



## 五、發明說明 ( 1 )

本發明係關於具有對間白素-13 (IL-13)具專一受體活性之純化多肽類，其生物學上具活性之片段，與相對應之核酸序列，以及其應用。

IL-13為最近經鑑定(1,2)具有112個胺基酸，由經活化T淋巴細胞，B淋巴細胞與於活化作用後之肥胖細胞所分泌之細胞活素。

由於其與IL-4共同具有許多生物學性質，IL-13已摘述為一種類-IL-4細胞活素。其活性的確與IL-4於B細胞(3-5)，單核細胞(6-10)及其他非-造血細胞(11-12)上之作用相似。另一方面，與IL-4相反地，其對休眠狀態或經活化T細胞具有特別之功效(13)。

IL-13對單核細胞/巨噬細胞，B淋巴細胞與特定造血先驅物之各種生物學活性，已詳述於A. J.明提(Minty)，以及IL-13之回顧文章中(參見，例如實施例14)。又，有些數據指出，此細胞活素對其他類細胞具有多向性之功效。此等直接受IL-13影響之非造血細胞為內皮與小神經膠質細胞，角質細胞及腎與結腸癌細胞。

IL-13之抗發炎與免疫調節活性可用於，例如，治療自體免疫，腫瘤及病毒病理學上。

然而，此等生物學性質於臨床層次上之利用，需要有關此等作用運作時所憑藉之訊號與機制的完整知識，使得能夠在相關病理學上控制及調整它們。

## 五、發明說明 ( 2 )

於對由細胞內生物分子所傳遞之訊號的分析中，其中階段之一包含鑑定其膜上受體。該等對IL-13受體所完成之最終研究顯示，IL-13與IL-4具有同一受體，或至少為某些相同受體複合物之組成，以及同一訊號傳導物質(15-18)。此受體表現於各類細胞之表面，其數量根據所認定之細胞類型而變。A. J.明提(14)已指出IL-13與IL-4受體之比較性分佈。

康朵(Kondo)等人(19)已描述具有對IL-4高親和性之受體的結構。此受體為一種二聚體，藉由具140 kDa之糖蛋白(IL-4R)與IL-2受體的 $\gamma$ 鏈( $\gamma c$ )之結合而形成。IL-4可以高親和性(Kd介於50至100 pM)與具140 kDa之糖蛋白次單位(IL-4R或gp 140)結合(15)。然而，此親和性當 $\gamma c$ 鏈與gp 140結合時，可增加2至3倍。此外，此結合係藉由IL-4居間參與之特定訊號傳遞所必需(19, 20)。

與IL-13或與IL-4結合之交叉-競爭實驗已證實，IL-4可正常地阻止IL-13之結合，而IL-13通常僅部份地阻止IL-4與其受體結合(17, 21)且無法與IL-4兩次單位之任一者結合，或與藉由此二者之聯合而形成的複合體結合。基於此等觀察，本發明之作者假定對IL-13具專一性之受體係由IL-4與另一IL-13-結合組成(IL-13R $\beta$ )聯合之受體複合體組成。

於能夠反應IL-13及IL-14(TF-1系)而增生之紅白血病細胞系上所進行之研究顯示，此兩種細胞活素在與其受體結合

## 五、發明說明 ( 3 )

後產生相似的細胞內反應(18)。相似地，交聯實驗顯示gp 140可與 $\gamma$ 鏈，或與新穎次單位(具有分子量55至70 kDa)形成雜二聚體(17, 21)。

又，最近於老鼠胚幹細胞系上所進行之研究，已可分離出編碼具424胺基酸殘基之多肽(IL-13R $\alpha$ )的基因組DNA與cDNA，其暗示IL-13受體與IL-4受體共用同一鏈，而使能構築高親和性之受體(22, 23)，也就是說，其具有常數Kd值介於約10 pM與100 pM之間的親和性(低-親和性受體具有常數Kd值介於2nM至10 nM之間)。

於醫學層級上，由於詳細了解IL-4及IL-13之現象與調節作用，且尤其係能夠分開並各別控制由此二種細胞活素所產生之作用而賦予之重要性，是以本發明作者一方面有興趣於對IL-13高親和性而專一結合之多肽的特徵化，以及另一方面有興趣於另一種單獨時以低親和性與IL-13專一結合，而若與IL-4受體聯合時，即構築成對IL-13具高親和性之受體的多肽之特徵化。

此等作者現已鑑定出一種以高於其他已知人類腎癌細胞系(21)之量表現對IL-13具專一性受體之人類癌細胞系，且已完成可對IL-13與IL-4/IL-13受體之結合(稱為IL-13R $\beta$ )具反應之主要次單位的選殖，以及由IL-13受體與IL-4受體所共有，以構成能使該2細胞活素之間產生交叉競爭作用之共同鏈(稱為IL-13R $\alpha$ )之選殖。因此本發明關於經純化專

## 五、發明說明 ( 4 )

一地與IL-13鍵聯之多肽。

更特別地，本發明之標的物為其胺基酸序列對應於對IL-13具專一性受體(IL-13R $\beta$ 及IL-13R $\alpha$ )之胺基酸序列的經純化多肽，或其生物學上具活性片段。

本發明之標的物亦為編碼該多肽或其生物學上具活性片段之經分離DNA序列。

此外，其關於含有至少一種如上所定義之核苷酸序列的表現載體，及以此等表現載體於可令該等核苷酸複製及/或表現之條件下轉感染之宿主細胞。

用以藉由經轉感染之宿主細胞製造重組型IL-13R $\beta$ 與IL-13R $\alpha$ 或其生物學上具活性片段之方法，亦為本發明之一部分。

本發明亦包含，調節由IL-13所產生之免疫學上或發炎機制之醫藥組合物，其包含IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 或其生物學上具活性之片段。此外，其關於用以鑑定能夠調節IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 活性之試劑的方法，以及IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 或其片段用以篩選此等試劑，與用以製造能夠調整IL-13受體活性之新穎產品的用途。

本發明亦包含對IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 具專一性之抗體或控體衍生物。

最後，其關於用以調節由IL-13居間參與之免疫反應的治療方法，其包含對患者投藥一種IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 或其

## 五、發明說明 ( 5 )

生物學上具活性片段，或一種能夠專一地調節此受體活性之化合物，與醫藥上可接受載體之組合物。

於以下本發明之說明中，使用下列定義：

— 以高親和性專一與IL-13結合之多肽(IL-13R $\beta$ )：一種包含胺基酸序列SEQ ID No. 2之多肽，或其任一生物學上具活性之片段或衍生物；

— 單獨時以低親和性與IL-13專一結合，而若與IL-4受體聯合時，即構築成對IL-13具有高親和性之受體的多肽(IL-13R $\alpha$ )：一種包含胺基酸序列SEQ ID No. 4之多肽，或其任一生物學上具活性之片段；

— 生物學上具活性：能夠專一地與IL-13結合及/或於細胞膜層級上參與由IL-13特別產生之訊號傳導作用，且/或能夠與對IL-4具專一性之受體(IL-4R/gp 140)交互反應，以形成能夠與IL-4及IL-13結合之複合物，且/或其係被專一於具序列SEQ ID No. 2及/或具序列SEQ ID No. 4之多肽的抗體辨識，且/或能夠誘發辨認具序列SEQ ID No. 2及/或序列SEQ ID No. 4之多肽的抗體產生；

— 衍生物：任何為具序列SEQ ID No. 2及/或序列SEQ ID No. 4之多肽變異體之多肽，或任何由序列SEQ ID No. 2或序列SEQ ID No. 4之遺傳及/或化學特性上之修飾而產生之分子，即，任何藉由突變，缺失，加入，取代作用及/或一或限定數量胺基酸之化學修飾而得之分子，以及任何同型

## 五、發明說明 ( 6 )

序列，即，與序列 SEQ ID No. 2 或與序列 SEQ ID No. 4 相同，與其任一片段或與其任一經修飾序列相同，含有一或多個以 D 鏡像異構物形式之胺基酸的序列，具有固有至少一種使其具生物學上活性之性質的該變異體，經修飾或同型序列。

本發明之標的物為一種包含選自下列胺基酸序列之經純化多肽：

- a) 序列 SEQ ID No. 2 或序列 SEQ ID No. 4，
- b) 任何根據上述所給予定義，衍生自 SEQ ID No. 2 或 SEQ ID No. 4 之生物學上具活性序列。

衍生物之製造可能具有各種不同之目的，特別包括增加對 IL-13 之受體親和性，改變 IL-13 與 IL-4 間之交叉競爭作用，增進其產量，增加其對蛋白質酶之抗性，改變其生物活性或確定其所具之新穎醫藥及/或生物性質。

於如上所述多肽之具生物活性變異體中，以藉由交替修剪編碼上述其一胺基酸序列之基因的轉錄物(訊息者 RNA) 所產生之片段為較佳。

於有利之變異體中，係將具序列 SEQ ID No. 2 之多肽的 8 個 C-末端胺基酸，以下列 6 個胺基酸取代：VRCVTL。

根據另一有利方面，本發明關於一種可溶形式之 IL-13R $\beta$ ，稱為 IL-13R $\beta$ s，其特別包含延展至殘基 343 且較佳延展至殘基 337 之具序列 SEQ ID No. 2 多肽之細胞外區域，以

## 五、發明說明 ( 7 )

及一種可溶形式之IL-13R $\alpha$ ，稱為IL-13R $\alpha$ s，其特別包含延伸至殘基336且較佳延伸至殘基336及342之間之具序列SEQ ID No. 4多肽之細胞外區域。

包含序列SEQ ID No. 2或序列SEQ ID No. 4的多肽，代表本發明之特別具體實施例。如實施例所示，此多肽可於人類細胞膜上表現，以形成具功能性之IL-13受體且/或與IL-4受體組合而形成(與IL-2受體之 $\gamma$ 鏈) IL-4與IL-13共有之受體複合物。

本發明之標的物亦為選自下列之經分離核酸序列：

- a) 序列SEQ ID No. 1，
- b) 序列SEQ ID No. 3，
- c) 能夠與序列SEQ ID No. 1或序列SEQ ID No. 3雜交，或與其互補序列雜交且能編碼具有IL-13受體活性之多肽，或令具有對IL-13及IL-4具高親和性之受體重建之核酸序列，
- d) 因為遺傳密碼子簡併性而衍生自序列a)與b)與c)之核酸序列。

更特別地，本發明之標的物為編碼IL-13R $\beta$ 或IL-13R $\alpha$ 之可溶部分，及任何由交替修剪IL-13R $\beta$ 或IL-13R $\alpha$ 之轉錄物，固有至少一種上述生物特性之變異體的序列。

較佳之具體實施例係以包含或由自核苷酸No. 1延伸至核苷酸1081，且較佳地至序列SEQ ID No. 1中第1063核苷酸之延伸物組成之核酸序列代表。

## 五、發明說明 ( 8 )

另一較佳具體實施例係以包含或由自核苷酸 No. 1 延伸至核苷酸 No. 1059，且較佳地至序列 SEQ ID No. 3 中第 1041 與 1056 號之間之延伸物組成之核酸序列代表。

有利地，根據本發明之核酸序列為編碼與成熟形 IL-13R $\beta$  或 IL-13R $\alpha$  相當之蛋白質的序列，此成熟蛋白質為釋放訊號多肽後之結果。

本發明之各種核苷酸序列，可為人造來源或其他。其可為藉由以基於序列 SEQ ID No. 1 或序列 SEQ ID No. 3 製造之探針，篩選序列庫而獲得之 DNA 或 RNA 序列。此等序列庫可藉習於該項技藝人士所知之習用分子生物技術製備得。

根據本發明之核苷酸序列亦可藉由化學合成，或另外藉由包括化學或以酵素修飾經由篩選序列庫得之序列的方法組合而製備得。

此等核苷酸序列可使能製備，編碼根據本發明之多肽及其生物學上具活性片段之核苷酸探針。適當之雜交條件相當於熟習該項技藝人士所慣用之溫度與離子強度條件，較佳地相當於介於  $T_m-5^\circ\text{C}$  與  $T_m-30^\circ\text{C}$  間，且更佳地介於  $T_m-5^\circ\text{C}$  與  $T_m-10^\circ\text{C}$  (高迫切性) 間之溫度條件， $T_m$  為熔解溫度，定義為 50% 鹼基配對股分離時之溫度。此等探針亦屬本發明之部分。其可使用作為用以藉雜交實驗，測定對存在生物樣品中本發明多肽具專一性之轉錄物，或測定因多樣性，因突變或因微弱接合造成之變異體合成或基因異常的活體

## 五、發明說明 ( 9 )

外診斷工具。

本發明之探針包含至少10個核苷酸，且包含至多完整的核苷酸序列SEQ ID No. 1或完整的核苷酸序列SEQ ID No. 3或其互補股。

在最短之探針中(即，約10至15個核苷酸)，適當之雜交條件相當於習於該項技藝人士所慣常使用之溫度與離子強度條件。

較佳地，本發明之探針係於使用之前先行標定。為此，包含數種習於該項技藝人士可使用之技術，例如螢光，放射性，化學發光或酵素標定。

活體外診斷方法，其中此等核苷酸探針係用於偵測變異體合成或基因異常，例如於編碼IL-13受體多肽或具生物學活性片段之核酸序列層次上之雜合性喪失及基因重排，係包含於本發明中。此類方法包含：

一使本發明之核苷酸探針與生物樣本，於能使該探針與上述核苷酸序列之間形成雜交複合物之條件下接觸，視需要於預先之上述核苷酸序列的擴大步驟後進行；

一偵測所可能形成之雜交複合物；

一視需要地，將與根據本發明探針形成雜交複合物之核苷酸序列定序。

此外，本發明之cDNA探針可有利地用於偵測染色體異常。

## 五、發明說明 ( 10 )

本發明之核苷酸序列亦可用於製造及使用作為定序反應或根據所謂PCR (聚合酶鏈反應) 技術或任何其變異形式之特定擴大反應之有義及/或反義寡核苷酸引子。

又，根據本發明之核苷酸序列於治療領域上，具有用於製備能特定與包括訊息者RNA之核酸序列雜交的反義序列，且可用於基因療法。因此本發明之標的物為能夠抑制(至少部分地)如上所述IL-13受體多肽產生的反義序列。此等序列有利地係由於轉錄物層級上構成編碼IL-13R $\beta$ 或IL-13R $\alpha$ 之讀框者組成。

其可更特別地用於治療過敏及發炎病症。

又，根據本發明之核苷酸序列，可用於製造具有IL-13受體活性之重組型多肽(如上所定義)。

此等多肽可從如上所定義之核苷酸序列，根據習於該項技藝已知用於製造重組型產物之技術而製得。於此案例中，所使用之核苷酸序列係置於使其能在細胞宿主內表現之訊號的控制下。所使用之細胞宿主可選自原核系統，如細菌，或選自真核系統，如酵母菌，昆蟲細胞，CHO細胞(中國倉鼠卵巢細胞)或任何有利地自商業上可得之其他系統。較佳用於表現本發明多肽之細胞宿主係由纖維母細胞系COS-7或COS-3組成。

控制多肽表現之訊號，例如啟動子，活化子或終結序列，係依所使用之細胞宿主而選擇。為此，根據本發明之

## 五、發明說明 ( 11 )

核苷酸序列可插入所選宿主中之自行複製之載體，或所選宿主之整合載體中。此等載體係根據習於該項技藝人士慣用之方法製備，且所得之純系可藉由標準方法，例如電穿透作用導入適當的宿主內。

含有至少一種如上所定義核苷酸序列之表現載體，亦為本發明之一部分。

在COS-7或COS-3細胞之例子中，轉染作用可使用載體pSE-1來完成，如(17)中所述。

此外，本發明亦關於經此等表現載體轉感染之宿主細胞。此等細胞可藉將插入至如上所定義載體中之核苷酸序列導入宿主細胞，接著將該細胞於使該等經轉感染之核苷酸序列複製及/或表現之條件下培養而獲得。

此等細胞可用於製造具序列SEQ ID No. 2或SEQ ID No. 4之重組型多肽或衍生物之方法中，該方法本身包含於本發明範圍內，且其特徵在於將經轉感染之細胞於使具序列SEQ ID No. 2或SEQ ID No. 4之多肽或衍生物表現之條件下培養，及在於將該重組型多肽回收。

所使用之純化方法係習於該項技藝人士已知者。重組型多肽可藉由各別或組合使用諸如分餾，層析方法，使用特殊專一性單株或多株抗體之免疫親和性技術等方法，自細胞溶胞產物及萃取物，自培養上清液中純化得。

可專一辨識上述根據本發明之IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 之單

## 五、發明說明 ( 12 )

一或多株抗體，亦為本發明之一部分。多株抗體可自經根據習用方法免疫對抗 IL-13R $\beta$ 及 / 或 IL-13R $\alpha$ 之動物的血清獲得。

單株抗體可根據由庫勒(Kohler)與米爾斯坦(Milstein)(自然, 1975, 256, 495-497)所述, 習知之融合瘤培養方法獲得。

有利之抗體為直接對抗 IL-13R $\beta$ 及 / 或 IL-13R $\alpha$ 細胞外區域之抗體。

根據本發明之抗體為, 例如, 嵌合型抗體, 人類化(humanized)抗體, Fab與F(ab')<sub>2</sub>片段。其亦可以已標定抗體或免疫共軛物之形式存在。例如, 其可與毒素, 例如白喉毒素或與放射性產品聯合。此等免疫毒素於此情形下可構成可用於治療特定涉及過度表現 IL-13R $\beta$ 及 / 或 IL-13R $\alpha$ 之病理的治療劑。

本發明之抗體, 特別是單株抗體, 亦可例如, 藉由免疫螢光或藉由金粒子或過氧化酶標定, 用於特殊組織切片上 IL-13受體之免疫化學分析。

其亦可有利地用於任何需要觀察 IL-13R $\beta$ 及 / 或 IL-13R $\alpha$ 表現之情況中, 例如異常過度表現, 或偵測膜表現之調節作用。

本發明因此亦關於一種用以於可能含有以異常程度表現之 IL-13R $\beta$ 及 / 或 IL-13R $\alpha$ 之生物樣本中, 活體外診斷與 IL-

