
HindIII
pHSG399
Cm
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以CIP脫磷酸化
HindIII
EcoRI
pEE.12.1
Amp
GS
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以CIP脫磷酸化
pHSGMM6
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
EcoRI
CMV
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
EcoRI
HindIII
p7AL-MM

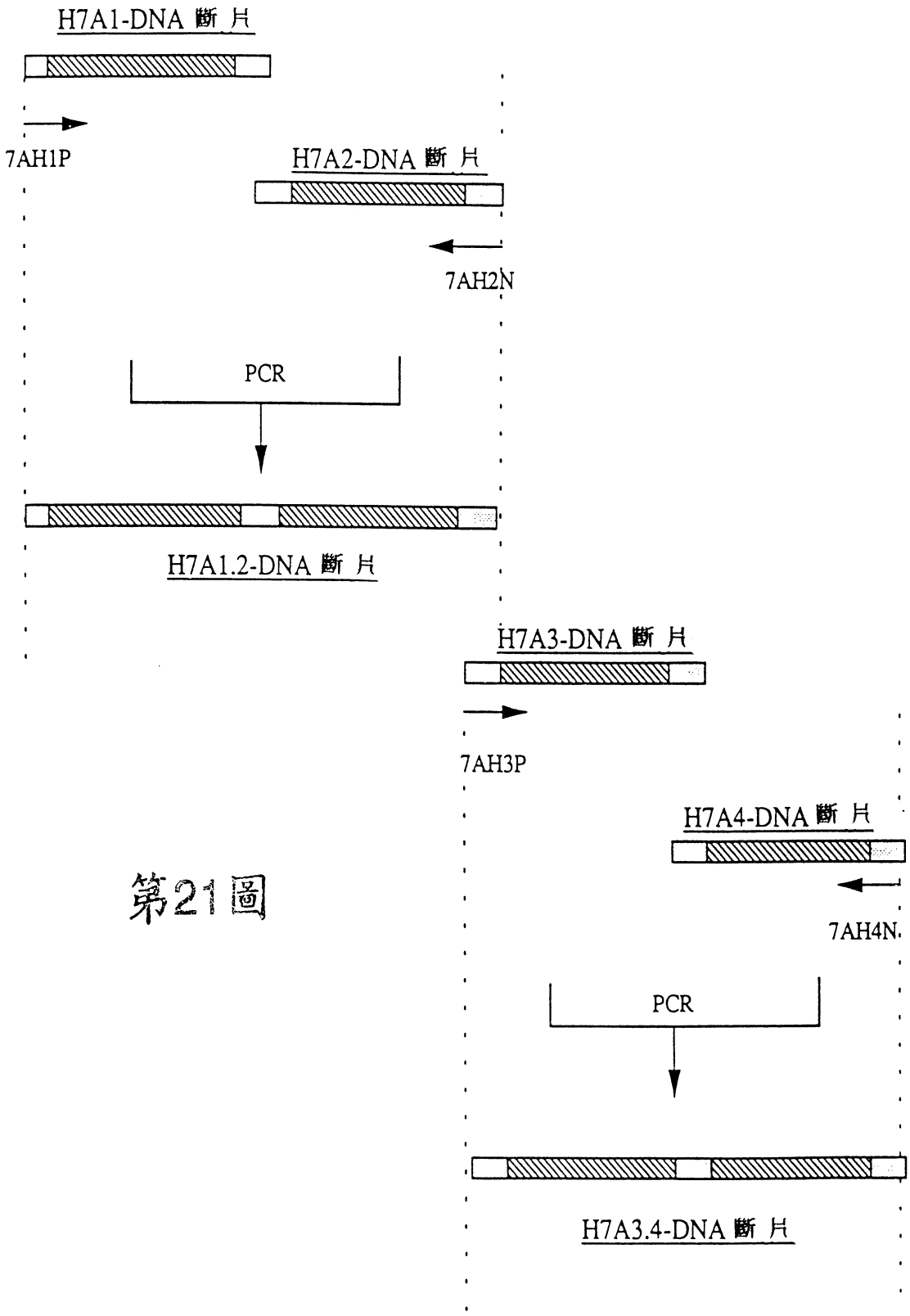
第18圖



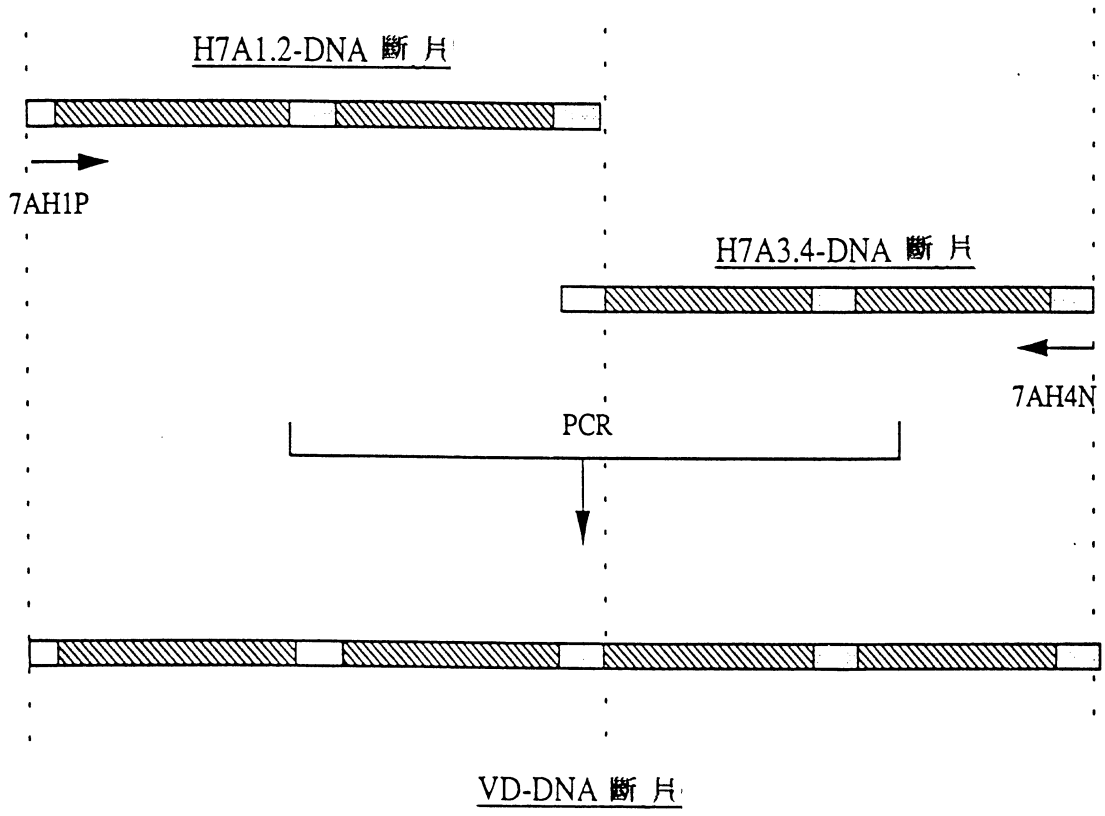
第19圖


質體 pME-H
H7A1-DNA 斷片
7AH1P
7AH1NNEW
H7A2-DNA 斷片
7AH2PNEW
7AH2N'
H7A3-DNA 斷片
7AH3P
7AH3N
H7A4-DNA 斷片
7AH4P
7AH4N

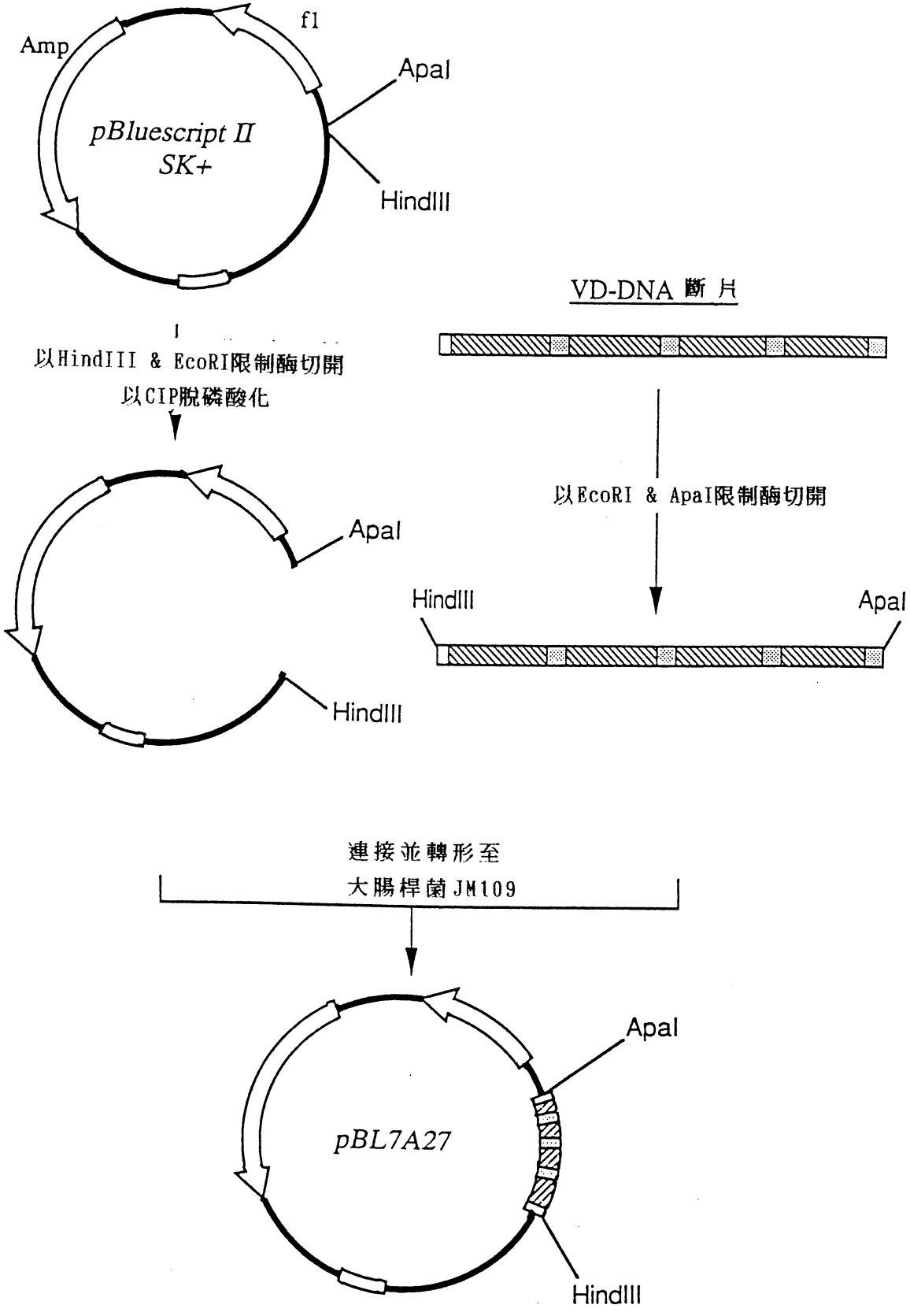
第20圖


H7A1-DNA 斷 片
7AH1P
H7A2-DNA 斷 片
7AH2N
PCR
H7A1.2-DNA 斷 片
H7A3-DNA 斷 片
7AH3P
H7A4-DNA 斷 片
7AH4N
PCR
H7A3.4-DNA 斷 片

