



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201617090 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 16 日

(21) 申請案號：104106652

(22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 03 月 03 日

(51) Int. Cl. : A61K38/17 (2006.01)

C07K14/47 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

(30) 優先權：2014/03/03 日本

2014-041017

(71) 申請人：國立大學法人東京大學 (日本) THE UNIVERSITY OF TOKYO (JP)

日本

(72) 發明人：田中純美 TANAKA, JUNMI (JP)

(74) 代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：5 項 圖式數：10 共 73 頁

(54) 名稱

角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療劑，細胞片、細胞培養補助劑以及細胞培養方法
 PRECAUTIONARY, PREVENTIVE, OR THERAPEUTIC SUBSTANCE FOR CORNEAL DISEASE
 OR CORNEAL DAMAGE, CELL SHEET, CELL CULTURE SUPPLEMENT, AND METHOD OF
 CULTURING CELLS

(57) 摘要

本發明之角膜疾病或角膜損傷的預防、抑制或治療劑之特徵在於是以含有多肽做為有效成分，且該多肽含有由選自以下(a)~(c)所構成群組中之任一多肽構成的區域。(a)由序列編號 4 所示胺基酸序列中之連續 70 個以上的胺基酸構成，且含有序列編號 4 中 166aa~235aa 區域的多肽、(b)由序列編號 2 所示胺基酸序列中之連續 70 個以上的胺基酸構成，且含有序列編號 2 中 166aa~235aa 區域之多肽、(c)具有與(a)或(b)之多肽 80%以上序列相同性的多肽。

A precautionary, preventive, or therapeutic substance for corneal disease or corneal damage of the present invention is characterized by including a polypeptide as an active ingredient, which includes a region consisting of any one of a polypeptide selected from the group consisting of the following (a) to (c): (a) a polypeptide composed of at least 70 consecutive amino acids in an amino acid sequence represented by sequence identification number 4 and including a region of 166aa to 235aa in the sequence identification number 4, (b) a polypeptide composed of at least 70 consecutive amino acids in an amino acid sequence represented by sequence identification number 2 and including a region of 166aa to 235aa in the sequence identification number 2, and (c) a polypeptide having at least 80 percent of sequence homology with the polypeptide (a) or (b).

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療劑，細胞片、
細胞培養補助劑以及細胞培養方法/

PRECAUTIONARY, PREVENTIVE, OR
THERAPEUTIC SUBSTANCE FOR CORNEAL
DISEASE OR CORNEAL DAMAGE, CELL SHEET,
CELL CULTURE SUPPLEMENT, AND METHOD OF
CULTURING CELLS

【技術領域】

發明領域

[0001]本發明是關於含有以腦信號蛋白3A (Semaphorin 3A)做為有效成分之角膜疾病或角膜損傷的預防、抑制或治療劑。又，本發明是關於在腦信號蛋白3A存在下所培養之細胞片、含有以腦信號蛋白3A做為有效成分之細胞培養補助劑、及在腦信號蛋白3A下培養之細胞培養方法。

本案主張基於2014年3月3日在日本提出申請之日本特願2014-041017之優先權，並於此援用其內容。

【先前技術】

發明背景

[0002]角膜是位於眼球最表面之無血管透明組織，為了獲得健全的視力機能，對角膜而言，無疤痕組織或血管侵入且透明是必須條件。在維持該角膜之透明性上發揮重要作用的是位於角膜最內層之角膜內皮細胞。角膜內皮細胞是藉由屏蔽功能與幫浦功能來控制角膜實質(Parenchyma)

水分量之細胞，且被認為在人類活體內幾乎沒有分裂能力。

報告指出，通常在誕生時密度是每1平方毫米約3000個，然而隨著年齡增加，會以0.5%/年逐漸減少，若依照這個速度，角膜內皮細胞將會有200年的壽命。然而，由於配戴隱形眼鏡、各種眼科手術、角膜感染症、富克斯角膜內皮變性(Fuchs' corneal endothelial degeneration)等的角膜遺傳性疾病、青光眼、眼色素層炎，角膜內皮的減少率會變高。一旦角膜內皮細胞降到每1平方毫米約400個時，仰賴角膜內皮細胞之角膜實質之水分控制將無法達成，因此，角膜整體會變的浮腫，並呈現出毛玻璃狀之混濁。如此病態稱為大泡性角膜病變(bullous keratopathy)。大泡性角膜病變之混濁是不可逆性，且一旦成為如此狀態，患者會呈現出伴隨痛楚之非常強烈的視力機能障礙，並且會成為社會性的失明狀態。

現在並無以角膜內皮為標的的藥物治療，形成大泡性角膜病變時，唯一方法只有整層角膜移植或角膜內皮移植等角膜移植。現在大泡性角膜病變占據角膜移植術之原因疾病的第一位。然而，相較於其他疾病，對大泡性角膜病變之整層角膜移植術被指出其移植片的壽命短，且預後不良。又，在本國(日本)，捐贈角膜之供給不充足，目前甚至連唯一治療法之角膜移植都無法充分執行，許多的患者正苦於因為角膜內皮功能不全所產生角膜混濁而造成的視力機能減少。從如此背景來看，開發以角膜內皮之機能回復、

或者預防大泡性角膜病變為目的之治療法是備受期盼的，然而，現狀是毫無任何方法。

[0003]據說人類角膜內皮細胞(HCEC)在in vivo不會分裂，為了克服此現象正在進行許多嘗試。

近年來，有報告指出，從小鼠角膜實質分離出具有幹細胞特徵之細胞(非專利文獻4)。藉由使用誘導分化培養基，源自神經脊之該幹細胞甚至會有分化成神經細胞或脂肪細胞等的的能力。有報告指出，藉由將組織幹細胞/前驅細胞在添加了TGF β 之培養基中進行接著培養，可將該等細胞朝角膜內皮細胞誘導分化(專利文獻4)，然而關於是否具有做為角膜內皮細胞之機能(例如，幫浦功能)，則是毫無表示。

到目前為止，有報告指出藉由懸浮培養角膜內皮細胞所獲得之凝集體(Sphere)具有角膜內皮前驅細胞之性質(專利文獻5及非專利文獻3)。然而，以這個方法所獲得之凝集體並未表現角膜內皮起源之神經脊幹細胞的標誌p75，就其未分化性而言仍不明確。

雖據說角膜內皮細胞在in vivo不會分裂，但在in vitro有一定程度是可能增殖的。已嘗試了使角膜內皮細胞在in vitro增殖，並利用其於治療之方法(非專利文獻1及專利文獻1~3)。但是，在使用了以往之血清的培養法，一但長期培養角膜內皮細胞，該細胞會變化並失去角膜內皮機能，最終會完全停止增殖，一般而言，只能使其增殖到繼代數5~7(非專利文獻2)。

其他即便也有開發使用有培養角膜內皮細胞之細胞注

入治療，及基因導入技術或Rho激酶抑制劑之滴眼治療等的使培養角膜內皮細胞增殖之技術，然由於細胞狀態不好、只能少量生產、技術要求等級高、成本高等理由而無法進行培養角膜內皮細胞之移植，現狀便是難以應用於臨床上。

[0004]在免疫系統之功能已明瞭之代表性腦信號蛋白分子Sema3A，在神經系統中作為引導因子(guidance factor)之功能已在世界中積極分析(非專利文獻5)。

關於Sema3A與角膜之關聯，近年來有數例的報告。非專利文獻6顯示，Sema3A分別會表現在角膜上皮、角膜實質、角膜內皮。又有報告指出，因為角膜創傷或炎症，會使Sema3A的表現增強(非專利文獻7及非專利文獻8)。

然而直到目前，仍無報告明確指出關於在角膜中之Sema3A的作用及功能。

先行技術文獻

專利文獻

[0005]專利文獻1：國際公開第2006/092894號

專利文獻2：國際公開第2010/084970號

專利文獻3：國際公開第2013/012087號

專利文獻4：國際公開第2013/051722號

專利文獻5：國際公開第2011/096593號

非專利文獻

[0006]非專利文獻1：MICHIHARU KIKUCHI ET AL.:
'Suihosei Kakumakusho ni Okeru Kakumaku Naihi Saibo no

Zoshokuno' JOURNAL OF JAPANESE
OPHTHALMOLOGICAL SOCIETY vol. 106, 2002, page 103,
47

非專利文獻2 : TADASHI SENOO ET AL.: 'Suihosei
Kakumakusho no Kakumaku Naihi Saibo Zoshokuno'
JOURNAL OF JAPANESE OPHTHALMOLOGICAL
SOCIETY vol. 105, 2001, page 196, P65

非專利文獻3 : YAMAMOTO,N. ET AL.: 'Basic study of
retinal stem/progenitor cell separation from mouse iris tissue'
MED MOL MORPHOL vol. 43, no. 3, 2010, pages 139 - 144

非專利文獻4 : TOMA,J.G. ET AL.: 'Isolation of
multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian
skin' NAT. CELL BIOL. vol. 3, no. 9, September 2001, pages
778 - 84。

非專利文獻5 : Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS.
"The semaphorin genes encode a family of transmembrane
and secreted growth cone guidance molecules". Cell 75 (7):
1389-99(1994)

非專利文獻6 : Morishige N et al. Exp Eye Res. Vol.86
p835-843.

非專利文獻7 : Morishige N et al. Biochem Biophys Res
Commun. 2010 Vol.395 p451-457.

非專利文獻8 : Ko JA et al. Biochem Biophys Res
Commun. 2008 Vol. 377 p104-108.

【發明內容】

發明概要

發明欲解決之課題

[0007]本發明為有鑑於上述事情而成者，且是以提供下述者為課題：提供對角膜疾病或角膜損傷具有預防、抑制或治療作用之預防、抑制或治療劑，及提供促進角膜內皮細胞之良好培養的細胞培養補助劑、含有角膜內皮細胞之細胞片、以及角膜內皮細胞之細胞培養方法。

用以解決課題之手段

[0008]本案發明者在以往已知在神經系統中做為引導因子之腦信號蛋白3A(Sema3A)上發現對角膜內皮細胞具有優異的增殖促進作用，使本發明得以完成。亦即，本發明為如下所述。

[0009](1)一種角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療劑，其特徵在於是以含有多肽做為有效成分，且該多肽含有由選自以下(a)~(c)所構成群組中之任一多肽構成的區域：

(a) 由序列編號4所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號4中166aa~235aa區域的多肽；

(b) 由序列編號2所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號2中166aa~235aa區域之多肽；

(c) 具有與(a)或(b)之多肽80%以上序列相同性的多

肽。

(2)如(1)之角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療劑，其中前述角膜疾病為伴隨角膜內皮細胞數之減少或功能不全之障礙。

(3)一種細胞片，其特徵在於是在多肽存在下培養角膜內皮細胞而得者，該多肽含有由選自以下(a)~(c)所構成群組中之任一多肽構成的區域：

(a) 由序列編號4所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號4中166aa~235aa區域的多肽；

(b) 由序列編號2所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號2中166aa~235aa區域之多肽；

(c) 具有與(a)或(b)之多肽80%以上序列相同性的多肽。

(4)一種角膜內皮細胞用之細胞培養補助劑，其特徵在於含有多肽做為有效成分，且該多肽含有由選自以下(a)~(c)所構成群組中之任一多肽構成的區域：

(a) 由序列編號4所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號4中166aa~235aa區域的多肽；

(b) 由序列編號2所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號2中166aa~235aa區域之多肽；

(c) 具有與(a)或(b)之多肽80%以上序列相同性的多肽。

(5)一種細胞培養方法，其特徵在於包含在多肽存在下培養角膜內皮細胞之步驟，該多肽含有由選自以下(a)~(c)所構成群組中之任一多肽構成的區域：

(a) 由序列編號4所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號4中166aa~235aa區域的多肽；

(b) 由序列編號2所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號2中166aa~235aa區域之多肽；

(c) 具有與(a)或(b)之多肽80%以上序列相同性的多肽。

發明效果

[0010]若利用本發明之角膜疾病或角膜損傷的預防、抑制或治療劑，以往所無法進行之in vivo的對角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療將成可能。又，若利用本發明之細胞培養補助劑，將可良好的培養角膜內皮細胞。再者，若利用本發明，將可提供含有角膜內皮細胞之高品質細胞片、及提供適於培養角膜內皮細胞之細胞培養方法。

【圖式簡單說明】

[0011]圖1A為顯示在培養實驗1中人類角膜內皮初代細胞培養結果的圖。

圖1B為顯示在培養實驗1中人類角膜內皮初代細胞培

養結果的圖。

圖2為顯示在培養實驗2-1中人類角膜內皮細胞之增殖結果的圖。

圖3顯示在培養實驗2-2中人類角膜內皮細胞之增殖結果的圖。

圖4為顯示在細胞培養實驗2-1中培養12小時後之角膜內皮細胞樣子的照片。

圖5為顯示在培養實驗3中 Wound healing 實驗結果的照片。

圖6為顯示在培養實驗4中 Wound healing 實驗結果的照片。

圖7為顯示在培養實驗4中 Wound healing 速度的圖表。

圖8為顯示對角膜氧化壓力之預防及/或治療實驗結果之小鼠前眼部的照片。

圖9為顯示對角膜氧化壓力之預防及/或治療實驗結果之角膜內皮細胞的觀察照片。

圖10為顯示對角膜氧化壓力之預防及/或治療實驗結果之BrdU免疫染色後的角膜組織照片。

【實施方式】

用以實施發明之形態

[0012]以下將說明本發明之較佳例，然本發明並不為該等例子所侷限。在不偏離本發明概要之範圍，結構之附加、省略、取代，及其他變更是可能。

《預防、抑制或治療劑》

[0013]本發明之角膜疾病或角膜損傷的預防、抑制或治療劑含有腦信號蛋白3A做為有效成分。

[0014]有效成分之腦信號蛋白3A可為天然型，亦可為變異體。在天然型腦信號蛋白3A或腦信號蛋白3A變異體之具體例方面，可舉含有任一由下述(a)~(c)之多肽所構成之區域，且具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性的多肽：

