414799

申請日期	84.03.30
案號	A6103273
類別	C07K14/52, 17/08,

（以上各欄由本局填註）

A4
C4

公告本

發明 ~~新型~~ 專利說明書

414799

一、發明 ~~新型~~ 名稱	中文	刺激巨核細胞生長與分化之組合物與方法
	英文	COMPOSITIONS AND METHODS FOR STIMULATING MEGAKARYOCYTE GROWTH AND DIFFERENTIATION
二、發明 ~~創作~~ 人	姓名	1.提摩西·D·巴特利 2.傑柯布·M·波根伯格 3.羅伯·A·波塞爾曼 4.帕梅拉·亨特 5.歌拉夫·金斯勒 6.巴魯·沙梅爾
	國籍	1.2.3.4.6. 均美國　5. 英國
	住、居所	1.美國加州千橡市麥克利亞路2431號 2.美國加州卡瑪利羅市芭芭拉大道2242號 3.美國加州千橡市巴卡拉特街3301號 4.美國加州千橡市麥克利亞路2431號 5.美國加州千橡市橡樹區533號 6.美國加州摩爾公園市柏洛德威大道1136號
三、申請人	姓名（名稱）	美商安美基公司
	國籍	美國
	住、居所（事務所）	美國加州千橡市德哈威爾路1840號
	代表人姓名	湯瑪士·E·渥克曼二世

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

裝　訂　線

（由本局填寫）

承辦人代碼：
大　　類：
IPC分類：

85年12月14日 修正補充

A6
B6

本案已向：

國（地區）　申請專利，申請日期：　　案號：　　，□有　□無主張優先權

國（地區）	申請日期	案號
美	1994.3.31	08/221,768
	1994.5.31	08/252,628
	1994.10.12	08/321,488
	1994.11.30	08/347,780

有關微生物已寄存於：　　，寄存日期：　　，寄存號碼：

寄存於	寄存日期	寄存號碼
食品工業發展研究所	84.3.28	CCRC 940086
		CCRC 940087
		CCRC 940088
		CCRC 950002
		CCRC 960025

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

（由本局填寫）

承辦人代碼：
大　　類：
IPC分類：

85年12月14日 修正補充

A6
B6

本案已向：

國（地區）　申請專利，申請日期：　　案號：　　，□有　□無主張優先權

國（地區）	申請日期	案號
美	1994.3.31	08/221,768
	1994.5.31	08/252,628
	1994.10.12	08/321,488
	1994.11.30	08/347,780

有關微生物已寄存於：　　，寄存日期：　　，寄存號碼：

寄存於	寄存日期	寄存號碼
食品工業發展研究所	84.3.28	CCRC 940086
		CCRC 940087
		CCRC 940088
		CCRC 950002
		CCRC 960025

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

修正補充

五、發明說明（10）

414799

供有關其操作的其他細節等所引述的文獻和其他資料都併於本文中以為參考。

微生物於台灣之寄存

質體pBCB(MGDF2)(於大腸桿菌AbleC中)已於84年3月28日寄存於食品工業發展研究所(FIRDI)，寄存編號：CCRC 940086。

質體pBCB(MGDF1)(於大腸桿菌AbleC中)已於84年3月28日寄存於FIRDI，寄存編號：CCRC 940087。

表現質體pAMG 11R-Hu Met Lys MGDF(於大腸桿菌FM15中)已於84年3月28日寄存於FIRDI，寄存編號：CCRC 940088。

大腸桿菌K12 FM15已於84年3月28日寄存於FIRDI，寄存編號：CCRC 950002。

中國倉鼠卵巢細胞株P0012 60nM已於84年3月28日寄存於FIRDI，寄存編號：CCRC 960025。

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
請委員明示，本案修正後是否變更原實質內容

五、發明說明(1)

發明領域

本發明係有關新穎蛋白質，於本文中同義地稱為Mpl 配體或MGDFs ，其可刺激巨核細胞的生長並增加巨核細胞的分化或成熟，最終效應為增加血小板的數目。此外，也提出從天然來源取得均質形式的蛋白質與經由重組遺傳工程技術製備彼等之方法。

於另一部份中，本發明概括地有關新穎的MGDF衍生物類別，其中該MGDF分子係接著到水溶性聚合物者，及製備彼等分子的方法。於又另一部份中，本發明係有關MGDF衍生物，其中MGDF分子係接到一或多種聚乙二醇("PEG") 者，及其製備方法。

發明背景

本發明包含至少兩種廣闊的研究領域。第一種係有關巨核細胞的發育及其隨後產生血小板，而第二種係有關生長因子受體族的多肽成員，本文稱之為Mpl 受體者，及其配體。下文即分別概述這些研究領域。

A.從巨核細胞產生血小板

血小板為循環細胞，其對於流血的遏止和血液凝結具有重要性。巨核細胞為血小板的細胞源且係源自共同的骨髓前體細胞－其可衍生成所有的造血細胞系。該共同的前體細胞稱為多種作用性幹細胞或PPSC。

巨核細胞前身細胞的層系係以在活體外（in vitro）對應於適當生長因子的培養系統中所出現的巨核細胞（MK）群落之出現時間和尺寸為基礎的。釋放形成單位巨核細胞

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（2）

（BFU-MK）為最原始的巨核細胞前身細胞。BFU-MK被認為到最後會產生眾多群落形成性單位巨核細胞（CFU-MK），其為更分化的MK前身細胞。

隨著MK細胞進行後續的分化，其即失去進行有絲分裂的能力但取得核內再複製的能力。核內再複製（或核內有絲分裂）為在沒有細胞分裂時，細胞內發生核分裂之現象。核內再複製到最後會導致成為多倍體的MK。進一步的MK成熟化促成構成血小板特徵的細胞質小器官和膜等組成物之取得。