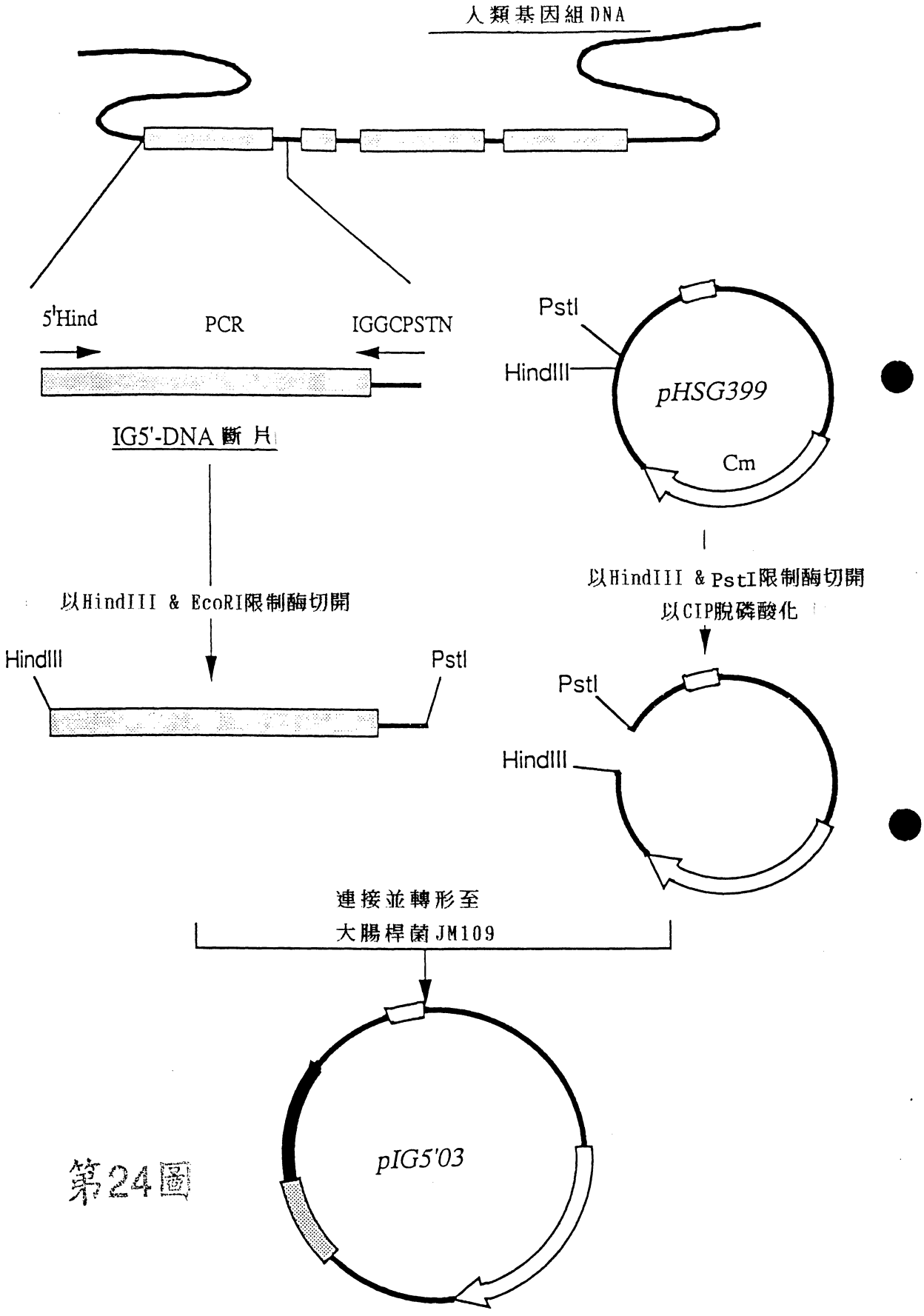
第21圖



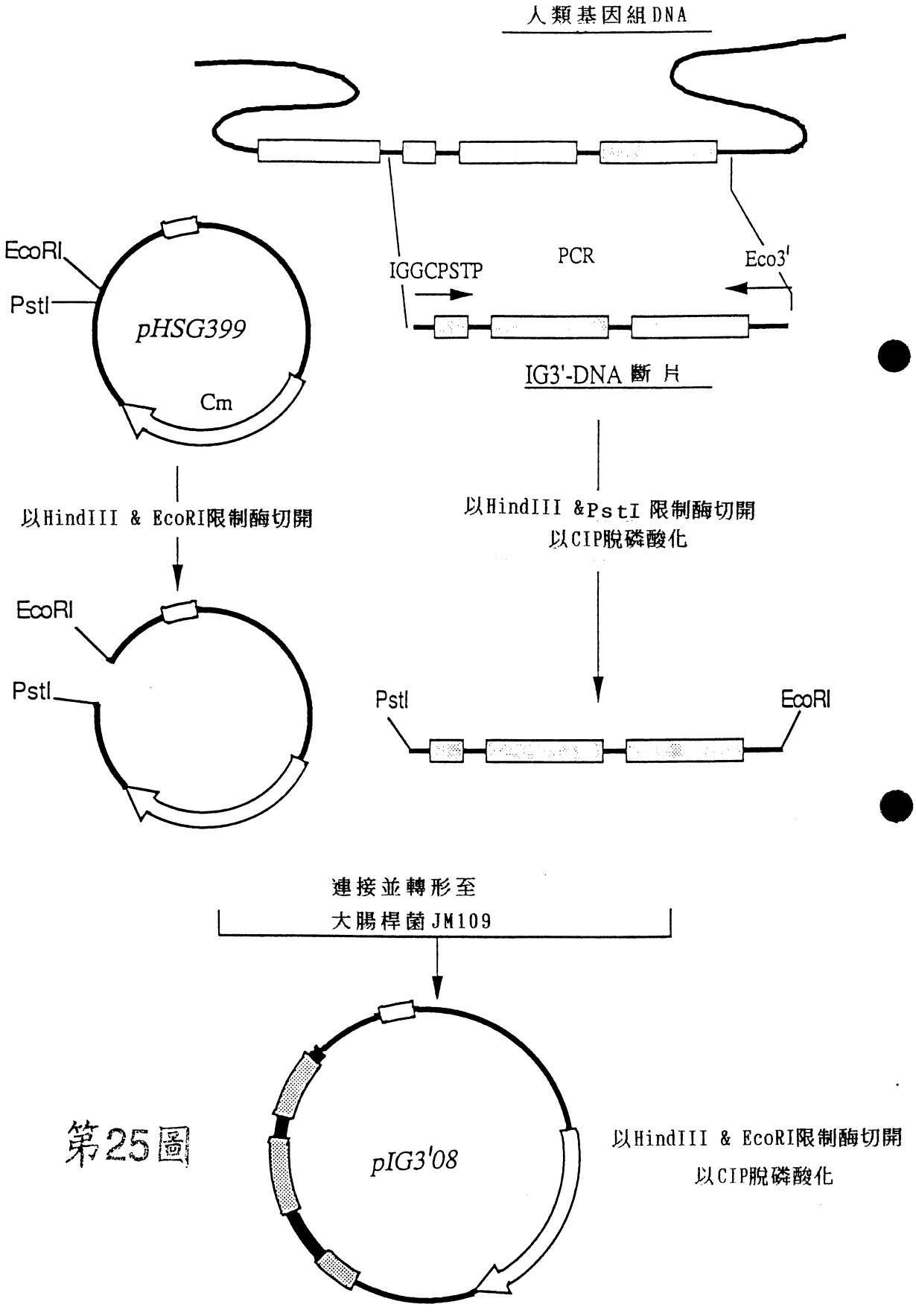
第22圖


Amp
f1
ApaI
pBluescript II
SK+
HindIII
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以CIP脫磷酸化
ApaI
HindIII
VD-DNA 斷片
以EcoRI & ApaI限制酶切開
HindIII
ApaI
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
ApaI
pBL7A27
HindIII

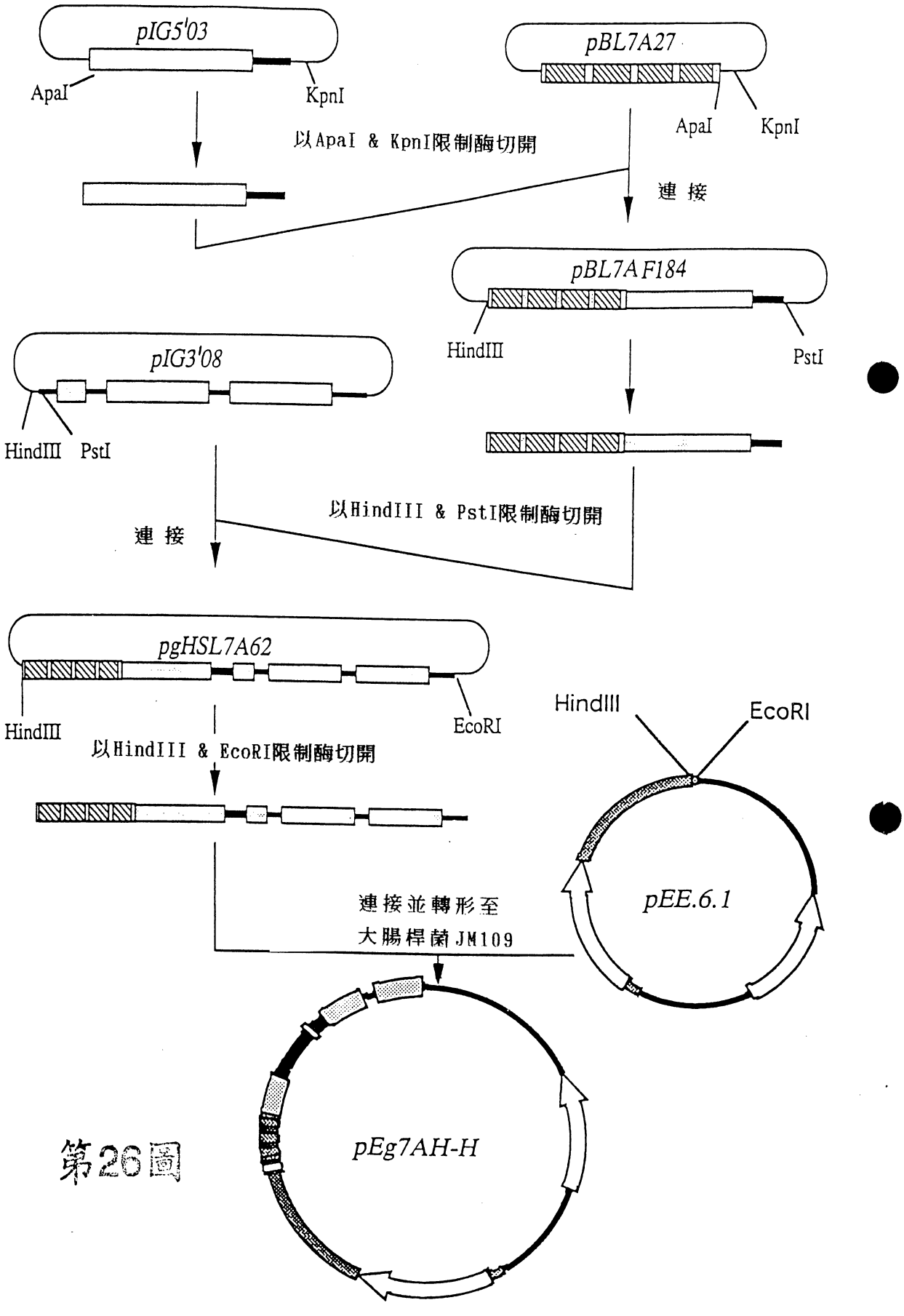
第23圖


人類基因組DNA
5'Hind
PCR
IGGCPSTN
IG5'-DNA 斷片
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
PstI
PstI
HindIII
pHSG399
Cm
以HindIII & PstI限制酶切開
以CIP脫磷酸化
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
pIG5'03

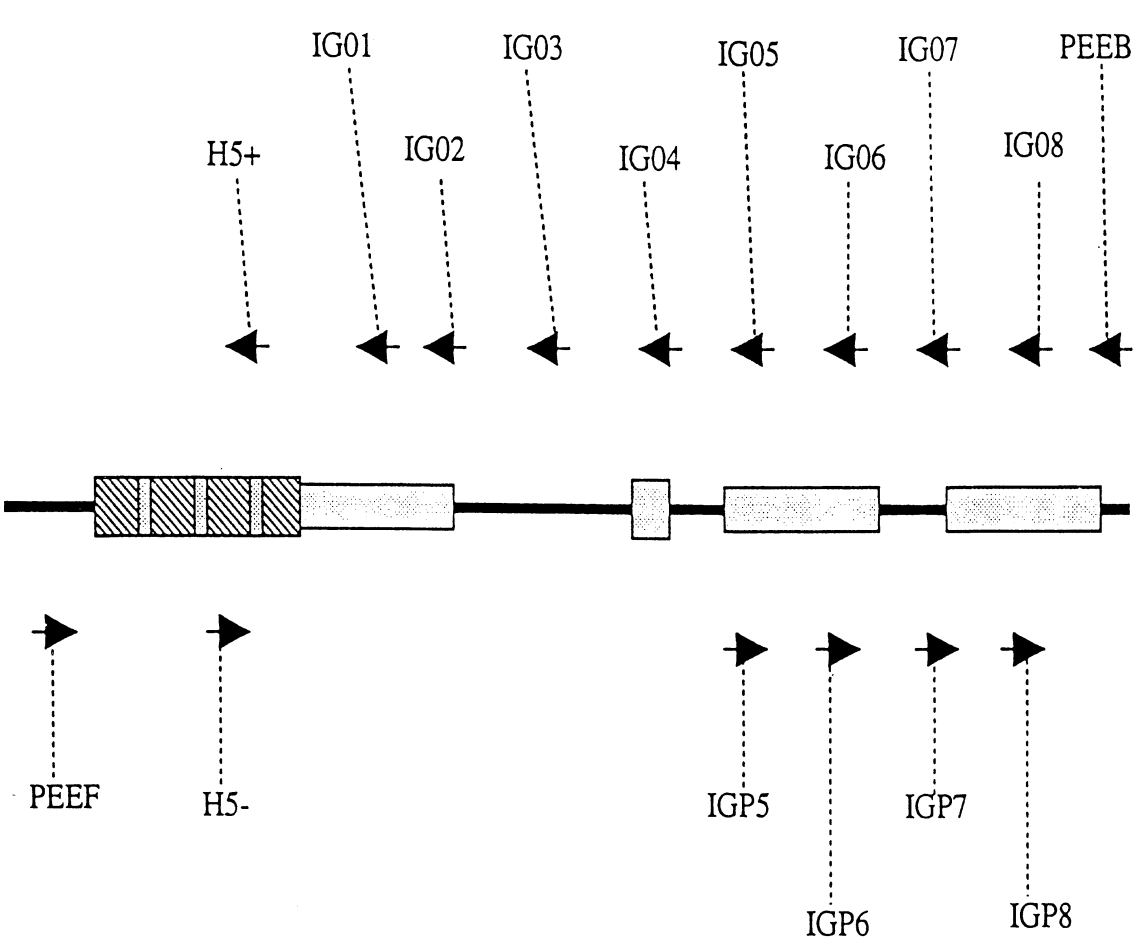
第24圖


人類基因組DNA
IGGCPSTP
PCR
Eco3'
IG3'-DNA 斷片
EcoRI
PstI
pHSG399
Cm
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以HindIII &PstI 限制酶切開
以CIP脫磷酸化
EcoRI
PstI
PstI
EcoRI
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
pIG3'08
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以CIP脫磷酸化

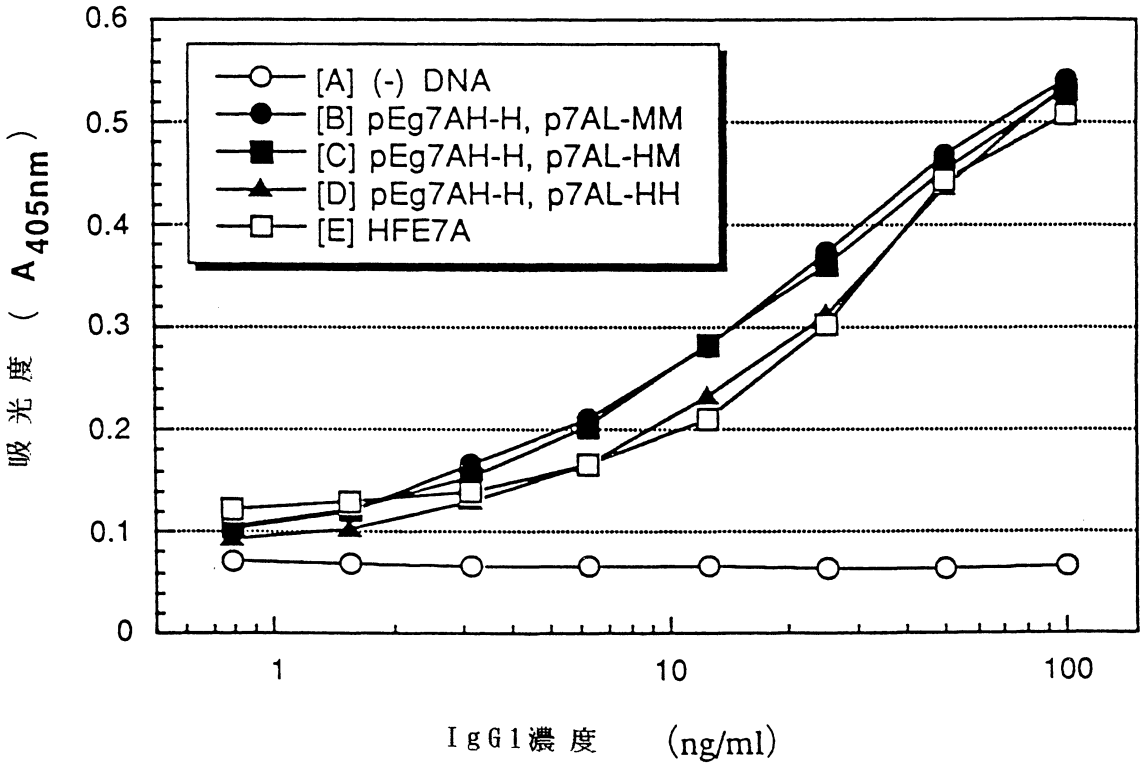
第25圖


pIG5'03
ApaI
KpnI
以ApaI & KpnI限制酶切開
pBL7A27
ApaI
KpnI
連 接
pBL7AF184
HindIII
PstI
pIG3'08
HindIII
PstI
以HindIII & PstI限制酶切開
連 接
pgHSL7A62
HindIII
EcoRI
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
EcoRI
pEE.6.1
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
pEg7AH-H