(a) 由序列編號4所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號4中166aa~235aa(意指「第166個胺基酸~第235個胺基酸」)區域的多肽；

(b) 由序列編號2所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號2中166aa~235aa區域之多肽；

(c) 具有與(a)或(b)之多肽80%以上序列相同性的多肽。

[0015]在此，所謂「角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性」意指改善角膜疾病或角膜損傷之角膜病變部症狀之活性，或防止該症狀惡化之活性。多肽是否具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性，可藉由in vitro之實驗來調查，例如可藉由對角膜內皮細胞投予多肽，並使其促進細胞之增殖或遷移來調查。角膜內皮細胞之增殖或遷移可藉由如後述[實施例]中<培養實驗3>及<培養實驗4>所示之Wound healing實驗來謀求。或者，多肽是否具有該活性，亦可藉由in vivo之實驗來調查，例如可藉由對角

膜疾病或角膜損傷正在發病之動物經由滴眼、結膜下投予等投予多肽，並評價病變部之症狀是否有改善來調查。角膜疾病或角膜損傷動物方面可使用例如下述實施例所記載之如紫外線角膜炎發病小鼠的模式動物。此小鼠是藉由對眼睛照射紫外線使紫外線角膜炎發病。使用了該小鼠之角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性的評價可藉由如下述實施例具體記載之，例如，透過對小鼠之角膜病變部滴眼與結膜下投予，以固定期間來投予多肽並評價病變部症狀有無改善來進行。結膜病變部症狀有無改善可以以，例如，如下述實施例所記載之疤痕、角膜透明性、細胞形態等做為指標來評價。例如，與無處置之紫外線角膜炎發病個體組之角膜炎症狀分數平均值比較，當經以固定期間來投予多肽之角膜炎發病個體組之角膜炎症狀分數平均值是顯著減少時，或者例如，當多肽投予組之分數平均值是無處置個體組分數平均值之約 $\frac{2}{3}$ 以下、且宜為成為 $\frac{1}{2}$ 以下時，可判斷該多肽具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性。

[0016]再者，本發明中所謂「多肽」是稱多數個(2以上)胺基酸透過肽鍵所形成之分子，且不僅是構成胺基酸數量多之高分子量的分子，亦包含胺基酸數量少之低分子量分子(寡肽)，或者蛋白質。

[0017]又，本發明中所謂「具有...胺基酸序列」意指胺基酸殘基是以如此順序排列。因此，所謂的，例如，「具有以序列編號2所示胺基酸序列之多肽」意指具有Met Gly Trp

Leu...(中略)...Pro Arg Ser Val之胺基酸序列且大小為771胺基酸殘基之多肽。

[0018]序列編號2及4所示之胺基酸序列為腦信號蛋白3A蛋白質(分別為人類及雞)之序列，並分別在GenBank以登錄編號NM006080及U02528登錄。所謂腦信號蛋白是一種蛋白質，其被鑑定為引導神經軸突伸長之分子。由於原先是發現會使位於神經突前端之生長錐退縮(collapse)之活性，因此有時亦被稱做腦衰蛋白(Collapsin)。腦信號蛋白構成一分泌型或跨膜型之蛋白質家族，且到現在從線蟲等之無脊椎動物至人類等之脊椎動物上已鑑定出超過30種的成員。腦信號蛋白3A(Sema3A)是腦信號蛋白之分泌型蛋白質成員之1，且已知是做為排斥性神經軸突引導分子之蛋白質分子。Sema3A等的分泌型腦信號蛋白具有3個結構域：~500aa胺基末端的腦信號蛋白域(sema domain)、C-2型免疫球蛋白(Ig)域、及鹼基性末端域。已知，發揮Sema3A之神經伸長抑制作用等生理活性必要區域，是在sema域之中，且特別正是位於第166~235號之70個胺基酸之區域(Koppel et al., Neuron, Vol.19, 531-537, 1997)。該70個胺基酸之區域(以下稱為「70aa區域」)在序列編號2及序列編號4之任一者中皆為166aa~235aa之區域。Sema3A已從人類、雞、小鼠、大鼠等各種動物被鑑定出。若以蛋白質整體做比較，該等Sema3A之相同性高達約85%上下；若僅比較上述之70個胺基酸的區域，更是高達95%左右以上。再者，在具有序列編號4胺基酸序列之雞Sema3A，sema域為61aa~567aa、Ig

域為592aa~655aa、鹼基性末端為726aa~772aa(參照Feiner et al., Neuron, Vol.19, 539-545, 1997)。在具有序列編號2胺基酸序列之人類Sema3A，sema域為61aa~567aa、Ig域為591aa~654aa、鹼基性末端域為726aa~771aa。

[0019]所謂上述(a)多肽，是由含有具序列編號4所示胺基酸序列之雞Sema3A蛋白質中之至少70aa區域之區域所構成之多肽，具體而言，是由序列編號4全長所構成之多肽或包含70aa區域之其片段(fragment)。本發明之預防、抑制或治療劑所含有之做為有效成分之多肽的1例為，包含由(a)多肽所構成之區域，且具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性的多肽(以下為方便起見稱為「有效成分多肽a」)。只要具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性，有效成分多肽a可為僅由(a)多肽所構成，又，亦可為在(a)多肽之一端或兩端附加有胺基酸或多肽。構成有效成分多肽a之胺基酸序列的長度並無限制，可例為70~10000aa，且以70~3000aa為宜，以70~1500aa為佳。

[0020]在僅由(a)多肽所構成之有效成分多肽a的具體例方面雖無特別限定，然可舉例如由序列編號4所示胺基酸序列全長所構成之多肽(亦即，雞Sema3A蛋白質)。雞Sema3A蛋白質具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性一事如下述實施例所具體記載。又，即便為缺失雞Sema3A蛋白質之N末端或C末端之一部分的片段，只要是具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性，皆為有效成分多肽a並被包含在本發明之範圍。

[0021]又，在(a)多肽附加有多肽等的有效成分多肽a之具體例方面並無特別限定，可例舉將序列編號4之70aa區域替換成Sema3A以外之分泌型腦信號蛋白對應區域來建構而成之嵌合蛋白(chimera protein)，以及於(a)多肽附加有His標記、FLAG標記、myc標記等各種標記(tag)等的多肽等。上述Sema3A以外之分泌型腦信號蛋白可舉諸如腦衰蛋白2、腦衰蛋白3、腦衰蛋白5等，然並不侷限於該等。再者，腦衰蛋白2、腦衰蛋白3及腦衰蛋白5之胺基酸序列如Feiner et al., *Neuron*, vol.19, 539-545 (1997)所記載為習知。如Koppel等之上述論文所揭示，將Sema3A之至少含有70aa區域的區域替換成腦衰蛋白2之對應區域來建構而成之嵌合蛋白仍保持Sema3A具有之DRG退縮活性，且發揮與Sema3A相同之生理活性。有鑑於此，如此的嵌合蛋白亦具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性，因此亦視為有效成分多肽a並納入在本發明之範圍。甚至，已缺失Ig域之Sema3A雖然亦具有DRG退縮活性(Koppel et al., 1997)，然這種多肽，可做為在Sema3A之中位在較Ig域更接近N末端側之含有70aa之區域附加有Sema3A之鹼基性域的多肽，而亦包含於有效成分多肽a並納入本發明之範圍。此外，上述之具體例僅單純為例示，不論(a)多肽被附加何種胺基酸或多肽，只要具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性，皆為有效成分多肽a並納入在本發明之範圍。

[0022]所謂上述(b)多肽，是由含有具序列編號2所示胺基酸序列之人類Sema3A蛋白質中之至少70aa區域之區域

所構成之多肽，具體而言，是由序列編號2全長所構成之多肽或包含70aa區域之其片段。本發明之預防、抑制或治療劑所含有之做為有效成分之多肽的另1例，為包含由(b)多肽所構成之區域，且具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性之多肽(以下為方便起見稱為「有效成分多肽b」)。

雞的Sema3A(序列編號4)與人類的Sema3A(序列編號2)之相同性，就蛋白質全長而言是86%，若僅比較對Sema3A之生理活性重要之70aa區域，更是高達95%。如下述實施例所記載，雞的Sema3A可預防、抑制或治療不是雞之小鼠的角膜疾病或角膜損傷，因此亦可能使用雞的Sema3A來預防、抑制或治療人類等雞及小鼠以外之角膜疾病或角膜損傷。因此，與雞Sema3A蛋白質等的上述有效成分多肽a相同的，人類Sema3A蛋白質等的有效成分多肽b亦對調製大泡性角膜病變、紫外線角膜炎等之角膜疾病或角膜損傷的預防、抑制或治療劑是有用的。有效成分多肽b亦與上述有效成分多肽a相同，只要具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性，可僅由(b)多肽所構成，又，亦可為在(b)多肽之一端或兩端附加有胺基酸或多肽。構成有效成分多肽b之胺基酸序列的長度並無限制，70~10000aa為一個例子，且以70~3000aa為宜、以70~1500aa為佳。如此多肽的具體例與上述有效成分多肽a相同，例如，雖無特別限定，可例舉由序列編號2全長所構成之多肽(亦即人類Sema3A蛋白質)，具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性之其片段；依據上述態樣之與Sema3A以外分泌型腦信號蛋白的嵌

合蛋白；在(b)多肽附加有各種標記之多肽等。該等具體例亦單純為例示，不論(b)多肽是被附加何種胺基酸或多肽之態樣，只要具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性，皆為有效成分多肽b並納入在本發明之範圍。

[0023]上述(c)多肽為上述(a)或(b)多肽之中少數個(宜為1至數個)胺基酸殘基被取代、缺失及/或插入之多肽，且為具有與原序列80%以上、宜為90%以上、佳為95%以上、更佳為98%以上之相同性的多肽。一般而言，廣泛為習於此藝者所知的是，在蛋白質中，即便在該蛋白質胺基酸序列中少數個胺基酸殘基被取代、缺失或插入時，有時仍會具有與原蛋白質幾乎相同的機能。因此，由於由上述(c)多肽所構成之區域亦可具有和上述70aa區域相同的Sema3A蛋白質之生理活性，因此，與上述有效成分多肽a及b相同的，含有由上述(c)多肽所構成之區域，且具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性之多肽(以下為方便起見稱為「有效成分多肽c」)亦對調製本發明之預防、抑制或治療劑是有用的。

[0024]在此，所謂胺基酸序列之「相同性」是指，使應比較之2條胺基酸序列的胺基酸殘基盡多的一致來並列兩胺基酸序列，並將一致之胺基酸殘基數除以全胺基酸殘基數所得者以百分率來表示者。在上述並列之際，依需要，適當的在比較之2條序列之一方或雙方插入空格。如此的序列並列化可使用，例如BLAST、FASTA、CLUSTAL W等周知的程式來進行。在空格被插入的情形，上述全胺基酸殘

基數會成爲將1個空格計爲1個胺基酸殘基之殘基數。依此計成之全胺基酸殘基數在比較之2條序列間爲相異之情況下，相同性(%)是以一致之胺基酸殘基數除以長者序列之全胺基酸殘基數來算出。再者，已知構成天然蛋白質之20種胺基酸是可將具有類似性質者分組，如具有低極性側鏈之中性胺基酸(Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro)、具有親水性側鏈之中性胺基酸(Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr Cys)、酸性胺基酸(Asp, Glu)、鹼基性胺基酸(Arg, Lys, His)、芳香族胺基酸(Phe, Tyr, Trp)，若爲該等之間的取代，很多時候多肽的性質並不會變化。因此，在取代上述(a)或(b)多肽中的胺基酸殘基時，藉由在該等各組間進行取代，做爲有效成分使用之多肽在維持結膜之角膜疾病或角膜損傷的預防、抑制或治療活性的可能性會變高。

[0025]所謂上述(c)多肽，具體而言，是具有與由以序列編號2或序列編號4所示胺基酸序列全長所構成之多肽(亦即，Sema3A蛋白質)80%以上序列相同性之多肽、或具有與含有70aa區域之Sema3A蛋白質片段80%以上序列相同性之多肽。因此，所謂上述有效成分多肽c是僅由該等多肽所構成之多肽、或在(c)多肽之一端或兩端附加有胺基酸或多肽者，並且具有角膜疾病或角膜損之預防、抑制或治療活性的多肽。該等之具體例與上述有效成分多肽a及b同樣，並無特別限定，例如可舉，具有與由序列編號2或4全長所構成之多肽(亦即，Sema3A蛋白質)80%以上序列相同性之多肽；具有與具角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療

活性的Sema3A蛋白質片段80%以上序列相同性之多肽；使具有與含70aa區域之區域80%以上序列相同性之區域，與Sema3A以外之分泌型腦信號蛋白之其他區域融合而成之嵌合蛋白；在(c)多肽附加有各種標記之多肽等。該等具體例亦單純為例示，不論(c)多肽是被附加何種胺基酸或多肽之態樣，只要具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性，皆為有效成分多肽c並納入在本發明之範圍。