血小板係經由未確定清楚的程序從成熟MK產生的，該程序經推測為MK物理裂殖，或其他機制之結果。巨核細胞內大量膜構造的觀察導致血小板形成模型，其中一界線膜系統在細胞體內概括出新生態血小板。另一種血小板形成模型係由下述觀察發展出者，亦即，巨核細胞會形成限制在血小板尺寸間段的長細胞質突起，由該突起，血小板可能因骨髓及／或肺內的血流壓力而分離出來。這些細胞質突起即為Becker和DeBruyn所稱的前血小板以反映其所假設的在血小板形成中的前體角色。參看Becker and DeBruyn, Amer. J. Anat. 145:183 (1976)。

圖1表出巨核細胞和血小板發展的各種前體細胞之總覽。圖中最左邊的細胞為PPSC，而圖中在PPSC右邊的其他細胞為BFU-MK，接著為CFU-MK。圖中緊接在PPSC右邊正進行核內再複製的細胞為成熟的巨核細胞。由於核內有絲分裂的結果，該細胞已變成多倍體。緊接其右邊的構造體包含

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

五、發明說明（3）

從成熟巨核細胞的多倍體核發出的長細胞質突起。於圖中最右邊為細胞質突起經裂殖所產生的許多血小板。

下列有關上面對於巨核細胞成熟和血小板產生的說明之某些先前文獻摘列：

1. Williams, N. and Levine, R.F., *British Journal of Haematology* **52**: 173-180 (1982).

2. Levin, J., *Molecular Biology and Differentiation of Megakaryocytes*, pub. Wiley-Liss, Inc.: 1-10 (1990).

3. Gewirtz, A.M., *The Biology of Hematopoiesis*, pub. Wiley-Liss, Inc.: 123-132 (1990).

4. Han, Z.C., et al., *Int. J. Hematol.* **54**: 3-14 (1991).

5. Nieuwenhuis, H.K. and Sixma, J., *New Eng. J. of Med.* **327**: 1812-1813 (1992).

6. Long, M., *Stem Cells* **11**: 33-40 (1993).

B. 血小板形成的調節

許多實驗室所產生的大量數據顯示血小板的產生係受體液因子所調節。這種生物程序的複雜性原先尚未了解，而在目前顯示有許多人類生長因子都具有這種能力。

巨核細胞調節發生在多重細胞層次。有許多組織介素（Cytokines）可經由擴大前身細胞池而增進血小板的產生

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

五、發明說明（ 4）

。第二組體液生長因子係用為作用在更為分化的細胞以促進核內再複製之成熟化因子。此外，似乎有兩種獨立的生物回饋迴路來調節這些程序。

有幾種譜系的非特定性造血生長因子對MK成熟化施加重要的影響。粒性細胞－巨噬細胞群落刺激因子（GM-CSF），間白素-3（IL-3），IL-6，IL-11，白血病抑制因子（LIF），和促紅血球生長素(EPO)等分別個別地依其對MK尺寸，數目或倍數性等之影響而在活體外顯示促進人類MK成熟化。LIF，IL-6，和IL-11等的MK成熟化效應相對於IL-3有部份加成性者（LIF和IL-6）或完全加成性者（IL-11）。從這些先前文獻所得這類數據可推測在活體內（in vivo）可能需要組織介素組合以促進MK成熟化。

下列所列為一些關於巨核細胞調節和血小板產生的先前文獻之摘述：

7. Hoffman, R. et al., *Blood Cells* 13: 75-86 (1987).

8. Murphy, M.J., *Hematology/Oncology Clinics of North America* 3 (3): 465-478 (1988).

9. Hoffman, R., *Blood* 74 (4): 1196-1212 (1989).

10. Mazur, E.M. and Cohen, J.L., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 46 (3): 250-256 (1989).

11. Gewirtz, A.M. and Calabretta, B., *Int. J. Cell Cloning* 8: 267-276 (1990).

12. Williams, N., *Progress in Growth Factor Research* 2: 81-95 (1990).

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 5 ）

13. Gordon, M.S. and Hoffman, R., *Blood* 80 (2): 302-307 (1992).

14. Hunt, P. et al., *Exp. Hematol.* 21: 372-281 (1993).

15. Hunt, P. et al., *Exp. Hematol.* 21: 1295-1304 (1993).

此外，也有報導（參看參考資料16）提及在人類再生不能性血清中含有異於IL-3，粒性細胞群落刺激因子，和經淋巴細胞調理過的培養基中所含因子等之巨核細胞群落刺激活性。不過，促成該活性的分子並未被分離出或在先前技藝中被鑑定過。

16. Mazur, E.M., et al., Blood 76:290-297 (1990)。

C.Mpl 受體

骨髓增生性白血病病毒（MPLV）為一種老鼠複製缺陷性逆轉錄酶病毒，其會引起被感染哺乳動物發生急性白血病。據發現MPLV所表現的基因中有一部份編碼著融合到與組織介素受體族，包含GM-CSF，G-CSF，和EPO等的受體相關連的序列之病毒所具逆轉錄酶病毒被膜（或外蛋白質殼）。