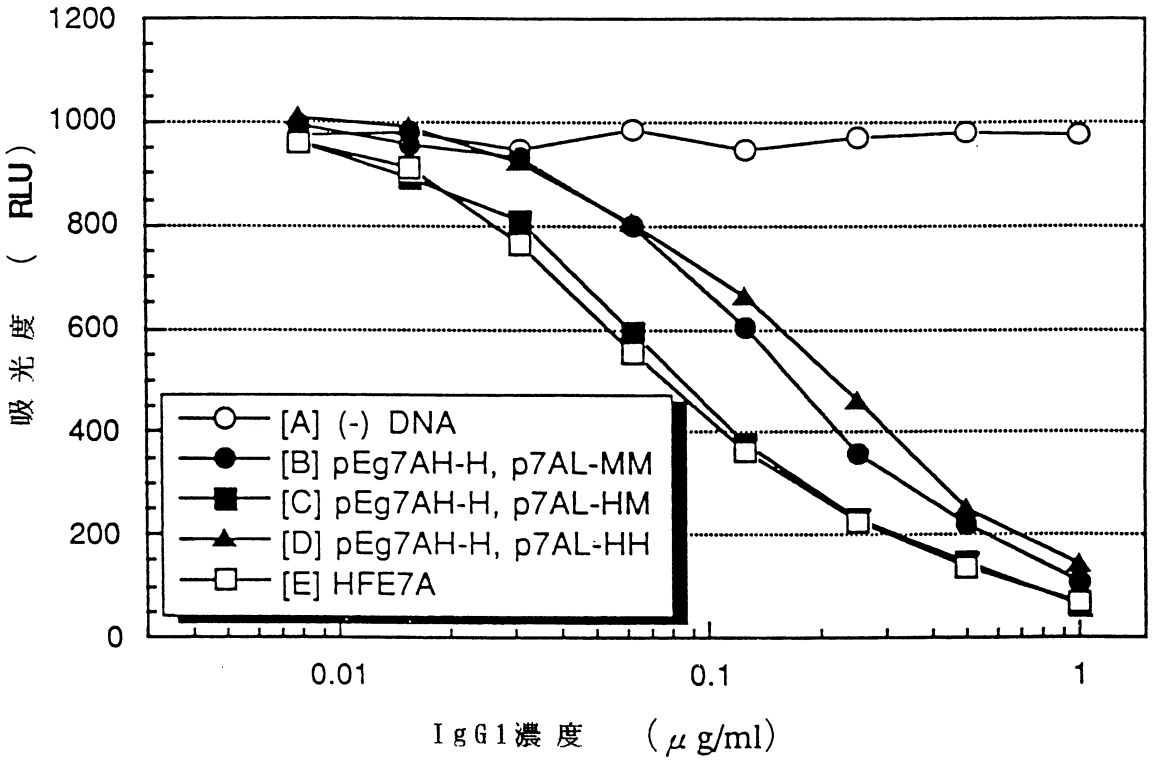
第26圖


IG01
IG03
IG05
IG07
PEEB
H5+
IG02
IG04
IG06
IG08
PEEF
H5-
IGP5
IGP7
IGP6
IGP8

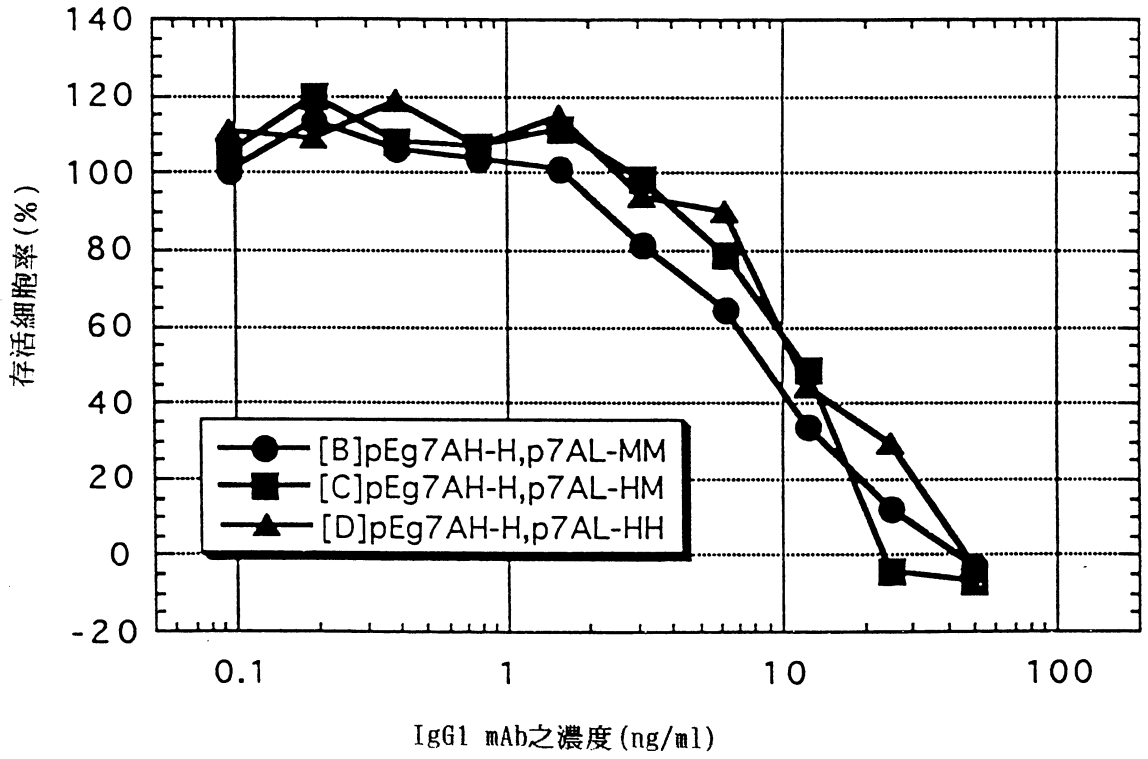
第27圖


0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
吸光度 (A405nm)
[A] (-) DNA
[B] pEg7AH-H, p7AL-MM
[C] pEg7AH-H, p7AL-HM
[D] pEg7AH-H, p7AL-HH
[E] HFE7A
1
10
100
IgG1濃度 (ng/ml)

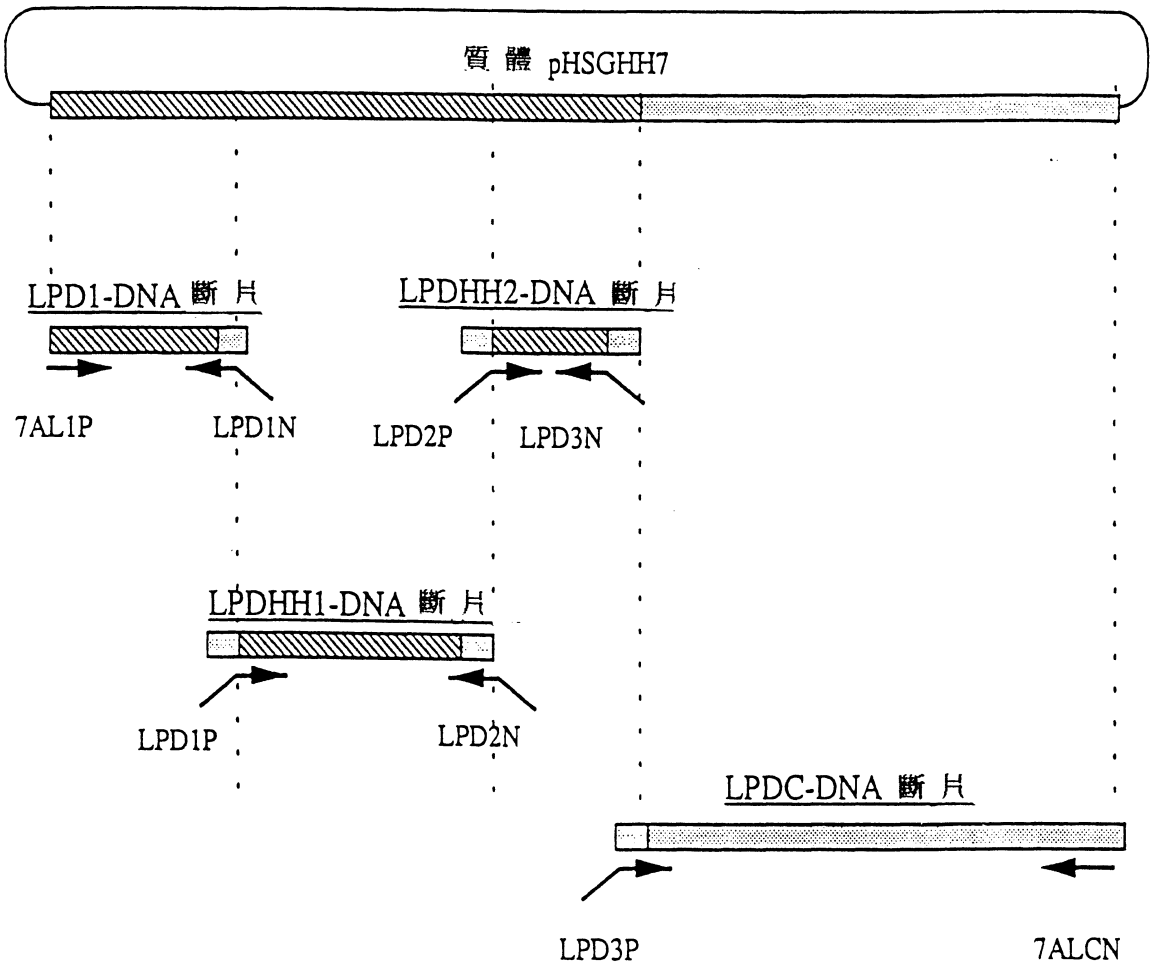
第28圖


1200
1000
800
600
400
200
0
吸光度 （ RLU）
0.01
0.1
1
IgG1濃度 （μg/ml）
[A] (-) DNA
[B] pEg7AH-H, p7AL-MM
[C] pEg7AH-H, p7AL-HM
[D] pEg7AH-H, p7AL-HH
[E] HFE7A

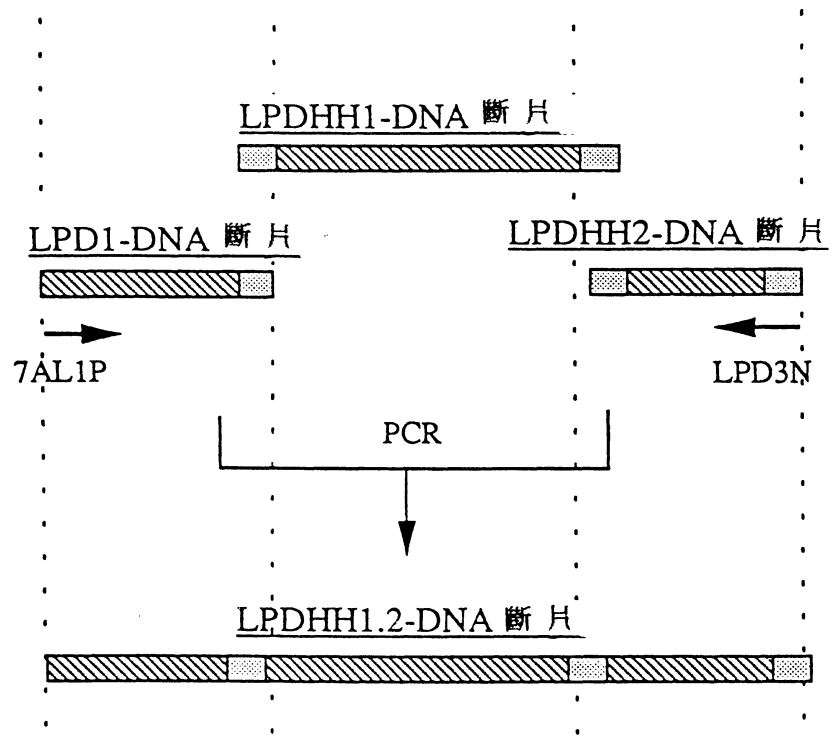
第29圖


140
120
100
80
60
40
20
0
-20
存活細胞率(%)
0.1
1
10
100
IgG1 mAb之濃度(ng/ml)
[B]pEg7AH-H,p7AL-MM
[C]pEg7AH-H,p7AL-HM
[D]pEg7AH-H,p7AL-HH