[0026]有效成分多肽c特別是以在70aa區域中之相同性要比由(c)多肽所構成區域整體之相同性還要高之多肽為宜。例如，當有效成分多肽c為具有與具序列編號2胺基酸序列之多肽80%相同性之多肽時，在70aa區域中之相同性宜超過80%，特別是在70aa區域中之相同性為90%以上、且95%以上為佳、98%以上更佳之多肽，最佳的是在70aa區域中之序列為相同之多肽。又，例如，當有效成分多肽c為使具有與人類Sema3A蛋白質之sema域80%序列相同性之區域，與Sema3A以外之分泌型腦信號蛋白之sema域以外之區域融合的嵌合蛋白時，在sema域中之70aa區域的相同性宜為超過80%，特別是在70aa區域中之相同性為90%以上、且95%以上為佳、98%以上更佳之嵌合蛋白，最佳的是在70aa區域中之序列為相同之嵌合蛋白。

[0027]在上述之有效成分多肽a至c中，特別宜為與具以序列編號2或序列編號4所示胺基酸序列之多肽具有80%以上相同性之多肽、且以90%以上為佳、95%以上更佳、最佳為具有98%以上相同性之多肽，於該等之中，如上述，是

以在70aa區域中之相同性較做爲多肽整體之相同性還要高之多肽爲宜。最好的是，本發明之預防、抑制或治療劑所含有做爲有效成分之多肽是具有序列編號2或序列編號4所示胺基酸序列之多肽。

[0028]一般來說，在由多肽所構成之醫藥中，爲了提高在活體內之多肽的穩定性，在多肽附加醣鏈或聚乙二醇(PEG)鏈、使用D體胺基酸做爲構成多肽之胺基酸的至少一部分、附加Fc域等技術是廣爲人知且已爲使用。藉由附加醣鏈或PEG鏈、使用D體胺基酸做爲構成多肽之胺基酸的至少一部分等，將會變得難以被活體內之胜肽酶分解，則在活體內多肽的半衰期會變長。本發明所使用之多肽，只要具有角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療活性，亦可爲爲了活體內穩定化而實施該等眾所皆知之修飾者，在本說明書及申請專利範圍中所謂「多肽」之用語，除了在文脈上很明顯並非如此之情況，亦使用來指稱包含爲了生體內穩定化而實施修飾者。

[0029]對多肽附加醣鏈爲周知，例如已爲 Sato M, Furuike T, Sadamoto R, Fujitani N, Nakahara T, Niikura K, Monde K, Kondo H, Nishimura S., "Glycoinsulins: dendritic sialyloligosaccharide-displaying insulins showing a prolonged blood-sugar-lowering activity.", J Am Chem Soc. 2004 Nov 3;126(43):14013-22 或 Sato M, Sadamoto R, Niikura K, Monde K, Kondo H, Nishimura S, "Site-specific introduction of sialic acid into insulin.", Angew Chem Int Ed

Engl. 2004 Mar 12;43(12):1516-20等所記載。醣鏈可鍵結在N末端、C末端或該等之間的胺基酸，然爲了不抑制多肽的活性，宜鍵結在N末端或C末端。又，附加之醣鏈個數宜爲1個或2個，且以1個爲佳。醣鏈宜爲從單糖至4糖，且以2糖或3糖爲佳。醣鏈可直接，或例如透過碳數1~10左右之亞甲基鏈等間隔結構(spacer structure)鍵結至多肽之遊離胺基或羧基。

[0030]對多肽附加PEG鏈亦爲周知，例如已爲Ulbricht K, Bucha E, Poschel KA, Stein G, Wolf G, Nowak G., "The use of PEG-Hirudin in chronic hemodialysis monitored by the Ecarin Clotting Time: influence on clotting of the extracorporeal system and hemostatic parameters.", Clin Nephrol. 2006 Mar;65(3):180-90. 或 Dharap SS, Wang Y, Chandna P, Khandare JJ, Qiu B, Gunaseelan S, Sinko PJ, Stein S, Farmanfarmaian A, Minko T., "Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide.", Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Sep 6;102(36):12962-7."等所記載。PEG鏈可鍵結在N末端、C末端或該等之間的胺基酸，通常1個或2個PEG鏈可鍵結於多肽上之遊離胺基或羧基。PEG鏈之分子量並無特別限定，通常可使用3000~7000左右者，且以5000左右爲宜。

[0031]將構成多肽之胺基酸的至少一部分做成D體的方法亦爲周知，例如已爲Brenneman DE, Spong CY, Hauser JM, Abebe D, Pinhasov A, Golian T, Gozes I., "Protective

peptides that are orally active and mechanistically nonchiral.", J Pharmacol Exp Ther. 2004 Jun;309(3):1190-7或Wilkemeyer MF, Chen SY, Menkari CE, Sulik KK, Charness ME., "Ethanol antagonist peptides: structural specificity without stereospecificity.", J Pharmacol Exp Ther. 2004 Jun;309(3):1183-9.等所記載。雖可將構成多肽之胺基酸的一部分做成D體，然爲了盡可能不抑制多肽之活性，相較於藉僅將一部分做成D體，宜爲將構成多肽之胺基酸全部做成D體胺基酸。

[0032]對多肽附加Fc域之方法亦爲周知，例如可使用市售之pFUSEN-Fc(InvivoGen公司製)等的Fc融合蛋白質表現載體來製造。

[0033]在本發明所使用做爲有效成分之腦信號蛋白3A可藉由，例如使用市售之胜肽合成機並以常法來容易的調製。又可使用眾所皆知的基因工程手法來容易的調製。例如可從有表現Sema3A基因之組織抽出RNA，利用RT-PCR從該RNA調製Sema3A基因的cDNA，再將該cDNA之全長或所欲之一部分轉殖到表現載體並導入宿主細胞中，而獲得目標之多肽。可藉由周知方法進行RNA之粹取、RT-PCR、對載體之cDNA轉殖、對宿主細胞之載體導入。又，使用之載體或宿主細胞亦爲周知，且有販賣各式各樣。嵌合蛋白之製作方法亦爲本領域周知，可例如以上述Koppel等的論文所記載之方法來製作嵌合蛋白。又，上述穩定化修飾亦可藉由如上述各文獻所記載之周知方法來容易的進行。

[0034]在本發明之預防、抑制或治療劑中為有效成分之腦信號蛋白3A對角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療是有效的。

[0035]角膜疾病之原因並未特別限定，可為在角膜局部產生的角膜疾病，亦可為角膜以外疾病所伴隨之角膜疾病。

角膜疾病宜為伴隨角膜內皮細胞減少或功能不良之角膜內皮障礙。一旦產生角膜內皮細胞減少或功能不良，依賴角膜內皮細胞之控制角膜實質之水分將會變得無法進行，則不僅是角膜內皮，角膜整體亦會有障礙。又，藉由提高角膜內皮細胞之機能，將可有效的預防、抑制或治療角膜整體之障礙。

伴隨角膜內皮細胞減少或功能不全之角膜疾病可舉大泡性角膜病變、脫屑症候群(PE)、脫屑角膜症、偽脫屑角膜內皮症、以角膜皰疹先天性遺傳性角膜內皮營養失調為代表之先天性角膜內皮變性症、滴狀角膜、富克斯角膜內皮變性症、富克斯角膜內皮營養失調、後部多形性角膜營養失調、虹膜內皮症候群等的角膜內皮變性、角膜內皮細胞營養失調、因病毒感染之角膜內皮炎(巨細胞病毒角膜內皮炎、單純皰疹病毒角膜內皮炎)、細菌性角膜感染症、角膜真菌症、阿米巴角膜炎、角膜移植後排斥反應等。

[0036]可能成為角膜內皮障礙之原因的外部要因可舉角膜眼色素層炎、角膜實質炎等。又，可能成為角膜內皮損傷之原因的物理性損傷可舉因外傷、手術之損傷、以青

光眼發作為代表之急劇眼壓上昇、因長期配戴隱形眼鏡之損傷、因隨年齡增加之變性、因紫外線等的氧化壓力等。外傷亦包含分娩時外傷、感染症的痕跡，或因鹼性或酸性液體飛入所致之化學外傷。

會有引起角膜內皮損傷之虞的手術手法可舉眼內手術、雷射治療等，且並不侷限於該等。具體之手術例子可例示角膜移植手術、視網膜・玻璃體手術、白內障手術、對PE患者之術後治療、青光眼手術(濾過手術、周邊紅膜切開、雷射治療)、對繼發白內障之雷射治療(YAG)、雷射虹彩切開術(LI)、雷射房角形成術(LGP)、房角黏連分離術(GSL)、雷射近視手術、利用準分子雷射之組織蒸散等。

由於上述例舉原因所引起之角膜內皮障礙，最終的所到達的疾病有大泡性角膜病變。

[0037]本發明之預防、抑制或治療劑的投予對象為哺乳動物，可舉諸如人類、狗、貓、兔、倉鼠等。再者，使用與預防、抑制或治療對象之患者相同生物種來源之腦信號蛋白3A被認為在預防、抑制或治療效果上亦高，因此從臨床應用之安全性觀點來看亦以此為佳。據此，例如，當本發明之預防、抑制或治療劑的投予對象是人類時，以將上述有效成分多肽b做為有效成分之預防、抑制或治療劑是特別為佳。

[0038]本發明之預防、抑制或治療劑可僅由腦信號蛋白3A所構成，亦可使適於各投予形態之藥理學上所容許之賦形劑、穩定化劑、防腐劑、緩衝劑、溶解補助劑、乳化劑、

稀釋劑、張力劑等添加劑適宜混合來做成製劑。製劑化方法及可使用之添加劑在醫藥製劑之領域中為周知，任一之方法及添加劑皆可使用。

[0039]本發明之預防、抑制或治療劑是用來投予至應預防之角膜部或應治療之角膜病變部。投予方法可舉局部投予(對角膜上之滴眼投予、結膜下注射投予等)等。劑型方面可舉隱形眼鏡型、眼軟膏劑、注射劑、滴眼劑等。

在上述隱形眼鏡型，是使具有隱形眼鏡狀之球面的透明膜含有腦信號蛋白3A，而可將自膜放出之腦信號蛋白3A投予至角膜。

投予量可依症狀、年齡、體重、投予方法等適宜選擇，並無特別限定，然就滴眼量而言，通常，對對象動物之有效分量為1日6000~60000 U左右，且以4000~40000 U左右為宜(參照國際公開第2013/005603)。

在結膜下注射量之情形，通常，對對象動物之有效分量為1日500~5000 U左右，以500~5000 U左右為宜，且可分為1次至數次投予。可設定成，例如，結膜下注射量1日0.001~10ng左右、0.05~5ng左右，且以，例如，10ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、1000ng/ml之濃度在各眼投予2 μ l，且宜依照症狀改善之程度，在數日至數個月之間，每日1回或數次，或者間隔數日一次或數次，進行定期的投予。

在滴眼投予或結膜下注射之情形，可設定成，例如，滴眼投予量1日1~3000ng左右、20~900ng左右、50~900ng左右、50~500ng左右、80~500ng左右，且以，例如，10ng/ml、

100ng/ml、300ng/ml、1000ng/ml之濃度在各眼投予 $2\mu\text{l}$ ，且宜依照症狀改善之程度，在數日至數個月之間，每日1次或數次，或者間隔數日一次或數次，進行定期的投予。

[0040]本發明之預防、抑制或治療劑可單獨使用，亦可與其他預防、抑制或治療劑等併用。其他預防、抑制或治療劑可舉抗生物質、抗炎劑、抗病毒劑、細胞增殖促進劑、創傷治療劑、細胞外基質成分、維他命類等。

若以上述眼軟膏劑為例，則例如可例示Sema3A/玻尿酸軟膏、Sema3A/Neo-Medrol EE軟膏、Sema3A/眼·耳科用臨得隆A(Rinderon-A)軟膏、Sema3A/黃素腺嘌呤二核苷酸鈉(Flavitan)眼軟膏0.1%。Sema3A/玻尿酸軟膏可使用做為玻尿酸眼科手術用製劑。上述Neo-Medrol EE軟膏是抗生物質與合成副腎上腺皮質素劑之摻合劑，藉由與Sema3A併用，可期待高抗炎作用。這對上述臨得隆A軟膏而言亦是相同。此外，亦可自Neo-Medrol EE軟膏中的成分適宜減少副腎上腺皮質素之成分來應用。

本發明之預防、抑制或治療劑可與抗壞血酸、抗壞血酸衍生物、或該等之鹽或者水合物，Rock抑制劑或者其相關物質等的物質併用。抗壞血酸衍生物宜為抗壞血酸-2-磷酸等的抗壞血酸之磷酸酯衍生物。

[0041]已知在體內之腦信號蛋白3A的存在量是藉由回饋作用來穩定化。因此，腦信號蛋白3A會在活體內穩定的作用。又，由於腦信號蛋白3A之投予並不會使角膜內皮細胞產生明顯的形態變化，而能使分裂能力活性化，因此本

發明之預防、抑制或治療劑的副作用風險少。

[0042]在一實施形態中，本發明提供一種角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療方法，其具備將腦信號蛋白3A投予至哺乳動物之步驟。