上述MPLV基因的表現具有一有趣的生物學性質，亦即會引起各種類型的老鼠前身細胞立即取得對增生與終端成熟化的生長因子無關性。再者，有些被MPLV急性轉形的骨髓細胞培養物中含有巨核細胞，顯示MPLV基因與巨核細胞生長／分化之間有某種關聯。

目前已被公認者，MPLV病毒基因（稱為v-Mpl）在哺乳

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（6）

動物細胞中有一同系物，其被稱為細胞Mpl基因（或c-Mpl）。使用v-Mpl-衍生探頭，可選殖出對應於人類c-Mpl基因的cDNA。參看PCT公開申請WO 92/07074（1992年4月30日公開；於下文討論之）。序列分析證明被c-Mpl基因產物所編碼的蛋白質，就像同系的v-Mpl基因產物一般，屬於高度保守性組織介質受體超族（superfamily）。

這種細胞基因，c-Mpl，基於經由RNAse保護和RT-PCR等實驗發現在正常小鼠的骨髓，脾和胎肝等之中有其表現，但在其他組織內則沒有表現之結果被認為其在造血中扮有機能性角色。特別者，c-Mpl係在巨核細胞上進行表現。此外也證實人類細胞基因，人類c-Mpl，係在CD34陽性細胞，包括經純化的巨核細胞和血小板等之內進行表現。CD34為顯示早期造血前身細胞的抗原。此外，將CD34陽性細胞接觸對c-Mpl mRNA或訊息呈反義（anti-sense）的寡去氧核苷酸時會明顯地抑制CFU-MK巨核細胞前身的群落形成能力，但對於紅血球與粒巨噬細胞等的前身則沒有影響。

由上述數據和觀察結果推斷c-Mpl編碼一細胞表面分子，在本文稱之為Mpl受體，其結合到一配體而活化該受體，可能導致巨核細胞的產生及／或發育。

PCT專利公開WO 92/07074係有關從來自人類和老鼠兩種來源的c-Mpl產生之蛋白質序列。該基因產物如上面解釋過者被認為是一受體，其係由至少三個共同區或域所構

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（7）

成，一細胞外域，一透膜域，及一細胞內（或細胞質）域。連接在一起時，這三域即構成完整的Mpl 受體。該PCT公報也提出一種可溶性的受體形式，其實質地對應於成熟c-Mpl 蛋白質的細胞外域。其細胞內域含有一疏水性區，其在經由透膜區連接到該蛋白質的細胞外域時，即促使整個蛋白質團聚而不溶。相反地，當c-Mpl 基因產物的細胞外域與該透膜域和細胞內域分開時，其即變成可溶，因此，該蛋白質的細胞外形式被稱為該受體的"可溶"形式。

下列為某些與上述v-Mpl 和c-Mpl 受體與基因相關聯的說明之先前文獻：

17. Wendling, F., et al., *Leukemia* 3 (7): 475-480 (1989).

18. Wendling, F., et al., *Blood* 73 (5): 1161-1167 (1989).

19. Souyri, M., et al., *Cell* 63: 1137-1147 (1990).

20. Vigon, I., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5640-5644 (1992).

21. Skoda, R.C., et al., *The EMBO Journal* 12 (7): 2645-2653 (1993).

22. Ogawa, M., *Blood* 81 (11): 2844-2853 (1993).

23. Methia, N., et al., *Blood* 82 (5): 1395-1401 (1993).

24. Wendling, F, et al., *Blood* 80: 246a (1993).

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 8 ）

D.能夠刺激血小板產生的藥劑之需要

最近有報導提及在北美，西歐和日本等境內的醫療中心正以逐漸的速率實施血小板灌輸。參看Gordon, M,S, and Hoffman, R., Blood 80(2) : 302-307 (1992) 。這種增加大半是因醫學技術的進步及下述技術的更大幅增加，例如，心臟手術及骨髓，心，和肝等的移植等。劑量加強作為癌症患者和HIV-1 流行性的輸送治療手段也助長血小板供給的過量需求。

血小板的使用伴隨著許多血液性感染病及同種異體免疫的傳遞可能性。此外，純化血小板的製備為昂貴的努力，因而這種血小板的增加使用會增高整體醫療費用。因此之故，對於製備供人類用的血小板之新穎且改良的方法存在著緊急需要。

增加血小板製備的範例先前作法分述如下：

美國專利第5,032,396 號報導間白素-7（IL-7）能夠刺激血小板產生。間白素-7也稱為淋巴細胞生成素-1且為一種促淋巴細胞生成性生長因子，能夠刺激骨髓內的B-和T-細胞前身之生長。公開的PCT 申請序號88/03747（1988年10月19日申請）和1988年10月24日申請的歐洲專利申請第88309977.2號都揭示經由重組DNA's 技術製備哺乳動物IL-7的DNA ，載體，和相關的方法。於該美國專利中提出的數據顯示IL-7可增加正常和半致死地照射過的小鼠之循環血小板。

美國專利第5,087,448 號揭示經由用間白素-6處治哺乳

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

五、發明說明（9）

動物可刺激巨核細胞和血小板的增生。重組人類間白素為一種具有多重生物活性的26,000分子量醣蛋白。該專利中提出的數據顯示IL-6具有在活體外增加巨核細胞群落的效應。