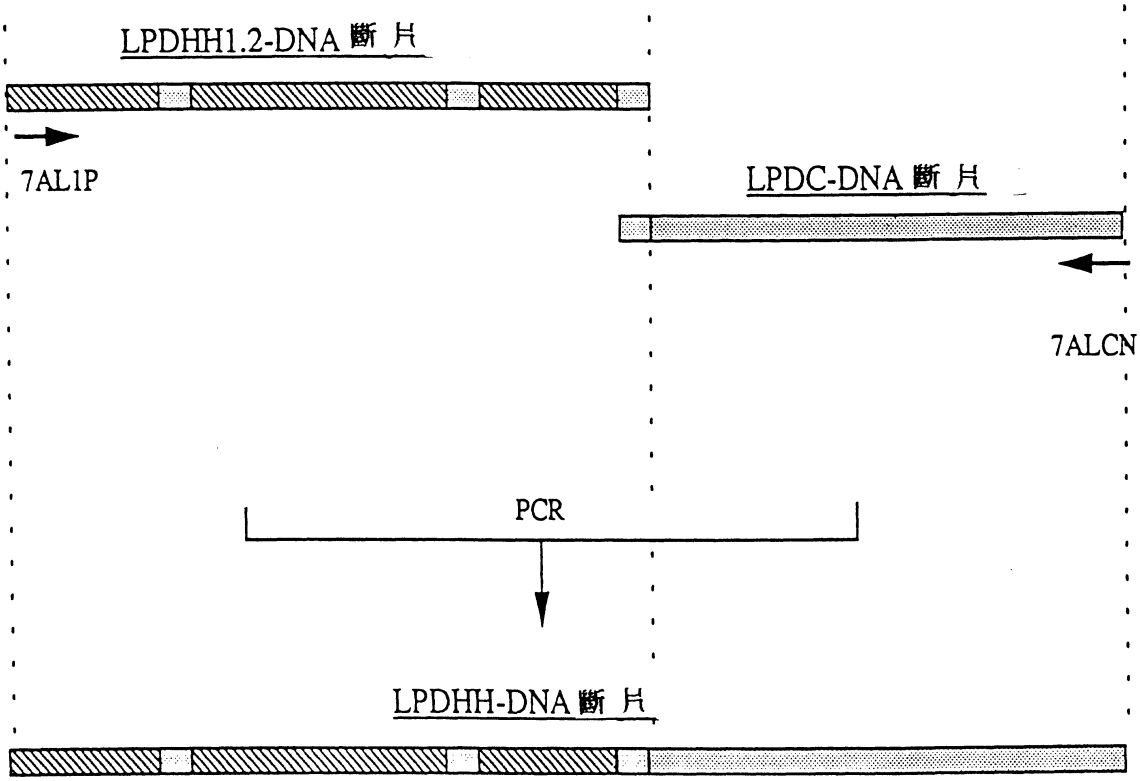
第30圖


質體 pHSGHH7
LPD1-DNA 斷片
LPDHH2-DNA 斷片
7AL1P
LPD1N
LPD2P
LPD3N
LPDHH1-DNA 斷片
LPD1P
LPD2N
LPDC-DNA 斷片
LPD3P
7ALCN

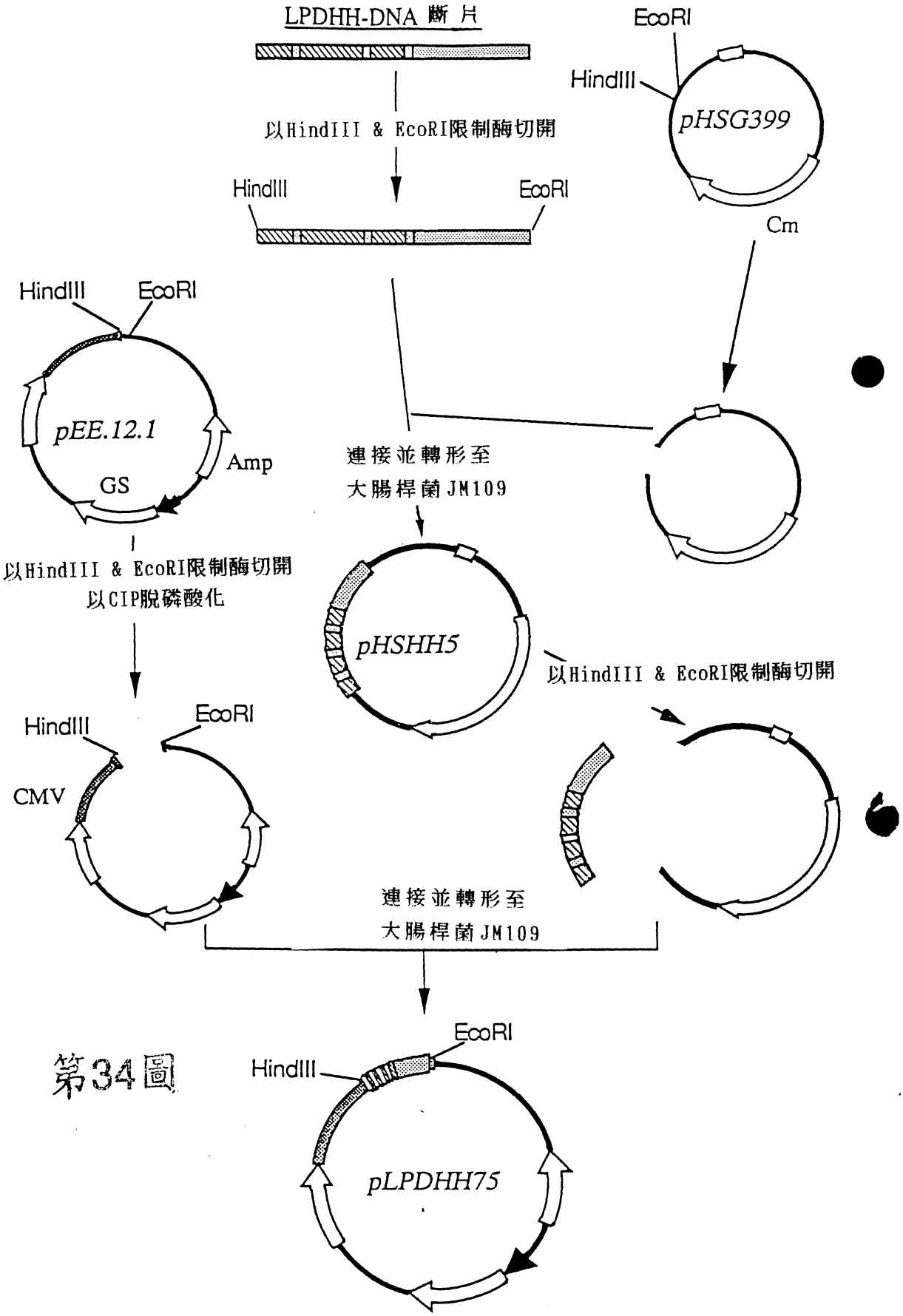
第31圖


LPDHH1-DNA 斷片
LPD1-DNA 斷片
LPDHH2-DNA 斷片
7AL1P
LPD3N
PCR
LPDHH1.2-DNA 斷片

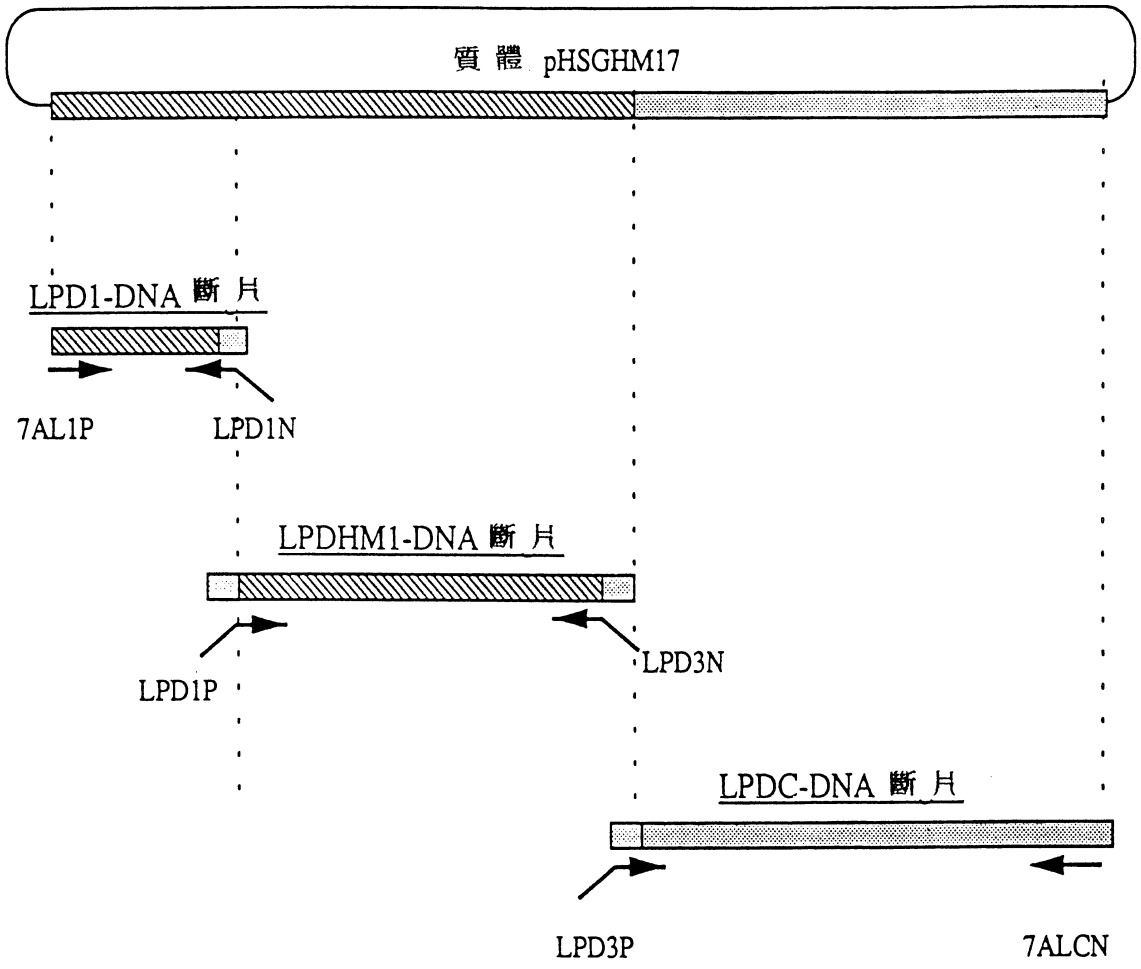
第32圖



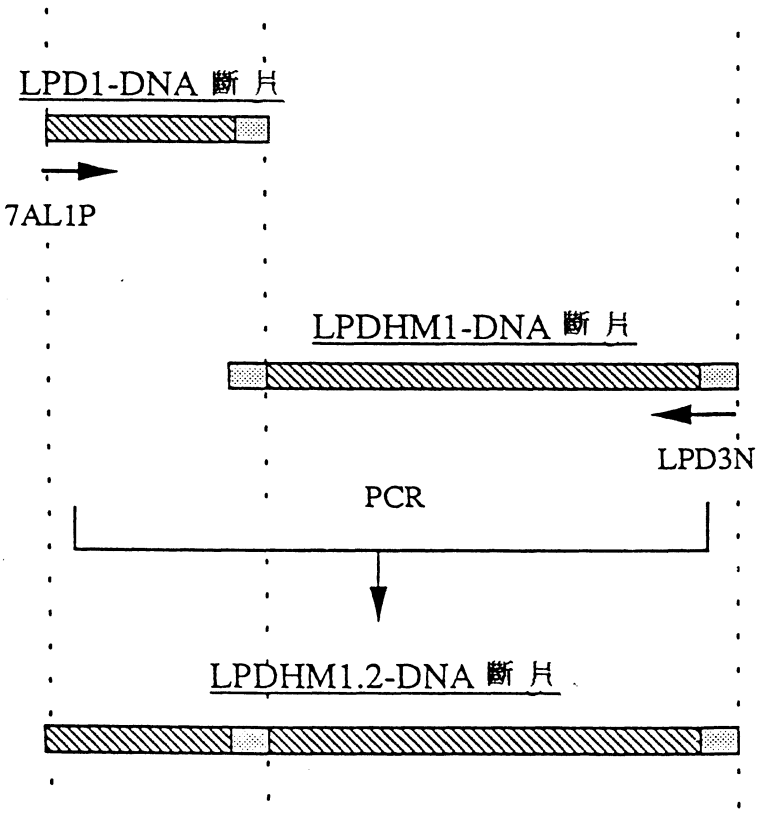
第33圖


LPDHH-DNA 斷 片
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
EcoRI
EcoRI
HindIII
pHSG399
Cm
HindIII
EcoRI
pEE.12.1
Amp
GS
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以CIP脫磷酸化
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
pHSHH5
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
EcoRI
CMV
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
EcoRI
HindIII
pLPDHH75