[0043]在一實施形態中，本發明提供一種用以預防、抑制或治療角膜疾病或角膜損傷之腦信號蛋白3A。

[0044]在一實施形態中，本發明提供一種腦信號蛋白3A之用途，其是用以製造角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療劑。

[0045]《細胞培養補助劑》

本發明之角膜內皮細胞用的細胞培養補助劑含有腦信號蛋白3A做為有效成分。在腦信號蛋白3A方面可使用與在上述《預防、抑制或治療劑》所示相同者。角膜內皮細胞除了使用已從角膜分離之角膜內皮初代細胞、角膜內皮幹細胞之外，還意指使用包含已將其繼代之繼代後角膜內皮細胞、已從角膜內皮前驅細胞或其他任意細胞誘導分化之角膜內皮細胞、角膜內皮幹細胞、顯示與角膜內皮前驅細胞或角膜內皮細胞相同性質之角膜內皮樣細胞。細胞是否為上述角膜內皮細胞，可藉由調查是否具有至少1種在既知之上述角膜內皮細胞中的各種顯著表現型特徵來判別。

又，本發明之細胞培養補助劑除了上述腦信號蛋白3A之外，亦可進一步含有營養成分、成長因子、細胞增殖因子、分化誘導因子、抗菌劑、抗真菌劑等以往眾所皆知使用做為細胞培養補助劑之成分，亦可進一步含有副腎上腺

皮質類固醇激素等的抗炎成分、抗壞血酸、抗壞血酸衍生物或該等之鹽或者水合物，Rock抑制劑或者其相關物質等的物質。抗壞血酸衍生物宜為抗壞血酸-2-磷酸等的抗壞血酸之磷酸酯衍生物。

本發明之細胞培養補助劑可添加適量在培養對象之角膜內皮細胞的培養基來使用，亦可將細胞培養補助劑含有培養基成分並將細胞培養補助劑本身提供做為培養基。該細胞培養補助劑或培養基含有之腦信號蛋白3A濃度可依使用該補助劑之對象角膜內皮細胞的種類、狀態、量等來適宜選擇，然每一培養基宜設為1~3000ng/mL，且以20~900ng/mL為佳、以50~900ng/mL為較佳、以50~500ng/mL為更佳、以80~500ng/mL特別佳。

[0046]上述培養基若為可培養角膜內皮細胞之培養基，則無特別限制，可舉DMEM培養基、BME培養基、IMDM培養基、及該等之混合培養基為例式。

上述培養基成分可舉通常之動物細胞用培養基所含有之成分，葡萄糖、氯化鈉、維他命/礦物質、胺基酸類等的營養成分；成長因子、細胞增殖因子、分化誘導因子、抗菌劑、抗真菌劑等。

若以本發明之細胞培養補助劑，將能夠以高度生產性的來培養接近本來角膜內皮細胞之狀態的角膜內皮細胞。

[0047]《細胞培養方法、細胞片》

本發明之細胞培養方法具有將角膜內皮細胞在腦信號蛋白3A存在下培養之步驟。腦信號蛋白3A方面可使用與在

上述《預防、抑制或治療劑》所示相同者。角膜內皮細胞方面可使用與在上述《細胞培養補助劑》所示相同者。所謂在腦信號蛋白3A存在下，可舉含有腦信號蛋白3A之培養基，培養基所含有之腦信號蛋白3A濃度可依照培養對象角膜內皮細胞之種類、狀態、量等來適宜選擇，每一培養基宜設為1~3000ng/mL，且以20~900ng/mL為佳、以50~900ng/mL為較佳、以50~500ng/mL為更佳、以80~500ng/mL特別佳。

[0048]在該培養時，除了上述腦信號蛋白3A之外，亦可進一步含有營養成分、成長因子、細胞增殖因子、分化誘導因子、抗菌劑、抗真菌劑等以往眾所皆知使用在培養角膜內皮細胞之成分。又，亦可與用副腎上腺皮質類固醇激素等抗炎症成分，抗壞血酸、抗壞血酸衍生物、或該等之鹽或水合物，Rock抑制劑或者其相關物質等的成分組合使用。抗壞血酸衍生物宜為抗壞血酸-2-磷酸等之抗壞血酸的磷酸酯衍生物。

若以本發明之細胞培養方法，將能夠以高度生產性的來培養接近本來角膜內皮細胞之狀態的角膜內皮細胞。

[0049]在一實施形態中，本發明提供一種在腦信號蛋白3A存在下培養而獲得之角膜內皮細胞。

[0050]本發明之細胞片是藉由在腦信號蛋白3A存在下培養角膜內皮細胞而獲得，且宜含有角膜內皮細胞。本發明之細胞片可藉由本發明之細胞培養方法來取得。因此，在一實施形態中，本發明提供一種細胞片之製造方法，其

含有將角膜內皮細胞在腦信號蛋白3A存在下培養之步驟。本發明之細胞片可僅由細胞構成，亦可進一步做成含有膠原蛋白凝膠等的支架(scaffold)或移植載體之狀態。所謂細胞片含有角膜內皮細胞，是指以體積換算，構成細胞片之細胞中的角膜內皮細胞比例宜為10%以上、30%以上、50%以上，且以80%以上為佳、以90%以上為更佳。

本發明之細胞片是可適宜的用來做為移植用角膜組織之程度的高品質，且為從來所沒有之極為有用的細胞片。

[0051]細胞片含有之角膜內皮細胞的培養可例如在37℃、5% CO₂之條件下進行。在培養基材上之角膜內皮細胞的培養之中，培養液中的角膜內皮細胞濃度可設在例如 $1 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$ 個/ml之範圍。在培養基材上所培養之角膜內皮細胞藉由相互接著形成細胞片。將細胞片從前述培養基材剝離而可用於移植手術。或者，亦可在培養基材之中使用可活體移植之細胞培養基材做為移植載體，並在其上培養角膜內皮細胞並且用於移植手術。培養期間可依細胞增殖之程度適宜訂定，可設為1~3週左右。移植手術可利用與以往源自捐贈之角膜移植手術相同的方法來進行。

前述培養基材若為細胞培養用則無特別限定，可舉例如纖維黏連蛋白、膠原蛋白、明膠、玻尿酸、海藻酸、層黏連蛋白等源自天然物之高分子材料；聚苯乙烯、聚酯、聚乙烯、聚丙烯等的合成高分子材料；聚乳酸、聚乙醇酸等的生物分解性高分子材料；玻璃、石英、羶磷灰石等的無機材料；羊膜等。

細胞片中的角膜內皮細胞密度若為可形成細胞片之程度則無特別限定，前述角膜內皮細胞密度宜在 $1.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^6 \text{ cells/cm}^2$ 之範圍，且以在 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6 \text{ cells/cm}^2$ 之範圍為佳。角膜內皮細胞宜為可良好作用在移植目的之眼內之密度。

細胞片可適宜的用於角膜移植。細胞片之厚度並無特別限制，然宜為可使用做為移植片之程度的厚度。因此，細胞片之厚度宜為與角膜厚度同程度，且以與角膜內皮之層的厚度同程度為佳。更具體而言，細胞片之厚度宜在 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 之範圍，且以在 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ 之範圍為佳，以在 $15 \sim 50 \mu\text{m}$ 之範圍更佳。

[實施例]

[0052] 接著將例示實施例以更進一步詳細說明本發明，然本發明並未被以下之實施例所限定。

[0053] « in vitro »

在以下 in vitro 實驗所使用之 Sema3A 為 Recombinant Human Semaphorin 3A/Fc Chimera (R & D Systems 公司製)。

<培養實驗1>

進行在 Sema3A 存在下之人類角膜內皮細胞的培養。

(Sema3A組)

在6cm孔底面，將150個($7.5/\text{cm}^2$)角膜內皮初代細胞種至置入含Sema3A之DMEM Low Glucose培養基的孔底面，並在 37°C 培養器內培養25天。培養基是製作成含有 100 ng/mL 之濃度的Sema3A。角膜內皮初代細胞是從Sight Life

或 Rocky Mountain Lions Eye Bank獲得。

(控制組)

除了使用不含 Sema3A之培養基之外，其餘與上述 Sema3A組相同的來培養人類角膜內皮細胞25天。

[0054]培養25天後，使用血球計算盤計測細胞數。結果顯示在圖1。培養25天後之 Sema3A組的細胞個數比控制組之細胞個數更顯著的增加。據此可知，Sema3A具有促進角膜內皮細胞增殖之效果。細胞增殖速度亦在正常細胞增殖速度之範圍，因此顯示出高度安全性。

[0055]<培養實驗2-1>

針對以往所使用之角膜內皮細胞培養補助劑與Sema3A對人類角膜內皮細胞之效果進行比較。

(Sema3A-10 組)

在置入每1mL含有10ng Sema3A之DMEM Low Glucose培養基的6孔盤底面，以細胞密度4000/cm²種繼代3~4次後之角膜內皮細胞，並在37°C培養器內培養。

(Sema3A-100 組)

除了使用每1mL含有100ng Sema3A之培養基之外，其餘與前述(Sema3A-10 組)相同的來進行培養。

(Sema3A-1000 組)

除了使用每1mL含有1000ng Sema3A之培養基之外，其餘與前述(Sema3A-10 組)相同的來進行培養。

(ROCK抑制劑組)

除了在一培養基使用10μM ROCK抑制劑(Y-27632)

做為胞培養補助劑取代 Sema3A 之外，其餘與前述 (Sema3A-10 組) 相同的來進行培養。

(ASC組)

除了在每一培養基使用0.3mM之抗壞血酸-2-磷酸做為胞培養補助劑取代Sema3A之外，其餘與前述(Sema3A-10 組)相同的來進行培養。

(控制組)

除了使用不含Sema3A及其他細胞培養補助劑之培養基之外，其餘與前述(Sema3A-10 組)相同的來進行培養。

[0056]針對使用各培養補助劑與Sema3A對人類角膜內皮細胞之細胞增殖促進效果進行比較。針對控制組、ASC 組、Sema3A-10 組、Sema3A-100 組、Sema3A-1000 組、Rock抑制劑組，使用血球計算盤計測從培養開始之3日後、及從培養開始之6日後之時點的細胞數。

[0057]結果顯示在圖2。在從培養開始之3日後及從培養開始之6日後的任一時點之中，在Rock抑制劑組、Sema3A-10 組，角膜內皮細胞之增殖速度和控制組是同等的。相對的，在抗壞血酸-2-磷酸組、Sema3A-100 組、Sema3A-1000 組，角膜內皮細胞之增殖速度是較控制組格外提升的。

[0058]<培養實驗2-2>

針對以往所使用之角膜內皮細胞培養補助劑與Sema3A對人類角膜內皮細胞的細胞增殖促進效果進行比較。

(Sema3A-100 組)

在置入每 1mL 含有 100ng Sema3A 之 DMEM Low Glucose 培養基的 12 孔盤底面，以細胞密度 $4000/\text{cm}^2$ 種繼代 3~4 次後之角膜內皮細胞，並在 37°C 培養器內培養。

(Sema3A-300 組)

除了使用每 1mL 含有 300ng Sema3A 之培養基之外，其餘與前述(Sema3A 100 組)相同的來進行培養。

(Sema3A-1000 組)

除了使用每 1mL 含有 1000ng Sema3A 之培養基之外，其餘與前述(Sema3A-100 組)相同的來進行培養。

(ASC 組)

除了在每一培養基使用 0.3mM 抗壞血酸-2-磷酸做為細胞培養補助劑取代 Sema3A 之外，其餘與前述(Sema3A-100 組)相同的來進行培養。

(Sema3A-100 + ASC組)

除了使用每 1mL 含有 100ng Sema3A 及 0.3mM 抗壞血酸-2-磷酸之培養基之外，其餘與前述(Sema3A-100 組)相同的來進行培養。

(Sema3A-1000 + ASC組)

除了使用每 1mL 含有 1000ng Sema3A 及 0.3mM 抗壞血酸-2-磷酸之培養基之外，其餘與前述(Sema3A-100 組)相同的來進行培養。

(控制組)

除了使用不含 Sema3A 及其他細胞培養補助劑之培養基之外，其餘與前述(Sema3A-100 組)相同的來進行培養。

[0059] 針對 Sema3A-100 組、Sema3A-300 組、Sema3A-1000 組、ASC 組、Sema3A-100 + ASC 組、Sema3A-1000 + ASC 組、控制組，使用血球計算盤計測從培養開始之3日後(12well盤)之時點的細胞數。

[0060] 結果顯示在圖3。在使用Sema3A、抗壞血酸-2-磷酸，及Sema3A及抗壞血酸-2-磷酸之任一情況之中，細胞數皆較控制組顯著的增大。

[0061] <細胞狀態確認>

接著，將在<細胞培養實驗2-1>之控制組、ASC組、Sema3A-100 組、Rock抑制劑中培養12小時後之角膜內皮細胞的樣子顯示在圖4。

在Rock抑制劑組及ASC組，角膜內皮細胞的形態及大小為不規則，且亦觀察到有許多形成偽足之細胞。又，緊密型連結(tight junction)之形成狀態、細胞接著狀態是稍微不良。

另一方面，在Sema3A-100 組，角膜內皮細胞之形態及大小為鋪石狀且規則性優異，形成偽足之細胞少且細胞形態亦良好。又，細胞彼此的接著狀態亦良好。

相較於本次探討之使用了以往所利用之角膜內皮細胞培養補助劑的組，Sema3A-100 組之角膜內皮細胞的形態顯示出最接近本來角膜內皮細胞之狀態的形態。又，因緊密型連結之形成為良好，因此可推測在角膜內皮細胞重要功能之屏蔽功能與幫浦功能上亦優異。