## 五、發明說明 ( 13 )

IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 異常表現相關病理之方法，其特徵在於將至少一種根據本發明之抗體與上述生物樣本，於使IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 與上述抗體之間可能形成免疫複合物，且於其中偵測所可能形成之專一特定免疫複合物的條件下接觸。

本發明亦關於用以於活體外診斷生物樣本中IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 之異常表現，及/或用以測量IL-13受體於該樣本中之表現程度的套組，其包含：—

- 至少一種對IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 專一之抗體或抗體，視需要接附於支持物上，
- 用以顯示IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 與該抗體之間專一形成抗原/抗體複合物，及/或定量此等複合物之裝置。

本發明之另一標的物係關於用以鑑定及/或分離專一於IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 或能調節其活性之配位體的方法，其特徵在於將視需要未經鑑定之化合物或含有各種化合物之混合物，與其表面上表現IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 之細胞，於使IL-13受體和上述化合物交互作用之條件下接觸，於後者對受體具親和性，及該等化合物與IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ ，或其他能夠調節其生物活性者結合之情形下，將彼等探出並/或分離。

於特別之具體實施例中，本發明此方法適用於鑑定及/或分離IL-13對其IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 受體之促動劑與拮抗

## 五、發明說明 ( 14 )

劑。

本發明亦包括包含相當於前述定義之多肽，作為活性成份(較佳以可溶形式存在)，以及醫藥上可接受載體的醫藥組合物。

此類多肽可能確實作用於與表現於細胞表面之IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ 競爭，並因此構成一種對IL-13與其受體結合具專一性之拮抗劑，其可有利地用於合成欲調節於病理狀態中由IL-13居間參與之反應的醫藥產品。

最後，本發明包含一種用以治療與由IL-13居間參與之免疫反應相關聯病況的方法，其包含將IL-13R $\beta$ 及/或IL-13R $\alpha$ (或其生物學上具活性之片段)，或將能夠專一調節其活性之化合物，與醫藥上可接受載體組合投藥予病患。

本發明之其他特徵與有利處，將以實施例與圖示呈現於發明說明之其餘敘述中，其說明表示於下。

## 圖示說明

一圖1：存在Caki-1細胞中之人類IL-13R $\beta$ 受體的特徵化。

a) 經 [ $^{125}$ I]標定之IL-13的飽和曲線史考恰得(Scatchard)分析(插圖)；

b) 於漸增濃度之未經標定IL-13 (·)與IL-4 (o)存在下， [ $^{125}$ I][Phe43]-IL-13-GlyTyrGlyTyr之結合；

## 五、發明說明 ( 15 )

- c) 使用放射性 IL-13 於無 (a 行) 與有一百倍過量之未經標定 IL-13 (b 行) 或 IL-4 (c 行) 存在下之交聯實驗；
- d) 由 IL-13 與 IL-4 誘發，於對 IL-4R 鏈專一之單株抗體及 IL-4 拮抗劑 Y124DIL-4 存在下，IL-6 分泌之抑制作用。

— 圖 2：IL-13R $\beta$  之 cDNA 的核苷酸序列，及 IL-5R 與 IL-13R $\beta$  之蛋白質序列比較。

a) IL-13R $\beta$  之 cDNA 的核苷酸序列。對應於經推論為核酸序列訊號肽之胺基酸係以斜體字表示，而對應於穿膜區者係以粗體字表示。有功效之 N-糖苷化位置 (Asn-X-Ser/Thr)，其下標示橫線；

b) 列示 IL-13R $\beta$  之 IL-5R 序列之胺基酸。IL-13R 及 IL-5R 之蛋白質序列係如上所述排列 (24)。為此類蛋白質家族特徵之半胱胺酸殘基與 WSXWS 主要部位係以框線表示。

— 圖 3：IL-13R $\beta$  mRNA 之表現型式。

該 RNA 係自下列細胞製備得：Caki-1 (a 行)，A431 (b 行)，TF-1 (c 行)，U937 (d 行)，Jurkat (e 行) 及 IM9 (f 行)。

— 圖 4：對 IL-13 之重組型 IL-13R $\beta$  受體之特徵化。COS-7 細胞係以 IL-13R $\beta$  cDNA 轉感染並用於：

- a) 藉由飽和曲線之史考恰得分析研究經放射性標定 IL-13 的結合 (插圖)；
- b) 使用放射性標定的 IL-13 於無 (a 行) 或有一百倍過量之未經標定 IL-13 存在下 (b 行) 進行之交聯實驗；

## 五、發明說明 ( 16 )

c-d) 使用經選殖之 IL-13R $\beta$ , IL-4R (gp140)與  $\gamma$ c 鏈進行之共轉感染實驗, 接著經放射性標定 IL-13 (c)或 IL-4 (d)之結合分析。黑色與白色柱形分別代表 IL-13及 IL-4之專一性結合。

— 圖 5: 藉由以短暫表現之可溶形受體 (IL-13R $\beta$ s)對 IL-13與 IL-13R $\beta$ 之結合的抑制作用。

IL-13R $\beta$ s於經 2034轉感染之細胞上清液中的表現, 係藉由 IL-13結合至經 IL-13R $\beta$  (2036)轉感染之細胞的抑制作用測試得。上清液係以藉將其於經碘化之配位體中稀釋一半之粗製狀態進行測試。

2036 NSB: 於過量未經標定 IL-13存在下之非專一性結合。

2036 BT: 於經 2036轉感染細胞上之總結合量。

2036 + sgt 2034: 於經 2034轉感染之細胞上清液存在下, 與經 2036轉感染之細胞的結合。

2036 + sgt pSEI: 對照組。

— 圖 6: 藉由穩定純系上可溶形式受體, 對 IL-13與 IL-13R $\beta$ 結合之抑制作用。

T2036-22: 無分泌 IL-13R $\beta$ s之純株上清液存在下, 於純株 IL-13R $\beta$  (2036-22)上之總結合量(參考值 100%)。

2034-4

2036-6

2034-19 4 選殖株 IL-13R $\beta$ s

## 五、發明說明 ( 17 )

2034-21

1274-20：於不表現 IL-13R $\beta$ s 之 CHO 細胞上清液存在下(對照組)。

圖 7：IL-13R $\alpha$  cDNA 之核苷酸序列，及人類 IL-13R $\alpha$  與鼠類 IL-13R $\alpha$  之蛋白質序列比較。

a) IL-13R $\alpha$  之 cDNA 的核苷酸序列。對應於經推論為核酸序列訊號肽之胺基酸係以斜體字表示，而對應於穿膜區者係以粗體字表示。有功效之 N-糖苷化位置(Asn-X-Ser/Thr)，其下標示橫線；

b) 列示人類 IL-13R $\alpha$  及鼠類 IL-13R $\alpha$  序列之胺基酸。人類 IL-13R 及鼠類 IL-13R $\alpha$  之蛋白質序列係如上所述排列(24)。為此類蛋白質家族特徵之半胱胺酸殘基與 WSXWS 主要部位係以框線表示。

— 圖 8：對 IL-13 之重組型 IL-13R $\alpha$  受體之特徵化。CHO 或 COS-3 細胞係以 IL-13R $\alpha$  及 / 或 IL-4R cDNA 轉感染並用於：

a) 藉由以經 IL-13 $\beta$  cDNA 轉感染(圖 A)，經 IL-13R $\beta$  cDNA 與 IL-4R cDNA 轉感染(圖 B)，經 IL-13R $\alpha$  cDNA 轉感染(圖 C) 及經 IL-13R $\alpha$  cDNA 與 IL-4R cDNA 轉感染(圖 D) 之 CHO 細胞的飽和曲線史考恰得分析，研究經碘-125 標定之 IL-13 的結合，

b) [<sup>125</sup>I]-IL-13 於經 IL-13R $\beta$  cDNA 轉感染(圖 E)，經 IL-13R $\beta$  cDNA 與 IL-4R cDNA 轉感染(圖 F)，經 IL-13R $\alpha$  cDNA 轉感染(圖 G) 及經 IL-13R $\alpha$  cDNA 與 IL-4R cDNA 轉感染(圖 H) 之 CHO

## 五、發明說明 ( 18 )

細胞上的結合競爭實驗。白色與加影線柱形分別代表經放射線標定IL-13於過量(1000倍過量)之IL-13或IL-4存在下之專一性結合，黑色柱形代表總結合量。

圖9：於CHO在IL-4或IL-13(4或13)存在下活化後，表現單獨對IL-4之受體(CHO-4)，單獨對IL-13R $\alpha$ 之受體(CHO-13)或經組合對IL-13R $\alpha$ 與IL-4R之受體(CHO-4-13)的細胞抽出物EMSA中之電泳移動性比較，c代表未經活化之對照組。

### 材料與方法

#### 結合與交聯實驗：

結合與交聯實驗係如為 [ $^{125}$ I][Phe 43]-IL-13-GlyTyrGlyTyr (17)所述者完成。

#### IL-6分泌作用之誘導：

將Caki-1細胞(ATCC HTB46)以 $5 \times 10^4$ 細胞/孔之密度置於24-孔平盤中，培養3天後，將融合性單層以不含胎牛血清之DMEM培養基清洗三次，Caki-1細胞之刺激係以30毫微克/升IL-4或IL-13於Y124DIL-4或抗-gp140單株抗體存在或不存在下完成。於培養24小時後，以ELISA技術(Innotest，法國)測量被釋放至培養基中之IL-6定量。

#### 人類IL-13R $\beta$ cDNA之分離與分析：

## 五、發明說明 ( 19 )

將全部 RNA 自如上述之 Caki-1 細胞萃取出 (25)。以包覆有寡 (dT)<sub>25</sub>(Dynal) 之磁性珠將聚 (A) RNA 自總體 RNA 中分離出。使用引子-承接子方法 (26) 與載體 pSE-1 (27) 構築含有  $2 \times 10^5$  選殖株之 cDNA 庫。所使用以表現之選殖策略已曾於先前敘述 (17)。

### 人類 IL-13R $\beta$ cDNA 之製備：

將 RNA 樣品以逆轉錄酶複製，並使用對應於序列 +52 至 +71 之有意義引子及對應於 +489 至 470 之反有意義引子 (編碼係以圖 2 中所列示之 cDNA 序列為基準) 進行 PCR (聚合酶鏈反應)。將經 PCR-放大之產物與互補於 cDNA 之序列 +445 至 +461 的探針雜交。大小標記係指示於該圖示之左側。

### 人類 IL-13R $\alpha$ cDNA 之分離與分析：

#### 1) 鼠類 IL-13R $\alpha$ 探針之製備

##### a) B9 細胞 (28) 之培養

將 B9 細胞培養於補充以 10% 胎牛血清與 50 微克 / 毫升慶大霉素之 RPMI 培養基 (Gibco) 中。

##### b) B9 細胞之 RNA 之製備

將細胞以 PBS 緩衝液 (以磷酸鹽緩衝之食鹽水，參考文獻 04104040-GIBCO-BRL) 清洗兩次。待於 1000 rpm 下離心 10 分鐘後，將細胞團塊懸浮於含下列組成之溶解緩衝液中：

## 五、發明說明 ( 20 )

4M脲 - 硫氰酸酯 ; 25 mM檸檬酸鈉 pH 7 ; 0.5%肌胺酸 ; 0.1 M  $\beta$ 2-巰基乙醇。

將懸浮液使用 Ultraturax 超音波振盪器 No. 231256 (JANKE 與 KUNDEL) 以最大功率超音波振盪 1 分鐘。將檸檬酸鈉 pH 4 加至 0.2 M。將溶液以 1 體積酚 / 三氯甲烷混合物 (v/v : 5/1) 萃取。

將含於水相中之 RNA 於  $-20^{\circ}\text{C}$  下，藉助於 1 體積異丙醇沈澱出。將團塊懸浮於溶解緩衝液中。再次以酚 / 三氯甲烷混合物萃取溶液，並以異丙醇沈澱 RNA。待將團塊以 70% 乙醇接著以 100% 乙醇清洗後，將 RNA 懸浮於水中。

## c) 互補 DNA 之製備

使用聚 T12 引子自 5 微克總體 RNA，製備得到 cDNA。將總體 RNA 培育於 30 微升體積緩衝液：50 mM Tris-HCl pH 8.3，6 mM  $\text{MgCl}_2$ ，10 mM DTT，40 mM KCl，含有 0.5 mM 各種去氧核苷酸磷酸鹽類及 30 單位 Rnasin (普羅美加，Promega)，於  $37^{\circ}\text{C}$  下一小時，然後於  $50^{\circ}\text{C}$  下 10 分鐘，再於  $37^{\circ}\text{C}$  下 10 分鐘，與 200 單位逆轉錄酶 Rnase H (Gibco-BRL 參考編號 8064A) 共培育。將反應於  $65^{\circ}\text{C}$  下加熱 10 分鐘而終止。

d) 藉 PCR 技術專一性放大老鼠 IL-13R $\alpha$  cDNA 片段。

聚合作用之進行係在 6 微升 cDNA 於 50 微升終體積 (含下列組合物之緩衝液：10 mM Tris-HCl pH 8.3，2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ，50 mM KCl，4dNTP 0.2 mM，2 微克 / 毫升各該二種

## 五、發明說明 ( 21 )

引子及 2.5 U TAQ DNA 聚合酶(貝克曼, Beckman)。引子對係依希爾頓(Hilton)所發表之序列選擇(22)。

有義引子：核苷酸 249 至 268

5' AGAGGAATTACCCCTGGATG 3'

反義引子：核苷酸 1256 至 1275

5' TCAAGGAGCTGCTTTCTTCA 3'

反應係以 30 次含於 94°C 下 1 分鐘，58°C 下 1 分鐘，72°C 下 4 分鐘之循環及接著於 72°C 下 10 分鐘之最終循環進行。

e) PCR 放大產物之純化。

待於 1% 存於 TAE 緩衝液(40 mM, Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.9)之瓊脂凝膠(Sigma)上，於 100 伏特下進行電泳 1 小時後，將凝膠以 1 微克/毫升存於相同緩衝液之溴乙吡啶染色。將對應於放大產物(IL-13R $\alpha$  具有 1027 鹼基對(bp)之 cDNA 片段)電泳泳帶使用 Glass Max 套組(Gibco)萃取。

f) 探針之製備。

將 25 毫微克含 1027 bp 對應於老鼠 IL-13R $\alpha$  受體之已純化 cDNA 片段以磷-32，使用 BRL 隨機引子 DNA 標定系統套組於  $2.4 \times 10^9$  dpm/微克之比活性下標定；或者，使用百靈佳(Boeringher)套組於  $4 \times 10^8$  dpm/微克之比活性下藉切割轉譯作用標定 100 毫微克。

2) 人類 IL-13R $\alpha$  cDNA 之分離與分析

a) 總體 RNA 之製備

## 五、發明說明 ( 22 )

總體RNA係如上1b段所述，自Caki-1細胞萃取出。

## b) 信息者RNA (聚A+流份)之純化

RNA之聚A+流份之純化係使用DYNAL寡(dT)<sub>25</sub> Dynabeads套組(參考編號610.05)，依照製造廠商所指示之步驟而完成。其原理係基於使用其上接附有聚(dT)<sub>25</sub>寡核苷酸之超順磁性聚苯乙烯珠。聚A+流份與偶合至陷入於磁性支持物上之珠的寡(dT)<sub>25</sub>寡核苷酸雜交。

## c) 北方墨點法。

將5微克聚A+訊息者RNA載於存在MOPS緩衝液(10 mM pH 7.4, 0.5 mM EDTA)之1%瓊脂，8%甲醛變性凝膠上。待泳動及轉移至N+ Hybond膜(艾默遜，Amersham)上，於20 X SSC緩衝液中後，將RNA藉於80°C烘箱中於真空下加熱固定。然後將膜於42°C下於下列緩衝液中：1M NaCl，30%甲醯胺；1% SDS，5X Denhart's；100微克/毫升鮭魚精子DNA前雜交2小時。待經2小時前雜交後，將膜於相同緩衝液中，以經由 $2.5 \times 10^6$  dpm/毫升隨機激發製備得之老鼠IL-13R $\alpha$ 探針濃縮物雜交16小時。然後將膜於室溫下於2X SSC緩衝液0.1% SDS中清洗30分鐘兩次，再於50°C下於相同緩衝液中清洗2小時。待於卡匣(分子動力學)中曝光4天後，以立即顯像機(分子動力學)對該北方墨點進行分析。於Caki-1細胞，U373與U937中偵測得具4200 bp及1500 bp與2000 bp重疊之作多數轉錄物。

## 五、發明說明 ( 23 )

人類 IL-13R $\alpha$ 與 IL-13R $\beta$ 性質之特徵化：

將 COS-7或 CHO細胞如上所述(17)於培養皿中進行轉感染。待24小時後，將細胞以胰蛋白酶處理，並以 $8 \times 10^4$ 細胞/槽之密度培養於24-槽平板中。待於37°C下培養48小時後，將細胞用於與如上所述經碘化 IL-13之結合實驗(分析以重覆三次完成，顯示小於10%之變度)(17)。對於轉感染作用，將 COS-7或 CHO細胞於25-平方公分平板中，使用0.6毫克各種質體進行轉感染。待24小時後，將細胞單層以胰蛋白酶處理，並以 $8 \times 10^4$ 細胞/槽培養於12-槽平板中。三天後，與經標定之 IL-13及未經標定之 IL-13與/或 IL-4完成結合及競爭實驗。結果以至少三次獨立進行之實驗為代表。

表現人類 IL-13R $\alpha$ 及/或 IL-4R之細胞核萃取物於 EMSA 中電泳移動性之比較：

將 $2 \times 10^6$  CHO細胞平鋪於10公分培養皿上。待24小時後，將細胞以6微克質體DNA轉感染(34)。於48小時後，將細胞於37°C下培養於3毫升含或不含濃度為100毫微克每毫升之 IL-13或 IL-4的培養基中30分鐘。然後將細胞以PBS-0.5mM EDTA緩衝液清洗兩次，接著收取於1.2毫升PBS中。然後將細胞離心，並如(35)中所述製備得細胞萃取物。接著如(36)中所述以10至20微克細胞萃取物及經 $^{32}\text{P}$  (50,000-100,000