上述專利沒有提及任何有關本發明所提的Mpl配體。

雖然有上述諸揭示，對於哺乳動物體內的巨核細胞及／或血小板之新刺激劑仍有強烈需求存在。

E.有關化學改質MGDF的背景

由於重組DNA技術的進展結果使得目前治療用蛋白質可取得適當形式且充分的供應量。這些種蛋白質的化學衍生物可以有效地阻斷蛋白水解酵素以免與蛋白質主鏈本身行物理接觸，因而防止降解。其他的優點包括，在某些情況下，增加治療性蛋白質的安定性和循環時間及減低抗原性。不過，必須提及者特殊蛋白質的改質效應是無法預測的。有一篇說明蛋白質改質和融合蛋白質的評論文章為Francis, "Focus on Growth Factors" 3:4-10 (May 1992)（為Mediscript, Mountview Court, Friern Barnet Lane, London N20, OLD, UK所出版）。

聚乙二醇（"PEG"或"peg"）為已用於治療性蛋白質產物的製備之一種這類化學品。例如，Adagen®，一種經聚乙二醇化的腺苷脫胺酶方劑即經許可用以治療嚴重的併發性免疫缺乏疾病；聚乙二醇化的超氧物歧化酶已在臨床實作中用以治療頭部創傷；聚乙二醇化α-干甘擾素已被試用於第I期肝炎臨床治療中；聚乙二醇化的葡糖腦苷脂酶和聚

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（10）

乙醇化的血紅素都已報導處於臨床前試驗中。對於某些蛋白質，接著聚乙二醇後經證明可對抗蛋白水解作用，Sada, et al., J. Fermentation Bioengineering 71：137-139 (1991)，且已有接著某些聚乙二醇部份體之方法可用。參看美國專利第4,179,337 號，Davis et al., "Non-Immunogenic Polypeptides"，(1979年12月18日核發)；和美國專利第4,002,531 號，Royer, "Modifying Enzymes with Polyethylene Glycol and Product Produced Thereby"，(1977年，1 月11日核發)。有關的評論可看看Abuchowski et al.,於"Enzymes as Drugs"中(J.S. Holcerberg and J. Roberts, eds. pp. 367-383 (1981))。

別的水溶性聚合物也已被用來改質蛋白質，例如，乙二醇／丙二醇共聚物，羧甲基纖維素，葡聚糖，聚乙烯醇，聚乙烯基吡咯烷酮，聚-1,3- 二噁茂烷，聚-1,3,6- 三氧陸圜，乙烯／順丁烯二酸酐共聚物，及聚胺基酸（均聚物或無規共聚物）等。

以聚乙二醇而言，已有多種手段被用來將聚乙二醇分子接著到蛋白質上。通常係經由蛋白質上的反應性基將聚乙二醇連接到蛋白質。胺基，和離胺酸殘基上或N-端上者，即為方便供這種接著所用者。例如，Royer（上列美國專利第4,002,531 號）提及使用還原性烷基化將聚乙二醇分子接著到酵素。1993年4 月28日公開的Wright, EP 0 539 167, " Peg Imidates and Protein Derivates

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

五、發明說明（11）

Thereof"中提及用PEG的醯亞胺酯衍生物或相關的水溶性有機聚合物改質具有自由胺基的肽和有機化合物。1990年2月27日核發給Shaw的美國專利第4,904,584號係有關用以經由反應性胺基接著聚乙二醇分子而將蛋白質所含許多離胺酸殘基予以改質之方法。

一種經化學改質過的特殊治療性蛋白質為粒性細胞群落刺激因子，"G-CSF"。參看歐洲專利公報EP 0 401 384，EP 0 473 268，和EP 0 335 423等。

另一例子為聚乙二醇化的IL-6，EP 0 442 724，發明名稱為"改質hIL-6"（參看共同申請中的U.S.S.N. 07/632,070），其揭示加到IL-6中聚乙二醇分子。1985年9月11日公開的EP 0 154 316提及用淋巴細胞活與聚乙二醇醛反應。

改質MGDF的能力在技藝中係未知者，其原因在於各個別蛋白質對改質的感受性係決定於該蛋白質的特定構造參數之故。再者，這種改質對各蛋白質所具生物學性質的影響從技藝上是不可預測者。如本文所述者，由於MGDF的許多臨床應用，因此需要有改變性質的衍化MGDF產物。彼等分子可能具有在活體內增加的半生期及／或活性，及其他性質等。

蛋白質分子經聚乙二醇化後通常會導致化學改質蛋白質分子混合物。舉例而言，具有5個離胺酸殘基和在N-端的一個自由胺基以上述諸方法反應後可導致異質混合物，有些具有6個聚乙二醇部份體，有些具有5個，有些3個，

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（12）

有些2個，有些1個而有些則無。此外，於具有幾個的分子中，其聚乙二醇部份體可能在不同分子上不接著到相同的位置。常需要的是得到均質產物，其中含有全部只有一種或少數種（如2-3）改質蛋白質物種，其在化學物種，如PEG的數目及／或位置等有變異。話雖如此，對於某一治療徵示而言，如單一，二一及或三一聚乙二醇化物種的混合物可能為適當者或可容忍者。

每批混合物的變異性在開發治療性聚乙二醇化蛋白質產物時可能為不利者。於這種開發中，生物活性的可預測性是重要因素。例如，業經證明者，有超氧物歧化酶與聚乙二醇的非選擇性結合之情況中，有幾個部份的改質酶素係完全無活性者（P. McGoff et al., Chem. Pharm. Bull. 36:3079-3091 (1988)）。亦參看，Rose et al., Bioconjugate Chemistry 2:154-159 (1991)，其中報導聯結劑基嫉醯胼對蛋白質基質（胰島素）C-端羧基的選擇性連接。若治療性蛋白質的組成每批不同時，就不能具有這種預測性。有些聚乙二醇部份體在某些位置上可能不像在其他位置結合得一樣安定，而這種情形可能導致彼等部份體從蛋白質上解離出來。當然，若這種部份體係無規地接著且可能因而無規地解離時，則該治療性蛋白質的藥物動力學就不能正確地預測。