[0062] 由上清楚得知，藉由投予抗壞血酸-2-磷酸可使

人類角膜內皮細胞之增殖速度提升，然相較於其，所生產之細胞狀態是在已投予Sema3A之情況下較優異。藉由使用Sema3A，可以更快的將人類角膜內皮細胞培養至接近本來角膜內皮細胞之狀態。又顯示出，藉由在Sema3A存在下培養人類角膜內皮細胞，可以高度生產性獲得高品質之人類角膜內皮細胞的細胞片。

[0063] <培養實驗3>

進行在Sema3A存在下之人類角膜內皮細胞的 Wound healing(創傷治癒)實驗。

(Sema3A組)

將繼代3~4次後之角膜內皮細胞以4000/cm²之細胞密度種至置入含有Sema3A的DMEM Low Glucose培養基的孔底面，並在37°C培養器內培養5天。培養基是製作成使每1mL含有100ng/ml之濃度的Sema3A。從孔底面呈圓形來削除細胞，使底面露出(圖5(Wound healing day 0, Ctrl))。之後繼續培養，觀察自使底面露出之3日後的細胞狀態。

(控制組)

除了使用不含Sema3A及其他細胞培養補助劑之培養基之外，其餘與前述(Sema3A組)相同的來進行培養。

[0064]將控制組之人類角膜內皮細胞的樣子顯示在圖5(Wound healing day 3, Ctrl)。如圖5(Wound healing day 3, Ctrl)所示，在使底面露出圓形之區域內，細胞是稀疏的點狀在，特別是在區域之中央部分，底面仍是維持露出狀態。

Sema3A群之人類角膜內皮細胞的樣子顯示在圖

5(Wound healing day 3, Sema3A)。如圖5(Wound healing day 3, Sema3A)所示，使底面露出圓形之區域整體是被人類角膜內皮細胞所覆蓋。

由此顯知，藉由使用Sema3A可促進人類角膜內皮細胞之增殖及遷移。

[0065]<培養實驗4>

進一步，進行利用角膜內皮細胞培養補助劑與Sema3A之人類角膜內皮細胞之Wound healing(創傷治癒)比較實驗。

(Sema3A組)

將繼代3~4次後之角膜內皮細胞以4000/cm²之細胞密度種至置入含有Sema3A之DMEM Low Glucose培養基的孔底面，並在37°C培養器內培養24小時。培養基是製作成每1mL含有100ng/ml之濃度的Sema3A。培養後，從孔底面呈帶狀來削除細胞，使底面露(圖6(Wound healing))。之後繼續培養，觀察從使底面露出之24小時後的細胞狀態。

(ROCK抑制劑組)

除了在每一培養基使用10 μM ROCK抑制劑(Y-27632)做為胞培養補助劑取代Sema3A之外，其餘與前述(Sema3A組)相同的來進行培養。

(ASC組)

除了在每一培養基使用0.3mM之抗壞血酸-2-磷酸做為胞培養補助劑取代Sema3A之外，其餘與前述(Sema3A組)相同的來進行培養。

(Sema3A + ASC組)

除了使用每1mL含有100ng Sema3A及0.3mM 抗壞血酸-2-磷酸之培養基之外，其餘與前述(Sema3A組)相同的來進行培養。(控制組)

除了使用不含Sema3A及其他胞培養補助劑之培養基之外，其餘與前述(Sema3A組)相同的來進行培養。

[0066]控制組之人類角膜內皮細胞的樣子顯示在圖6(Ctrl)。在使底面露出帶狀之區域內細胞密度低，特別是在區域之中央部分，底面仍維持露出狀態。

ROCK抑制劑組之人類角膜內皮細胞的樣子顯示在圖6(ROCK抑制劑)。在使底面露出帶狀之區域內細胞密度低，特別是在區域之中央部分，底面仍維持露出狀態。

ASC組之人類角膜內皮細胞的樣子顯示在圖6(ASC)。在使底面露出帶狀之區域整體是被人類角膜內皮細胞所覆蓋。但可觀察到不規則之細胞形態及大小。

Sema3A組之人類角膜內皮細胞的樣子顯示在圖6(Sema3A)。在使底面露出帶狀之區域整體是被人類角膜內皮細胞所覆蓋。且細胞之形態及大小為均一。

Sema3A + ASC組之人類角膜內皮細胞的樣子顯示在圖6(Sema3A + ASC)。在使底面露出帶狀之區域整體是被人類角膜內皮細胞所覆蓋。且細胞之形態及大小為均一。

[0067]各組之Wound healing速度顯示在圖7。圖7之圖表縱軸是在使以帶狀露出之區域中，底面之露出面積。將最初之露出面積顯示為100%，區域整體被細胞所覆蓋之狀態

爲0%。

從圖7之圖表可清楚得知，藉由使用Sema3A、抗壞血酸-2-磷酸、以及Sema3A及抗壞血酸-2-磷酸，可促進人類角膜內皮細胞之增殖及遷移。若比較以往之培養細胞補助劑與Sema3A，則Sema3A之Wound healing速度是最爲優異。

[0068] << in vivo >>

在以下 in vivo 實驗使用之 Sema3A 爲 Recombinant Mouse Semaphorin 3A/Fc Chimera(R&D Systems公司製)。

<紫外線角膜炎之預防及/或治療實驗>

(Sema3A投予組)

使用C57BL6小鼠(白色、4週齡雄性、各組N=8)做爲對象動物進行實驗。爲了誘發紫外線角膜炎症，在麻醉後小鼠之眼睛以UV燈照射UV-A 3.9 J，1次/2日(計5次，第0、2、4、6、8日)。在照射各UV-A後，結膜下注射含有Sema3A(100ng/ml或300ng/ml)之PBS 2 μ l。在第10日攝影前眼部照片，且進行眼球摘出。

(控制組)

除了結膜下注射不含Sema3A之PBS之外，其餘與前述Sema3A投予組相同的來進行實驗。

[0069] <確認角膜之狀態>

實驗開始後第10日之小鼠前眼部照片顯示在圖8。在控制組確認到新生血管之形成，且疤痕面積是>100ng/ml組。相對的，在Sema3A投予組，並未確認到新生血管之形成及疤痕，角膜透明性亦良好。

[0070]利用 Whole mount法來染色角膜組織。

首先，進行茜素紅染色，觀察角膜內皮細胞。照片顯示在圖9。在控制組確認到新生血管之形成及細胞脫落。在 Sema3A投予組，細胞排列之狀態為良好。且幾乎未觀察到新生血管之形成及細胞脫落。

[0071]接著，利用溴化去氧尿嘧啶(BrdU)免疫染色檢測組織中之細胞分裂。染色結果顯示在圖10。若比較藉由UV照射而被認為有引發炎症之部分(圖10中虛線內側部分)，相較於控制組，在 Sema3A投予組之角膜組織觀察到明確的螢光訊號，確認了細胞增殖。

相同的，利用DAPI之核染色，結果相較於控制組，在 Sema3A投予組之角膜組織觀察到明確的螢光訊號，確認了角膜內皮組織之修復。

[0072]以上結果可推知，Sema3A具有促進角膜中之細胞增殖，修復因紫外線之角膜損傷的作用。並顯示出藉由 in vivo之 Sema3A投予可以進行紫外線角膜炎之預防及/或治療。

[產業上之可利用性]

[0073]關於本發明之預防、抑制或治療劑細胞片、細胞培養補助劑以及細胞培養方法，以再生醫學為首，可廣泛的適用在醫學、藥學、生物學、生物工程學領域。

[0074]<序列編號1>

序列編號1顯示人類腦信號蛋白3A基因之DNA序列。

<序列編號2>

序列編號2顯示人類腦信號蛋白3A之胺基酸序列。

<序列編號3>

序列編號3顯示雞腦信號蛋白3A基因之DNA序列。

<序列編號4>

序列編號4顯示雞腦信號蛋白3A之胺基酸序列。

【符號說明】

(無)

【序列表】

<110> 東京大學
 <120> 角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療劑，細胞片、細胞培養補助劑以及細胞培養方法

<130> OSP57768

<150> JP 2014-041017

<151> 2014-03-03

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5672

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (316)..(2631)

<223>

<400> 1

aagcaccact gcagcagacc ttgttaattt tttttttttt tctttccaca caacagttgt 60

gcctcattat ccggtgcctg gctcgggaatt tttttttttt tttttctttt tggagggttt 120

gaagtttctg tgcttcagtg actgttacag aagaagaggt gttagtgttg ccatgaggtc 180

ttgattgtct gcatttatga atgaaactga cctaaatcac ctgttacctc cagtttccag 240

attgtttgaa cttctctggc cgcacaatac aggaaggaag actaaagcag caaagggacc 300

tacagcgtct gcagc atg ggc tgg tta act agg att gtc tgt ctt ttc tgg 351

Met Gly Trp Leu Thr Arg Ile Val Cys Leu Phe Trp

1

5

10

gga gta tta ctt aca gca aga gca aac tat cag aat ggg aag aac aat 399

Gly Val Leu Leu Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Gln Asn Gly Lys Asn Asn

15

20

25

gtg cca agg ctg aaa tta tcc tac aaa gaa atg ttg gaa tcc aac aat 447

Val Pro Arg Leu Lys Leu Ser Tyr Lys Glu Met Leu Glu Ser Asn Asn

30	35	40	
gtg atc act ttc aat ggc ttg gcc aac agc tcc agt tat cat acc ttc			495
Val Ile Thr Phe Asn Gly Leu Ala Asn Ser Ser Ser Tyr His Thr Phe			
45	50	55	60
ctt ttg gat gag gaa cgg agt agg ctg tat gtt gga gca aag gat cac			543
Leu Leu Asp Glu Glu Arg Ser Arg Leu Tyr Val Gly Ala Lys Asp His			
	65	70	75
ata ttt tca ttc gac ctg gtt aat atc aag gat ttt caa aag att gtg			591
Ile Phe Ser Phe Asp Leu Val Asn Ile Lys Asp Phe Gln Lys Ile Val			
	80	85	90
tgg cca gta tct tac acc aga aga gat gaa tgc aag tgg gct gga aaa			639
Trp Pro Val Ser Tyr Thr Arg Arg Asp Glu Cys Lys Trp Ala Gly Lys			
	95	100	105
gac atc ctg aaa gaa tgt gct aat ttc atc aag gta ctt aag gca tat			687
Asp Ile Leu Lys Glu Cys Ala Asn Phe Ile Lys Val Leu Lys Ala Tyr			
	110	115	120
aat cag act cac ttg tac gcc tgt gga acg ggg gct ttt cat cca att			735
Asn Gln Thr His Leu Tyr Ala Cys Gly Thr Gly Ala Phe His Pro Ile			
125	130	135	140
tgc acc tac att gaa att gga cat cat cct gag gac aat att ttt aag			783
Cys Thr Tyr Ile Glu Ile Gly His His Pro Glu Asp Asn Ile Phe Lys			
	145	150	155
ctg gag aac tca cat ttt gaa aac ggc cgt ggg aag agt cca tat gac			831
Leu Glu Asn Ser His Phe Glu Asn Gly Arg Gly Lys Ser Pro Tyr Asp			
	160	165	170
cct aag ctg ctg aca gca tcc ctt tta ata gat gga gaa tta tac tct			879
Pro Lys Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Ile Asp Gly Glu Leu Tyr Ser			
	175	180	185
gga act gca gct gat ttt atg ggg cga gac ttt gct atc ttc cga act			927
Gly Thr Ala Ala Asp Phe Met Gly Arg Asp Phe Ala Ile Phe Arg Thr			
	190	195	200
ctt ggg cac cac cac cca atc agg aca gag cag cat gat tcc agg tgg			975
Leu Gly His His His Pro Ile Arg Thr Glu Gln His Asp Ser Arg Trp			
205	210	215	220

ctc aat gat cca aag ttc att agt gcc cac ctc atc tca gag agt gac	1023
Leu Asn Asp Pro Lys Phe Ile Ser Ala His Leu Ile Ser Glu Ser Asp	
225 230 235	
aat cct gaa gat gac aaa gta tac ttt ttc ttc cgt gaa aat gca ata	1071
Asn Pro Glu Asp Asp Lys Val Tyr Phe Phe Phe Arg Glu Asn Ala Ile	
240 245 250	
gat gga gaa cac tct gga aaa gct act cac gct aga ata ggt cag ata	1119
Asp Gly Glu His Ser Gly Lys Ala Thr His Ala Arg Ile Gly Gln Ile	
255 260 265	
tgc aag aat gac ttt gga ggg cac aga agt ctg gtg aat aaa tgg aca	1167
Cys Lys Asn Asp Phe Gly Gly His Arg Ser Leu Val Asn Lys Trp Thr	
270 275 280	
aca ttc ctc aaa gct cgt ctg att tgc tca gtg cca ggt cca aat ggc	1215
Thr Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Val Pro Gly Pro Asn Gly	
285 290 295 300	
att gac act cat ttt gat gaa ctg cag gat gta ttc cta atg aac ttt	1263
Ile Asp Thr His Phe Asp Glu Leu Gln Asp Val Phe Leu Met Asn Phe	
305 310 315	
aaa gat cct aaa aat cca gtt gta tat gga gtg ttt acg act tcc agt	1311
Lys Asp Pro Lys Asn Pro Val Val Tyr Gly Val Phe Thr Thr Ser Ser	
320 325 330	
aac att ttc aag gga tca gcc gtg tgt atg tat agc atg agt gat gtg	1359
Asn Ile Phe Lys Gly Ser Ala Val Cys Met Tyr Ser Met Ser Asp Val	
335 340 345	
aga agg gtg ttc ctt ggt cca tat gcc cac agg gat gga ccc aac tat	1407
Arg Arg Val Phe Leu Gly Pro Tyr Ala His Arg Asp Gly Pro Asn Tyr	
350 355 360	
caa tgg gtg cct tat caa gga aga gtc ccc tat cca cgg cca gga act	1455
Gln Trp Val Pro Tyr Gln Gly Arg Val Pro Tyr Pro Arg Pro Gly Thr	
365 370 375 380	
tgt ccc agc aaa aca ttt ggt ggt ttt gac tct aca aag gac ctt cct	1503
Cys Pro Ser Lys Thr Phe Gly Gly Phe Asp Ser Thr Lys Asp Leu Pro	
385 390 395	