## 五、發明說明 ( 26 )

用於選擇與表現之策略已於先前技藝描述(17)。使用 Caki-1 細胞構築得含有  $2 \times 10^5$  重組型純株之 cDNA 庫。將該庫以各 1000 cDNA 分成數批，其中各批之 DNA 以質體形式導入 COS-7 細胞中(29)。經標定 IL-13 與經轉感染 COS-7 細胞之結合使其能夠鑑定編碼 IL-13 受體之純選植株的批次。將陽性批次取出，並經再篩選直到鑑定得能完成合成可與 IL-13 結合之細胞表面蛋白質的單一選植株。最後分離得兩種獨立的 IL-13R $\beta$  cDNA。IL-13R $\beta$  cDNA 之完整核苷酸序列及由其推衍出之胺基酸序列係列示於圖 2a 中。該 cDNA 排除聚-A 尾端後具有 1298 個鹼基之長度，且具有含 106 個鹼基之短的 3' 未轉譯區。標準 AATAAA 聚腺苷化作用訊號係位於預定位置上。介於核苷酸 53 與 1192 間之開放解讀框架表明一段具 380 個胺基酸之多肽。該序列編碼一段具有可能訊號肽，單一穿膜區及短胞質內尾部之膜蛋白。

四個可能的糖苷化位置係位於胞外區域內。其重要地指出亦存在兩個被認為是第 II 型細胞活素受體家族之號記的一致特色，第一個係衍生自 N-末端雙硫橋聯環結構，第二個為位於胞內區域 C-末端之 WSXWS 類型特色。該非常短之胞質序列可解釋為何其係 Caki 細胞中，唯一由 IL-4 及 IL-13 共用之傳導細胞內訊號的受體複合物。

排列研究證明其與人類 IL-5R $\alpha$  鏈(51%相似性及 27%同一

## 五、發明說明 ( 27 )

性)及，較少程度，與促乳素受體之同源性(圖 2b)。令人注意地指出，IL-5R 複合體由與 IL-5 結合但需要另一蛋白質之 $\alpha$ 鏈，與 IL-3 共用之 $\beta$ 鏈及 GM-CSF 受體組成，而形成能夠傳導訊號之高親和性受體(31)。

## 實施例 4：

人類 IL-13R $\beta$  訊息者 RNAs 於各種細胞系中之偵測。

令人驚訝地，雖然於 Caki-1 細胞中有大量的 IL-13R $\beta$  表現，但由北方墨點分析偵測得相似量之 IL-13R $\beta$  與 IL-4R 的訊息者 RNA。此項觀察暗示，此 mRNA 相較於 IL-4R 轉錄體有較大之轉譯作用，並解釋為何於表現小量 IL-13 結合位置之細胞系無法偵測到 IL-13R $\beta$  mRNA。RT-PCR 分析(圖 3)顯示，於 Caki-1 細胞中所發現之轉錄體亦以較低程度出現於角質細胞系 A431，前骨髓細胞 TF-1，前單核血球細胞 U937 及細胞系 B IM9 中。於吉爾卡特(Jurkat) T 細胞系或前-B NALM 6 細胞系中，未偵測到轉錄體。此等結果與本發明作者對此等前述相同細胞系進行之 IL-13 結合研究(17)，及與 IL-13 之已知生物學上標的物相符合。

## 實施例 5：

於經人類 IL-13R $\beta$  cDNA 轉感染之 COS-7 細胞上所完成之結合分析。

## 五、發明說明 ( 28 )

將 COS-7 細胞以編碼 IL-13R $\beta$  專一結合標定之 IL-13 的經分離 cDNA 轉感染。飽和曲線之史考恰得分析顯示，有一具 kd 值為  $250 \pm 30$  pM 及最大結合容量為  $5.6 \times 10^5$  受體/細胞之單一組成位置存在(圖 4a)。

重組型受體之親和性與 Caki-1 細胞中對 IL-13R $\beta$  之 kd 值，及於其他數種細胞中(17)之 kd 值為 446 pM，十分符合。因此，姑且不論其與 IL-5R $\alpha$  鏈之序列同源性，由於所選殖之受體不需要第二個鏈來重建高親和性結合位置，故其作用有所差異。

令人注意地指出，最近所述之蛋白質結合 IL-15，在缺乏其他兩種 IL-15R 複合物組成分存在下，具有以高親和性與 IL-15 結合之特徵(32)。

於競爭實驗中，IL-13 可以  $1.5 \pm 0.5$  nM 之抑制常數(Ki)抑制經標定 IL-13 與所選殖受體之結合，然而 IL-4 不會抑制該結合。因此所選殖之受體的藥理學與存在 Caki-1 細胞中之 IL-13R $\beta$  者相似。交聯實驗顯示 70 kDa 之放射性標定帶。該帶具有與於 Caki 細胞以及於其他細胞中(17)所觀察得相同之泳動性。此複合物最有可能相當於以經標定 IL-4 所完成之交聯實驗中，所觀察到除了 IL-4R 140 kDa 帶以外的 60-70 kDa 帶。此亦可能暗示，在官能性受體複合物的兩蛋白質之間存在強的交互反應。本發明之作者因此檢試是否 IL-13R $\beta$  與 IL-4R 會在細胞內交互作用，而重建一種能使該二

## 五、發明說明 ( 29 )

種細胞活素間產生交叉競爭之受體。其表現實驗之結果列示於第4c及d圖中。

其明顯地表示出，該二受體之表現，不論個別地或同時表現，產生大量專一辨識該二種細胞活素中任一種之受體。然而，當其共同表現時，有少數受體(5至10%)能夠辨識該二種細胞活素。 $\gamma$ c鏈以IL-4R與IL-13R $\beta$ 之共轉感染作用，並未增加共同結合位置之數量。此等結果暗示；IL-13R $\beta$ 與IL-4R鏈可於細胞膜中交互作用，而重建一種可能使IL-13與IL-4競爭結合之受體。重建受體之低百分比率與支持有另一種以有限量存在COS細胞中，其為重建使IL-13及IL-4競爭結合之受體複合物所需的蛋白質(IL-13R $\alpha$ )存在相符合。

於以 $\gamma$ c鏈轉感染之實驗中所得之結果證明，此蛋白質並非先前所暗示之限制因子(15)。此結論亦由 $\gamma$ c訊息者RNA不存在Caki-1細胞中而支持(21)。

另一項解釋該低數量重建受體之可能原因係該二種蛋白質在細胞膜中存在不正確之化學計量。但是，使用不同相對量之IL-4R與IL-13R $\beta$ 的共轉感染作用，並未顯示在重建受體上之主要差異。藉由IL-13R $\alpha$  cDNA之分離，於老鼠(22)及人類中確定有另一種具有較大能力與IL-4R交互作用之IL-13R存在的可能性。(參照實施例7)。應注意， $\gamma$ c之表現增進IL-4之結合，如先前所述(19)，但減低IL-13之結

## 五、發明說明 ( 30 )

合，此暗示不同鏈間有複合物交互作用。

實施例 6：

藉由可溶形式受體抑制 IL-13 與其膜上受體結合之研究。

經描述於瞬時表現(圖 5)或安定純系(圖 6)之結果。

該二種編碼 IL-13R $\beta$  及 IL-13R $\beta$ s 之 cDNA 替代 IL-2 cDNA 之位置插入載體 p7055 中 (33)。所形成之質體分別稱為 2036 及 2034。

a) 瞬時表現

將 CHO 細胞以  $3 \times 10^5$  細胞 / 槽之濃度接種於 12-槽平板中，並於次日藉由對於 COS 細胞進行之 DEAE-糊精方法，以質體 2036 或 2034，或以作為對照組之空質體 pSE-1 轉感染。

將細胞培養於使 IL-13R $\beta$ s 堆積於經質體 2034 轉感染細胞之上清液中，及使 IL-13R $\beta$  於經質體 2036 轉感染細胞膜中良好表現之條件下三天。

將經 IL-13R $\beta$ s (2034) 或陰性對照組 (空的 pSE-1) 轉感染細胞之上清液收集，並將經 IL-13R $\beta$  轉感染之細胞用於研究 IL-13 結合之抑制作用。

IL-13 與表現 IL-13R $\beta$  (2036) 之 CHO 細胞表面的結合作用，係於此等以放射性配位體等倍稀釋之粗上清液存在與否下，或於過量未經放射性標定之 IL-13(NSB) 存在下進行測量。該結合作用係於終體積為 500 毫升含 300 pM 放射性配

## 五、發明說明 ( 31 )

位子的完整細胞上，以三次重複實驗完成。

## b) 安定純系

藉由以編碼完整IL-13R $\beta$  (含380個殘基之多肽)或可溶形式IL-13R $\beta$  (IL-13R $\beta$ s, 含對應於IL-13R $\beta$ 第1至337殘基之經截斷多肽)之序列轉感染, 得到兩種安定經轉形之CHO細胞系。將此等序列插入載體p7055中。

將CHO-DHFR<sup>-</sup>細胞以質體2036 (IL-13R $\beta$ )及2034 (IL-13R $\beta$ s)轉感染, 並如先前所述(33)篩選重組型選殖株。

將所得到一具有每細胞2至 $5 \times 10^5$ 位置之CHO-IL-13R $\beta$  (CHO 2036)選殖株, 以 $10^5$ 細胞每槽之密度接種至12-槽平板中, 並將細胞於兩天後用於IL-13R $\beta$ s存在與否之結合實驗中。

為此, 將CHO-IL-13R $\beta$ s (CHO 2034)選殖株以 $5 \times 10^5$ 細胞每盤之密度接種於6公分盤中, 重覆三組實驗。待於培養基中累積3天後, 收集培養基(每盤取5毫升)用於IL-13於CHO 2036選殖株之IL-13R $\beta$ 上的結合抑制研究。以相同方法, 收集不表現可溶形IL-13R $\beta$ 之CHO細胞上清液。

於此等以放射性配位體等倍稀釋之粗上清液存在與否下, 或於過量未經放射標定之IL-13 (NSB)存在下, 測量IL-13於CHO-2036-22選殖株表面之結合作用。該結合作用係於終體積為500毫升含300 pM放射性配位子的完整細胞上, 以三次重複實驗完成。

## 五、發明說明 ( 32 )

圖5與圖6之柱狀圖表示由IL-13Rβs造成對IL-13於IL-13Rβ上結合之抑制作用。於數個選殖株上可觀察到IL-13與其受體結合上抑制作用。

## 實施例7

## 人類IL-13Rα受體之選殖

a) 從Caki-1細胞之聚A+訊息者RNA製備cDNA庫。

自0.5毫微克聚A+訊息者RNA開始，以具有下列序列(包含BamHI切割位置)：

5' <GATCCGGGCCCTTTTTTTTTTTT <3'

之合成引子，於體積為30微升之下列緩衝液中：

50 mM Tris-HCl pH 8.3, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 40 mM KCl, 含有各0.5 mM之去氧核糖三磷酸鹽, 30 μCi [α<sup>32</sup>P]dCTP及30單位Rnasin (普羅美加), 製備經[<sup>32</sup>P]dCTP標定之單股互補DNA (所得之互補DNA具有比活性為3000 dpm/毫微克)。待於37°C下培育1小時, 然後於50°C下10分鐘, 再於37°C下10分鐘後, 將含200單位逆轉錄酶酵素Rnase H (Gibco-BRL)之4微升EDTA加入。然後將RNA模板藉添加6微升2N NaOH溶液及於65°C下培育5分鐘而分解。

為去除該合成引子, 將互補DNA置於1毫升Sephacryl S400管柱(法碼希雅, Pharmacia), 於TE緩衝液中平衡之上純化。將最先的兩個具放射活性之流份收集組合, 並以

## 五、發明說明 ( 33 )

1/10體積之10 M醋酸銨及2.5體積之乙醇沈澱，此於以氯仿萃取後進行。然後將cDNA藉添加含20單位末端轉移酶酵素(法碼希雅27073001)之dG同聚物尾端，而延長5'末端。接著，於20微升具有下列組合物之緩衝液中：30 mM Tris-HCl pH 7.6；1 mM氯化鈷；140 mM四甲雙胍酸；0.1 mM DTT；1 mM dGTP，於37°C下培育15分鐘，然後將2微升0.5 M EDTA加入。再以氫氧化鈉於無加熱下處理，接著於S400管柱上再純化，以氯仿萃取並以乙醇沈澱。將丸粒溶解於33微升TE緩衝液中。下一階段包含將預先已加上同聚物dC尾端之選殖載體pT7T3-18，於以Pst1切割後與cDNA及承接子配對。將cDNA (33微升)與75毫微克載體pT/T3-18 (5微升)，120毫微克具下列序列(包含Apa1切割位置)之承接子(1微升)：

5'AAAAAAAAAAAAAGGGCCCG 3'

10微升200 mM NaCl溶液接觸，並將混合物於65°C下培育5分鐘，然後令反應混合物冷卻至室溫。下一階段包含將選殖載體與單股cDNA於100微升反應體積中，以32.5單位酵素T4噬菌體DNA接合酶(法碼希雅)於15°C下於具有下列組成物之緩衝液中進行接合過夜：50 mM Tris-HCl pH 7.5，10 mM MgCl<sub>2</sub>，1 mM ATP。然後藉以酚接著以氯仿萃取，而將蛋白質去除，然後將1/10體積之10 mM醋酸銨溶液與2.5體積之乙醇加入。將混合物離心，將丸粒吸收於具有組成

## 五、發明說明 ( 34 )

物：33 mM Tris-醋酸鹽 pH 7.9，62.5 mM 醋酸鉀，1 mM 醋酸鎂及 1 mM DTT 之緩衝液中；將第 2 cDNA 股於 30 微升體積中，以 30 單位酵素 T4 噬菌體 DNA 聚合酶 (法瑪雅) 及含 1 mM 四種去氧核苷三磷酸鹽之混合物以及二單位 T4 噬菌體基因 32 之蛋白質 (法瑪希雅) 於 37°C 下合成 1 小時。將混合物以酚萃取，並將痕量物質藉置於 P10 管柱 (Biogel P 10-200-400 篩目 - 參考編碼 150 11050-Biorad) 上去除。

最後階段包含藉由於 2.5 kV 下，於製造廠商建議之條件下使用 Biorad Gene Pulser 裝置進行重組型 DNA 之電穿透作用，而將大腸桿菌 MC 1061 細胞轉形，然後將細胞培養於含有下列組成之 LB 培養基中 1 小時：

細菌胰化蛋白胨 10 克 / 升；酵母抽出物 5 克 / 升；NaCl 10 克 / 升。

藉於轉形後培育 1 小時之後，取 1/1000 稀釋塗佈於補充以 1.5% 瓊脂 (w/v) 及 100 微克 / 毫升青黴素之 LB 培養基平盤 (以下稱 LB 瓊脂培養基) 上，測定所得之獨立選殖株數量。

所得獨立選殖株之數量為一百萬株。

## b) cDNA 庫之篩選

將整個庫塗佈於覆蓋有 Biodyne A 膜 (PALL 參考號 BNG 132) 之瓊脂培養基上 (培養皿直徑為 150 毫米)。待置於 37°C 下過夜後，將選殖株轉移接觸到新膜上。將後者藉將其置於 Wathman 3 MM 濾紙 (已以下列溶液浸漬：0.5 N NaOH，

## 五、發明說明 ( 35 )

1.5 M NaCl 5分鐘，然後 0.5 M Tris-HCl pH 8，1.5 M NaCl 5分鐘)上進行處理。待以蛋白酶k於下列緩衝液，10 mM Tris-HCl pH 8，10 mM EDTA，50 mM NaCl，0.1% SDS，100微克/毫升蛋白酶K中，於37°C下處理30分鐘後，將膜徹底以2X SSC緩衝液(檸檬酸鈉-NaCl)清洗，然後於80°C下之真空烘箱中乾燥20分鐘。

## c) 膜之前雜交與雜交作用

然後將膜於42°C下，於下列緩衝液：1M NaCl；30%甲醛；1% SDS；5X Denhart's 100微克/毫升鮭魚精子DNA中前雜交2小時。待2小時前雜交作用後，將膜於相同緩衝液中與藉由短斷轉譯製備得濃度為 $2.5 \times 10^6$  dpm/毫升之老鼠IL-13R $\alpha$ 探針雜交16小時。將膜於2X SSC，0.1% SDS緩衝液中於室溫下清洗30分鐘兩次，然後於相同緩衝液中於50°C下清洗2小時。待於-80°C下，於柯達X-OMAT底片存在下曝光過夜，偵測到數個陽性選殖株。

d) 人類IL-13R $\alpha$ 選殖株之定序及序列之分析。

使用應用生物系統套組(參考編號401628)，得到該序列。完整之IL-13R $\alpha$  cDNA序列及從其推行得之胺基酸序列列示於圖7中。該cDNA長為3999鹼基對(排除聚-A尾端部分)具有一段含2145鹼基對之長未經轉譯3'區域。

一段標準聚腺苷基化訊號存在預期之位置。介於核苷酸34與1851之開放解讀框架，確定一段具427個胺基酸之多

## 五、發明說明 ( 36 )

肽。該序列編碼一種具有可能訊號肽與單一穿膜區域及短細胞質內區域。

10個可能的糖基化作用部位係位於胞外區域中。重要地指出，亦存在兩個被認為係第II類細胞活素家族標記之一致特徵，第一為衍生自N-末端雙硫橋聯環結構，第二為位於C-末端胞外區域之WSXWS型特色。

## 實施例 8

於經人類 IL-13R $\alpha$  cDNA 轉感染之 COS-3 或 CHO 細胞上所完成之結合分析

將 CHO 細胞以編碼專一結合經標定 IL-13 之 IL-13R $\alpha$  的經分離 cDNA 轉感染。飽和曲線之史考恰得分析顯示，有一具有 kd 值為  $4.5 \pm 0.4$  nM 及最大結合容量為 26000 受體/細胞之單一組成位置 (圖 8C 及圖 8G)。

共表現實驗之結果列示於圖 8D 及 8H 中。

圖 8C 結果之分析顯示 IL-13R $\alpha$  於 CHO 細胞之選殖株 2036 中，有良好的表現。亦可注意到，於經 IL-4R 與 IL-13R $\alpha$  cDNA 轉感染之 CHO 細胞中，IL-4R 取代 60% IL-13 之結合 (圖 8H)，但對 IL-13R $\alpha$  之 kd 值反而為 7.5 nM，其為 IL-13R $\alpha$  位置和 IL-4R 位置相等時之 10 倍之多。