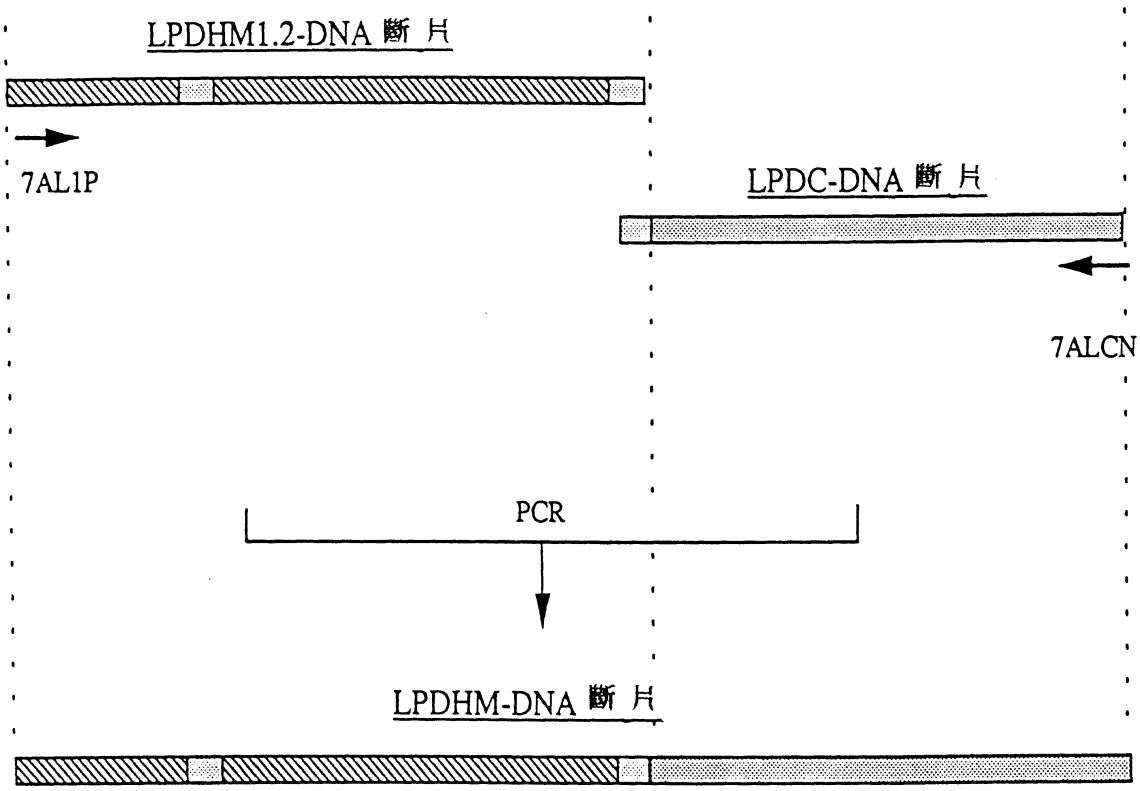
第34圖


質體 pHSGHM17
LPD1-DNA 斷片
7AL1P
LPD1N
LPDHM1-DNA 斷片
LPD1P
LPD3N
LPDC-DNA 斷片
LPD3P
7ALCN

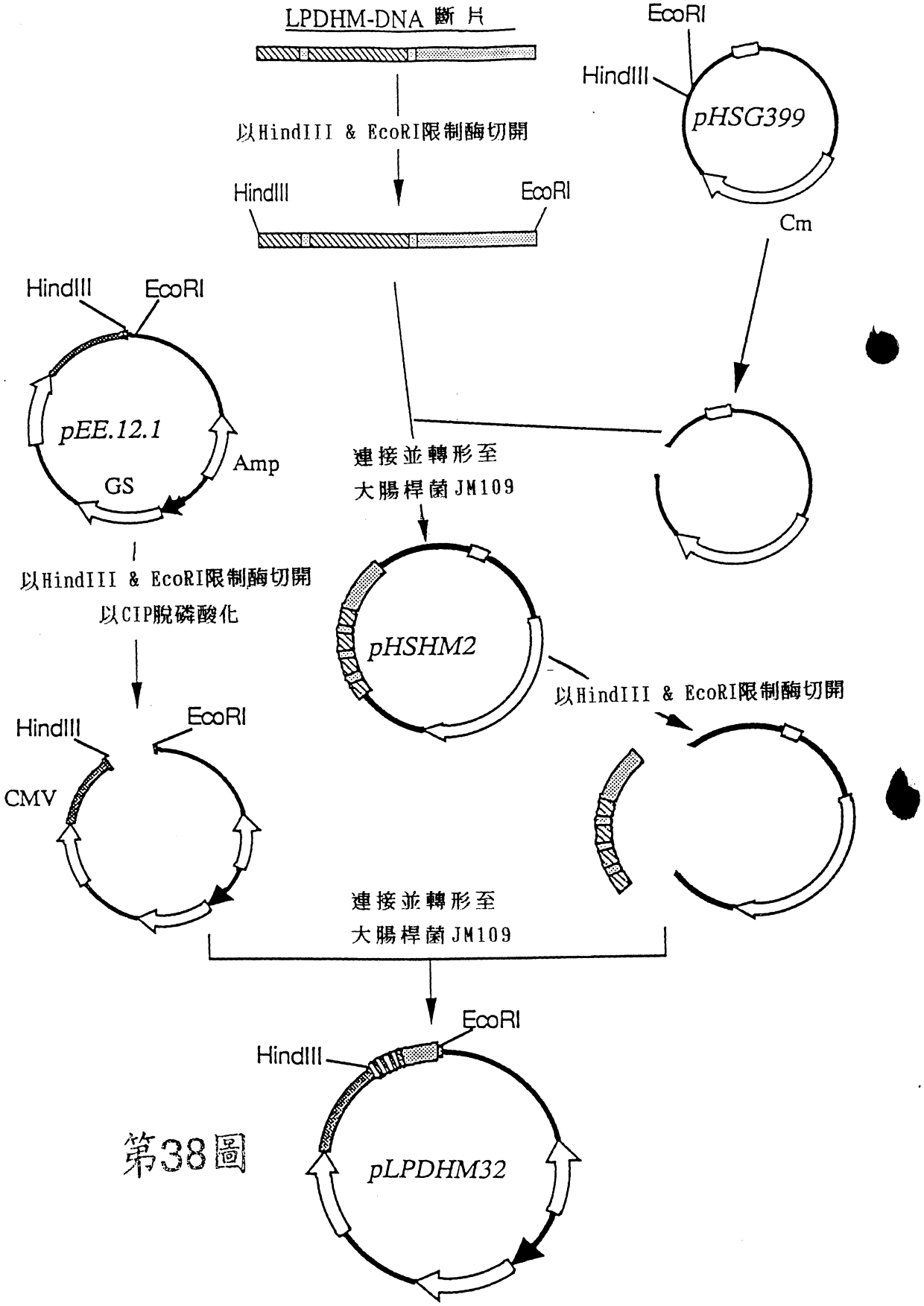
第35圖



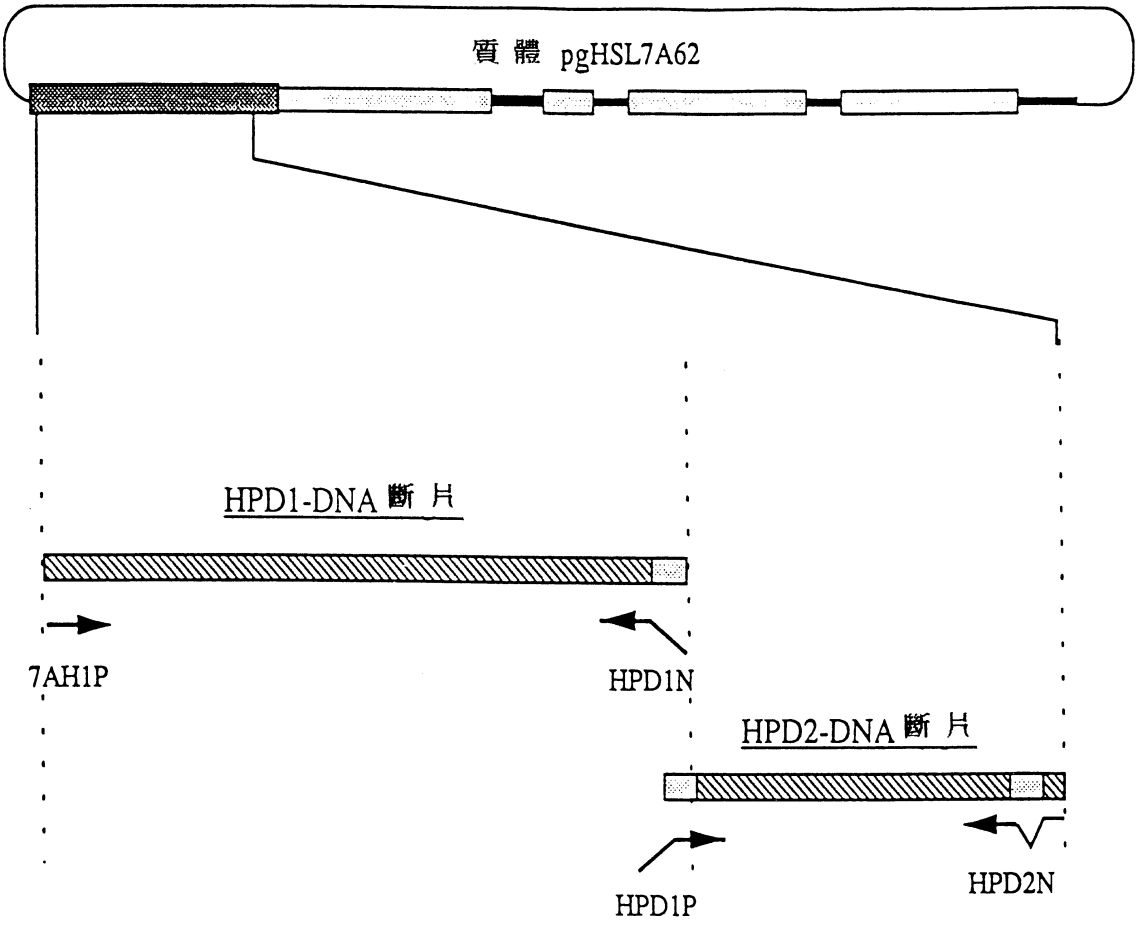
第36圖



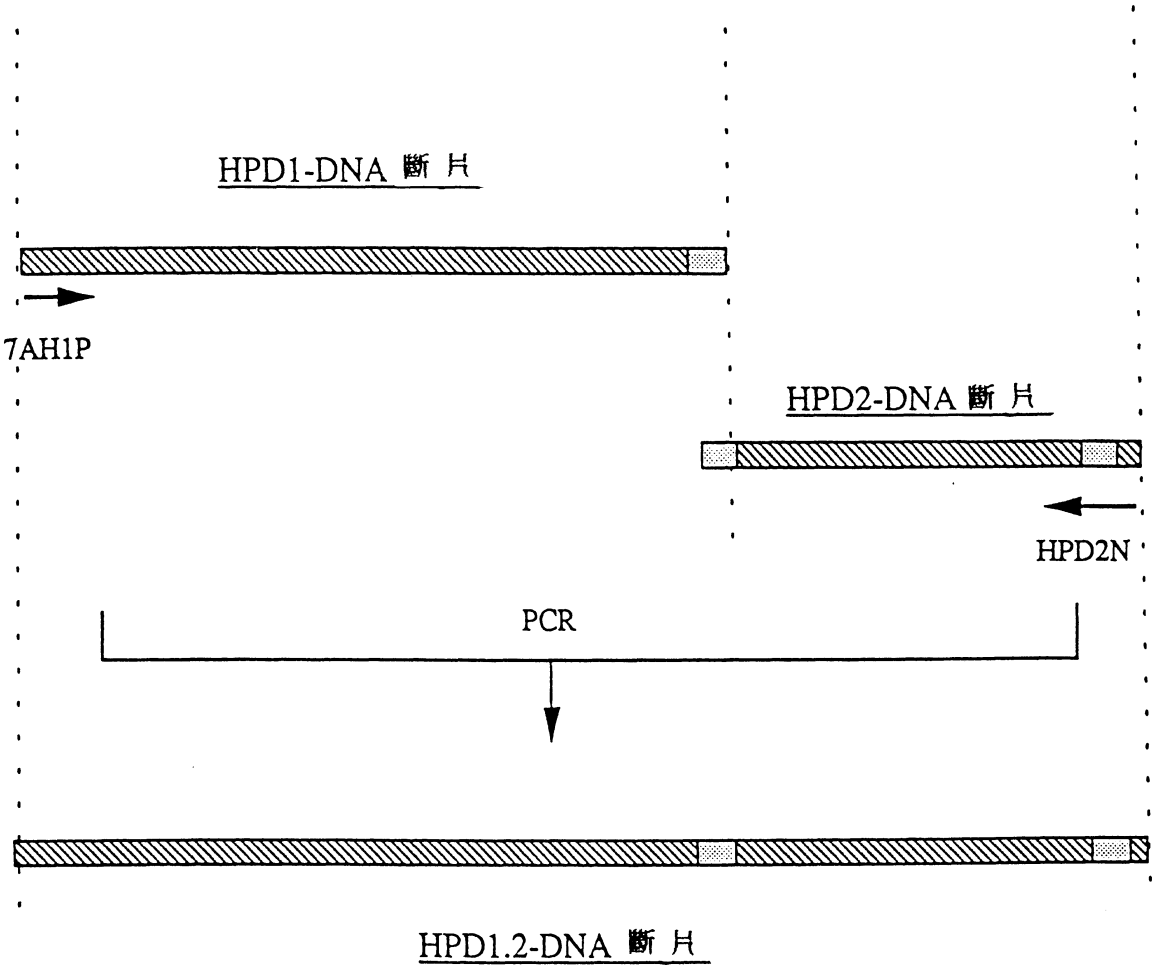
第37圖


LPDHM-DNA 斷片
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
EcoRI
EcoRI
HindIII
pHSG399
Cm
HindIII
EcoRI
pEE.12.1
Amp
GS
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以CIP脫磷酸化
pHSHM2
以HindIII & EcoRI限制酶切開
HindIII
EcoRI
CMV
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
EcoRI
HindIII
pLPDHM32

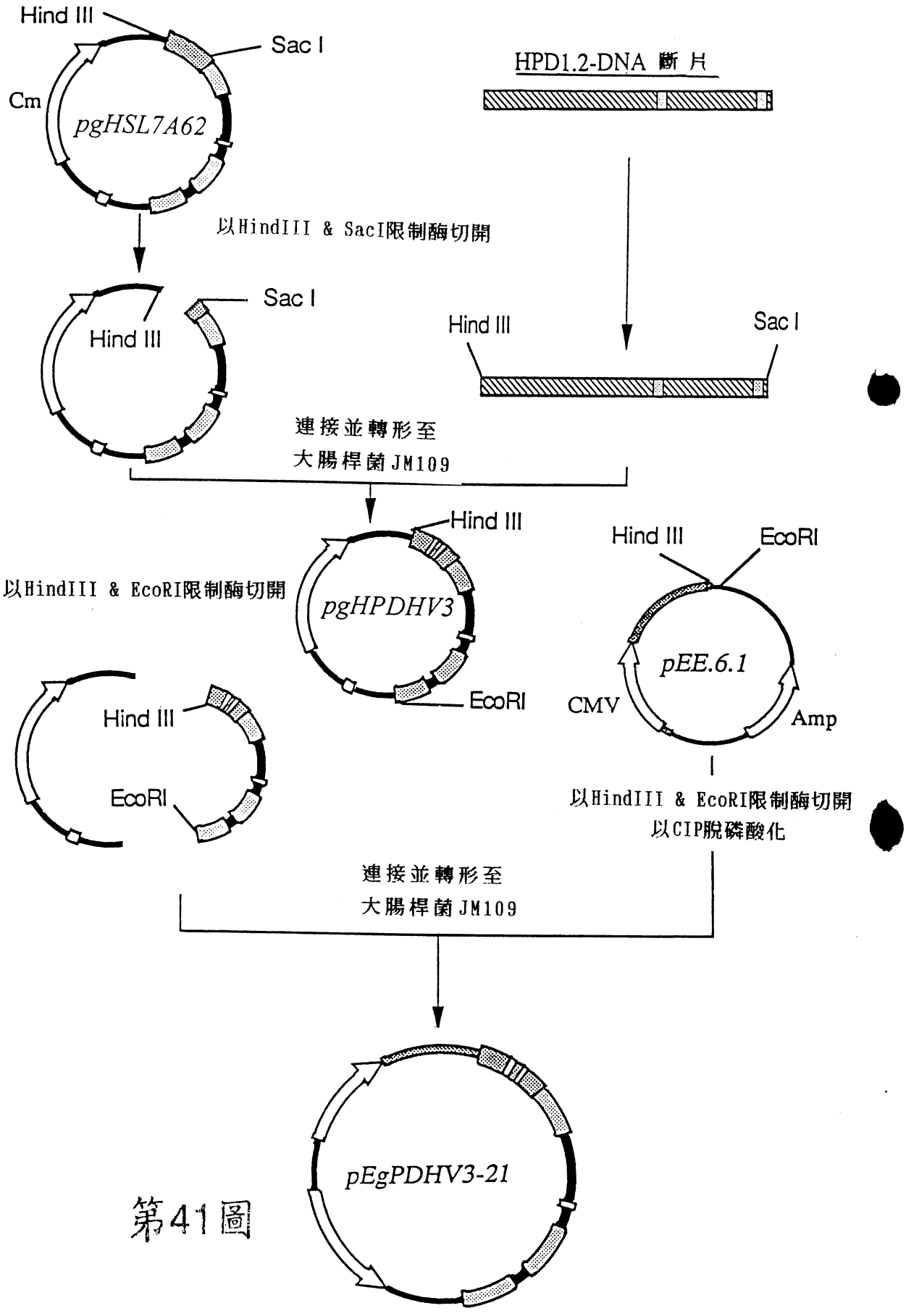
第38圖



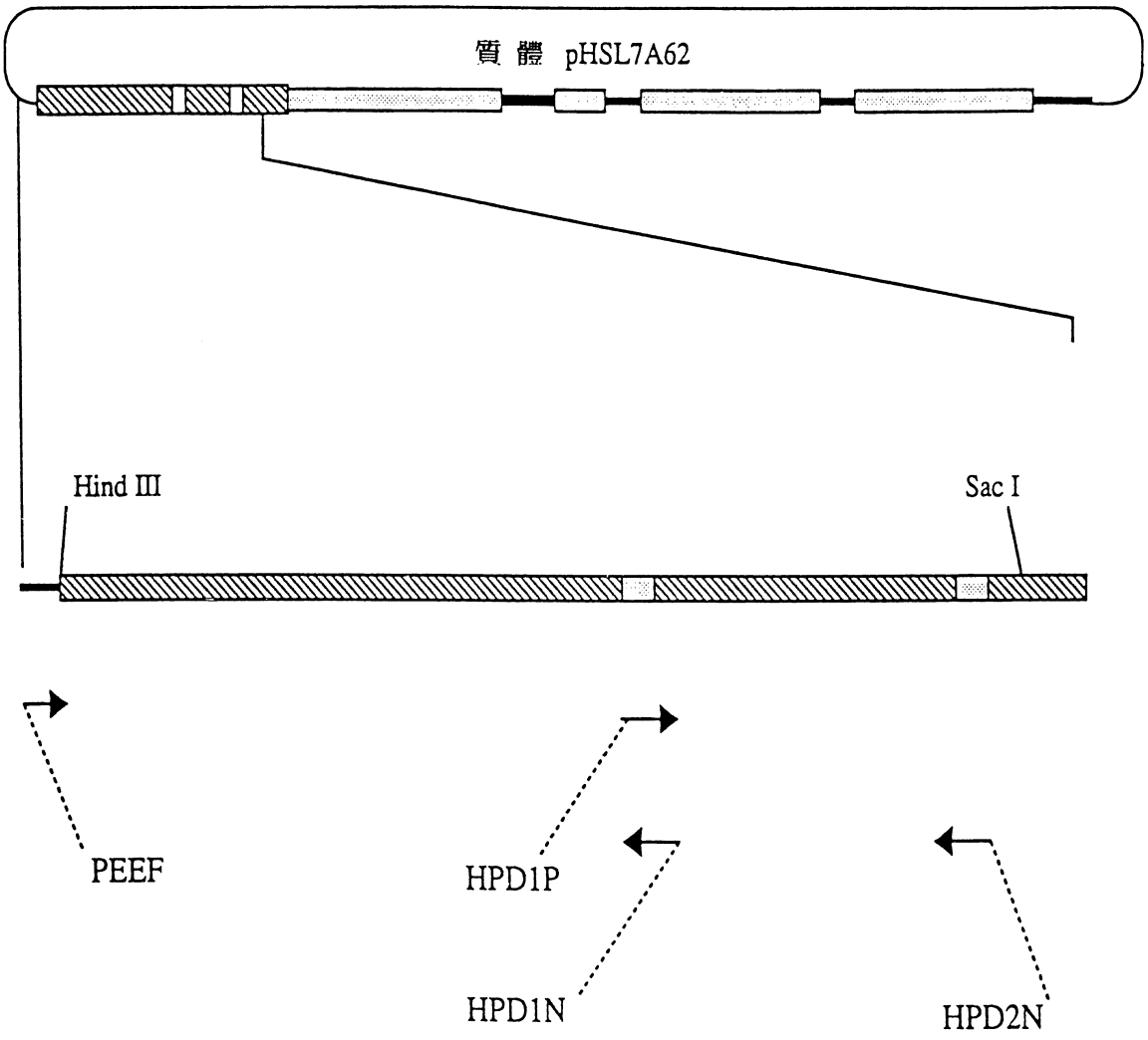
第39圖



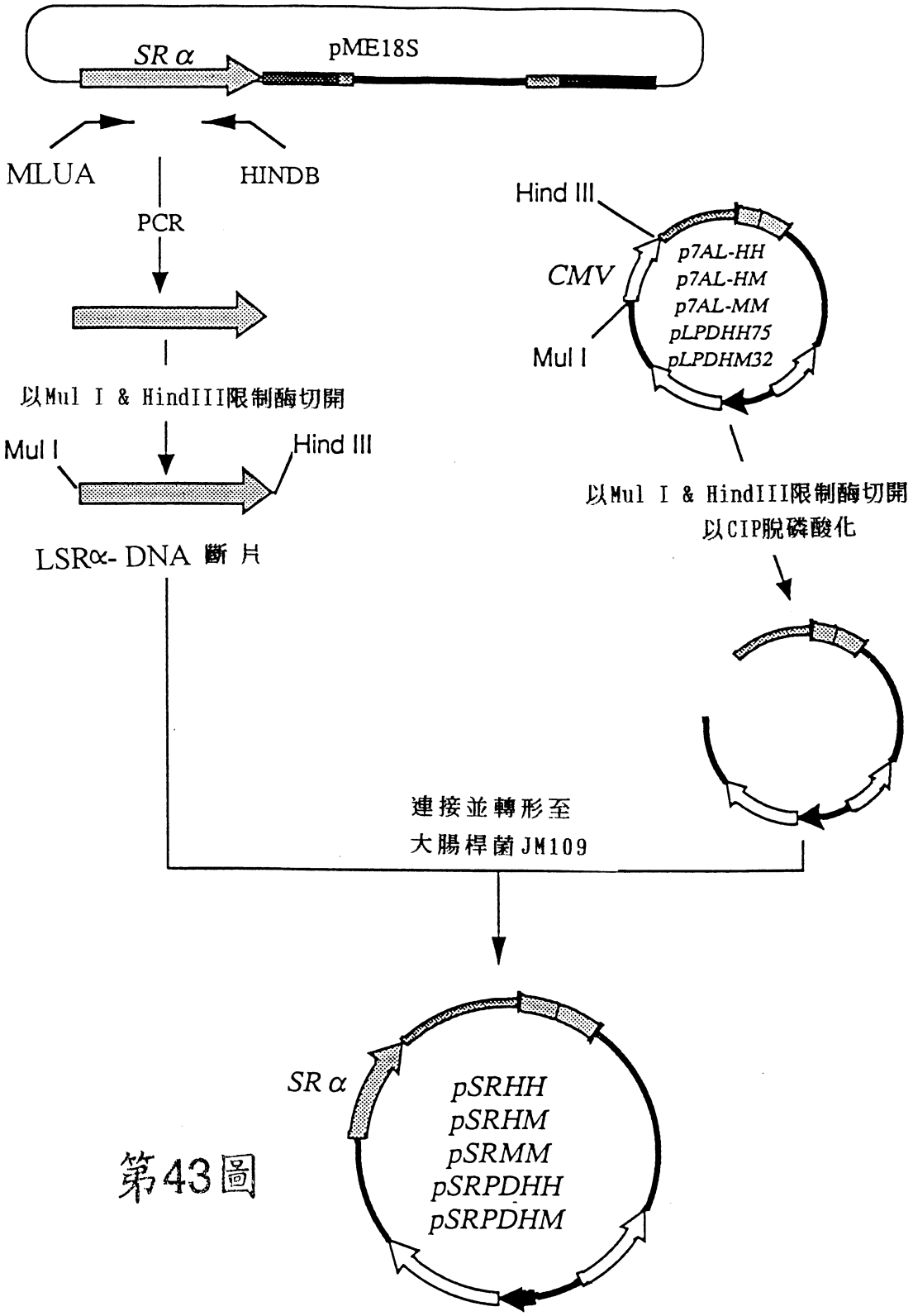
第40圖


Hind III
Sac I
Cm
pgHSL7A62
以HindIII & SacI限制酶切開
HPD1.2-DNA 斷片
Hind III
Sac I
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
Hind III
以HindIII & EcoRI限制酶切開
pgHPDHV3
EcoRI
Hind III
EcoRI
Hind III
EcoRI
pEE.6.1
CMV
Amp
以HindIII & EcoRI限制酶切開
以CIP脫磷酸化
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
pEgPDHV3-21