另外高度需要者為衍化MGDF產物中在聚合物部份體與MGDF部份體之間沒有聯結部份體者。上文所述方法的一項問題在於其典型地需要在蛋白質與聚乙二醇分子之間有一

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

五、發明說明（13）

聯結部份體。這些聯結部份體可能具抗原性，這點在開發治療性蛋白質時也是不利者。

一種不含聯結基的方法載於Francis et al., "Stability of Protein Pharmaceuticals : in vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization" (Eds. Ahern., T. and Manning, M.C.) Plenum, New York, 1991) 之中。此外，在Fisher et al.,編輯的"Separations Using Aqueous Phase Systems, Applications In Cell Biology and Biotechnology, Plenum Press, N.Y., N.Y. 1989 pp. 211-213 中，Delgado et al.的"Coupling of PEG to Protein By Activation with Tresyl Chloride, Applications In Immunoaffinity Cell Preparation" 一文中提及使用tresyl chloride，其可導致聚乙二醇部份體與蛋白質部份體之間沒有聯結基。由於tresyl chloride 的使用可能產生毒性副產物，因此該方法可能難以用來製成治療性產物。

Chamow et al., Bioconjugate Chem. 5:133-140 (1994)報導到用一甲氧基－聚乙二醇("MePEG二醇)醛經由還原性烷基化改質CD4 免疫吸附素（CD4 immunoadhesin）。作者提及有50% 的CD4-Ig經由在N-端的α- 胺基之選擇性反應而被mePEG-改質（上引資料，第137 頁）。此外，該作者也提及該改質CD4-Ig（對蛋白質gp 120）的活體外結合能力會以與MePEG 化程度相關聯的速率減低（同上

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

五、發明說明（14）

）。

綜上所述，對於MGDF衍生物存在著一種需求，且，更特定言之，對聚乙二醇化MGDF有所需求。此外，也存在著對於進行這種衍化的方法之需求。

發明概述

於一部份中，本發明提出一種多肽，其可特定地促進巨核細胞生長及／或發育（"Mpl配體"或"MGDFs"），且其實質地不含（亦即，分離出者）其他蛋白質（如，於得自哺乳動物來源的Mpl配體之情況中，哺乳動物蛋白質）。這種蛋白質可從經由天然地或用其他因子誘導下產生因子的細胞來源純化出。其亦可用重組遺傳工程技術產生。Mpl配體更可經由化學技術，或上述技術的組合合成而得。

本發明Mpl配體可從哺乳動物源以其固有形式製得。本發明實施例節段中述及從犬的再生不能性血漿中分離出範例Mpl配體。不過，在本發明其他實施例中也證明從人類和豬等兩來源的再生不能性血漿中也存在著密切相關的Mpl配體。值得注意者，人，豬和狗等的Mpl配體的個別活性都會被老鼠Mpl受體的可溶形式所特定地抑制，顯示所有這些Mpl配體（及來自其他哺乳動物，包括老鼠等來源者）在構造和活性水平上都密切相關著。

人，豬和其他哺乳動物Mpl配體預料都可從天然來源經由本文詳述之程序分離而得。參看實施例10。綜上所述，本發明概括地包含哺乳動物Mpl配體，例如得自狗，豬，

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

五、發明說明（15）

人，小鼠，馬，羊和兔子等者。特別較佳的Mpl配體是得自狗，豬和人者。

此外，也從人胎腎和肝庫選殖出編碼人類Mpl配體的基因並定其順序，如後面實施例中所說明者。定出在細胞基分析中具有活性的兩種人類多肽序列（參看實施例4）。這兩序列的長度彼此不同，但在其胺基酸順序中有一大段是相同者。該相同的部份對紅血球生成素具同系性。該Mpl配體在本文內也稱為巨核細胞生長和發育因子（MGDFs）；對於Mpl配體的所有一般參考資料也應用於本文所稱的MGDF，且反之亦然。"MGDF多肽"一詞的意思為具有可特定地刺激或抑制巨核細胞生長及／或發育的活性之多肽，本文要揭示這種多肽的範例。

本發明Mpl配體經發現在巨核細胞品系中具特定活性，可增大巨核細胞的成熟作用及／或增殖，如後面的實施例2和4分析中所顯示者。"特定地"一詞意為相對於許多其他細胞類型而言，該多肽對巨核細胞顯示出相對較大程度的生物活性。對於巨核細胞具有刺激性者，預期可經由對巨核細胞的成熟化和分化等之刺激而具有在活體內刺激血小板產生之活性。

兩種得自犬源的較佳Mpl配體具有經十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳法（SDS-PAGE）在非還原性條件下測得約25 kd和31 kd的表觀分子量。於後面實施例中詳述的相同純化程序中純化出兩種蛋白質。