表現 hIL-4R (人類 IL-4R)，經編碼人類 IL-13R $\alpha$  之 cDNA 轉感染之 CHO-hIL-4R 細胞，專一地與經標定之 IL-13 結合。

## 五、發明說明 ( 37 )

飽和曲線之史考恰得分析明白地顯示出2個組成位置，其一具有kd值為 $23 \pm 8.9$  pM及最大結合容量為28000位置/細胞之高親和性，而另一者具有kd值為 $4.2 \pm 1.4$  nM及最大結合容量為150000位置/細胞之低親和性(圖8D)。

該第二位置特徵為具有與被單獨表現之hIL-13R $\alpha$  (人類IL-13R $\alpha$ )相同的親和性，且由於其以大於hIL-4R之量表現，故相當於未經聯合之IL-13R $\alpha$ 鏈。

此等於2種hIL-13R $\alpha$ 與hIL-4R鏈存在下重建之高-親和性受體，能夠辨識該2種細胞活素(圖8D及圖8H)。此甚至於以其中IL-4取代所有結合IL-13之可比較量下共表現該2種hIL-13R $\alpha$ 與hIL-4R鏈之COS/pSE1細胞上更加明顯。

重組型人類IL-13R $\alpha$ 之親和性可與所述對老鼠IL-13 $\alpha$ 受體之親和性(2-10 nM)(參考文獻22)相比擬。

相對於先前所述之hIL-13R $\beta$ 鏈，人類IL-13R $\alpha$ 其本身單獨不構成高-親和性之結合位置。

因此於細胞膜中，IL-13R $\alpha$ 與IL-4R交互作用而重建一高親和性之受體。

## 實施例9

於共表現hIL-13R與hIL-4R之CHO細胞中，由IL-13及IL-4所引起STAT蛋白質之活化作用。

於人類PBMC細胞中，hIL-4與IL-13活化2種雙面聯體蛋白

## 五、發明說明 ( 38 )

(janus)家族之酪胺酸激酶，Jak 1與Jak 2，其磷酸化一種潛伏性轉錄因子，STAT6。此經活化之因子進入細胞核中，並與由IL-4調節之基因的促進子中特定物質結合。

吾等選擇人類C $\epsilon$ 促進子之C $\epsilon$ 物質作為電泳移動性轉換分析(EMSA)之探針，以證明由IL-13引起類以STAT6之結合因子的活化作用。

將僅表現IL-13R，僅表現IL-4R，或共同表現該2鏈之CHO細胞核萃取物，於37°C下以100毫微克/毫升IL-13或IL-4刺激30分鐘，並與經放射標定之C $\epsilon$ 物質培育。

表現hIL-13R $\alpha$ 與hIL-4R之細胞核萃取物，不論該細胞是否經IL-4或IL-13誘發，於EMSA中形成具有相同移動性之複合物(參見圖9)。另一方面，僅表現其中一種鏈之細胞，則未偵測得任何複合物。

於表現hIL-13R $\alpha$ 與hIL-4R $\alpha$ 之CHO細胞中，IL-13與IL-4因此引發相同的傳訊階程(signalling cascade)。

本發明所述之IL-13R $\beta$ 及IL-13R $\alpha$ 選殖，使能夠增進對參與相較於由IL-4誘發之反應，其為專一地由IL-13誘發之反應之因子的瞭解。另外，其使能夠發展一種用於研究於正常及以IL-13為重要角色之病理狀況下，受體表現調節作用之工具。

又，cDNA之可利用性使能夠幫助其他重建IL-4/IL-13受體複合物所需蛋白質之選殖，且可用於製造或合理模擬能

## 五、發明說明 ( 39 )

夠作為IL-13活性專一拮抗劑之新穎醫藥產品。

## 參考文獻：

1. Minty, A. et al., *Nature*, 1993, 362, 248-250.
2. McKenzie, A.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, 90, 3735-3739.
3. Defrance, T. et al., *J. Exp. Med.*, 1994, 179, 135-143.
4. Punnonen, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1993, 90, 3730-3734.
5. Fior, R. et al., *Eur. Cytokine Network*, 1994, 5, 593-600.
6. Muzio, M. R. F. et al., *Blood*, 1994, 83, 1738-1743.
7. De Waal Malefyt, R. et al., *J. Immunol*, 1993, 151, 6370-6381.
8. Doyle, A. et al., *Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 1441-1445.
9. Montaner, L.J. et al., *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 743-747.
10. Sozzani, P. et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 5084-5088.
11. Herbert, J.M. et al., *Febs Lett.*, 1993, 328, 268-270.
12. Derocq, J.M. et al., *Febs Lett.* 1994, 343, 32-36.
13. Zurawski, G. et al., *Immunol. Today*, 1994, 15, 19-26.
14. *Interleukin-13 for Cytokines in Health and Disease.* Eds D.G. Remick and J.S. Frie, Marcel Decker, N.Y. 1996.
15. Zurawski S.M. et al., *Embo Journal*, 1993, 12, 2663-

## 五、發明說明 ( 40 )

- 2670.
16. Aversa, G. et al., J. Exp. Med., 1993, 178, 2213-2218.
  17. Vita, N. et al., Biol. Chem., 1995, 270, 3512-3517.
  18. Lefort, S. et al., Febs Lett., 1995, 366, 122-126.
  19. Kondo, M. et al., Science, 1993, 262, 1874-1883.
  20. Russell, S.M. et al., Science, 1993, 262, 1880-1883.
  21. Obiri, N. et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 8797-8804.
  22. Hilton, D.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 497-501.
  23. Cállard, R.E. et al., Immunology Today, 1996, 17, 3 108-110.
  24. Devereux, J. et al., Nucleic Acids Res., 1984, 12, 387-395.
  25. Chomczynski, P. et al., N. Anal. Biochem., 1987, 152, 156-159.
  26. Caput, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 1670-1674.
  27. Minty, A. et al., Eur. Cytokine Network, 1993, 4, 99-110
  28. Labit Le Bouteiller, C. et al., J. of Immunol. Methods, 1995, 181, 1, 29-36.
  29. Seed, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 3365-3369.
  30. Bazan, J.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 6934-6938.
  31. Honjo, T. et al., Current Opinion in Cell Biology, 1991, 1, 201-203.
  32. Giri, J.G. et al., Embo Journal, 1993, 14, 3654-3663.
  33. Miloux, B. et al., Gene, 1994, 149, 341-344.

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 ( 41 )

34. Sampayrac, L.M. et al., PNAS USA, 1981, 78, 7575-7578.
35. Jiang, S-W et al., Nucleic Acid Res., 1995, 23, 3607-3608.
36. Köhler, I. et al., FEBS Letters, 1994, 345, 187-192.
37. Seidel, H.M. et al., PNAS USA, 1995, 92, 3041-3045.

## 序列表

## (1) 一般資料：

## (i) 申請人：

(A)名稱：SANOFI

(B)街名：32,34 rue MARBEUF

(C)城市：巴黎

(D)國名：法國

(E)郵遞區號(ZIP)：75374

(F)電話：0153774133

## (ii) 發明名稱：間白素-13受體

## (iii) 序列編號：4

## (iv) 電腦可讀取形式：

(A)介質類型：軟式磁碟片

(B)電腦：IBM PC可相容

(C)操作系統：PC-DOS/MS-DOS

(D)軟體：專利鍵入釋出#1.0，版本#1.25 (EPO)

## 五、發明說明 ( 42 )

## (2) 關於 SEQ ID NO:1 之資料：

## (i) 序列特徵：

(A) 長度：1539 鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 拓撲學：線形

## (ii) 分子類型：cDNA

## (vi) 原始來源：

(A) 有機體：人類 (Homo sapiens)

(F) 組織類型：癌

(G) 細胞類型：腎細胞

(H) 細胞系：caki-1

## (xi) 序列描述：SEQ ID NO:1:

GGTGCCTGTC	GGCGGGGAGA	GAGGCAATAT	CAAGGTTTTA	AATCTCGGAG	AAATGGCTTA	60
ATTCGTTTGC	TTGGCTATCG	GATGCTTATA	TACCTTCTG	ATAAGCACAA	CATTTGGCTG	120
TACAAGCTTT	TGCACTTCAT	CTTCAGACAC	CGAGATAAAA	GTTAACCCTC	CTCAGGATTT	180
TGAGATAGTG	GATTATGAAG	AGAACCCGGA	TACTTAGGTT	ATCTCTATTT	GCAATGGCAA	240
CCCCCACTGT	CTCTGGATCA	TTTTGTGTTG	TGAAAGGAAT	GCACAGTGGA	ATATGAACTA	300
AAATACCGAA	ACATTGGTAG	TGAAACATGG	AAGGCTAGTG	TAGAGGTTAC	CATCATTACT	360
AAGAATCTAC	ATTACAAAGA	TGGGTTTGAT	CTTAACAAGG	GCATTGAATT	ATAGAAGGGC	420
GAAGATACAC	ACGCTTTTAC	CATGGCAATG	CACAAATGGA	TCAGAAGTTC	AAAGTTCCAA	480
TTGCTAGGAG	TGGGCAGAAA	CTACTTATTG	GATATCACCA	CAAGGAATTC	CAGAACTAA	540
AGTTCAGGAT	TAAGTTTTGG	GTAGAATGGA	TTGCGTATAT	TACAATTGGC	AATATTTACT	600
CTGTTCTTGG	AAACCTGGCA	TAGGTTACAT	TATGTCTGGG	TACTTCTTGA	TACCAATTAC	660
AACTTGTTTT	ACTGGTATGA	GGGCTTGGAT	CATGCATTAA	ATATATTTGG	AAACAGTGTG	720

## 五、發明說明 ( 43 )

TTGATTACAT CAAGGCTGAT GGACAAAATA TAGGATGCAG ATTTCCCTAT TTGGCAATAA	780
AGGAGCAGTG AGGCATCAGA CTATAAAGAT TTCTATATTT GTGTTAATGG ATCATCAGAG	840
AACAAGCCTG AAATATCAAG GAATCAGATC CAGTTATTTT ACTTTTCAGC TTCAAAATAT	900
AGTTAAACCT TTGCCGCCAG TCAGTTGGAA ATATCTTACT TTTACTCGGG AGAGTTCATG	960
TGAAATTAAG CTGAAATGGA GCATACCTTT GTTTAGGCGT GGACCTATTC CAGCAAGGTG	1020
TTTTGATTAT .GAAATTGAGA TCAGAGAAGA TGATACTACC GAAAGCATGG AGGAATTTTG	1080
GTGACTGCTA CAGTTGAAAA TGAAACATAC ACCTTGAAAA CAACAAATGA AACCCGAATA	1140
ATAGAGTTTT TAGTAGCAAT TATGCTTTGT AGTAAGAAGC AAAGTGAATA TTTATTGCTC	1200
AGATGACGGA ATTTGGGCAA AGAATCAAGT AGTGAGTGA GTGATAAACA ATGCTGGGAA	1260
GGTGAAGACC TATCGAAGAA AACTTTGCTA GTAGCTGGGA TCGTTTCTGG CTACCATTTG	1320
GTTTCATCTT AATATTAGTT ATATTTGTAA CCGGTCTGCT TAGTGAATGT TCGTAAAGCC	1380
AAACACCTAC CCAAAAATGA TTCCAGAATT TTTCTGTGAT ACATGAAGAA GATTTCATC	1440
TTTCCATATC AAGAGACATG GTATTGACTC AACAGTTTCC AGTCATGGCC AAATGTTCAA	1500
TATGAGTCTC AATAAACTGA ATTTTCTTG CGAATGTTG	1539

## (2) 關於 SEQ ID NO:2 之資料：

## (i) 序列特徵：

(A) 長度：380 胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(D) 拓撲學：線形

## (ii) 分子類型：蛋白質

## (vi) 原始來源：

(A) 有機體：人類 (Homo sapiens)

(F) 組織類型：癌

(G) 細胞類型：腎細胞

(H) 細胞系：caki-1

## 五、發明說明 ( 44 )

## (xi) 序列描述 : SEQ ID NO:2:

```

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

Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp
130        135        140

Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly
145        150        155
Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu
165        170
Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly
180        185        190
Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys
195        200        205
Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg
210        215        220
Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro
225        230        235
Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu
245        250        255
Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr
260        265        270
Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val
275        280        285

```

## 五、發明說明 ( 45 )

Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu  
 290 295 300  
 Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly  
 305 310 315 320  
 Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu  
 325 330 335  
 Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu  
 340 345 350  
 Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr  
 355 360 365  
 Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr  
 370 375 380

## (2) 關於 SEQ ID NO:3 之資料：

## (i) 序列特徵：

(A) 長度：4009 鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 拓撲學：線形

## (ii) 分子類型：cDNA

(iii) 假定：無

(iii) 反意義：無

## (vi) 原始來源：

(A) 有機體：人類 (Homo sapiens)

(F) 組織類型：癌

(G) 細胞類型：腎細胞

(H) 細胞系：caki-1

## (xi) 序列描述：SEQ ID NO:3:

## 五、發明說明 ( 46 )

TCAGCCCGGC CGGGCTCCGA GGCGAGAGGC TGCATGGAGT GGCCGGCGCG GCTCTGCGGG	60
CTGTGGGCGC TGCTGCTCTG CGCCGGCGGC GGGGGCGGGG GCGGGGGCGC CGCGCTACG	120
GAAACTCAGC CACCTGTGAC AAATTTGAGT GTCTCTGTTG AAAACCTCTG CACAGTAATA	180
TGGACATGGA ATCCACCCGA GGGAGCCAGC TCAAATTGTA GTCTATGGTA TTTTAGTCAT	240
TTTGGCGACA AACAAGATAA GAAAATAGCT CCGGAAACTC GTCGTTCAAT AGAAGTACCC	300
CTGAATGAGA GGATTTGTCT GCAAGTGGGG TCCCAGTGTA GCACCAATGA GAGTGAGAAG	360
CCTAGCATT TGGTTGAAAA ATGCATCTCA CCCCCAGAAG GTGATCCTGA GTCTGCTGTG	420
ACTGAGCTTC AATGCATTTG GCACAACCTG AGCTACATGA AGTGTTCCTG GCTCCCTGGA	480
AGGAATACCA GTCCCGACAC TAACTATACT CTCTACTATT GGCACAGAAG CCTGGAAAAA	540
ATTCATCAAT GTGAAAACAT CTTTAGAGAA GGCCAATACT TTGGTTGTTT CTTTGATCTG	600
ACCAAAGTGA AGGATTCCAG TTTTGAACAA CACAGTGTCC AAATAATGGT CAAGGATAAT	660
GCAGGAAAAA TTAAACCATC CTTCAATATA GTGCCTTTAA CTTCCCGTGT GAAACCTGAT	720
CCTCCACATA TTAAAAACCT CTCCTTCCAC AATGATGACC TATATGTGCA ATGGGAGAAT	780
CCACAGAATT TTATTAGCAG ATGCCTATTT TATGAAGTAG AAGTCAATAA CAGCCAAACT	840
GAGACACATA ATGTTTTCTA CGTCCAAGAG GCTAAATGTG AGAATCCAGA ATTTGAGAGA	900
AATGTGGAGA ATACATCTTG TTTTCATGGTC CCTGGTGTTC TTCCTGATAC TTTGAACACA	960
GTCAGAATAA GAGTCAAAC AAATAAGTTA TGCTATGAGG ATGACAAACT CTGGAGTAAT	1020
TGGAGCCAAG AAATGAGTAT AGGTAAGAAG CGCAATTCCA CACTCTACAT AACCATGTTA	1080
CTCATTGTTT CAGTCATCGT CGCAGGTGCA ATCATAGTAC TCCTGCTTTA CCTAAAAAGG	1140
CTCAAGATTA TTATATTCCC TCCAATTCCCT GATCCTGGCA AGATTTTTAA AGAAATGTTT	1200
GGAGACCAGA ATGATGATAC TCTGCACTGG AAGAAGTACG ACATCTATGA GAAGCAAACC	1260
AAGGAGGAAA CCGACTCTGT AGTGCTGATA GAAAACCTGA AGAAAGCCTC TCAGTGATGG	1320
AGATAATTTA TTTTACCTT CACTGTGACC TTGAGAAGAT TCTTCCATT CTCCATTTGT	1380
TATCTGGGAA CTTATTTAAAT GGAAACTGAA ACTACTGCAC CATTTAAAAA CAGGCAGCTC	1440
ATAAGAGCCA CAGGTCTTTA TGTTGAGTCG CGCACCGAAA AACTAAAAAT AATGGGCGCT	1500
TTGGAGAAGA GTGTGGAGTC ATTCTCATTG AATTATAAAA GCCAGCAGGC TTCAAACCTAG	1560
GGGACAAAGC AAAAAGTGAT GATAGTGGTG GAGTTAATCT TATCAAGAGT TGTGACAACT	1620
TCCTGAGGGA TCTATACTTG CTTTGTGTTT TTTGTGTCAA CATGAACAAA TTTTATTTGT	1680
AGGGGAACTC ATTTGGGGTG CAAATGCTAA TGTCAAACCT GAGTCACAAA GAACATGTAG	1740
AAAACAAAAT GGATAAAATC TGATATGTAT TGTTTGGGAT CCTATTGAAC CATGTTTGTG	1800