gat gat gtt ata acc ttt gca aga agt cat cca gcc atg tac aat cca Asp Asp Val Ile Thr Phe Ala Arg Ser His Pro Ala Met Tyr Asn Pro 400 405 410	1551
gtg ttt cct atg aac aat cgc cca ata gtg atc aaa acg gat gta aat Val Phe Pro Met Asn Asn Arg Pro Ile Val Ile Lys Thr Asp Val Asn 415 420 425	1599
tat caa ttt aca caa att gtc gta gac cga gtg gat gca gaa gat gga Tyr Gln Phe Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Val Asp Ala Glu Asp Gly 430 435 440	1647
cag tat gat gtt atg ttt atc gga aca gat gtt ggg acc gtt ctt aaa Gln Tyr Asp Val Met Phe Ile Gly Thr Asp Val Gly Thr Val Leu Lys 445 450 455 460	1695
gta gtt tca att cct aag gag act tgg tat gat tta gaa gag gtt ctg Val Val Ser Ile Pro Lys Glu Thr Trp Tyr Asp Leu Glu Glu Val Leu 465 470 475	1743
ctg gaa gaa atg aca gtt ttt cgg gaa ccg act gct att tca gca atg Leu Glu Glu Met Thr Val Phe Arg Glu Pro Thr Ala Ile Ser Ala Met 480 485 490	1791
gag ctt tcc act aag cag caa caa cta tat att ggt tca acg gct ggg Glu Leu Ser Thr Lys Gln Gln Gln Leu Tyr Ile Gly Ser Thr Ala Gly 495 500 505	1839
gtt gcc cag ctc cct tta cac cgg tgt gat att tac ggg aaa gcg tgt Val Ala Gln Leu Pro Leu His Arg Cys Asp Ile Tyr Gly Lys Ala Cys 510 515 520	1887
gct gag tgt tgc ctc gcc cga gac cct tac tgt gct tgg gat ggt tct Ala Glu Cys Cys Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly Ser 525 530 535 540	1935
gca tgt tct cgc tat ttt ccc act gca aag aga cgc aca aga cga caa Ala Cys Ser Arg Tyr Phe Pro Thr Ala Lys Arg Arg Thr Arg Arg Gln 545 550 555	1983
gat ata aga aat gga gac cca ctg act cac tgt tca gac tta cac cat Asp Ile Arg Asn Gly Asp Pro Leu Thr His Cys Ser Asp Leu His His 560 565 570	2031
gat aat cac cat ggc cac agc cct gaa gag aga atc atc tat ggt gta	2079

Asp	Asn	His	His	Gly	His	Ser	Pro	Glu	Glu	Arg	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val		
	575						580					585					
gag	aat	agt	agc	aca	ttt	ttg	gaa	tgc	agt	ccg	aag	tcg	cag	aga	gcg		2127
Glu	Asn	Ser	Ser	Thr	Phe	Leu	Glu	Cys	Ser	Pro	Lys	Ser	Gln	Arg	Ala		
	590					595					600						
ctg	gtc	tat	tgg	caa	ttc	cag	agg	cga	aat	gaa	gag	cga	aaa	gaa	gag		2175
Leu	Val	Tyr	Trp	Gln	Phe	Gln	Arg	Arg	Asn	Glu	Glu	Arg	Lys	Glu	Glu		
605				610					615					620			
atc	aga	gtg	gat	gat	cat	atc	atc	agg	aca	gat	caa	ggc	ctt	ctg	cta		2223
Ile	Arg	Val	Asp	Asp	His	Ile	Ile	Arg	Thr	Asp	Gln	Gly	Leu	Leu	Leu		
			625					630					635				
cgt	agt	cta	caa	cag	aag	gat	tca	ggc	aat	tac	ctc	tgc	cat	gcg	gtg		2271
Arg	Ser	Leu	Gln	Gln	Lys	Asp	Ser	Gly	Asn	Tyr	Leu	Cys	His	Ala	Val		
			640					645					650				
gaa	cat	ggg	ttc	ata	caa	act	ctt	ctt	aag	gta	acc	ctg	gaa	gtc	att		2319
Glu	His	Gly	Phe	Ile	Gln	Thr	Leu	Leu	Lys	Val	Thr	Leu	Glu	Val	Ile		
		655					660					665					
gac	aca	gag	cat	ttg	gaa	gaa	ctt	ctt	cat	aaa	gat	gat	gat	gga	gat		2367
Asp	Thr	Glu	His	Leu	Glu	Glu	Leu	Leu	His	Lys	Asp	Asp	Asp	Gly	Asp		
	670					675					680						
ggc	tct	aag	acc	aaa	gaa	atg	tcc	aat	agc	atg	aca	cct	agc	cag	aag		2415
Gly	Ser	Lys	Thr	Lys	Glu	Met	Ser	Asn	Ser	Met	Thr	Pro	Ser	Gln	Lys		
685				690						695					700		
gtc	tgg	tac	aga	gac	ttc	atg	cag	ctc	atc	aac	cac	ccc	aat	ctc	aac		2463
Val	Trp	Tyr	Arg	Asp	Phe	Met	Gln	Leu	Ile	Asn	His	Pro	Asn	Leu	Asn		
				705					710					715			
aca	atg	gat	gag	ttc	tgt	gaa	caa	gtt	tgg	aaa	agg	gac	cga	aaa	caa		2511
Thr	Met	Asp	Glu	Phe	Cys	Glu	Gln	Val	Trp	Lys	Arg	Asp	Arg	Lys	Gln		
			720					725					730				
cgt	cgg	caa	agg	cca	gga	cat	acc	cca	ggg	aac	agt	aac	aaa	tgg	aag		2559
Arg	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Thr	Pro	Gly	Asn	Ser	Asn	Lys	Trp	Lys		
		735					740					745					
cac	tta	caa	gaa	aat	aag	aaa	ggt	aga	aac	agg	agg	acc	cac	gaa	ttt		2607
His	Leu	Gln	Glu	Asn	Lys	Lys	Gly	Arg	Asn	Arg	Arg	Thr	His	Glu	Phe		

750	755	760	
gag agg gca ccc agg agt gtc tga gctgcattac ctctagaaac ctcaaacaag			2661
Glu Arg Ala Pro Arg Ser Val			
765	770		
tagaaacttg cctagacaat aactggaaaa acaaatgcaa tatacatgaa cttttttcat			2721
ggcattatgt ggatgtttac aatgggtggga aattcagctg agttccacca attataaatt			2781
aaatccatga gtaactttcc taataggctt tttttcctaa taccaccacc taacagagaa			2841
cacaggtgaa tgcagatgtt cactttagca gacttaatgt ttccatgag atttactgt			2901
acaggtttgt ctttcttctt tgccctgagaa ataaaaatgt catttgccat attgccatct			2961
aaaggagaaa aactgcatca gcaaagccat tgtattgaac taaaagtta aatgaactg			3021
catggattta ctaagctgat gaatattcca aaacgtgggt ggattcaagg atatatttg			3081
tctaccggcc ctcatgtttg tatgtacttg aggagtaaaa tgagtaaaat gatactgaat			3141
gaaatgttct gtggaaatat taaaaaaaaa aaaaaacata agccatccat catccagaag			3201
aaaaatggaa tacactgata tactactgat gtcttctttc agctttgata taaagatgta			3261
ttttattaaa actataatft aaatgtacca tgaaaaatat gcagtaaaaa ttagttgttt			3321
tctaagctag agtaggattt gtcttacaat tattgtgcta tgtagttttt gttttaaaaa			3381
ttccaatggt gtgctgcttt ctttggacat tttattttca attctataag agggatagat			3441
gacattgttc tagaaacaca tatacatcat taagagtga tctctaaaaac caggatataa			3501
attatgcttt atttctctga gaaaatcaaa caaatggaag ctgttcacac ctccccttct			3561
ttaagcatta tctaaattaa tttttacttg cataatgttc ttagaaaaaa aaacagaaca			3621
tttaagcagg aaaaaaggaa gaaacaagtt gatttttaag tgcattttac tataatgaat			3681
caatgaaggg aaaaggaact gcatatttca tgaaaataat aagcattgtc ttaatatact			3741
gttaatagaa aatgtgtctt aattccgtgc ttgaatccct gcatgatatt tgagactaag			3801
atctctctta tgattctacc aagaattata tctgtgtcac ttaatttttt taaaagagag			3861

agatcaataa ctattcagag caacatgta aaggcaaagt ttccaatcat ttacatctgt 3921
 atcaggtgcc tcttaccttt ccttatttaa gacaattatt tgtacaagaa acacatgact 3981
 cttttcatat caatgggagg gacttttcta caaagtattt tccaggatgc aaccacatt 4041
 taaacaatgt aaaattcttt gtttcctgca acaacttaca aaataaggta aaagactaaa 4101
 attcaagatt tgcttccttc attgtcctaa gacgattcgt tgagaatcac tgactttgag 4161
 atatttaaaa ctttcagcat tatactgtgg tttcttttgc actgcactca cctattcagg 4221
 actcctcccc caggttcctc atcatgcaca aaaatgcaaa gaaaacatct tattagtaat 4281
 taatgaagca acattgaaat tctaactcta gctgtctttg gattctaatt aactcagcat 4341
 caatttctca cctcagacta cagtgaattt ttatttctta tcagctgaaa tatttcacag 4401
 atggaagctc atgtttcagt tttaatgact gccttgaata aacaagttgt tgccacttgt 4461
 ttcaaacaaa agcctaataa taatctacat tcaattttag gctccattga ctaatatggt 4521
 gttgcttttg gaagtactgt atacctcac atggaagcca aattgttaaa ttatttgaag 4581
 gacacaccac tgtacagaaa gtagtgttc aaatataaat cgaagaacaa agagtgtctc 4641
 aaaaaatagg tcattctttt attttcataa agtatctaaa ctgtactaac attcagtgtt 4701
 gtgtttcatt ctaaatttgc agctgaaata aatttatttg cgatagcaga aatatcttat 4761
 tattcatcct cagaaataaa ggatttgaag ggatagagat tatatgataa atttatagaa 4821
 gactttcaga atttgaatgc attttgttta gtgttatgaa atgacaatag aaaaaagtct 4881
 cgacttcaat taaaagttac acaaacacaa aaatctacag gcatgtcttt atataccatc 4941
 aggtctaagt tttcaaagaa aattgtagat ataacttgca gataactcat tacagtcata 5001
 atctctgccc atgtgtattg agagggggca gtttgcacga aaaagaatta ttggcccatt 5061
 taataattca gctttaaata gactttgtca tatgcatgaa tcatcagaga tgaaactgtt 5121
 tgagagactc atgtgacctt acgaaaatta caacagcagt cttaaagtat gaaaaagatg 5181

catcacagca gagacattat ggcccagttg atatcaaag taaaatgtaa atgcatgtaa 5241
 atgcacactt cattttatgt attatntagt aatttgcagt ggtatgtggt taatattttt 5301
 gctacctaca cattaggcaa aaaaaagatg taaataattt gggagaaaaa gaggaagaac 5361
 agtgtaaaat aaaactttct ataagtactic catttcaatg tgttcaacat catcctaaaa 5421
 ggcaagattt tcccacgcag gtgacaaggt ggtttatgta ctatttaagg gcggaaggtg 5481
 cgtgcccgtt caataagcat gttttttgcc aggtaggaaa tatgttccat atctttactt 5541
 atcattgcat ttcagatggg aactagaaaa actggagaga aaaatgtaat gaaactgctg 5601
 ctgtaaatta ttccttttag catgtattca ctgctaaat acacatttct tcaaaataaa 5661
 aaaaaaaaaa a 5672

<210> 2

<211> 771

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Trp Leu Thr Arg Ile Val Cys Leu Phe Trp Gly Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Gln Asn Gly Lys Asn Asn Val Pro Arg Leu
 20 25 30
 Lys Leu Ser Tyr Lys Glu Met Leu Glu Ser Asn Asn Val Ile Thr Phe
 35 40 45
 Asn Gly Leu Ala Asn Ser Ser Ser Tyr His Thr Phe Leu Leu Asp Glu
 50 55 60
 Glu Arg Ser Arg Leu Tyr Val Gly Ala Lys Asp His Ile Phe Ser Phe
 65 70 75 80
 Asp Leu Val Asn Ile Lys Asp Phe Gln Lys Ile Val Trp Pro Val Ser
 85 90 95
 Tyr Thr Arg Arg Asp Glu Cys Lys Trp Ala Gly Lys Asp Ile Leu Lys