兩種較佳的人類配體，MGDF-1和MGDF-2，長度分別為

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

五、發明說明（16）

332和173胺基酸，不包括21個胺基酸的擬定信號肽。這些序列，及第三種相關分子，MGDF-3，皆示於圖11和12。

本發明的另一部份為從哺乳動物源，較佳者全血液，血清或血漿分離和純化本發明Mpl配體或其片段的方法。再生不能性血液，血清或血漿為特別較佳的起始物。再生不能性血液，血清或血漿可由下述方法取得；用輻射源，例如鈷－60，以約400-800雷得（Rad）的輻射水平照射哺乳動物使其再生不能。這種程序係技藝中已知者，如下文實施例1中所引文獻中所說明者。於人類的情況中，經照射的血液，血漿或血清可得自輻射治療，如治療癌症後的患者。

之後，對該再生不能性血液，血清或血漿施以純化程序。本發明所提出的純化方法包括下列關鍵程序：外源擬集素親和層析術和Mpl受體親和層析術。這些程序都可等致得自犬再生不能性血漿的25至31 kd兩蛋白質達到約300-500倍的純化。其他的標準蛋白質純化程序也可與上述程序一些包含在本發明方法中以進一步純化本發明的Mpl配體，如下文詳細說明的程序。

本發明的另一部份包括編碼哺乳動物Mpl配體蛋白質的表現之多核苷酸。這種DNA序列可能包括編碼本文所述哺乳動物Mpl配體蛋白質表現的經離析DNA序列。彼等DNA序列也包括在該Mpl配體密碼序列兩側的5'和3'哺乳動物非密碼序列。彼等DNA序列可更編碼胺基端信號肽。彼等序列可經由已知方法製得，包括完全或部份的化學合成。

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

五、發明說明 (17)

該等密碼子可經最適化以在經選擇用來表現的宿主細胞內進行表現〔如，大腸桿菌（E. Coli）或CHO細胞）。

此外，本發明也提出重組DNA分子，各包括載體DNA（vector DNA）和編碼一哺乳動物Mpl配體的DNA序列。該DNA分子提供Mpl配體DNA與能夠導引Mpl配體在所選宿主細胞內的複製與表現之調節性序列一起處於操縱締合狀態。本發明也提出用以表現重組Mpl配體蛋白質的經這種DNA分子轉形過的宿主細胞（如，細菌細胞，哺乳動物細胞，昆蟲細胞，酵母細胞或植物細胞等）。

本發明的DNA分子和經轉形細胞都用於另一部份中，一種新穎的製備重組哺乳動物Mpl配體蛋白質，或其肽片段之方法。於該方法中，用以編碼Mpl蛋白質或其片段的表現之DNA序列（或如上所述之重組DNA分子）與一能夠控制蛋白質表現的適當調節性或表現控制性序列處於操縱締合狀態而轉形所得細胞系於可使重組DNA進行表現的適當條件下進行培養。該專利申請方法可以採用許多已知的細胞作為蛋白質表現用之宿主細胞。本發明較適合於產生Mpl配體的細胞系為哺乳動物細胞系（如，CH細胞）和細菌細胞（如，大腸桿菌）。

用大腸桿菌生產Mpl配體時，較佳者為採用在要表現的蛋白質N-端之Met和Lys殘基，因其所得表現產物的產率典型地較高之故。特別較佳的表現產物為全部具有165個胺基酸的Met-Lys人類MGDF（亦即，Met^{-2}-Lys^{-1} [1-163] MGDF（從成熟蛋白質的第一個胺基酸開始編號）

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

五、發明說明（18）

。將在細菌細胞，如大腸桿菌之內表現所得產物予以純化出之後，可用酵素，例如二肽酶（如，組織蛋白酶C）等處理而脫除掉鏈端Met-Lys 殘基。

然後，以適當的傳統手段從宿主細胞，細胞溶裂物或培養基內收取表現出的Mpl 配體蛋白質。調理過的培養基可經由相同的純化步驟或其修改步驟，如從再生不能性血漿中分離Mpl 配體所用者予以處理（參看實施例7）。

於本發明另一部份中，提出重組Mpl 配體蛋白質。這些蛋白質實質地不含其他哺乳動物物質，尤其是蛋白質。本發明Mpl 配體蛋白質的其他特徵在於含有一或多種本文所述的物理，生化學，藥學或生物等活性。

本發明也有關由MGDF蛋白質部份體連接到至少一種水溶性合物所構成的化學改質MGDF，以及這種組合物的製備方法及其使用。特別者，本發明包括化學改質MGDF，其中該MGDF物種係與反應性聚乙二醇分子反應而使PEG 接著到MGDF。這種接著可用本文討論過的聚乙二醇化反應予以完成，例如，用醯基化或烷基化反應等。用PEG 進行醯基化或烷基化反應可在主要產物為一聚乙二醇化或多聚乙二醇化之條件下進行。多聚乙二醇化通常包括將PEG 接著到離胺酸殘基的ε- 胺基且可另外包括在多肽的N-端聚乙二醇化。一聚乙二醇化較佳者包括將PEG 接著在蛋白質N-端的α- 胺基。該一聚乙二醇化反應的產率和均一性可經由一種還原性烷基化予以增進，該種反應係將MGDF蛋白質部份體N-端殘基的α- 胺基予以選擇性地改質，藉而促成水溶

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

五、發明說明（19）

性聚合物部份體選擇性接著到蛋白質的N-端。如此可得實質均一的聚合物／MGDF蛋白質結合體分子的製備及（若使用聚乙二醇時）使聚乙二醇部份體直接偶合到蛋白質部份體的聚乙二醇化MGDF蛋白質分子之製備。