## 五、發明說明 ( 47 )

GCTATTAAAA	CTCTTTTAAC	AGTCTGGGCT	GGGTCCGGTG	GCTCACGCCT	GTAATCCCAG	1860
CAATTTGGGA	GTCCGAGGCG	GGCGGATCAC	TCGAGGTCAG	GAGTTCCAGA	CCAGCCTGAC	1920
CAAAATGGTG	AAACCTCCTC	TCTACTAAAA	CTACAAAAAT	TAAGTGGGTG	TGGTGGCGCG	1980
TGCCTGTAAT	CCCAGCTACT	CGGGAAGCTG	AGGCAGGTGA	ATTGTTTGAA	CCTGGGAGGT	2040
GGAGGTTGCA	GTGAGCAGAG	ATCACACCAC	TGCACTCTAG	CCTGGGTGAC	AGAGCAAGAC	2100
TCTGTCTAAA	AAACAAAACA	AAACAAAACA	AAACAAAAAA	ACCTCTTAAT	ATTCTGGAGT	2160
CATCATTTCC	TTGACAGCA	TTTTCCTCTG	CTTTGAAAGC	CCCAGAAATC	AGTGTGGGCC	2220
ATGATGACAA	CTACAGAAAA	ACCAGAGGCA	GCTTCTTTGC	CAAGACCTTT	CAAAGCCATT	2280
TTAGGCTGTT	AGGGGCAGTG	GAGGTAGAAT	GACTCCTTGG	GTATTAGAGT	TTCAACCATG	2340
AAGTCTCTAA	CAATGTATTT	TCTTCACCTC	TGCTACTCAA	GTAGCATTTA	CTGTGTCTTT	2400
GGTTTGTGCT	AGGCCCCCGG	GTGTGAAGCA	CAGACCCCTT	CCAGGGGTTT	ACAGTCTATT	2460
TGAGACTCCT	CAGTTCTTGC	CACTTTTTTTT	TTAATCTCC	ACCAGTCATT	TTTCAGACCT	2520
TTAACTCCT	CAATTC AAC	ACTGATTTCC	CCTTTTGCAT	TCTCCCTCCT	TCCCTTCCTT	2580
GTAGCCTTTT	GACTTTCATT	GGAAATTAGG	ATGTAAATCT	GCTCAGGAGA	CCTGGAGGAG	2640
CAGAGGATAA	TTAGCATCTC	AGGTTAAGTG	TGAGTAATCT	GAGAAACAAT	GACTAATCTT	2700
TGCATATTTT	GTAAC TTCCA	TGTGAGGGTT	TTCAGCATTG	ATATTTGTGC	ATTTTCTAAA	2760
CAGAGATGAG	GTGGTATCTT	CACGTAGAAC	ATTGGTATTG	GCTTGAGAAA	AAAAGAATAG	2820
TTGAACCTAT	TTCTCTTTCT	TTACAAGATG	GGTCCAGGAT	TCCTCTTTTC	TCTGCCATAA	2880
ATGATTAATT	AAATAGCTTT	TGTGTCTTAC	ATTGGTAGCC	AGCCAGCCAA	GGCTCTGTTT	2940
ATGCTTTTGG	GGGGCATATA	TTGGGTTCCA	TTCTCACCTA	TCCACACAAC	ATATCCGTAT	3000
ATATCCCCTC	TACTCTTACT	TCCCCAAAT	TAAAGAAGT	ATGGGAAATG	AGAGGCATTT	3060
CCCCCACCCC	ATTTCTCTCC	TCACACACAG	ACTCATATTA	CTGGTAGGAA	CTTGAGAACT	3120
TTATTTCCAA	GTGTTTCAA	CATTTACCAA	TCATATTAAT	ACAATGATGC	TATTTGCAAT	3180
TCCTGCTCCT	AGGGGAGGGG	AGATAAGAAA	CCCTCACTCT	CTACAGGTTT	GGGTACAAGT	3240
GGCAACCTGC	TTCCATGGCC	GTGTAGAAGC	ATGGTGCCCT	GGCTTCTCTG	AGGAAGCTGG	3300
GGTTCATGAC	AATGGCAGAT	GTAAAGTTAT	TCTTGAAGTC	AGATTGAGGC	TGGGAGACAG	3360
CCGTAGTAGA	TGTTCTACTT	TGTTCTGCTG	TTCTCTAGAA	AGAATATTTG	GTTTTCTCTG	3420
ATAGGAATGA	GATTAATTCC	TTTCCAGGTA	TTTTATAATT	CTGGGAAGCA	AAACCCATGC	3480
CTCCCCCTAG	CCATTTTTTAC	TGTTATCTTA	TTTAGATGGC	CATGAAGAGG	ATGCTGTGAA	3540
ATTCCCAACA	AACATTGATG	CTGACAGTCA	TGCAGTCTGG	GAGTGGGGAA	GTGATCTTTT	3600

## 五、發明說明 ( 48 )

```

GTTCCCATCC TCTTCTTTTA GCAGTAAAAT AGCTGAGGGA AAAGGGAGGG AAAAGGAAGT - 3660
TATGGGAATA CCTGTGGTGG TTGTGATCCC TAGGTCTTGG GAGCTCTTGG AGGTGTCTGT 3720
ATCAGTGGAT TTCCCATCCC CTGTGGGAAA TTAGTAGGCT CATTTACTGT TTTAGGTCTA 3780
GCCTATGTGG ATTTTTTCCT AACATACCTA AGCAAACCCA GTGTCAGGAT GGTAATTCTT 3840
ATTCTTTCGT TCAGTTAAGT TTTTCCCTTC ATCTGGGCAC TGAAGGGATA TGTGAAACAA 3900
TGTTAACATT TTTGGTAGTC TTCAACCAGG GATTGTTTCT GTTTAACTTC TTATAGGAAA 3960
GCTTGAGTAA AATAAATATT GTCTTTTTGT ATGTCACCCA AAAAAAAAAA 4009

```

(2) 關於 SEQ ID NO:4之資料： —

(i) 序列特徵：

(A)長度：427胺基酸

(B)類型：胺基酸

(D)拓撲學：線形

(ii) 分子類型：蛋白質

(vi) 原始來源：

(A)有機體：人類(Homo sapiens)

(F)組織類型：癌

(G)細胞類型：腎細胞

(H)細胞系：caki-1

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:4:

```

Met Glu Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys
1           5           10           15
Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln
20           25           30
Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val
35           40           45

```

## 五、發明說明 ( 49 )

Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu  
 50 55 60  
 Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu  
 85 90 95  
 Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile  
 100 105 110  
 Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala  
 115 120 125  
 Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys  
 130 135 140  
 Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu  
 145 150 155 160  
 Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile  
 165 170 175  
 Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val  
 180 185 190  
 Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp  
 195 200 205  
 Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser  
 210 215 220  
 Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn  
 225 230 235 240  
 Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His  
 260 265 270  
 Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu  
 275 280 285  
 Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro  
 290 295 300  
 Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys  
 305 310 315 320  
 Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile  
 325 330 335  
 Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val  
 340 345 350

## 五、發明說明 ( 50 )

Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu Lys  
355 360 365

Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro Gly Lys Ile  
370 375 380

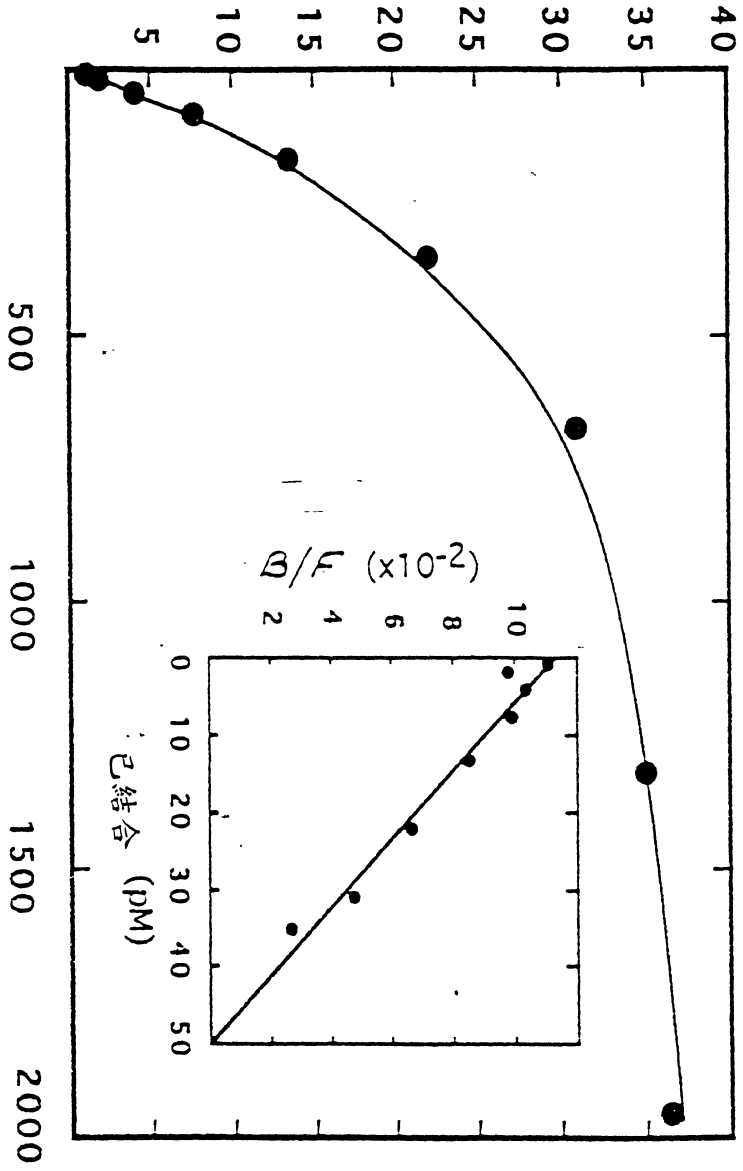
Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu His Trp Lys  
385 390 395 400

Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys Glu Glu Thr Asp Ser Val  
405 410 415

Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln  
420 425

8511542

已結合之  $[^{125}\text{I}]\text{-IL-13}$  (pM)



$[^{125}\text{I}]\text{-IL-13}$  (pM)

圖 1a

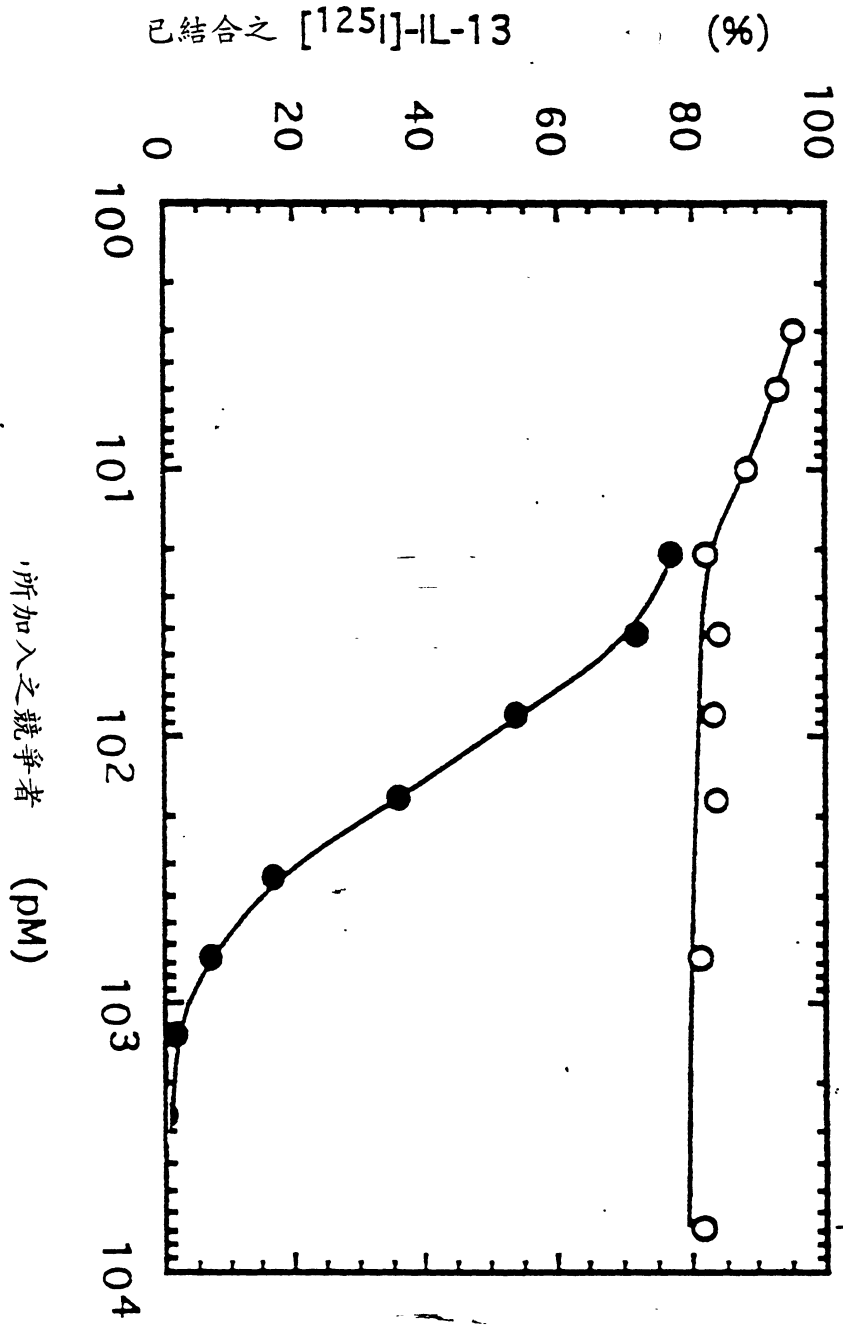


圖 1b

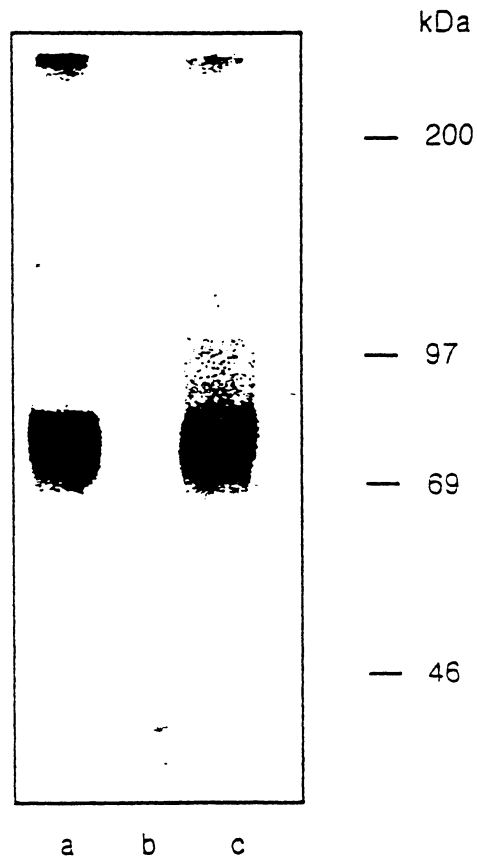
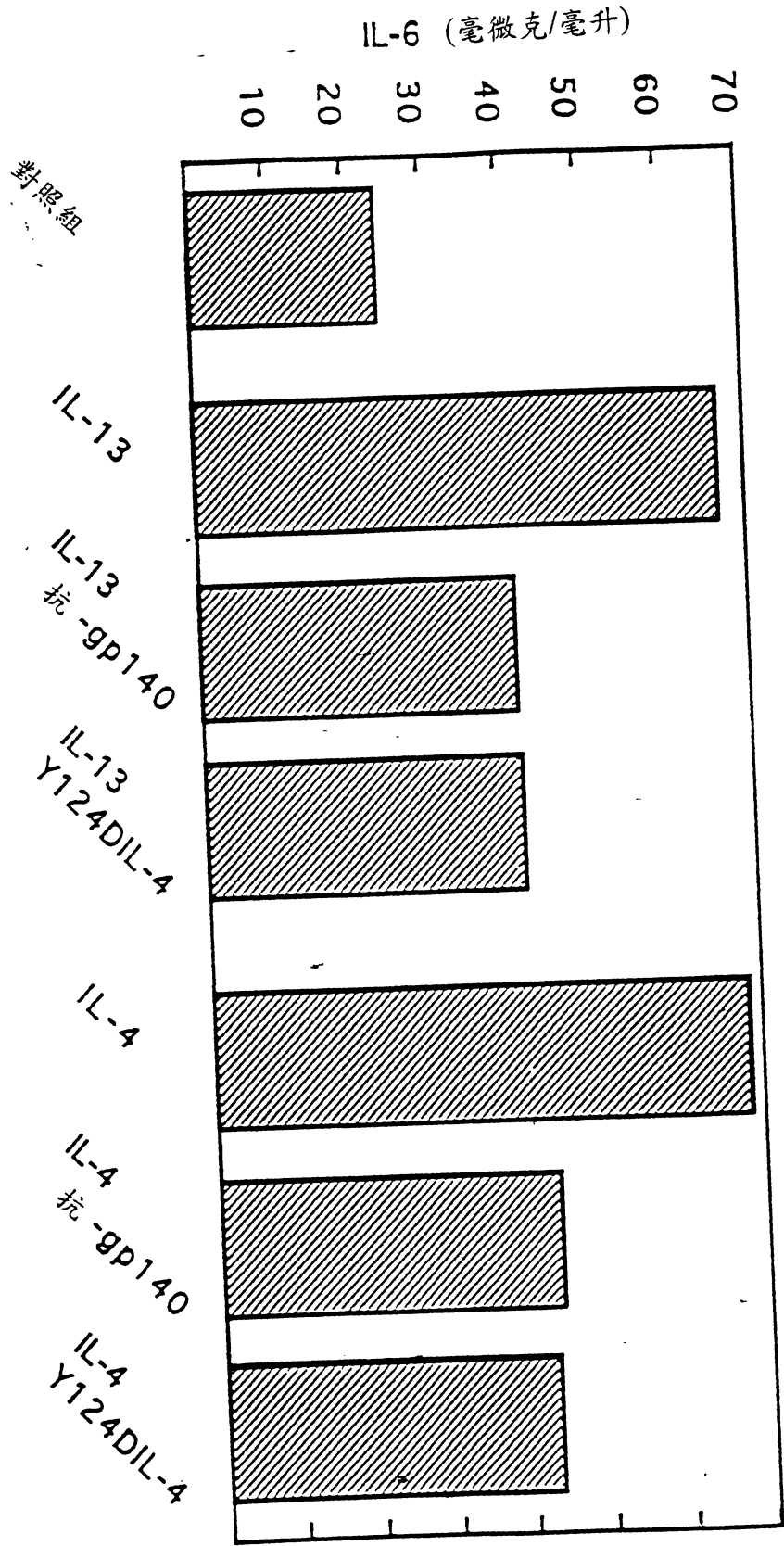