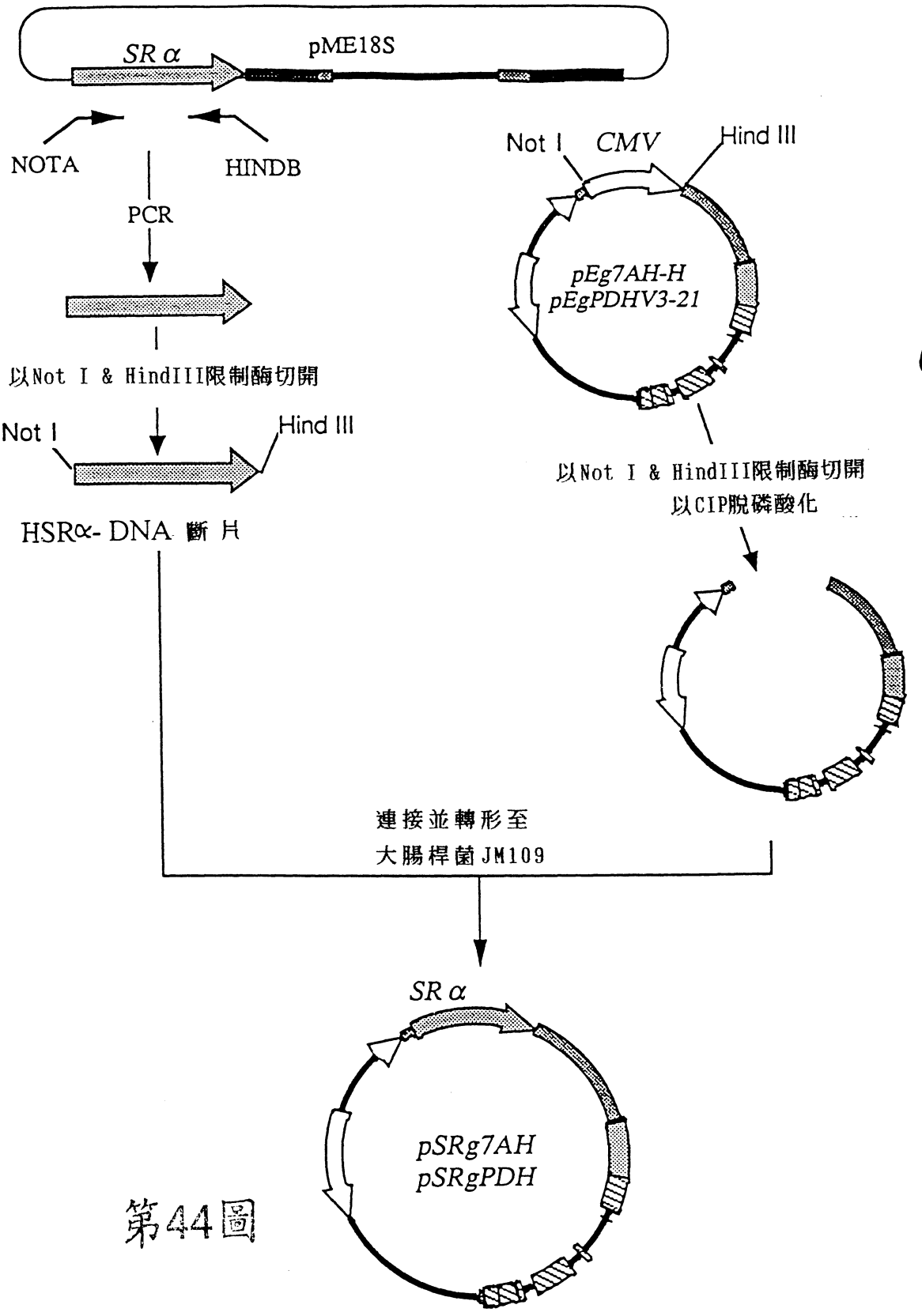
第41圖



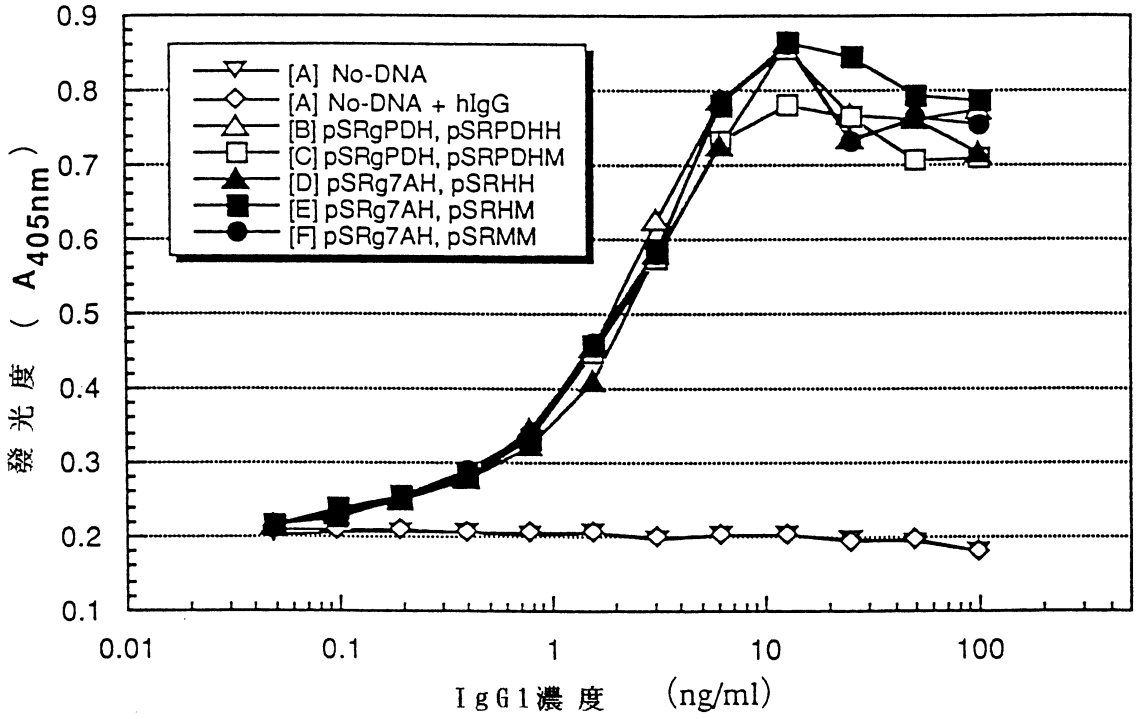
第42圖


SR α
pME18S
MLUA
HINDB
PCR
以Mul I & HindIII限制酶切開
Mul I
Hind III
LSRα- DNA 斷片
Hind III
CMV
Mul I
p7AL-HH
p7AL-HM
p7AL-MM
pLPDHH75
pLPDHM32
以Mul I & HindIII限制酶切開
以CIP脫磷酸化
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
SR α
pSRHH
pSRHM
pSRMM
pSRPDHH
pSRPDHM

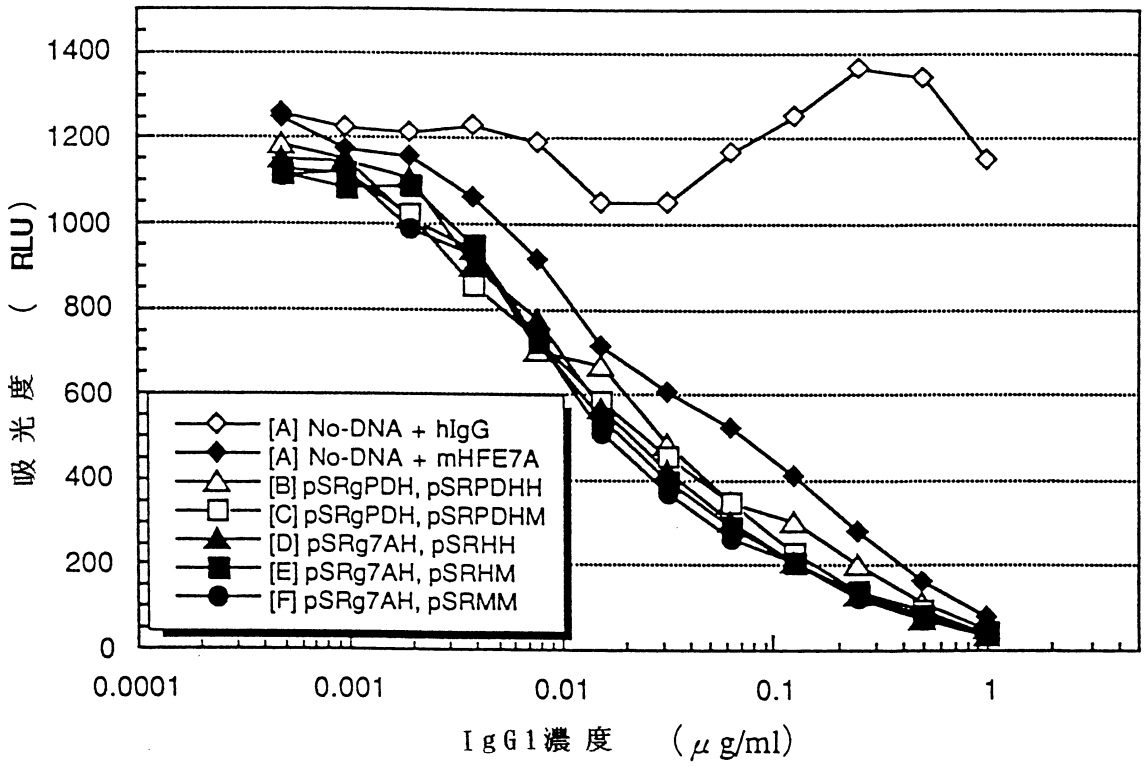
第43圖


SR α
pME18S
NOTA
HINDB
PCR
以Not I & HindIII限制酶切開
Not I
Hind III
HSRα- DNA 斷片
Not I
CMV
Hind III
pEg7AH-H
pEgPDHV3-21
以Not I & HindIII限制酶切開
以CIP脫磷酸化
連接並轉形至
大腸桿菌JM109
SR α
pSRg7AH
pSRgPDH

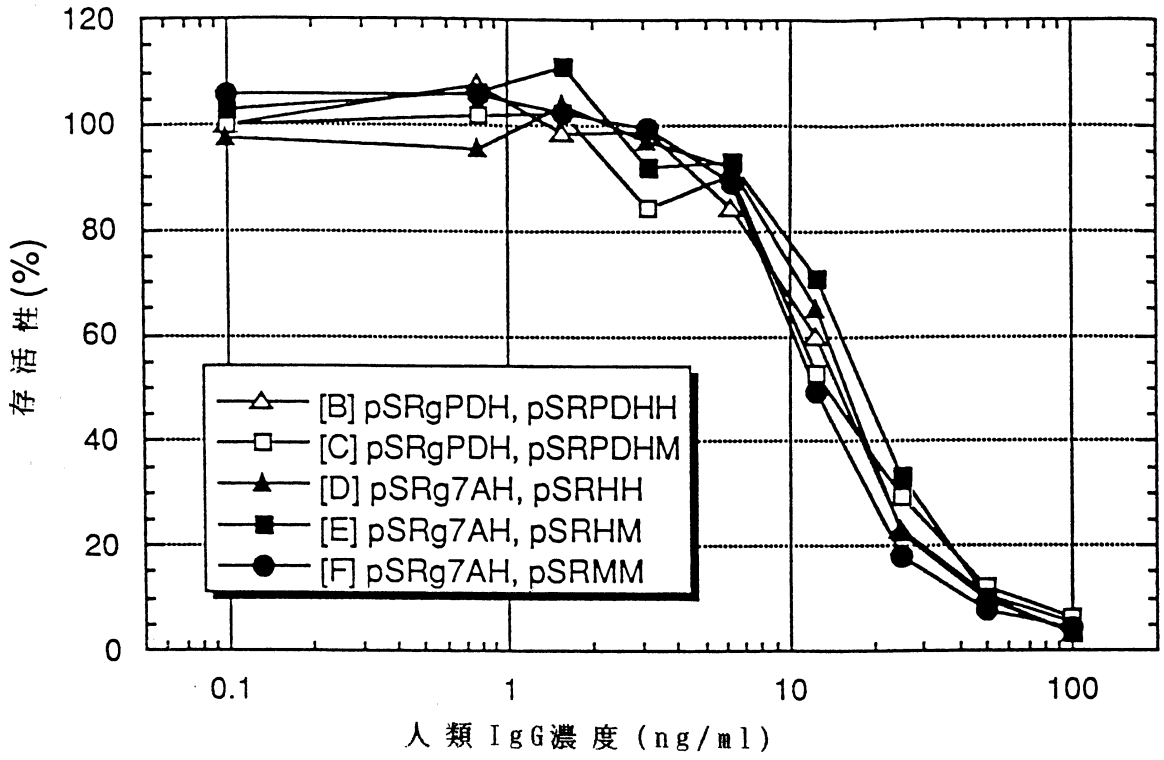
第44圖


0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
發光度 (A_{405nm})
[A] No-DNA
[A] No-DNA + hIgG
[B] pSRgPDH, pSRPDHH
[C] pSRgPDH, pSRPDHM
[D] pSRg7AH, pSRHH
[E] pSRg7AH, pSRHM
[F] pSRg7AH, pSRMM
0.01
0.1
1
10
100
IgG1濃度 (ng/ml)

第45圖


1400
1200
1000
800
600
400
200
0
吸光度 （RLU）
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
IgG1濃度 （μg/ml）
[A] No-DNA + hIgG
[A] No-DNA + mHFE7A
[B] pSRgPDH, pSRPDHH
[C] pSRgPDH, pSRPDHM
[D] pSRg7AH, pSRHH
[E] pSRg7AH, pSRHM
[F] pSRg7AH, pSRMM

第46圖


120
100
80
60
40
20
0
存活性(%)
0.1
1
10
100
人類IgG濃度(ng/ml)
[B] pSRgPDH, pSRPDHH
[C] pSRgPDH, pSRPDHM
[D] pSRg7AH, pSRHH
[E] pSRg7AH, pSRHM
[F] pSRg7AH, pSRMM