本發明的另一部份提出醫藥組合物，其含有治療有效量的經離析之天然發生或重組Mpl 配體，其可用水溶性聚合物，例如聚乙二醇予以衍化過；及醫藥可接受的載體，稀釋劑，或賦形劑。這種醫藥組合物可用於治療其特徵為巨核細胞及／或血小板缺乏以及活體內（in vivo)Mpl 配體缺乏等的疾病狀態或疾病之方法中。其亦可預防性地用來改善預測的巨核細胞或血小板缺乏（例如，因手術而致者）。

依此，本發明的Mpl 配體可以用來治療再生不能性貧血症，例如，增強血小板產生受損患者的血小板產生（例如，AIDS患者或正進行癌症化學治療的患者）。Mpl 配體可用來治療血液疾病，例如，血小板減少症。Mpl 配體可用於骨髓移植患者的輔助治療。這類患者可為人類或其他哺乳動物。得自一物種的Mpl 配體也預期可用於另一物種。

所以，本發明的另一部份為一種治療用血小板缺乏所導致的這些和其他病理狀態之方法，其包括給患者服用治療有效量的上述醫藥組合物。這種治療方法可包括與Mpl 配體同時或順序地給用有效量的至少一種別的巨核細胞群落刺激因子，組織介素（如EPO），可溶性Mpl 受體，造血素，間白素，生長因子，或抗體等。

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

五、發明說明（20）

本發明的另一部份提出抗體（多株，單株，人化，和重組等型），和抗體片段，其係對抗哺乳動物Mpl配體或配體片段者（亦即，對彼等具反應性者）。所以，本發明該部份中的一部份包括能夠分泌這種抗體的細胞（如，在單株抗體情況中的雜種瘤（hybridomas），及其製備方法與其在診斷或治療程序中的用途等。

本發明的另一部份為體液含有Mpl配體之分析。這種分析可採用以單一抗體或"三明治"（sandwich）格式特定地辨識Mpl配體之抗體。這種分析可以用來判定患者是否需要由外部給用Mpl配體及／或這種患者是否可能經歷血小板缺乏或疾病。這種分析可能包含在配套藥方式中，內含陽性和陰性的對照，抗體，及其他標準配套藥劑成份。

本發明的其他部份和優點可從後面較佳實施例的詳細說明而獲得闡明。

繪圖之簡略說明

本發明的許多特性和優點可從繪圖的閱覽而變得明顯，其中：

圖1所示為巨核細胞和血小板的發育和成熟化之綜覽。

圖2所示為可溶性老鼠Mpl受體實質地完全抑制受照射狗血漿（"再生不能性犬血漿"或"APK9"）誘導巨核細胞發育之能力。巨核細胞發育的分析述於實施例2中。

圖3所示為APK9經外源擬集素和Mpl受體兩種親和層析術程序增強的活性（"Mpl配體"）刺激1A6.1細胞的生長及可溶性老鼠Mpl受體阻斷該生長之情形。

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（21）

圖4所示為從再生不能性犬血漿純化25和31 kd兩形式的犬Mpl受體所包含的純化步驟總覽。

圖5所示為用逆相HPLC（RP-HPLC)純化Mpl配體。洗提份21含有高度純化的31 kd Mpl配體；洗提份22含有31 kd和25 kd兩種Mpl配體的混合物；而洗提份23含有高度純化的25 kd Mpl配體。

圖6所示為含有25及／或31 kd兩種Mpl配體蛋白質的逆相HPLC（C4管柱）洗提份中之Mpl配體活性的比較。

圖7所示為經CD34-選擇過的周圍血液細胞培養物用APK9，Mpl配體和各種其他因子予以刺激所產生的巨核細胞之數目。

圖8所示為經CD34-選擇過的周圍血液細胞培養物用APK9，Mpl配體和各種其他因子予以刺激而產生的總白血球數目。

圖9所示為經CD34-選擇過的周圍血液細胞培養物用APK9，Mpl配體和各種其他因子予以刺激而產生的巨核細胞百分比。

圖10所示為未參與在Mpl-配體-誘導巨核細胞發育中的人類IL-3。

圖11所示為cDNA和推演所得人類MGDF-1和MGDF-2的胺基酸順序。

圖12所示為cDNA和推演所得人類MGDF-3的胺基酸順序。

圖13所示為MGDF-1與得自犬源（A）和老鼠源（B）的MGDFs（Mpl配體）之間的比較。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（22）

圖14所示為用一甲氧基－聚乙二醇的N-羥基丁二醯亞胺基（NHS）活性酯將MGDF醯化導到聚乙二醇化產物之實施例。

圖15所示為用一甲氧基－聚乙二醇醛進行非特定性MGDF還原性烷基化得到多聚乙二醇化產物之例子。

圖16所示為用一甲氧基－聚乙二醇醛在N-端殘基的α-胺基進行部位特定性MGDF還原性烷基化導致實質的單聚乙二醇化產物之實例。

圖17所示為用MW 20kDa MePEG活化衍生物製得的MePEG-MGDF結合物之粒度排外（SEC）HPLC分析結果；

A.用MePEG（PEG 11)的NHS 酯將MGDF醯化製成的多-MePEG-MGDF-結合物；

B.用MePEG 醛（PEG 20）將MGDF烷基化製成的多-MePEG-MGDF-結合物；

C.用MePEG 醛（PEG 16）將MGDF烷基化製成的單-MePEG-MGDF-結合物。

圖18所示為用重組人類MGDF處理小鼠後的血小板計數之空心菱形=CHO- 衍生22-353 MGDF；空心圓＝未聚乙二醇化的大腸桿菌22-184 MGDF（亦即，1-163 MGDF）；及空心圓＝聚乙二醇化的大腸桿菌22-184 MGDF。