<221> CDS

<222> (168)..(2486)

<223>

<400> 3

gctgatggaa gactttgtta cttgtttcta gctgggagcg acccaaagag gattatgtta 60

tgggcagaag atgttattta tgttgcctga agttccccgg cggcgccccgg caggacgggg 120

agcgccgcgg ctccggctcg cagggaccct acagtggctg ctgcagc atg ggc tgg 176

Met Gly Trp

1

ctc agg ggg att gcc ttg ctt tcc ttg gga gta tta cta gca gga aga 224

Leu Arg Gly Ile Ala Leu Leu Ser Leu Gly Val Leu Leu Ala Gly Arg

5

10

15

gtg aac tgc cag cat gtg aag aat aac gtg cca aga ctc aaa tta tcc 272

Val Asn Cys Gln His Val Lys Asn Asn Val Pro Arg Leu Lys Leu Ser

20

25

30

35

tat aaa gaa atg ttg gaa tcc aat aat ata gtc aat ttc aat gga cta 320

Tyr Lys Glu Met Leu Glu Ser Asn Asn Ile Val Asn Phe Asn Gly Leu

40

45

50

gct aat agt tcc agt tac cat act ttc ctc ttg gat gaa gaa cga agt 368

Ala Asn Ser Ser Ser Tyr His Thr Phe Leu Leu Asp Glu Glu Arg Ser

55

60

65

cgg ctg tat gtt gga gca aaa gac cac ata ttt tct ttc aac ctg gtt 416

Arg Leu Tyr Val Gly Ala Lys Asp His Ile Phe Ser Phe Asn Leu Val

70

75

80

aac atc aag gaa tat caa aag att gtt tgg cct gta tct cat tcc cga 464

Asn Ile Lys Glu Tyr Gln Lys Ile Val Trp Pro Val Ser His Ser Arg

85

90

95

agg gat gag tgt aag tgg gct gga aaa gat att ctg aga gaa tgt gct 512

Arg Asp Glu Cys Lys Trp Ala Gly Lys Asp Ile Leu Arg Glu Cys Ala

100

105

110

115

aat ttc atc aag gtg ctt aag act tat aac caa aca cac ttg tac gct 560

Asn Phe Ile Lys Val Leu Lys Thr Tyr Asn Gln Thr His Leu Tyr Ala

120

125

130

tgt gga acg ggg gct ttt cat ccc atg tgc act tat att gaa gtt gga	608
Cys Gly Thr Gly Ala Phe His Pro Met Cys Thr Tyr Ile Glu Val Gly	
135 140 145	
agc cat cct gag gac aac att ttt agg atg gaa gat tca cat ttt gaa	656
Ser His Pro Glu Asp Asn Ile Phe Arg Met Glu Asp Ser His Phe Glu	
150 155 160	
aac ggc cga ggg aaa agc cct tac gat cct aaa ttg ctg aca gct tct	704
Asn Gly Arg Gly Lys Ser Pro Tyr Asp Pro Lys Leu Leu Thr Ala Ser	
165 170 175	
ctt tta gta gat gga gaa ttg tac tct ggc aca gca gca gac ttc atg	752
Leu Leu Val Asp Gly Glu Leu Tyr Ser Gly Thr Ala Ala Asp Phe Met	
180 185 190 195	
ggc aga gac ttt gcc att ttc cga act ctg ggg cat cac cat cca atc	800
Gly Arg Asp Phe Ala Ile Phe Arg Thr Leu Gly His His His Pro Ile	
200 205 210	
aga aca gag cag cat gac tcc cgg tgg cta aac gat ccc aga ttt att	848
Arg Thr Glu Gln His Asp Ser Arg Trp Leu Asn Asp Pro Arg Phe Ile	
215 220 225	
agt gct cac ctg ata cct gaa agt gat aat cca gaa gat gac aaa atc	896
Ser Ala His Leu Ile Pro Glu Ser Asp Asn Pro Glu Asp Asp Lys Ile	
230 235 240	
tat ttc ttc ttt cgt gaa aat gcg att gat gga gag cac act gga aaa	944
Tyr Phe Phe Phe Arg Glu Asn Ala Ile Asp Gly Glu His Thr Gly Lys	
245 250 255	
gcc act cat gcc aga ata ggg cag atc tgt aag aat gac ttt ggt gga	992
Ala Thr His Ala Arg Ile Gly Gln Ile Cys Lys Asn Asp Phe Gly Gly	
260 265 270 275	
cac agg agc ctt gtt aac aaa tgg aca act ttc ctc aaa gca cgt ctg	1040
His Arg Ser Leu Val Asn Lys Trp Thr Thr Phe Leu Lys Ala Arg Leu	
280 285 290	
att tgt tct gtg cca gga ccc aat ggt att gac aca cac ttt gat gaa	1088
Ile Cys Ser Val Pro Gly Pro Asn Gly Ile Asp Thr His Phe Asp Glu	
295 300 305	
tta cag gac gtg ttc cta atg aac tct aag gac cct aaa aat cca ata	1136

Leu Gln Asp Val Phe Leu Met Asn Ser Lys Asp Pro Lys Asn Pro Ile	
310	315 320
gtg tat gga gtg ttt aca act tcc agt aat atc ttc aag gga tca gca	1184
Val Tyr Gly Val Phe Thr Thr Ser Ser Asn Ile Phe Lys Gly Ser Ala	
325	330 335
gta tgt atg tac agc atg act gat gtg agg agg gta ttt ctt ggc ccc	1232
Val Cys Met Tyr Ser Met Thr Asp Val Arg Arg Val Phe Leu Gly Pro	
340	345 350 355
tat gcc cac cga gat ggc cca aac tac cag tgg gtt ccc tac caa ggg	1280
Tyr Ala His Arg Asp Gly Pro Asn Tyr Gln Trp Val Pro Tyr Gln Gly	
360	365 370
cga gtt cca tat cca cgg cca gga act tgc ccc agt aaa aca ttt ggc	1328
Arg Val Pro Tyr Pro Arg Pro Gly Thr Cys Pro Ser Lys Thr Phe Gly	
375	380 385
ggc ttt gac tcc acc aag gac ctt cct gat gaa gtt ata aca ttt gca	1376
Gly Phe Asp Ser Thr Lys Asp Leu Pro Asp Glu Val Ile Thr Phe Ala	
390	395 400
aga agt cat cct gcc atg tat aac cca gta ttc ccc atc aac agc cgt	1424
Arg Ser His Pro Ala Met Tyr Asn Pro Val Phe Pro Ile Asn Ser Arg	
405	410 415
cca atc atg atc aaa acg gat gta gat tac cag ttc aca cag ata gta	1472
Pro Ile Met Ile Lys Thr Asp Val Asp Tyr Gln Phe Thr Gln Ile Val	
420	425 430 435
gta gat cga gta gat gca gaa gat ggt caa tac gat gtt atg ttc att	1520
Val Asp Arg Val Asp Ala Glu Asp Gly Gln Tyr Asp Val Met Phe Ile	
440	445 450
ggc aca gat att gga aca gtt ctt aaa gtg gtt tcc att cct aag gag	1568
Gly Thr Asp Ile Gly Thr Val Leu Lys Val Val Ser Ile Pro Lys Glu	
455	460 465
act tgg cat gaa tta gaa gaa gtc ttg ctg gaa gaa atg acc gtc ttt	1616
Thr Trp His Glu Leu Glu Glu Val Leu Leu Glu Glu Met Thr Val Phe	
470	475 480
cgg gaa ccc act gtt att tca gca atg aag att tcc aca aaa cag caa	1664
Arg Glu Pro Thr Val Ile Ser Ala Met Lys Ile Ser Thr Lys Gln Gln	

485	490	495	
cag ctc tac att ggc tca gcc acc gga gtt tca cag ctt cct tta cac			1712
Gln Leu Tyr Ile Gly Ser Ala Thr Gly Val Ser Gln Leu Pro Leu His			
500	505	510	515
cgc tgt gat gtc tat gga aaa gca tgt gct gag tgt tgt ctt gca aga			1760
Arg Cys Asp Val Tyr Gly Lys Ala Cys Ala Glu Cys Cys Leu Ala Arg			
	520	525	530
gac ccc tac tgc gcc tgg gat ggt tca tct tgc tca cgt tac ttt ccc			1808
Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly Ser Ser Cys Ser Arg Tyr Phe Pro			
	535	540	545
act gct aag aga cgt act agg cga caa gac atc cga aat gga gat ccc			1856
Thr Ala Lys Arg Arg Thr Arg Arg Gln Asp Ile Arg Asn Gly Asp Pro			
	550	555	560
ctc act cac tgc tca gac ctg cag cat cat gat aac cca agt ggt cag			1904
Leu Thr His Cys Ser Asp Leu Gln His His Asp Asn Pro Ser Gly Gln			
	565	570	575
acc ctg gag gaa aag att att tat gga gta gag aat agc agc act ttt			1952
Thr Leu Glu Glu Lys Ile Ile Tyr Gly Val Glu Asn Ser Ser Thr Phe			
580	585	590	595
ctt gag tgc agt cca aaa tct caa cgt gcc ata gtc tac tgg caa ttc			2000
Leu Glu Cys Ser Pro Lys Ser Gln Arg Ala Ile Val Tyr Trp Gln Phe			
	600	605	610
cag aag caa aat gat gac cac aaa gtt gag ata aaa gtg gat gat cga			2048
Gln Lys Gln Asn Asp Asp His Lys Val Glu Ile Lys Val Asp Asp Arg			
	615	620	625
atg atc cgg aca gaa cag ggc cta ttg cta cga agt ctt caa cgg aga			2096
Met Ile Arg Thr Glu Gln Gly Leu Leu Leu Arg Ser Leu Gln Arg Arg			
	630	635	640
gac tct ggt att tat ttt tgt cat gct gtg gag cat ggc ttc att caa			2144
Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys His Ala Val Glu His Gly Phe Ile Gln			
	645	650	655
act ttg ctc aaa gtg aca ctg gaa gta att gat act gac cac ttg gaa			2192
Thr Leu Leu Lys Val Thr Leu Glu Val Ile Asp Thr Asp His Leu Glu			
660	665	670	675

gag ctg ctc cat aag gaa gaa gac gcc gat gcc tcc aag acc aag gat Glu Leu Leu His Lys Glu Glu Asp Ala Asp Ala Ser Lys Thr Lys Asp 680 685 690	2240
gct acc aat agc atg act cct agt caa aag atc tgg tat aga gac ttc Ala Thr Asn Ser Met Thr Pro Ser Gln Lys Ile Trp Tyr Arg Asp Phe 695 700 705	2288
atg cag tta atc aat cac ccc aat ctc aac aca atg gat gaa ttc tgt Met Gln Leu Ile Asn His Pro Asn Leu Asn Thr Met Asp Glu Phe Cys 710 715 720	2336
gag cag gtt tgg aaa aga gac cgc aag cag cgc cgg caa agg cct gcc Glu Gln Val Trp Lys Arg Asp Arg Lys Gln Arg Arg Gln Arg Pro Ala 725 730 735	2384
aat gcg cag gtg aac aca aat aag tgg aag cac cta caa gag aat aaa Asn Ala Gln Val Asn Thr Asn Lys Trp Lys His Leu Gln Glu Asn Lys 740 745 750 755	2432
aaa ggt agg aat agg agg acc cat gaa ttt gag agg gca cca cgg agt Lys Gly Arg Asn Arg Arg Thr His Glu Phe Glu Arg Ala Pro Arg Ser 760 765 770	2480
gtc tga gctacattac ctctagaaac ctcatctaag tagaaacttg tatacacaga Val	2536
taactggaaa aaaaatgcaa tatacatgaa ctttttcatg gcattaagtg gatggttaca	2596
agagttgaaa gctcaaacaa tttccaccgg gtttaaacatc aatatatttc taactttcct	2656
agtaagtcct tcgtctctgc tctgattcta agaccaggta gaccagagtt tcaaggatga	2716
acactcagct ggacatagct tactgctcaa aaagttctac aagagttcag caggcaggtt	2776
ttgctttctc tgttgccctga gatataaatg aaatgctgta tttcatgctg tcgtcttcaa	2836
gaaaaacaaa acccactttt catcatcagc accaccattc ctagactatg tataaaactg	2896
catgaactca ttaagctgat gaatgtctaa acacgtgatt ggacacaagg atttgttctt	2956
gttttgtcta ccagttctcc tgtttatgag tactagaaga ggaaaaacaa tgctgaatga	3016

gattgcggaa atcttaacaa cataagccat tcatcatcta gaagaacaaa aaaatgtgga 3076
gtacactggc ctactactga tgacttcttt cagctttgat ctaaagatgt attttattaa 3136
aactataatt taaatatacc atgaaaaata tgcagcaaac attagctctt ttctaaaata 3196
gattagcctc tttgtcttag aatatattgta cttcctaatt attggtttag aggggaaaaa 3256
aaaaaaa 3263