第47圖

526205

A6
B6

（由本局填寫）

承辦人代碼：
大　　類：
IPC分類：

本案已向：

日本　國（地區）　申請專利，申請日期：　　案號：　　，☑有　□無主張優先權

1997年4 月1 日特願平9-82953(主張優先權)
1997年6 月25日特願平9-169088(主張優先權)
1997年10月8 日特願平9-276064(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　民國 87 年 3 月 25 日　分別如下：

微生物名稱：	寄存號碼：
Mus Musculus HFE7A	CCRC 960078
E. Coli pME-L SANK 70297	CCRC 940201
E. Coli pME-H SANK 70197	CCRC 940202
E. Coli pHSGMM6 SANK 73697	CCRC 940203
E. Coli pHSGHM17 SANK 73597	CCRC 940204
E. Coli pHSGHH7 SANK 73497	CCRC 940205
E. Coli pg HSL7A62 SANK 73397	CCRC 940206
E. Coli pHSHM2 SANK 70198	CCRC 940207
E. Coli pg HPDHV3 SANK 70298	CCRC 940208
E. Coli pHSHH5 SANK 70398	CCRC 940209

（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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（52）

89年1月24日 修正補充

五個載有編碼造成本發明人型化抗-人類Fas抗體輕鏈可變區之DNA的轉形體菌株，即大腸桿菌pHSGMM6 SANK 73697、大腸桿菌 pHSGHM17 SANK 73597、大腸桿菌 pHSGHH7 SANK 73497、大腸桿菌 pHSGHM2 SANK 70198和大腸桿菌 pHSHH5 SANK 70398、及兩個載有編碼造成本發明人型化抗-Fas抗體重鏈可變區之DNA的轉形體菌株，即大腸桿菌 pgHSL7A62 SANk 73397和大腸桿菌 pgHPDHV3 SANK 70298為於1997年8月22日依據布達佩斯條約寄存於工業技術院生命工學工業技術研究所，且分別以登記號碼FERM BP-6071、FERM BP-6072、FERM BP-6073、FERM-6272和FERM-6274(輕鏈)、及FERM BP-6074和FERM BP-6273(輕鏈)將其記錄。此等轉形體菌株亦於1998年3月25日寄存於台灣之食品工業發展研究所菌種中心(CCRC)，且其寄存編號分別爲：

CCRC 960078 (融合瘤 Mus Musculus HFE7A)；

CCRC 940201 (大腸桿菌 E. Coli pME-L SANK 70297)；

CCRC 940202 (大腸桿菌 E. Coli pME-H SANK 70197)；

CCRC 940203 (大腸桿菌 E. Coli pHSGMM6 SANK 73697)；

CCRC 940204 (大腸桿菌 E. Coli pHSGHM17 SANK 73597)；

CCRC 940205 (大腸桿菌 E. Coli pHSGHH7 SANK 73497)；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

89年1月修正補充

五、發明說明（52a）

CCRC 940206（大腸桿菌 E. Coli pg HSL7A62 SANK 73397）；

CCRC 940207（大腸桿菌 E. Coli pHSHM2 SANK 70198）；

CCRC 940208（大腸桿菌 E. Coli pgHPDHV3 SANK 70298）；

CCRC 940209（大腸桿菌 E. Coli pHSHH5 SANK 70398）。

因此，編碼人型化抗-Fas抗體蛋白質各次單位之DNA，例如可經由此些寄存菌株離出質體、或使用寄存菌株之萃取物作爲模板進行PCR而取得。

高純度的重組抗-Fas抗體可依據上述方法輕易地以高產率製備。

爲了檢查上述製得之重組抗-Fas抗體專一地結合Fas，可依上述類似方式進行ELTSA，於免疫鼠中評估抗體效價。

HFE7A抗體，及本發明之人型化抗-Fas抗體具有下列a)至f)不同的官能性質，其各可例如依所述方法予以證明。

於表現Fas之T細胞中誘導細胞自滅。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

公告本

92.1.15 修正補充

六、申請專利範圍

第 87104806 號「抗 Fas 抗體」專利案

(92 年 1 月 15 日修正)

六、申請專利範圍：

1.一種抗體，其包含輕多肽鏈及重多肽鏈，該重鏈具式(I)結構：

$$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4- \quad (I)$$

其中

FRH_1 爲任何由 18 至 30 個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_1$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.2 所定義之序列：

Ser Tyr Trp Met Gln
1 5 ，

FRH_2 爲任何由 14 個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_2$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.3 所定義之序列：

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

FRH_3 爲任何由 32 個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_3$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.4 所定義之序列：

Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

FRH_4 爲任何由 11 個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合，

該輕鏈具有式(II)結構：

$$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4- \quad (II)$$

六、申請專利範圍

其中

FRL_1 爲任何由 23 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_1$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.5 所定義之序列：

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

FRL_2 爲任何由 15 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_2$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.6 所定義之序列：

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

FRL_3 爲任何由 32 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_3$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.7 所定義之序列：

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr
1 5

FRL_4 爲任何由 10 個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合。

2.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其爲免疫球蛋白 G 類型。

3.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其經人型化。

4.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其可於表現 Fas 之異常細胞中誘導細胞自滅，且可於正常細胞中抑制細胞自滅。

5.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其具有對於 Fas 抗原

A8
B8
C8
D8

六、申請專利範圍

之抗原決定基專一之抗原結合區，對抗原決定基爲在靈長類及非靈長類動物間被保留。

6. 如申請專利範圍第5項之抗體，其中靈長類爲人類。

7. 如申請專利範圍第5項之抗體，其中非靈長類爲齧齒動物。

8. 如申請專利範圍第7項之抗體，其中齧齒動物爲鼠。

9. 如申請專利範圍第5項之抗體，其中靈長類爲人類且非靈長類動物爲鼠。

10. 如申請專利範圍第1項之抗體，其具有對於保留、哺乳動物、Fas抗原決定基專一之抗原結合區。

11. 如申請專利範圍第1項之抗體，其具有至少六個抗體CDR，該抗體爲對於人類Fas專一，且該CDR與具有登記號碼CCRC960078之融合瘤HFE7A所產生之抗體的CDR具相同性。

12. 如申請專利範圍第1項之抗體，其具有抗原決定基結合區，該結合區對於由具有登記號碼CCRC-960078之融合瘤HFE7A所產生之抗體所辨識之抗原性決定區具有專一性。

13. 如申請專利範圍第11項之抗體，其可於表現Fas之異常細胞中誘導細胞自滅，且可於正常細胞中抑制細胞自滅。

14. 如申請專利範圍第1項之抗體，其具有對於靈長類及非靈長類動物間所保留之Fas抗原之抗原決定基專一

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

之抗原結合區，該抗體可經由令來自對該 Fas 抗原決定基專一之抗體的各別 CDR，移植至至少一個人類輕鏈或其斷片、及至少一個人類重鏈或其斷片中而取得。

15. 如申請專利範圍第 14 項之抗體，可取得 CDR 之抗體爲具有包括 CDR 之可變區，且其中該人類輕鏈和重鏈爲以其內所包括之可變區與該抗體可變區間之最接近相似性爲基礎而選出。

16. 如申請專利範圍第 14 項之抗體，其中來自可取得 CDR 抗體之抗原決定基辨識部位中所包括之骨架區之有意義胺基酸，亦被移植至該重鏈和輕鏈中，用以維持抗原決定基辨識部位中之構造。

17. 如申請專利範圍第 1 項之抗體，其結合至一種包括如下序列表 SEQ ID No.1 胺基酸序列之胜肽：

```
Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg Cys Lys
 1               5                  10
```

18. 如申請專利範圍第 1 項之抗體，其包括一種輕鏈多肽蛋白質獨立選自序列表 SEQ ID No.50 胺基酸序列 1 至 218：

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


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 45                  50                  55                  60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                 65                  70                  75
Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Ala Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
             80                  85                  90
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu
         95                 100                 105
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    110                 115                 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125                 130                 135                 140
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                145                 150                 155
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            160                 165                 170
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        175                 180                 185
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    190                 195                 200
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205                 210                 215
```

SEQ ID No.52胺基酸序列1至218：

```
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20                 -15                 -10                  -5
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                 1                   5                  10
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
            15                  20                  25
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
        30                  35                  40
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 45                  50                  55                  60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                 65                  70                  75
Leu Thr Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
             80                  85                  90
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu
         95                 100                 105
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    110                 115                 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125                 130                 135                 140
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                145                 150                 155
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            160                 165                 170
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        175                 180                 185
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    190                 195                 200
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205                 210                 215
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

SEQ ID No.54胺基酸序列1至218：

```
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20                 -15                 -10                  -5
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                  1                   5                  10
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
          15                  20                  25
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
      30                  35                  40
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
  45                  50                  55                  60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                  65                  70                  75
Leu Thr Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
              80                  85                  90
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu
          95                  100                 105
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
     110                 115                 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125                 130                 135                 140
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                  145                 150                 155
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
              160                 165                 170
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
          175                 180                 185
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
     190                 195                 200
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205                 210                 215
```

SEQ ID No.107胺基酸序列1至218：

```
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20                 -15                 -10                  -5
Gly Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                  1                   5                  10
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
          15                  20                  25
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
      30                  35                  40
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
  45                  50                  55                  60
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                  65                  70                  75

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
              80                  85                  90

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
          95                 100                 105

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
     110                 115                 120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125                 130                 135                 140

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                  145                 150                 155

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
              160                 165                 170

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
          175                 180                 185

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
     190                 195                 200

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 205                 210                 215
```

及 SEQ ID No.109 胺基酸序列 1 至 218：

```
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20                 -15                 -10                  -5

Gly Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                    1                   5                  10

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
          15                  20                  25

Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
     30                  35                  40

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 45                  50                  55                  60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                  65                  70                  75

Leu Thr Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
              80                  85                  90
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
          95                  100                 105

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
     110                 115                 120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125                 130                 135                 140

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                145                 150                 155

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            160                 165                 170

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        175                 180                 185

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    190                 195                 200

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205                 210                 215
```

19.如申請專利範圍第1項之抗體，其包括一種重鏈多肽蛋白質獨立選自序列表之SEQ ID No.89之胺基酸序列1至471：

```
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-19             -15                 -10                  -5
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
               1                   5                   10
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
      15                  20                  25
 Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
  30                  35                  40                  45
 Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
                  50                  55                  60
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser
              65                  70                  75
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
          80                  85                  90
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp
      95                  100                 105
 Val Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
110                 115                 120                 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
                 130                 135                 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
             145                 150                 155
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
        160                 165                 170
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
    175                 180                 185
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
190                 195                 200                 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
                210                 215                 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
            225                 230                 235
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        240                 245                 250
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    255                 260                 265
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
270                 275                 280                 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                290                 295                 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            305                 310                 315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        320                 325                 330
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    335                 340                 345
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
350                 355                 360                 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                370                 375                 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            385                 390                 395
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        400                 405                 410
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    415                 420                 425
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
430                 435                 440                 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                450
```

及 SEQ ID No.117 胺基酸序列 1 至 451：

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-19                 -15                 -10                  -5

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                1                   5                  10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
     15                  20                  25

Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 30                  35                  40                  45
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
                50                  55                  60

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser
            65                  70                  75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
        80                  85                  90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp
    95                  100                 105

Val Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
110                 115                 120                 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
                130                 135                 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
            145                 150                 155

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
        160                 165                 170

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
    175                 180                 185

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
190                 195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
                210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
            225                 230                 235

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        240                 245                 250

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    255                 260                 265

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
270                 275                 280                 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                290                 295                 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            305                 310                 315

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        320                 325                 330

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    335                 340                 345
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
350                 355                 360                 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                370                 375                 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            385                 390                 395

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        400                 405                 410

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    415                 420                 425

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
430                 435                 440                 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                450
```

20.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其包括一種輕鏈多肽蛋白質具有如申請專利範圍第 18 項中所示序列表之 SEQ ID No.50 之胺基酸序列 1 至 218 及一種重鏈多肽蛋白質具有如申請專利範圍第 19 項中所示之序列表之 SEQ ID No.89 之胺基酸序列 1 至 451。

21.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其包括一種輕鏈多肽蛋白質具有如申請專利範圍第 18 項所示之序列表之 SEQ ID No.107 之胺基酸序列 1 至 218，及一種重鏈多肽蛋白質具有如申請專利範圍第 19 項中所示之序列表之 SEQ ID No.117 之胺基酸序列 1 至 451。

六、申請專利範圍

22.一種由寄存號碼 CCRC 960078 之融合瘤 HFE7A 所產生之抗體，其包含輕多肽鏈及重多肽鏈，該重鏈具式(I)結構：

$$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4- \quad (I)$$

其中

FRH_1 爲任何由 18 至 30 個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_1$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.2 所定義之序列：

Ser Tyr Trp Met Gln
1 5 ，

FRH_2 爲任何由 14 個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_2$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.3 所定義之序列：

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

FRH_3 爲任何由 32 個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_3$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.4 所定義之序列：

Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

FRH_4 爲任何由 11 個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合，

該輕鏈具有式(II)結構：

六、申請專利範圍

$$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4- \quad (II)$$

其中

FRL_1 爲任何由 23 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_1$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.5 所定義之序列：

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

FRL_2 爲任何由 15 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_2$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.6 所定義之序列：

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

FRL_3 爲任何由 32 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_3$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.7 所定義之序列：

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr
1 5

FRL_4 爲任何由 10 個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合。

23.一種 DNA，其核苷酸序列係由選自序列表之 SEQ ID No.49 之核苷酸序列 100 至 753 所組成：

六、申請專利範圍

```
CCCAAGCTTA AGAAGCATCC TCTCATCTAG TTCTCAGAG ATG GAG ACA GAC ACA      54
                                           Met Glu Thr Asp Thr
                                           -20
ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGC TCC ACT GGT GAC    102
Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp
-15                 -10                 -5                  1
ATT GTG CTC ACC CAA TCT CCA GGT ACT TTG TCT CTG TCT CCA GGG GAG    150
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
               5                  10                  15
AGG GCC ACC CTC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT    198
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
         20                  25                  30
GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG GCA CCC AGA    246
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg

     35                  40                  45
CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTC GAA TCT GGG ATC CCA GAC AGG    294
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 50                  55                  60                  65
TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATC TCT CGT    342
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
                    70                  75                  80
CTG GAG CCG GCG GAT TTT GCA GTC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG    390
Leu Glu Pro Ala Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu
               85                  90                  95
GAT CCT CGG ACG TTC GGT CAA GGC ACC AGG CTG GAA ATC AAA CGG ACT    438
Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr
         100                 105                 110
GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG    486
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
    115                 120                 125
AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC    534
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130                 135                 140                 145
AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT    582
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                150                 155                 160
AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC    630
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
           165                 170                 175
AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC    678
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
         180                 185                 190
AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC    726
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    195                 200                 205
ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAGTAAGAAT TCGGG               768
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                 215
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

SEQ ID No.51之核苷酸序列100至753：

```
CCCAAGCTTA AGAAGCATCC TCTCATCTAG TTCTCAGAG ATG GAG ACA GAC ACA      54
                                          Met Glu Thr Asp Thr
                                          -20
ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGC TCC ACT GGT GAC    102
Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp
-15                 -10                 -5                  1
ATT GTG CTC ACC CAA TCT CCA GGT ACT TTG TCT CTG TCT CCA GGG GAG    150
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
               5                  10                  15
AGG GCC ACC CTC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT    198
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
          20                  25                  30
GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG GCA CCC AGA    246
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
      35                  40                  45
CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTC GAA TCT GGG ATC CCA GAC AGG    294
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 50                  55                  60                  65
TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATC CAT CCT    342
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His Pro
                 70                  75                  80
GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG    390
Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu
               85                  90                  95
GAT CCT CGG ACG TTC GGT CAA GGC ACC AGG CTG GAA ATC AAA CGG ACT    438
Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr
          100                 105                 110
GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG    486
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
      115                 120                 125
AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC    534
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130                 135                 140                 145
AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT    582
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                150                 155                 160
AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC    630
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            165                 170                 175
AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC    678
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
          180                 185                 190
AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC    726
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
      195                 200                 205
ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAGTAAGAAT TCGGG               768
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                 215
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

SEQ ID No.53之核苷酸序列100至753：