圖 1c



PI 圖

1	GGTGCCCTGTCGGCGGAGAGAGCAATATCAAGGTTTAAATCTCGGAGAAATGGCT	58
1		<i>MetA1a</i>
59	TTCGTTGCTTGGCTATCGGATGCTTATATACCTTCTGATAAGCACAACATTTGGCTGT	118
3	<i>PheValCysLeuAlaIleGlyCysLeuTyrThrPheLeuIleSerThrThrPheGlyCys</i>	22
119	ACTTCATCTTCAGACACCAGATMAAAGTTAAACCCTCCTCAGGATTTTGAGATAGTGAT	178
23	<i>ThrSerSerAspThrGluIleLysValAsnProProGlnAspPheGluIleValAsp</i>	42
179	CCCGATACTTAGGTTATCTCTATTTGCAATGGCAACCCCACTGCTCTGGATCATTTT	238
43	<i>ProGlyTyrLeuGlyTyrLeuTyrLeuGlnTrpGlnProProLeuSerLeuAspHisPhe</i>	62
239	AAGGATGCACAGTGGMATATGAACTAAATACCGAAACATTTGGTAGTGAACAATGGAAG	298
63	<i>LysGluCysThrValGluTyrGluLeuLysTyrArgAsnIleGlySerGluThrTrpLys</i>	82
299	ACCATCATTACTAAGATCTACATTACAAGATGGGTTGATCTTAACAAGGCCATTGAA	358
83	<i>ThrIleIleThrLysAsnLeuHisTyrLysAspGlyPheAspLeuAsnLysGlyIleGlu</i>	102
359	GCGAAGATACACACCGCTTTTACCATGGCAATGCACAATGATCAGAAGTTCAAAGTCC	418
103	<i>AlaLysIleHisThrLeuLeuProTrpGlnCysThrAsnGlySerGluValGlnSerSer</i>	122
419	TGGCAGAAACTACTTATTGGATATCACCAAGCAAGGAAATTCAGAAACTMAAGTTCAGGAT	478
123	<i>TrpAlaGluThrThrTyrTrpIleSerProGlnGlyIleProGluThrLysValGlnAsp</i>	142
479	ATGATTTGCCGTATATACAAATTTGGCAATATTACTCTGTTCTTGGAACCTGGCAATAGT	538
143	<i>MetAspCysValTyrTyrAsnTrpGlnTyrLeuLeuCysSerTrpLysProGlyIleGly</i>	162
539	GTA CTCTTGATACCAATTACA ACTTGT TTTACTGGTATGAGGGCTTGATCATGCATTA	598
163	<i>ValLeuLeuAspThrAsnTyrAsnLeuPheTyrTrpTyrGluGlyLeuAspHisAlaLeu</i>	182
599	CAGTGTGTTGATTACATCAAGGCTGATGACAAATATAGGATGCAGATTTCCCTATTTG	658
183	<i>GlnCysValAspTyrIleLysAlaAspGlyGlnAsnIleGlyCysArgPheProTyrLeu</i>	202

659	GAGGATCAGACTATAAGATTCTATATTTGTTAAATGATCAGAGAACAAAGCCT	718
203	Gl uAl aSe rAs pTy rL ys aS pHe tTy rI l eCy sVa lAs nG lY Se rSe rGl uAs nL ys pRo	222
719	ATCAGATCCAGTTATTTCACTTTTCAGCCTTCAAAATATAGTTAAACCTTTGCCGCCAGTC	778
223	I l eAr gSe rSe rTy rP he tTh rP he Gl nLe uGl nAs nI l eVa lL ys pRo l eUp roP roVa l	242
779	TATCTTACTTTTACTCGGAGAGTTTCATGTGAAATTAAGCTGAAATGGACATACCTTTG	838
243	Ty rLe uTh rP he tTh rAr gGl uSe rSe rCy sGl uI l eL ys Le uL ys tR pSe rI l eP roLe u	262
839	GGACCTATTCAGCAAGGTGTTTGAATTATGAAATGAGATCAGAGAGATGATACTACC	898
263	Gl yP roI l eP roAl aAr gCy sP he aS pTy rGl uI l eGl uI l eAr gGl uAs pAs pTh rTh r	282
899	TTGGTGACTGCTACAGTTGAAATGAAACATACACCCTTGAAAAACAAATGAAACCCCGA	958
283	Le uVa lTh rAl aTh rVa lGl uAs nG lU tTh rTy rTh rLe uL ys Th rTh rAs nG lU tTh rAr g	302
959	CAATTATGCTTTGTAGTAAGAACAAAGTGAATATTTATTTGCTCAGATGACCGAATTTGG	1018
303	Gl nLe uCy sP he Va lVa lAr gSe rL ys Va lAs nI l eTy rCy sSe rAs pAs pG lY l l eT rp	322
1019	AGTGAGTGGAGTGAATAACAATGCTGGGAAAGGTGAAGACCTATCGAAGAAAACCTTTGCTA	1078
323	Se rGl uTr pSe rAs pL ys Gl nCy sTr pGl uG lY Gl uAs pLe uSe rL ys tTh rLe uLe u	342
1079	CGTTTCTGGCTAACCATTTGGTTTCATCTTAATATAGTTATATTTGTAACCGGCTGCTT	1138
343	Ar gP he tTr pLe uP roP he Gl yP he I l eLe uI l eLe uVa lI l eP he Va lTh rG lY Le uLe u	362
1139	TTGCGTAAGCCAAACAACCTACCCAAAATGATTTCCAGAAATTTTCTGTGATACATGAMAGA	1198
363	Le uAr gL ys pRo aS nTh rTy rP roL ys Me tI l eP roG lU pHe pHe Cy sAs pTh r	381
1199	CTTTCATATACAGACATGGTATTTGACTCAACAGTTTCCAGTCATGGCCAAATGTTC	1258
1259	ATATGAGTCTCAATAAAGTGAATTTTCTTCCGAATGTTG 1298	

IL13R MAFVCLAIGCLYTFLISTTFGCTSSSDTEIKVNPQDFEIVDPGYLGYLEY 50  
 IL5R ..MIIVAHVLLILLGATEELQADLLPDEKISLLPVPVNFNIKVTG.LAQVL 47

IL13R LQWQPPLSLDHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIITKNLHYKDGFDLNKG 100  
 IL5R LQWKPNPDQEQ.RNVNLEYQVKINAPKEDDYETRITES...KCVTILHKG 93

IL13R IEAKIHTELLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWISPOGIPETKVQDMDCV.... 146  
 IL5R FSASVRTILQ...NDHSLASSWASAE.LHAPPGSPGTSIVNLTCTTNTT 139

IL13R ..YYNWQ.....YELCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQCVDYIK 189  
 IL5R EDNYSRLRSYQVSLHCTWLVGTDAPEDTQYFLYRYGSWTE..EQEYSK 187

IL13R AD.GONIGCRFP..YLEASDYKDFYICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIIV 236  
 IL5R DTLGRNIAQWFPRTFILSKGRDWLSVLVNGSSKHSAIRPFDQLFALHAID 237

IL13R KPLPPVYLTFRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCFDYEIEEREDDTTLVTA 286  
 IL5R QINPPLNVTAEIEGT.RLSIQWEKPVSAFPIHCFDYEVKIHNTRNGYLQI 286

IL13R TVENETYTLKTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIIWSEWSDKQCWEGEDL 336  
 IL5R EKLMTNAFISIEDLSKYDVQVRAAVSSMCREAGLIWSEWSQ.PIYVGND 335