<210> 4
<211> 772
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 4

Met Gly Trp Leu Arg Gly Ile Ala Leu Leu Ser Leu Gly Val Leu Leu
1 5 10 15

Ala Gly Arg Val Asn Cys Gln His Val Lys Asn Asn Val Pro Arg Leu
20 25 30

Lys Leu Ser Tyr Lys Glu Met Leu Glu Ser Asn Asn Ile Val Asn Phe
35 40 45

Asn Gly Leu Ala Asn Ser Ser Ser Tyr His Thr Phe Leu Leu Asp Glu
50 55 60

Glu Arg Ser Arg Leu Tyr Val Gly Ala Lys Asp His Ile Phe Ser Phe
65 70 75 80

Asn Leu Val Asn Ile Lys Glu Tyr Gln Lys Ile Val Trp Pro Val Ser
85 90 95

His Ser Arg Arg Asp Glu Cys Lys Trp Ala Gly Lys Asp Ile Leu Arg
100 105 110

Glu Cys Ala Asn Phe Ile Lys Val Leu Lys Thr Tyr Asn Gln Thr His
115 120 125

Leu Tyr Ala Cys Gly Thr Gly Ala Phe His Pro Met Cys Thr Tyr Ile
130 135 140

Glu Val Gly Ser His Pro Glu Asp Asn Ile Phe Arg Met Glu Asp Ser
 145 150 155 160

His Phe Glu Asn Gly Arg Gly Lys Ser Pro Tyr Asp Pro Lys Leu Leu
 165 170 175

Thr Ala Ser Leu Leu Val Asp Gly Glu Leu Tyr Ser Gly Thr Ala Ala
 180 185 190

Asp Phe Met Gly Arg Asp Phe Ala Ile Phe Arg Thr Leu Gly His His
 195 200 205

His Pro Ile Arg Thr Glu Gln His Asp Ser Arg Trp Leu Asn Asp Pro
 210 215 220

Arg Phe Ile Ser Ala His Leu Ile Pro Glu Ser Asp Asn Pro Glu Asp
 225 230 235 240

Asp Lys Ile Tyr Phe Phe Phe Arg Glu Asn Ala Ile Asp Gly Glu His
 245 250 255

Thr Gly Lys Ala Thr His Ala Arg Ile Gly Gln Ile Cys Lys Asn Asp
 260 265 270

Phe Gly Gly His Arg Ser Leu Val Asn Lys Trp Thr Thr Phe Leu Lys
 275 280 285

Ala Arg Leu Ile Cys Ser Val Pro Gly Pro Asn Gly Ile Asp Thr His
 290 295 300

Phe Asp Glu Leu Gln Asp Val Phe Leu Met Asn Ser Lys Asp Pro Lys
 305 310 315 320

Asn Pro Ile Val Tyr Gly Val Phe Thr Thr Ser Ser Asn Ile Phe Lys
 325 330 335

Gly Ser Ala Val Cys Met Tyr Ser Met Thr Asp Val Arg Arg Val Phe
 340 345 350

Leu Gly Pro Tyr Ala His Arg Asp Gly Pro Asn Tyr Gln Trp Val Pro
 355 360 365

Tyr Gln Gly Arg Val Pro Tyr Pro Arg Pro Gly Thr Cys Pro Ser Lys
 370 375 380

Thr Phe Gly Gly Phe Asp Ser Thr Lys Asp Leu Pro Asp Glu Val Ile
385 390 395 400

Thr Phe Ala Arg Ser His Pro Ala Met Tyr Asn Pro Val Phe Pro Ile
405 410 415

Asn Ser Arg Pro Ile Met Ile Lys Thr Asp Val Asp Tyr Gln Phe Thr
420 425 430

Gln Ile Val Val Asp Arg Val Asp Ala Glu Asp Gly Gln Tyr Asp Val
435 440 445

Met Phe Ile Gly Thr Asp Ile Gly Thr Val Leu Lys Val Val Ser Ile
450 455 460

Pro Lys Glu Thr Trp His Glu Leu Glu Glu Val Leu Leu Glu Glu Met
465 470 475 480

Thr Val Phe Arg Glu Pro Thr Val Ile Ser Ala Met Lys Ile Ser Thr
485 490 495

Lys Gln Gln Gln Leu Tyr Ile Gly Ser Ala Thr Gly Val Ser Gln Leu
500 505 510

Pro Leu His Arg Cys Asp Val Tyr Gly Lys Ala Cys Ala Glu Cys Cys
515 520 525

Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Asp Gly Ser Ser Cys Ser Arg
530 535 540

Tyr Phe Pro Thr Ala Lys Arg Arg Thr Arg Arg Gln Asp Ile Arg Asn
545 550 555 560

Gly Asp Pro Leu Thr His Cys Ser Asp Leu Gln His His Asp Asn Pro
565 570 575

Ser Gly Gln Thr Leu Glu Glu Lys Ile Ile Tyr Gly Val Glu Asn Ser
580 585 590

Ser Thr Phe Leu Glu Cys Ser Pro Lys Ser Gln Arg Ala Ile Val Tyr
595 600 605

Trp Gln Phe Gln Lys Gln Asn Asp Asp His Lys Val Glu Ile Lys Val

610	615	620
Asp Asp Arg Met Ile Arg Thr Glu Gln Gly Leu Leu Leu Arg Ser Leu 625	630	635
Gln Arg Arg Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys His Ala Val Glu His Gly 645	650	655
Phe Ile Gln Thr Leu Leu Lys Val Thr Leu Glu Val Ile Asp Thr Asp 660	665	670
His Leu Glu Glu Leu Leu His Lys Glu Glu Asp Ala Asp Ala Ser Lys 675	680	685
Thr Lys Asp Ala Thr Asn Ser Met Thr Pro Ser Gln Lys Ile Trp Tyr 690	695	700
Arg Asp Phe Met Gln Leu Ile Asn His Pro Asn Leu Asn Thr Met Asp 705	710	715
Glu Phe Cys Glu Gln Val Trp Lys Arg Asp Arg Lys Gln Arg Arg Gln 725	730	735
Arg Pro Ala Asn Ala Gln Val Asn Thr Asn Lys Trp Lys His Leu Gln 740	745	750
Glu Asn Lys Lys Gly Arg Asn Arg Arg Thr His Glu Phe Glu Arg Ala 755	760	765
Pro Arg Ser Val 770		

發明摘要

※ 申請案號：| 0 4 1 0 6 6 5 2

A61K38/17 (2006.01)

※ 申請日：

104.3.03

※IPC 分類：

C07K14/47 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療劑，細胞片、細胞培養補助劑以及細胞培養方法/ PRECAUTIONARY, PREVENTIVE, OR THERAPEUTIC SUBSTANCE FOR CORNEAL DISEASE OR CORNEAL DAMAGE, CELL SHEET, CELL CULTURE SUPPLEMENT, AND METHOD OF CULTURING CELLS

【中文】

● 本發明之角膜疾病或角膜損傷的預防、抑制或治療劑之特徵在於是以含有多肽做為有效成分，且該多肽含有由選自以下(a)~(c)所構成群組中之任一多肽構成的區域。(a)由序列編號4所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號4中166aa~235aa區域的多肽、(b)由序列編號2所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號2中166aa~235aa區域之多肽、(c)具有與(a)或(b)之多肽80%以上序列相同性的多肽。

【英文】

● A precautionary, preventive, or therapeutic substance for corneal disease or corneal damage of the present invention is characterized by including a polypeptide as an active ingredient, which includes a region consisting of any one of a polypeptide selected from the group consisting of the following (a) to (c): (a) a polypeptide composed of at least 70 consecutive amino acids in an amino acid sequence represented by sequence identification number 4 and including a region of 166aa to 235aa in the sequence identification number 4, (b) a polypeptide composed of at least 70 consecutive amino acids in an amino acid sequence represented by sequence identification number 2 and including a region of 166aa to 235aa in the sequence identification number 2, and (c) a polypeptide having at least 80 percent of sequence homology with the polypeptide (a) or (b).

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。(無)

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

申請專利範圍

1. 一種角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療劑，其特徵在於是以含有多肽做為有效成分，且該多肽含有由選自以下(a)~(c)所構成群組中之任一多肽構成的區域：
 - (a) 由序列編號4所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號4中166aa~235aa區域的多肽；
 - (b) 由序列編號2所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號2中166aa~235aa區域之多肽；
 - (c) 具有與(a)或(b)之多肽80%以上序列相同性的多肽。
2. 如請求項1之角膜疾病或角膜損傷之預防、抑制或治療劑，其中前述角膜疾病為伴隨角膜內皮細胞數之減少或功能不全之障礙。
3. 一種細胞片，其特徵在於是在多肽存在下培養角膜內皮細胞而得者，該多肽含有由選自以下(a)~(c)所構成群組中之任一多肽構成的區域：
 - (a) 由序列編號4所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號4中166aa~235aa區域的多肽；
 - (b) 由序列編號2所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號2中166aa~235aa區域之

多肽；

(c) 具有與(a)或(b)之多肽80%以上序列相同性的多肽。

4. 一種角膜內皮細胞用之細胞培養補助劑，其特徵在於含有多肽做為有效成分，且該多肽含有由選自以下(a)~(c)所構成群組中之任一多肽構成的區域：

(a) 由序列編號4所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號4中166aa~235aa區域的多肽；

(b) 由序列編號2所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號2中166aa~235aa區域之多肽；

(c) 具有與(a)或(b)之多肽80%以上序列相同性的多肽。

5. 一種細胞培養方法，其特徵在於包含在多肽存在下培養角膜內皮細胞之步驟，該多肽含有由選自以下(a)~(c)所構成群組中之任一多肽構成的區域：

(a) 由序列編號4所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號4中166aa~235aa區域的多肽；

(b) 由序列編號2所示胺基酸序列中之連續70個以上的胺基酸構成，且含有序列編號2中166aa~235aa區域之多肽；

(c) 具有與(a)或(b)之多肽80%以上序列相同性的多

肽。

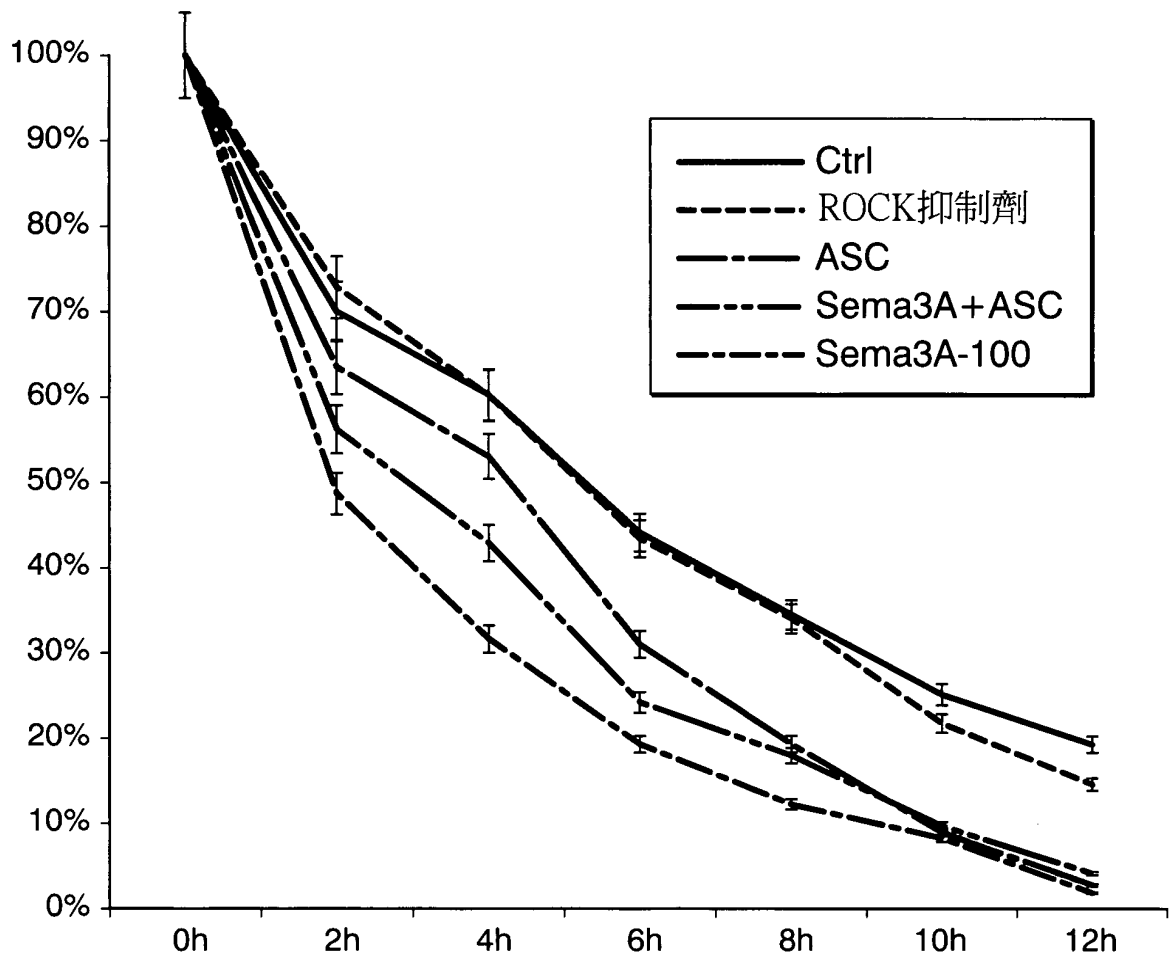


圖7