```
CCCAAGCTTA AGAAGCATCC TCTCATCTAG TTCTCAGAG ATG GAG ACA GAC ACA      54
                                           Met Glu Thr Asp Thr
                                           -20
ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGC TCC ACT GGT GAC    102
Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp
-15                 -10                 -5                  1
ATT GTG CTC ACC CAA TCT CCA GGT ACT TTG TCT CTG TCT CCA GGG GAG    150
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
              5                  10                  15
AGG GCC ACC CTC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT    198
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
          20                  25                  30
GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA    246
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
      35                  40                  45
CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTC GAA TCT GGG ATC CCA GAC AGG    294
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 50                  55                  60                  65
TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATC CAT CCT    342
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His Pro
                 70                  75                  80
GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG    390
Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu
             85                  90                  95
GAT CCT CGG ACG TTC GGT CAA GGC ACC AGG CTG GAA ATC AAA CGG ACT    438
Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr
         100                 105                 110
GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG    486
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
     115                 120                 125
AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC    534
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130                 135                 140                 145
AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT    582
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                150                 155                 160
AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC    630
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            165                 170                 175
AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC    678
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
        180                 185                 190
AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC    726
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    195                 200                 205
ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAGTAAGAAT TCGGG               768
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                 215
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

SEQ ID No.106之核苷酸序列100至753：

```
CCCAAGCTTA AGAAGCATCC TCTCATCTAG TTCTCAGAG ATG GAG ACA GAC ACA          54
                                          Met Glu Thr Asp Thr
                                          -20

ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGC TCC ACT GGT GAG         102
Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Glu
-15                 -10                 -5                  1

ATT GTG CTC ACC CAA TCT CCA GGT ACT TTG TCT CTG TCT CCA GGG GAG         150
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
              5                  10                  15

AGG GCC ACC CTC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT         198
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
          20                  25                  30

GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG GCA CCC AGA         246
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
      35                  40                  45

CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTC GAA TCT GGG ATC CCA GAC AGG         294
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 50                  55                  60                  65

TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATC TCT CGT         342
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
                 70                  75                  80

CTG GAG CCG GAG GAT TTT GCA GTC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG         390
Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu
             85                  90                  95

GAT CCT CGG ACG TTC GGT CAA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG ACT         438
Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
         100                 105                 110

GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG         486
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
     115                 120                 125

AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC         534
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130                 135                 140                 145

AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT         582
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                150                 155                 160

AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC         630
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            165                 170                 175
```


（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC      678
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
        180                 185                 190

AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC      726
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    195                 200                 205

ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAGTAAGAAT TCGGG                 768
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                 215
```

及 SEQ ID No.108之核苷酸序列100至753：

```
AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC      678
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
        180                 185                 190

AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC      726
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    195                 200                 205

ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAGTAAGAAT TCGGG                 768
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                 215
```

24.一種DNA，其核苷酸序列係由選自序列表之SEQ ID No.88之核苷酸序列84至2042所組成：

```
GGGCGAAAGC TTGGCTTGAC CTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC      53
                             Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe
                             -19             -15
TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCT CAG GTC CAA CTG GTG CAG      101
Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln
-10                 -5                  1                   5
TCT GGG GCT GAG GTC AAG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC      149
Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys
            10                  15                  20
AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAG TGG GTA AAA      197
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys
        25                  30                  35
CAG GCC CCT GGA CAG AGG CTT GAG TGG ATG GGA GAG ATT GAT CCT TCT      245
Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser
    40                  45                  50
GAT AGC TAT ACT AAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG      293
Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
55                  60                  65                  70
ACT GTA GAC ACA TCC GCT AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC CTG      341
Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
                75                  80                  85
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
AGA TCT GAG GAC ACG GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA AAT AGG GAC TAT     389
Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr
                 90                  95                 100
AGT AAC AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GAA GGG ACC CTG GTC ACC     437
Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr
         105                 110                 115
GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC     485
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
     120                 125                 130
TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC     533
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
135                 140                 145                 150
AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC     581
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
                155                 160                 165
CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA     629
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
            170                 175                 180
CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC     677
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
        185                 190                 195
ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG     725
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
    200                 205                 210
GTG GAC AAG AGA GTT GGTGAGAGGC CAGCACAGGG AGGGAGGGTG TCTGCTGGAA     780
Val Asp Lys Arg Val
215
GCCAGGCTCA GCGCTCCTGC CTGGACGCAT CCCGGCTATG CAGTCCCAGT CCAGGGCAGC   840
AAGGCAGGCC CCGTCTGCCT CTTCACCCGG AGGCCTCTGC CCGCCCCACT CATGCTCAGG   900
GAGAGGGTCT TCTGGCTTTT TCCCCAGGCT CTGGGCAGGC ACAGGCTAGG TGCCCCTAAC   960
CCAGGCCCTG CACACAAAGG GGCAGGTGCT GGGCTCAGAC CTGCCAAGAG CCATATCCGG  1020
GAGGACCCTG CCCCTGACCT AAGCCCACCC CAAAGGCCAA ACTCTCCACT CCCTCAGCTC  1080
GGACACCTTC TCTCCTCCCA GATTCCAGTA ACTCCCAATC TTCTCTCTGC A GAG CCC   1137
                                                        Glu Pro
                                                        220
AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAGCCAG      1186
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            225                 230

CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG  1246
GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCCTCA GCA CCT GAA    1303
                                                    Ala Pro Glu
                                                    235
CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC     1351
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        240                 245                 250
ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC     1399
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    255                 260                 265
GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC     1447
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
270                 275                 280                 285
GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC     1495
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                290                 295                 300
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG   1543
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            305                 310                 315
CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA   1591
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        320                 325                 330
GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG 1644
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
    335                 340
AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC 1704
CAACCTCTGT CCCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG     1754
                  Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                  345                 350                 355
CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC   1802
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
                360                 365                 370
CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC   1850
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
            375                 380                 385
AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC   1898
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
        390                 395                 400
TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC   1946
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
    405                 410                 415
AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT   1994
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420                 425                 430                 435
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA   2042
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                440                 445                 450
TGAGTGCGAC GGCCGGCAAG CCCCGCTCCC GAATT                           2077
```

及 SEQ ID No.116之核苷酸序列84至2042：

```
AAGCTTGGCT TGACCTCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG      50
                      Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu
                      -19             -15                 -10

GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCT CAG GTC CAA CTG GTG CAG TCT    98
Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser
                -5                  1               5

GGG GCT GAG GTC AAG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG   146
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
        10                  15                  20

GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAG TGG GTA AAA CAG   194
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln
    25                  30                  35
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
GCC CCT GGA CAG GGC CTT GAG TGG ATG GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAT        242
Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp
 40                  45                  50                  55

AGC TAT ACT AAC TAC AAT CAA AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT        290
Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
                 60                  65                  70

GTA GAC ACA TCC ACT AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC CTG AGA        338
Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
             75                  80                  85

TCT GAG GAC ACG GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA AAT AGG GAC TAT AGT        386
Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser
         90                  95                 100

AAC AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GAA GGG ACC CTG GTC ACC GTC        434
Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val
     105                 110                 115

TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC        482
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
120                 125                 130                 135

TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG        530
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                140                 145                 150

GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG        578
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
            155                 160                 165

ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC        626
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
        170                 175                 180

TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC        674
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    185                 190                 195

CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG        722
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

200                 205                 210                 215

GAC AAG AGA GTT GGTGAGAGGC CAGCACAGGG AGGGAGGGTG TCTGCTGGAA            774
Asp Lys Arg Val


GCCAGGCTCA GCGCTCCTGC CTGGACGCAT CCCGGCTATG CAGTCCCAGT CCAGGGCAGC      834

AAGGCAGGCC CCGTCTGCCT CTTCACCCGG AGGCCTCTGC CCGCCCCACT CATGCTCAGG      894

GAGAGGGTCT TCTGGCTTTT TCCCCAGGCT CTGGGCAGGC ACAGGCTAGG TGCCCCTAAC      954
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
CCAGGCCCTG CACACAAAGG GGCAGGTGCT GGGCTCAGAC CTGCCAAGAG CCATATCCGG     1014

GAGGACCCTG CCCCTGACCT AAGCCCACCC CAAAGGCCAA ACTCTCCACT CCCTCAGCTC     1074

GGACACCTTC TCTCCTCCCA GATTCCAGTA ACTCCCAATC TTCTCTCTGC A GAG CCC      1131
                                                          Glu Pro
                                                          220

AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAGCCAG        1180
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            225                 230

CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG     1240

GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCCTCA GCA CCT GAA       1297
                                                    Ala Pro Glu
                                                    235

CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC        1345
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        240                 245                 250

ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC        1393
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    255                 260                 265

GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC        1441
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
270                 275                 280                 285

GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC        1489
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                290                 295                 300

AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG        1537
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            305                 310                 315

CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA        1585
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        320                 325                 330

GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG     1638
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
    335                 340

AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC     1698

CAACCTCTGT CCCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG         1748
                  Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                  345                 350                 355
```


經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

```
CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC      1796
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
                360                 365                 370

CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC      1844
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
            375                 380                 385

AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC      1892
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
        390                 395                 400

TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC      1940
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
    405                 410                 415

AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT      1988
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420                 425                 430                 435

CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA      2036
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                440                 445                 450

TGAGTGCGAC GGCCGGCAAG CCCCGCTCCC GAATT                               2071
```

25.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1 項之抗體作爲活性成分。

26.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1 項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲選自自體免疫疾病、過敏、特異反應性、動脈硬化、心肌炎、心肌病、血管球腎炎、發育不全貧血、肝炎、後天免疫不全症候群及器官移植後之排斥。

27.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1

六、申請專利範圍

項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲一種自體免疫疾病選自全身紅斑性狼瘡、橋本氏病、風濕性關節炎、移植物對宿主疾病、謝格連氏症候群、惡性貧血、阿狹孫氏病、皮硬化、克德帕斯茄氏症候群、克隆氏病、自體免疫溶血性貧血、不孕症、重症肌無力、多發性硬化、巴塞杜氏症、血小板減少性紫癜病、和胰島素依賴性糖尿病。

28.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1 項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲過敏。

29.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1 項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲風濕性關節炎。

30.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1 項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲動脈硬化。

31.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1 項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲選自心肌炎和心肌病。

32.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1

六、申請專利範圍

項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲血管球腎炎。

33.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1 項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲發育不全貧血。

34.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1 項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲肝炎。

35.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1 項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲選自暴發性肝炎、慢性肝炎、病毒性肝炎、C 型肝炎、B 型肝炎、D 型肝炎和醇毒性肝炎。

36.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之醫藥組合物，其包括以如申請專利範圍第 1 項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲器官移植後之排斥。

37.一種治療或預防歸因於 Fas／Fas 配位體系統異常狀況之藥劑，其包括以如申請專利範圍第 1 項之抗體作爲活性成分，其中該狀況爲後天性免疫不全症候群。

38.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其具有選自下列之一種性質：

六、申請專利範圍

於表現 Fas 之 T 細胞中誘發細胞自滅；

減輕 MRL gld/gld 鼠之自體免疫症狀；

不會誘發肝病；

於暴發性肝炎上之治療或預防功效：

於膠原所誘發之關節炎之開始上的預防功效；

於來自風濕性關節炎患者之滑液細胞中誘發細胞自滅。

39.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其具有下列性質：

於表現 Fas 之 T 細胞中誘發細胞自滅；

減輕 MRL gld/gld 鼠之自體免疫症狀；

不會誘發肝病；

於暴發性肝炎上之治療或預防功效：

於膠原所誘發之關節炎之開始上的預防功效；

於來自風濕性關節炎患者之滑液細胞中誘發細胞自滅。

40.一種具有對於 Fas 抗原之抗原決定基專一之抗原結合區之抗體的製法，其中該抗體，包含輕多肽鏈及重多肽鏈，該重鏈具式(I)結構：

$$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4- \quad (I)$$

其中

FRH_1 爲任何由 18 至 30 個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_1$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.2 所定義之序列：

Ser Tyr Trp Met Gln

1 5 ，

六、申請專利範圍

FRH_2 爲任何由 14 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRH_2$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.3 所定義之序列：

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

FRH_3 爲任何由 32 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRH_3$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.4 所定義之序列：

Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

FRH_4 爲任何由 11 個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合，

該輕鏈具有式(II)結構：

$$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4- \quad (II)$$

其中

FRL_1 爲任何由 23 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_1$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.5 所定義之序列：

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

FRL_2 爲任何由 15 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_2$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.6 所定義之序列：

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

FRL_3 爲任何由 32 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_3$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.7 所定義之序列：

六、申請專利範圍

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr
1 5

FRL_4 爲任何由 10 個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合，該方法包括培養具有登記號碼 CCRC 960078 之融合瘤 HFE7A，並收集其表現抗體。

41.一種抗體之製法，該抗體包含輕多肽鏈及重多肽鏈，該重鏈具式(I)結構：

$$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4- \quad (I)$$

其中

FRH_1 爲任何由 18 至 30 個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_1$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.2 所定義之序列：

Ser Tyr Trp Met Gln
1 5 ，

FRH_2 爲任何由 14 個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_2$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.3 所定義之序列：

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

FRH_3 爲任何由 32 個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRH_3$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.4 所定義之序列：

Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

FRH_4 爲任何由 11 個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合，該輕鏈具有式(II)

六、申請專利範圍

結構：

$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4-$ (II)

其中

FRL_1 爲任何由 23 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_1$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.5 所定義之序列：

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

FRL_2 爲任何由 15 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_2$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.6 所定義之序列：

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

FRL_3 爲任何由 32 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_3$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.7 所定義之序列：

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr
1 5

FRL_4 爲任何由 10 個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合，該方法包括培養具有登記號碼 CCRC 960078 之融合瘤 HFE7A，並收集其表現抗體。

42.一種多肽，其包含輕多肽鏈及重多肽鏈，該重鏈具式(I)結構：

$-FRH_1-CDRH_1-FRH_2-CDRH_2-FRH_3-CDRH_3-FRH_4-$ (I)

其中

FRH_1 爲任何由 18 至 30 個胺基酸所組成之胺基酸序列

六、申請專利範圍

，$CDRH_1$為如下序列表之 SEQ ID NO.2 所定義之序列：

Ser Tyr Trp Met Gln
1 5 ，

FRH_2為任何由 14 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRH_2$為如下序列表之 SEQ ID NO.3 所定義之序列：

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

FRH_3為任何由 32 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRH_3$為如下序列表之 SEQ ID NO.4 所定義之序列：

Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

FRH_4為任何由 11 個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合，

該輕鏈具有式(II)結構：

$$-FRL_1-CDRL_1-FRL_2-CDRL_2-FRL_3-CDRL_3-FRL_4- \quad (II)$$

其中

FRL_1為任何由 23 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_1$為如下序列表之 SEQ ID NO.5 所定義之序列：

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

FRL_2為任何由 15 個胺基酸所組成之胺基酸序列，

$CDRL_2$為如下序列表之 SEQ ID NO.6 所定義之序列：

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

六、申請專利範圍

FRL_3 爲任何由 32 個胺基酸所組成之胺基酸序列，$CDRL_3$ 爲如下序列表之 SEQ ID NO.7 所定義之序列：

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr
1 5

FRL_4 爲任何由 10 個胺基酸所組成之胺基酸序列，且各胺基酸經由胜肽鍵彼此結合，其係產自轉形之大腸桿菌選自大腸桿菌 pHSGMM6 SANK 73697(CCRC 940203)大腸桿菌 pHSGHM17 SANK73597(CCRC 940204)，大腸桿菌 pHSGHH7 SANK73497(CCRC940205)，大腸桿菌 pHSHM2 SANK 70198(CCRC 940207)，大腸桿菌 pHSHH5 SANK 70398(CCRC 940209)，大腸桿菌 pgHSL7A62 SANK73397(CCRC 940206)及大腸桿菌 pgHPDHV3 SANK 70298(CCRC 940208)。