IL13R SKKTLRLFWLPPGFILILVEFVTGLLLRKPNTYPMIP.....EF 376  
 IL5R HKPLREWFVIVIMATICFILLILSLICKICHLWIKLFPPIAPKSNIKDL 385

IL13R FCDT..... 380  
 IL5R FVTTNIEKAGSSETEIEVICYIEKPGVETLEDSVF 420

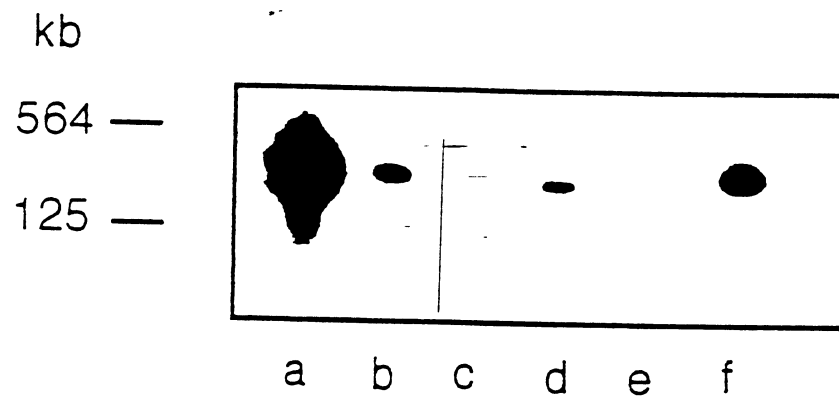


圖 3

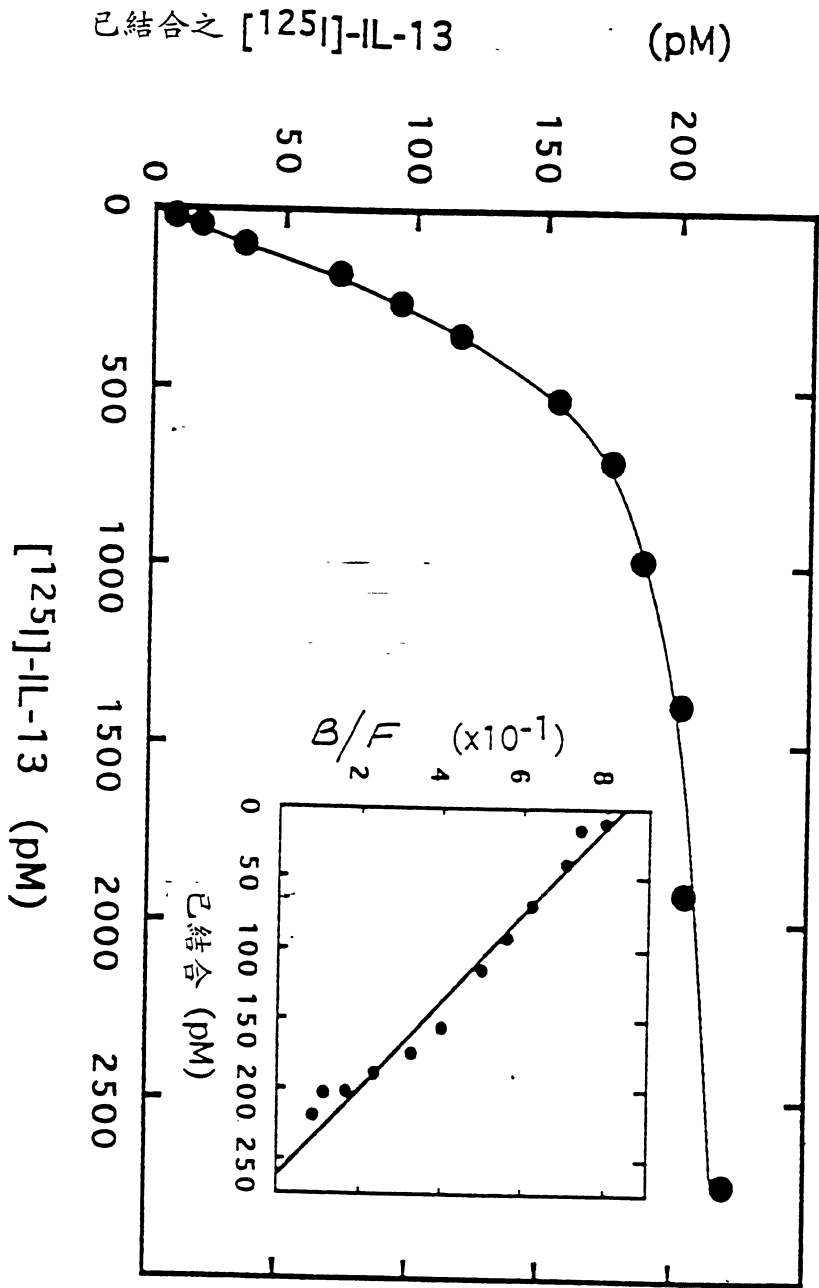


圖 4a

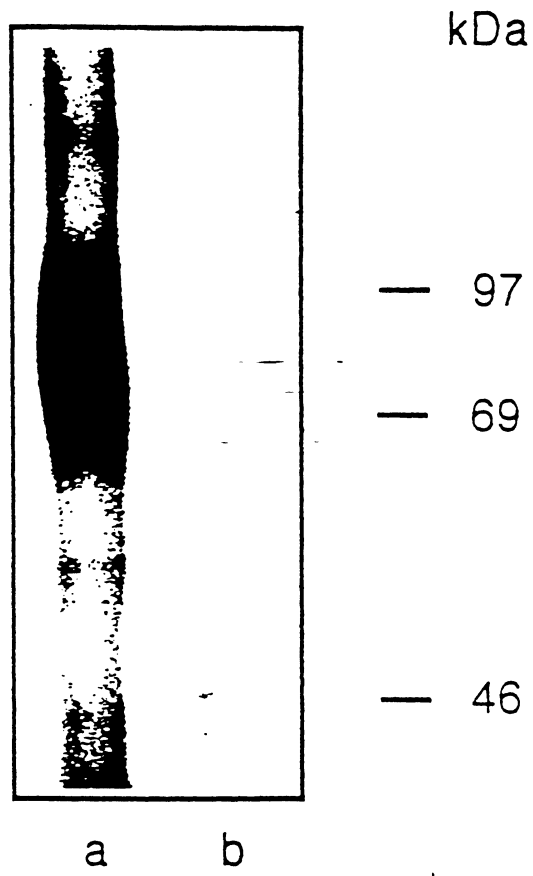


圖 4b

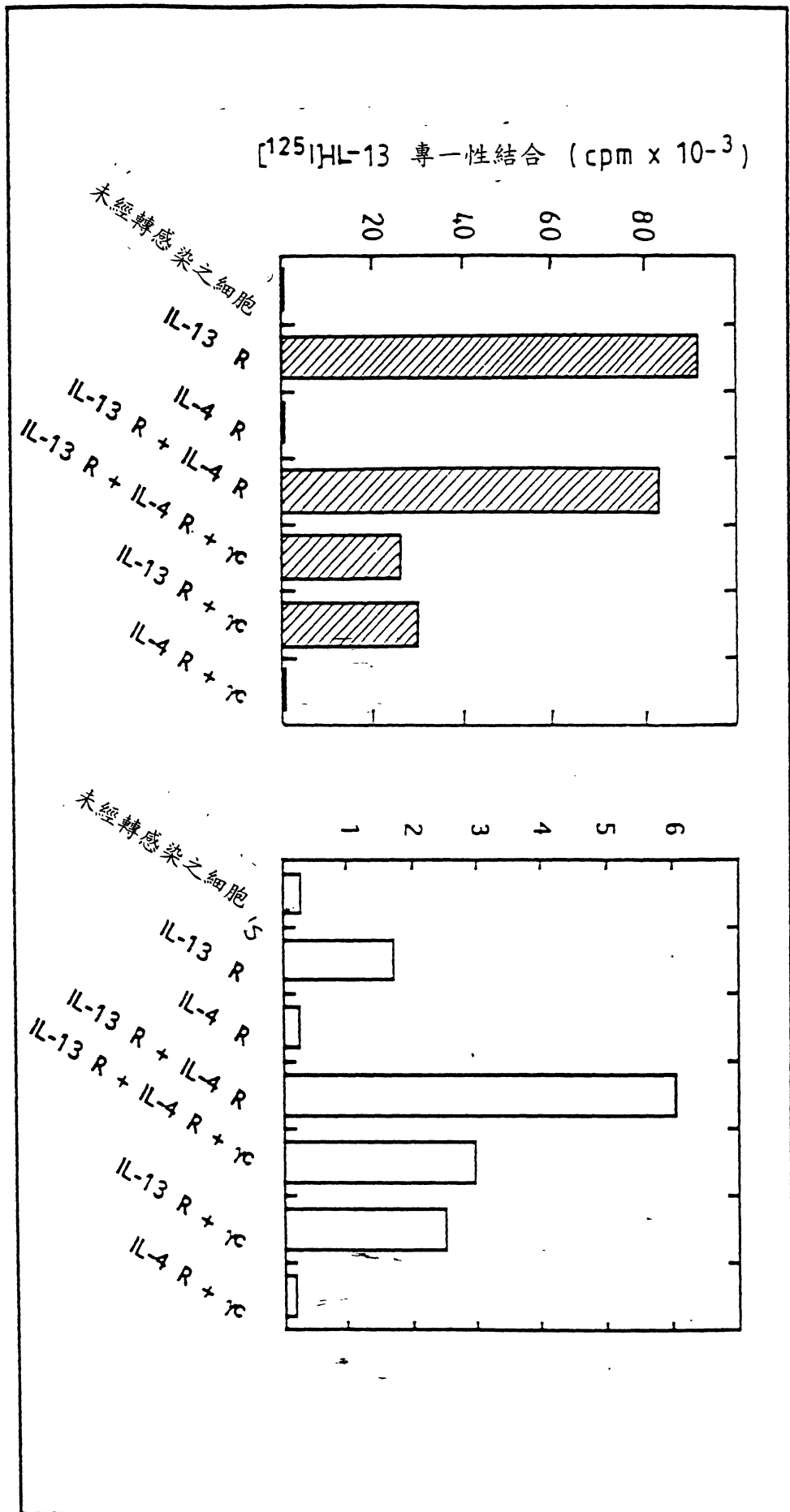


圖 4c

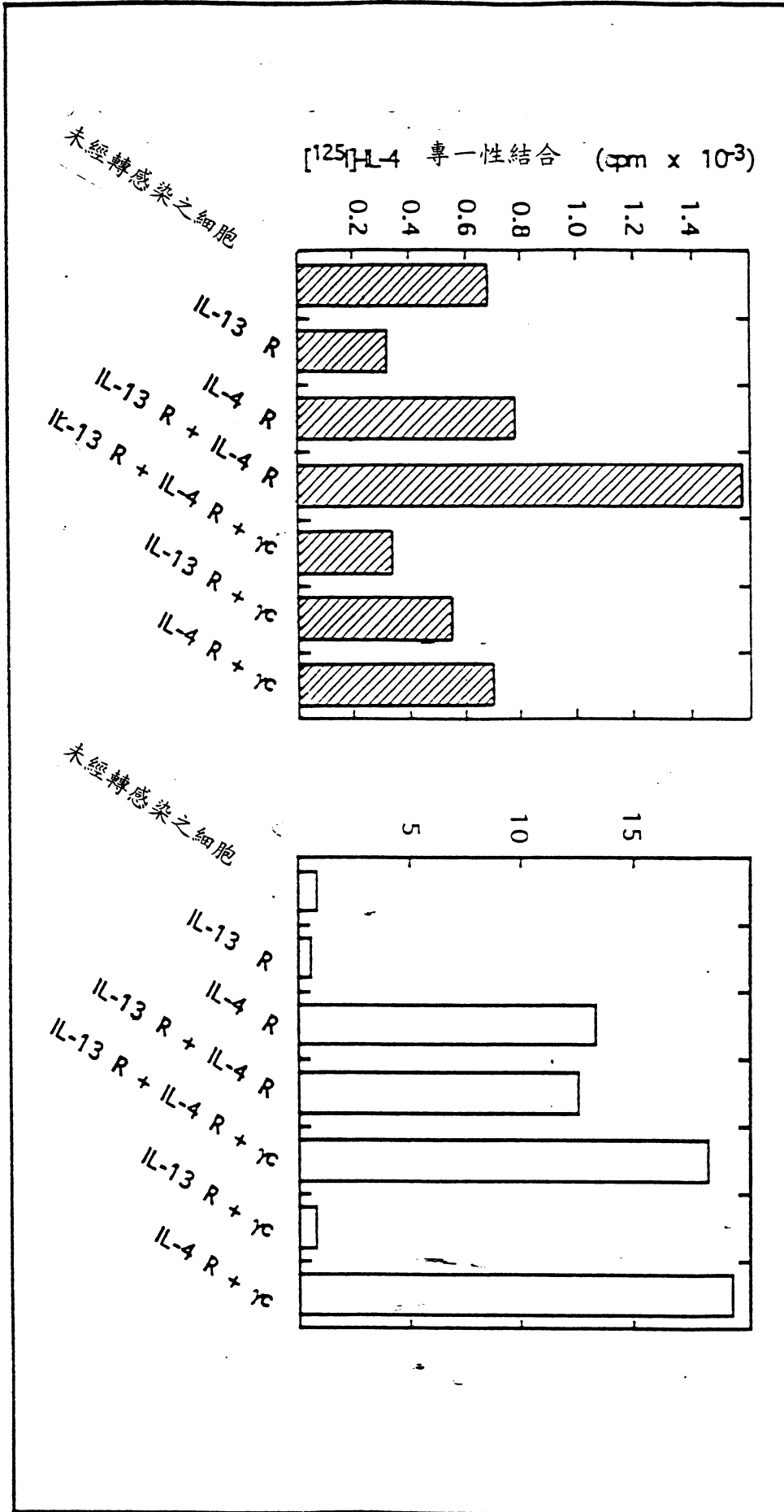
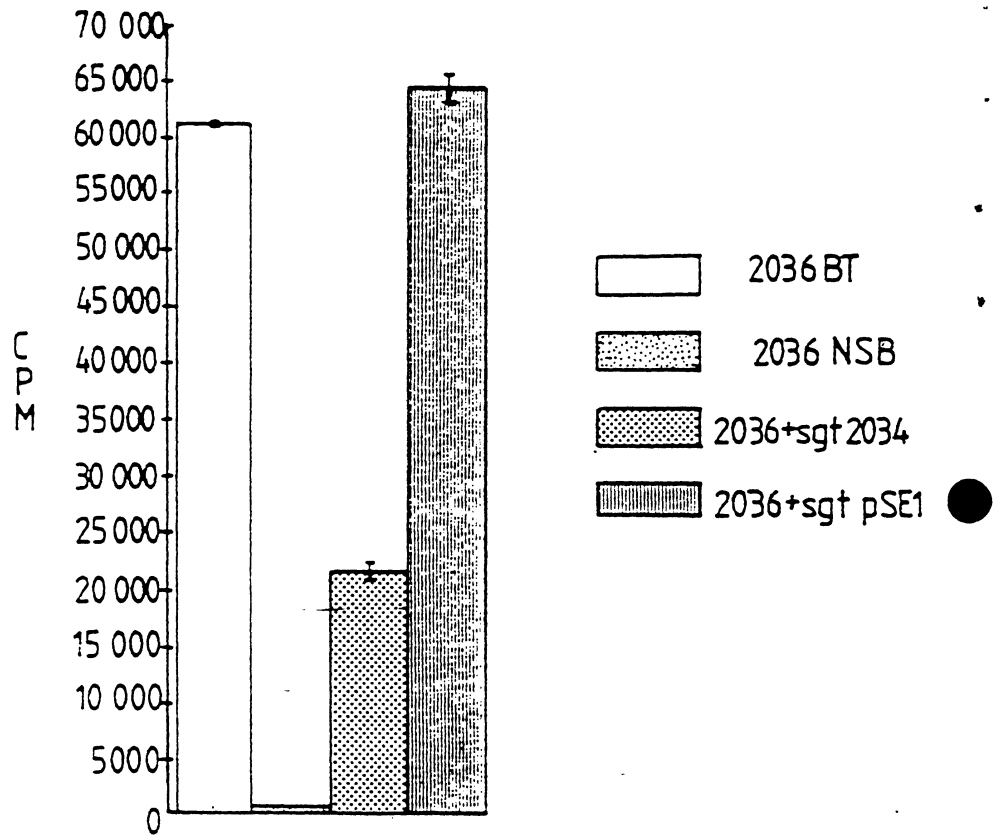


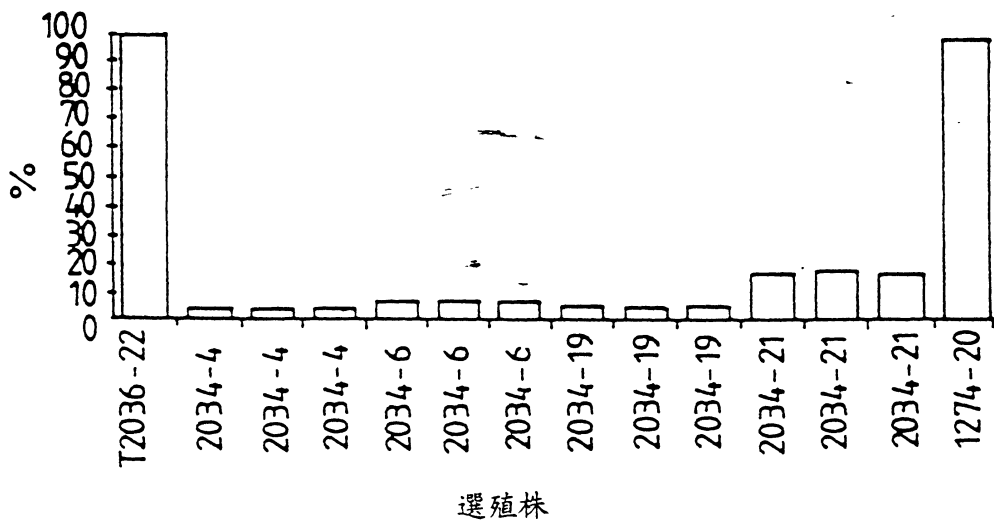
圖 4d



轉感染:

圖 5

圖 6

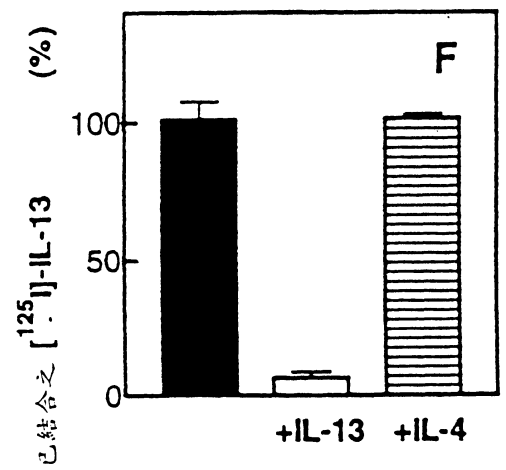
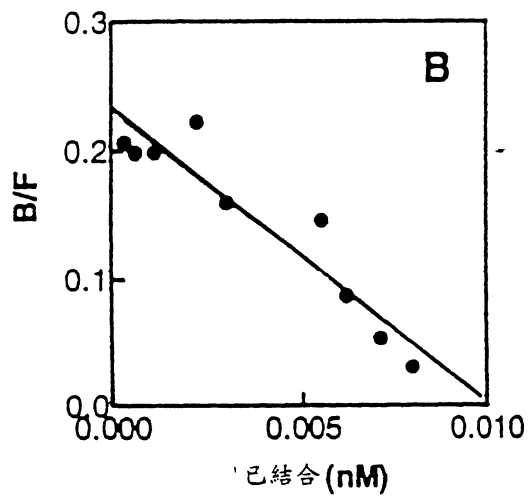
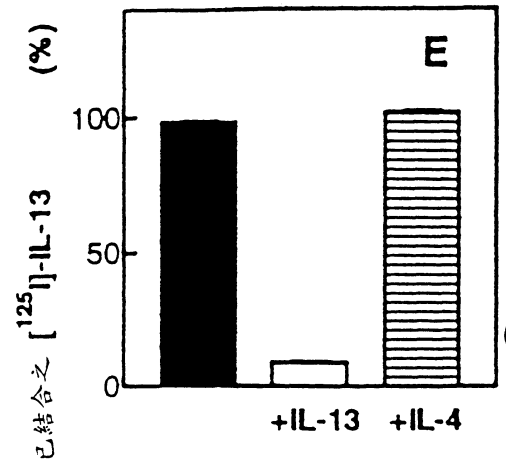
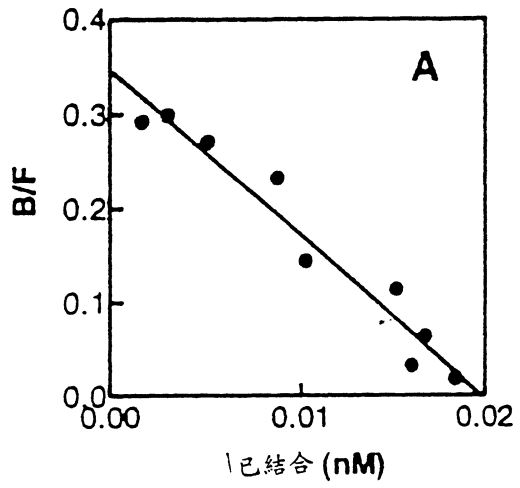


選植株

1 TCAGCCCGGCCGGGCTCCGAGGCGAGAGGCTGCATGGAGTGGCCGGCGGGCTCTGCGGG 60  
 -10 M E W P A R L C G 9  
 61 CTGTGGGCGCTGCTGCTCTGCGCCGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGCCGCGCCTACG 120  
 10 L W A L L L C A G G G G G G G A A P T 29  
 121 GAAACTCAGCCACCTGTGACAAATTTGAGTGTCTCTGTTGAAAACCTCTGCACAGTAATA 180  
 30 E T Q P P V T N L S V S V E N L C T V I 49  
 181 TGGACATGGAATCCACCCGAGGGAGCCAGCTCAAATTTAGTCTATGGTATTTTAGTCAT 240  
 50 W T W N P P E G A S S N C S L W Y F S H 69  
 241 TTTGGCGACAAACAAGATAAGAAAATAGCTCCGAAACTCGTCGTTCAATAGAAGTACCC 300  
 70 F G D K Q D K K I A P E T R R S I E V P 89  
 301 CTGAATGAGAGGATTTGTCTGCAAGTGGGGTCCCAGTGTAGCACCAATGAGAGTGAGAAG 360  
 90 L N E R I C L Q V G S Q C S T N E S E K 109  
 361 CCTAGCATTTTGGTTGAAAAATGCATCTCACCCCCAGAAGGTGATCCTGAGTCTGTGTG 420  
 110 P S I I V E K C I S P P E G D P E S A V 129  
 421 ACTGAGCTTCAATGCATTTGGCACAACC'TGAGCTACATGAAGTGTCTCTGGCTCCCTGGA 480  
 130 T E L Q C I W H N L S Y M K C S W L P G 149  
 481 AGGAATACCAGTCCCGACACTAATACTCTACTATTGGCACAGAAGCCTGGAAAAA 540  
 150 R N T S P D T N Y T L Y Y W H R S L E K 169  
 541 ATTCATCAATGTGAAAACATCTTTAGAGAAGGCCAATACTTTGGTTGTTCTTTGATCTG 600  
 170 I H Q C E N I F R E G Q Y F G C S F D L 189  
 601 ACCAAAGTGAAGGATTCCAGTTTGAACAACACAGTGTCCAATAATGGTCAAGGATAAT 660  
 190 T K V K D S S F E Q H S V Q I M V K D N 209  
 661 GCAGGAAAAATTAACCATCCTTCAATATAGTGCCTTTAACTTCCCGTGTGAAACCTGAT 720  
 210 A G K I K P S F N I V P L T S R V K P D 229  
 721 CCTCCACATATTA AAAACCTCTCCTTCCACAATGATGACCTATATGTGCAATGGGAGAAT 780  
 230 P P H I K N L S F H N D D L Y V Q W E N 249  
 781 CCACAGAATTTTATTAGCAGATGCCTATTTTATGAAGTAGAAGTCAATAACAGCCAACT 840  
 250 P Q N F I S R C L F Y E V E V N N S Q T 269  
 841 GAGACACATAATGTTTCTACGTCCAAGAGGCTAAATGTGAGAATCCAGAATTTGAGAGA 900  
 270 E T H N V F Y V Q E A K C E N P E F E R 289  
 901 AATGTGGAGAATACATCTTGTTCATGGTCCCTGGTGTCTTCTGATACTTTGAACACA 960  
 290 N V E N T S C F M V P G V L P D T L N T 309  
 961 GTCAGAATAAGAGTCAAAAACAATAAGTTATGCTATGAGGATGACAAACTCTGGAGTAAT 1020  
 310 V R I R V K T N K L C Y E D D K L W S N 329  
 1021 TGGAGCCAAGAAATGAGTATAGGTAAGAAGCGCAATTCCACACTCTACATAACCATGTTA 1080  
 330 W S Q E M S I G K K R N S T L Y I T M L 349  
 1081 CTCATTGTTCCAGTCATCGTCGCAGGTGCAATCATAGTACTCCTGCTTTACCTAAAAAGG 1140  
 350 L I V P V I V A G A I I V L L L Y L K R 369  
 1141 CTCAAGATTATTATATTCCTCCAATTCCTGATCCTGGCAAGATTTTAAAGAAATGTTT 1200  
 370 L K I I I F P P I P D P G K I F K E M F 389  
 1201 GGAGACCAGAATGATGATACTCTGCACTGGAAGAAGTACGACATCTATGAGAAGCAAACC 1260  
 390 G D Q N D D T L H W K -K Y D I Y E K Q T 409  
 1261 AAGGAGGAAACCGACTCTGTAGTGTGATAGAAAACCTGAAGAAAGCCTCTCAGTGATGG 1320  
 410 K E E T D S V V L I E N L K K A S Q 429

1381	TATCTGGGAACCTATTAAATGGAACTGAACTACTGCACCATTTAAAAACAGGCAGCTC	1440
1441	ATAAGAGCCACAGGTCTTTATGTTGAGTCGCGCACCGAAAAACTAAAAATAATGGGCGCT	1500
1501	TTGGAGAAGAGTGTGGAGTCATTCTCATTGAATTATAAAAGCCAGCAGGCTTCAAACCTAG	1560
1561	GGGACAAAGCAAAAAGTGATGATAGTGGTGGAGTTAATCTTATCAAGAGTTGTGACAACCT	1620
1621	TCCTGAGGGATCTATACTTGCTTTGTGTTCTTTGTGTCAACATGAACAAATTTTATTTGT	1680
1681	AGGGGAACTCATTTGGGGTGCAAATGCTAATGTCAAACCTGAGTCACAAAGAACATGTAG	1740
1741	AAAACAAAATGGATAAAAATCTGATATGTATTGTTTGGGATCCTATTGAACCATGTTTGTG	1800
1801	GCTATTAAACTCTTTTAAACAGTCTGGGCTGGGTCCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAG	1860
1861	CAATTTGGGAGTCCGAGGCGGGCGGATCACTCGAGGTGAGGATTCAGACCAGCCTGAC	1920
1921	CAAAATGGTGAAACCTCCTCTCTACTAAAACCTACAAAAATTAACCTGGGTGTGGTGGCGCG	1980
1981	TGCCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAAGCTGAGGCAGGTGAAATGTTTGAACCTGGGAGGT	2040
2041	GGAGGTTGACAGTGCAGAGATCACACCCTGCACTCTAGCCTGGGTGACAGAGCAAGAC	2100
2101	TCTGTCTAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACCTCTTAATATTCTGGAGT	2160
2161	CATCATTTCCCTTTGACAGCAATTTTCTCTGCTTTTGAAGGCCCCAGAAAATCAGTGTGGCC	2220
2221	ATGATGACAACCTACAGAAAACCAGAGGCAGCTTCTTTGCCAAGACCTTTCAAAGCCATT	2280
2281	TTAGGCTGTTAGGGGCAGTGGAGGTAAATGACTCCTTGGGTATTAGAGTTTCAACCATG	2340
2341	AAGTCTCTAACAAATGTAATTTCTTCACCTCTGCTACTCAAGTAGCATTTACTGTGTCTTT	2400
2401	GGTTTGTGCTAGGCCCGGGTGTGAAGCACAGACCCCTTCCAGGGGTTTACAGTCTATC	2460
2461	TGAGACTCCTCAGTCTTGCCACTTTTTTTTTTAATCTCCACCAGTCATTTTTCAGACCT	2520
2521	TTTAACTCCTCAATTTCAACACTGATTTCCCCTTTTGCATTCTCCCTCCTCCCTCCTT	2580
2581	GTAGCCTTTTGACTTTTCAATGGAAATTAGGATGTAAATCTGCTCAGGAGACCTGGAGGAG	2640
2641	CAGAGGATAAATTAGCATCTCAGGTTAAGTGTGAGTAATCTGAGAAACAATGACTAATTCT	2700
2701	TGCATATTTTGTAACTTCCATGTGAGGGTTTTTCCAGCATTGATATTTGTGCATTTTCTAAA	2760
2761	CAGAGATGAGGTGGTATCTTCACGTAGAACATTGGTATTCGCTTGAGAAAAAAGAATAG	2820
2821	TTGAACCTATTTCTCTTTCTTTACAAGATGGGTCCAGGATTCCTCTTTTCTCTGCCATAA	2880
2881	ATGATTAATTAATAGCTTTTTGTGTCTTACATTGGTAGCCAGCCAGCCAAGGCTCTGTTT	2940
2941	ATGCTTTTGGGGGCATATATTGGGTTCATTCTCACCTATCCACACAACATATCCGTAT	3000
3001	ATATCCCCTACTCTTACTTCCCCAAATTTAAAGAAGTATGGGAAATGAGAGGCATTT	3060
3061	CCCCACCCCATTTCTCTCCTCACACACAGACTCATATTACTGGTAGGAACCTGAGAACT	3120
3121	TTATTTCCAAGTTGTTCAAACATTTACCAATCATATTAATACAATGATGCTATTTGCAAT	3180
3181	TCCTGTCTTAGGGGAGGGGAGATAAGAAACCCTCACTCTCTACAGGTTTGGGTACAAGT	3240
3241	GGCAACCTGCTTCCATGGCCGTGTAGAAGCATGGTGCCCTGGCTTCTCTGAGGAAGCTGG	3300
3301	GGTTCATGACAATGGCAGATGTAAAGTTATTCTTGAAGTCAGATTGAGGCTGGGAGACAG	3360
3361	CCGTAGTAGATGTTCTACTTTGTTCTGCTGTTCTCTAGAAAAGAAATTTGGTTTTCTGT	3420
3421	ATAGGAATGAGATTAATTCCTTTCCAGGATTTTTATAATTCTGGGAAGCAAACCCATGC	3480
3481	CTCCCCCTAGCCATTTTTACTGTTATCCTATTTAGATGGCCATGAAGAGGATGCTGTGAA	3540
3541	ATTCCCAACAACATTGATGCTGACAGTCATGCAGTCTGGGAGTGGGGAAGTGATCTTTT	3600
3601	GTTCCCATCCTCTTCTTTTAGCAGTAAAATAGCTGAGGGAAAAGGGAGGGAAAAGGAAGT	3660
3661	TATGGGAATACCTGTGGTGGTTGTGATCCCTAGGTCTTGGGAGCTCTTGGAGGTGTCTGT	3720
3721	ATCAGTGGATTTCCCATCCCCTGTGGGAAATTAGTAGGCTCATTTACTGTTTTAGGTCTA	3780
3781	GCCTATGTGGATTTTTTCCTAACATACTTAAGCAAACCCAGTGCAGGATGGTAATTCTT	3840
3841	ATTCTTTCGTTTCAGTTAAGTTTTTCCCTTCATCTGGGCACTGAAGGGATATGTGAAACAA	3900
3901	TGTTAACATTTTTGGTAGTCTTCAACCAGGGATTGTTTCTGTTTAACTTCTTATAGGAAA	3960
3961	GCTTGAGTAAAATAAATATTGTCTTTTTGTATGTCACCcaaaaaaaaaa 4009	





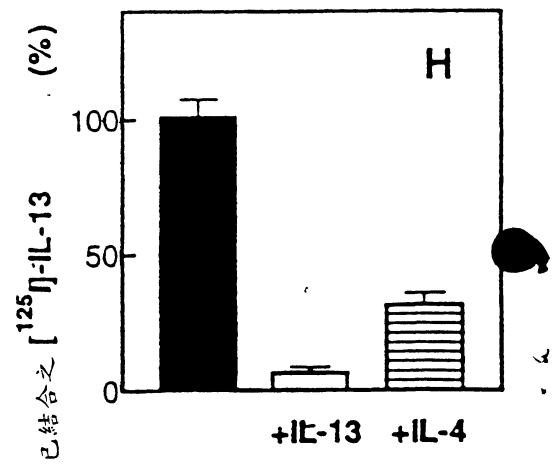
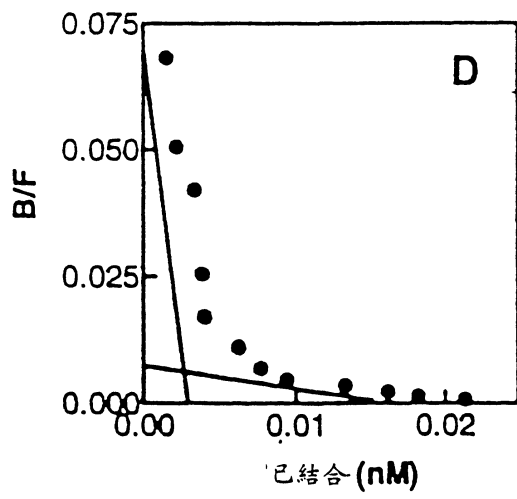
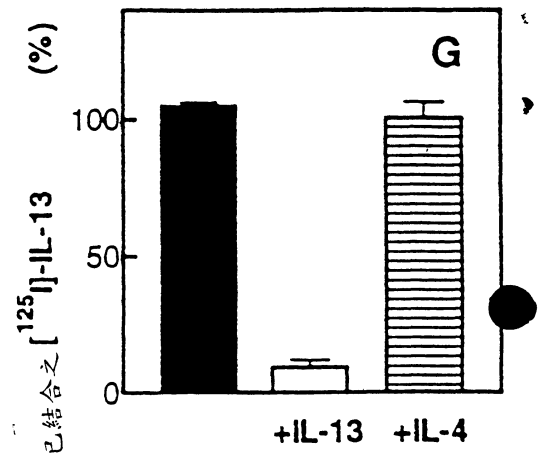
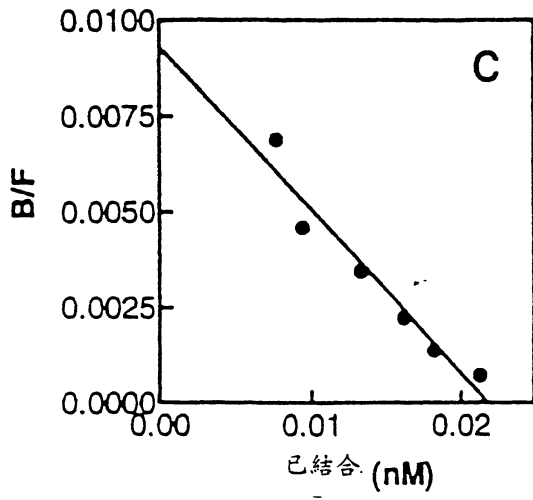


圖 8 (續)

CHO CHO-4 CHO-13 CHO-4-13  
4 13 4 13 c 4 13 c 4 13 c



圖 9

92.7.11 修正  
年 月 日 補充

公告本

申請日期	85.12.05
案 號	085115042
類 別	C07K 14/15, 16/28, C12N 15/12, 17/85, 5/10 C07H 2/10, C12P 2/102, G01N 33/33, A61K 39/17

A4  
C4

(以上各欄由本局填註) 中文說明書替換頁 (92年7月)

565570

發明  
新 型 專 利 說 明 書

一、發明 新 型 名 稱	中 文	人類間白素-13受體β
	英 文	"HUMAN IL-13 RECEPTOR β"
二、發明 創 作 人	姓 名	1. 丹尼爾 卡普 2. 巴斯瓜爾 斐瑞拉 3. 派崔克 勞倫特 4. 納塔利歐 維塔
	國 籍	1. 3. 法國 2. 阿根廷 4. 義大利
三、申請人	住、居所	1. 法國艾文諾特勞拉蓋斯市保奎爾路 2. 法國艾文諾特勞拉蓋斯市利玻聖艾希可 3. 法國歐特里佛市卡蒙泰斯路 4. 法國歐特里佛市卡蒙泰斯路
	姓 名 (名 稱)	法商沙諾費-辛芷拉保公司
	國 籍	法國
	住、居所 (事務所)	法國巴黎市第174大道
	代 表 人 姓 名	伊莉莎貝絲 梭特-萊麥特

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 ( 24 )

cpm)放射性標定之寡核苷酸探針，對應於人類Cε促進子之Cε單元之探針完成EMSA(37)。所合成之寡核苷酸探針具有下列序列：

5'-GATCCACTTCCCAAGAACAGA-3'.

## 實施例

## 實施例1

於Caki-1細胞表面表現人類IL-13Rβ之分析

最近頃發現，人類腎癌細胞除了表現IL-4及IL-13共用之受體外，尚表現大量專一的IL-13受體(21)。基於此等結果，以人類癌細胞系樣品用於研究如上所述IL-13之附著(17)。對一種表現特別大數量IL-13結合位置之特別細胞系，Caki-1(ATCC HTB46)，進行更詳盡之分析。得自飽和實驗之史考恰得曲線顯示存在具有kd為 $446 \pm 50$  pM及容量為 $7.2 \times 10^4$ 受體/細胞之結合位置(圖1a)。於競爭實驗中，未經標定之IL-13以劑量-依賴方式完全取代經標定之IL-13，而IL-4以較高親和性取代約10%經標定之IL-13。更高濃度之IL-4(大於100 ppm)並不會取代剩餘90%已結合之IL-13(圖1b)。

此等結果與兩位置，一者由該二種細胞活素共用，而另一者對IL-13具專一性，之存在相符。藉由對IL-13之親和力的交聯實驗，顯示一種具約70 kDa之複合物，其與以IL-



## 五、發明說明 ( 25 )

13於各種細胞型中進行相同交聯實驗所觀察得之複合物相符(17, 21)。經標定之IL-13完全被IL-13而非IL-4從複合物置換出，其與競爭實驗相符(圖1c)。

## 實施例2：

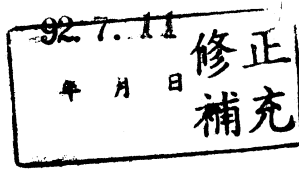
由IL-4或IL-13誘發IL-6分泌之分析。

本發明作者分析由IL-4或IL-13於Caki-1細胞誘發之分泌作用。該兩種細胞活素誘發相同程度之IL-6分泌。且該分泌作用被對IL-4R之 $\alpha$ 鏈專一的抗體及拮抗劑Y124DIL-4抑制(圖1d)。此暗示於Caki-1細胞中由該二種細胞活素共用之受體，係成為誘發IL-6分泌的原因。當由IL-4與IL-13所誘發蛋白質複合物IRS1/4PR (18)之磷酸化作用，於抗-IL-4R抗體及IL-4拮抗劑存在與否下進行分析時，觀察到相似的結果。

就整體而言，此等結果暗示，Caki細胞中所表現之受體複合物IL-4/IL-13與先前所述者相同，且被過度表現之與IL-13結合的蛋白質(IL-13R $\beta$ )係負責於包括IL-4R之功能性複合物中辨識IL-13之組成。因此使用此等細胞做為選殖此IL-13結合實體之訊息者RNA來源。

## 實施例3：

IL-13受體之第一級次單位(IL-13R $\beta$ )之選殖：

四、中文發明摘要(發明之名稱：人類間白素-13受體 $\beta$ )

本發明係關於一種經純化之多肽，其包含選自下列之胺基酸序列：

- a) 序列鑑定編碼(SEQ ID No.) 2之序列，
- b) 任何衍生自SEQ ID No. 2之生物學上具活性序列。

英文發明摘要(發明之名稱："HUMAN IL-13 RECEPTOR  $\beta$ ")

This invention relates to a purified polypeptide, comprising an amino acid sequence chosen from:

- a) the sequence SEQ ID No. 2,
- b) any biologically active sequence derived from SEQ ID No. 2.

## 六、申請專利範圍

1. 一種人類 IL-13 受體多肽，其係由胺基酸序列 SEQ ID NO. 2 組成；其中該 SEQ ID NO. 2 之序列如下所示：

```

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

Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp
130        135        140
Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly
145        150        155
Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu
165        170        175
Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly
180        185        190
Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys
195        200        205
Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg
210        215        220
Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro
225        230        235
Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu
245        250        255
Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr
260        265        270

```



## 六、申請專利範圍

b) 因為遺傳密碼子簡併性而衍生自序列 a) 之核酸序列；其中 SEQ ID NO. 1 之序列如下所示：

GGTGCCTGTC	GGCGGGGAGA	GAGGCAATAT	CAAGGTTTTTA	AATCTCGGAG	AAATGGCTTA	60
ATTGTTTTGC	TTGGCTATCG	GATGCTTATA	TACCTTTCTG	ATAAGCACAA	CATTTGGCTG	120
TACAAGCTTT	TGCAC TTCAT	CTTCAGACAC	CGAGATAAAA	GTTAACCCCTC	CTCAGGATTT	180
TGAGATAGTG	GATTATGAAG	AGAACCCGGA	TACTTAGGTT	ATCTCTATTT	GCAATGGCAA	240
CCCCACTGT	CTCTGGATCA	TTTTGTGTTG	TGAAAGGAAT	GCACAGTGGA	ATATGAACTA	300
AAATACCGAA	ACATTGGTAG	TGAAACATGG	AAGGCTAGTG	TAGAGGTTAC	CATCATTACT	360
AAGAATCTAC	ATTACAAAGA	TGGGTTTGAT	CTTAACAAGG	GCATTGAATT	ATAGAAGGGC	420
GAAGATACAC	ACGCTTTTAC	CATGGCAAATG	CACAAATGGA	TCAGAAGTTC	AAAGTTCCAA	480
TTGCTAGGAG	TGGGCAGAAA	CTACTTATTG	GATATCACCA	CAAGGAATTC	CAGAAACTAA	540
AGTTCAGGAT	TAAGTTTTGG	GTAGAATGGA	TTGCGTATAT	TACAATTGGC	AATATTTACT	600
CTGTTCTTGG	AAACCTGGCA	TAGGTTACAT	TATGTCTGGG	TACTTCTTGA	TACCAATTAC	660
AACTTGTTTT	ACTGGTATGA	GGGCTTGGAT	CATGCATTAA	ATATATTTGG	AAACAGTGTG	720
TTGATTACAT	CAAGGCTGAT	GGACAAAATA	TAGGATGCAG	ATTTCCCTAT	TTGGCAATAA	780
AGGAGCAGTG	AGGCATCAGA	CTATAAAGAT	TTCTATATTT	GTGTTAATGG	ATCATCAGAG	840
AACAAGCCTG	AAATATCAAG	GAATCAGATC	CAGTTATTTT	ACTTTTCAGC	TTCAAAAATAT	900
AGTTAAACCT	TTGCCGCCAG	TCAGTTGGAA	ATATCTTACT	TTTACTCGGG	AGAGTTCATG	960
TGAAATTAAG	CTGAAATGGA	GCATACCTTT	GTTTAGGCGT	GGACCTATTC	CAGCAAGGTG	1020
TTTTGATTAT	GAAATTGAGA	TCAGAGAAGA	TGATACTACC	GAAAGCATGG	AGGAATTTTG	1080
GTGACTGCTA	CAGTTGAAAA	TGAAACATAC	ACCTTGAAAA	CAACAAATGA	AACCCGAATA	1140
ATAGAGTTTT	TAGTAGCAAT	TATGCTTTGT	AGTAAGAAGC	AAAGTGAATA	TTTATTGCTC	1200
AGATGACGGA	ATTTGGGCAA	AGAATCAAGT	AGTGAGTGGA	GTGATAAACA	ATGCTGGGAA	1260
GGTGAAGACC	TATCGAAGAA	AACTTTGCTA	GTAGCTGGGA	TCGTTTCTGG	CTACCATTTG	1320
GTTTCATCTT	AATATTAGTT	ATATTTGTAA	CCGGTCTGCT	TAGTGAATGT	TGCGTAAGCC	1380
AAACACCTAC	CCAAAAATGA	TTCCAGAATT	TTTCTGTGAT	ACATGAAGAA	GATTTGCATC	1440
TTTCCATATC	AAGAGACATG	GTATTGACTC	AACAGTTTCC	AGTCATGGCC	AAATGTTCAA	1500
TATGAGTCTC	AATAAACTGA	ATTTTTCTTG	CGAATGTTG			1539

## 六、申請專利範圍

7. 根據申請專利範圍第5項之分離之核酸序列，其特徵為其由序列SEQ ID NO. 1中之核苷酸NO: 1延展至核苷酸NO: 1081鍵聯組成；其中SEQ ID NO. 1之序列如申請專利範圍第5項所示。
8. 根據申請專利範圍第5項之分離之核酸序列，其特徵為其由序列SEQ ID NO. 1中之核苷酸NO: 1延展至核苷酸NO: 1063鍵聯組成；其中SEQ ID NO. 1之序列如申請專利範圍第5項所示。
9. 根據申請專利範圍第6項之核酸序列，其中a)中之核酸序列係藉由雜交作用，做為用以於生物樣本中偵測編碼根據申請專利範圍第1至4項中任一項之多肽的核酸序列，或用以顯示變異合成或基因異常如異質結合性喪失或基因重排之活體外診斷工具。
10. 根據申請專利範圍第6項之核酸序列，其中a)中之核酸序列係用於偵測染色體異常。
11. 一種用於編碼根據申請專利範圍第1至4項任一項之多肽的核酸序列層級上偵測變異合成或基因異常之活體外診斷方法，其特徵為其包含：
  - 將根據申請專利範圍第6項之a)中之核酸序列於能使該核酸序列與上述核苷酸間形成雜交複合物之條件下，視須要於預先將上述核苷酸序列放大後接觸；
  - 偵測所可能形成之雜交複合物；

## 六、申請專利範圍

一視須要，將與本發明形成雜交複合物之核苷酸定序。

12. 根據申請專利範圍第5項之核酸序列，其係用於製造根據申請專利範圍第1至4項中任一項之重組型多肽。

裝  
訂