圖19所示為γ-HuMGDF的純化流程圖。

圖20所示為在老鼠Carboplatin 模型中γ-HuMGDF（大腸桿菌1-163）對血小板計數的影響，於第0日時，用單劑的Carboplatin（1.25毫克／小鼠經腹膜內注射

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（23）

Balb/c小鼠。只有賦形劑的組則不加Carboplatin。於24小時後，於研究的其餘天數內每天用賦形劑或100 μg/kg γ-HuMGDF經皮下注射經Carboplatin-處理的動物。（每一組，n=10；於每隔一時點，將5隻動物放血）。

圖21所示為γ-HuMGDF的（大腸桿菌1-163）對於經照射處理過的小鼠所具血小板計數的影響。在第0天用500雷得γ-輻射（鈷源）單劑量照射Balb/c小鼠。只含賦形劑的組未受照射。於24小時後，在其餘的研究天數內每天用賦形劑或100 μg/kg γ-HuMGDF經皮下注射受照射動物（每一組，n=8；於每隔一時點時將4隻動物放血）。

圖22所示為γ-HuMGDF的（大腸桿菌1-163）對於經照射和Carboplatin組合處理過的小鼠所具血小板計數之影響。於第0天時，用500雷得γ-輻射（鈷源）照射Balb/c小鼠並給用Carboplatin（1.25毫克／小鼠）於24小時後，在其餘研究天數中每天用賦形劑或100 μg/kg γ-HuMGDF經皮下注射試驗動物（每組n=8）。沒有γ-HuMGDF的支撐時，大部份的動物在此研究中都不能殘存。於對照組中，8隻動物中有1隻殘存。於處理組中，8隻動物中8隻都存活。

圖23所示為γ-HuMGDF的（大腸桿菌1-163）對於恆河猴照射誘導血小板減少症之影響。使恆河猴接受照射（700 cGy Co-80）。於照射後24小時起的18連續天中，經皮下給用γ-HuMGDF（n=3）或人類血清白蛋白（n=9）（各為25微克／公斤／天）。用電子血球分析儀進行血球分析

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（24）

。每一符號代表平均值（+/- sem）。

圖24所示為經聚乙二醇化與糖甘化的ｙ-HuMGDF對於經Carboplatin和照射等處理過的小鼠所具血小板計數之影響。依圖22進行的研究所述對小鼠施以Carboplatin和照射之組合處理。於處理後24小時開始的天數中，每天經皮下注射所示ｙ-HuMGDF製劑（50微克／公斤／天）。用電子血球計數器（Sysmex，Baxter）於所示天進行血球計數。

圖25所示為具有大腸桿菌最適化密碼子的重組人類MGDF，胺基酸1-163之合成基因序列。

發明之詳細說明

本發明的其他部份和優點可由諳於此技者從思考下列詳述本發明操作的說明中明顯得知。

本發明所提出的新穎哺乳動物巨核細胞生長促進，及／或血小板產生因子，稱為Mpl配體者為實質地不與其他31種含蛋白質物質締合之均一蛋白質。較佳者，該蛋白質中有約90%不為其他蛋白質，特別較佳者，有約95%不為其他蛋白質，且最佳者約有≧98%不為其他蛋白質。這些蛋白質可經由重組技術產生，以大量製備供治療應用所用的純活性Mpl配體。另外，這種蛋白質可從哺乳動物再生不能性血液，血漿或血清，或從能分泌或表現Mpl配體的哺乳動物細胞系等以均勻形式取得。再者，也可經由化學合成得到Mpl配體或其活性片段。

概括而言，本發明所用"Mpl配體"之意為本發明所揭示

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

五、發明說明（25）

的，於下文較詳細說明的Mpl 配體及其活性片段和變化形式。

得自犬源的兩種較佳Mpl 配體具有用十二烷硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳（SDS-PAGE）在非還原條件下測定的表觀分子量：約25 kd和31 kd。這兩種蛋白質都是用後面實施例節段中詳述的相同純化程序予以純化。例如，兩種Mpl 配體都結合麥芽外源凝集素並固定化Mpl 受體。該25 kd 形式包含下示胺基酸序列：

Ala-Pro-Pro-Ala-Xaa-Asp-Pro-Arg-Leu-Leu-Asn-Lys-Met-Leu-Arg-Asp-Ser-His-Val-Leu-His-Xaa-Arg-Leu-Xaa-Gln-Xaa-Pro-Asp-Ile-Tyr (SEQ ID NO: 1).

該31 kd 形式包含下示胺基酸序列：

Ala-Pro-Pro-Ala-Xaa-Asp-Pro-Arg-Leu-Leu-Asn-Lys-Met-Leu-Arg-Asp-Ser-His-Val-Leu-His (SEQ ID NO: 2).

SEQ ID NOS:1和2 中的"Xaa" 胺基酸為不能確定地得知者，不過預料其為半胱胺酸，絲胺酸，蘇胺酸，或（較不可能者）色胺酸。

從上示兩序列可以看出該31 kd 配體包含至少一部份的25 kd 形式。特別者，該31 kd 蛋白質的前面21個胺基酸與25 kd 蛋白質所含者完全相同。此證據，及特別者，兩種蛋白質在本文所提Mpl 配體活性分析中都具有活性之事實，可以推斷兩種蛋白質在構造和活性上有非常密切的關

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

五、發明說明（26）

聯。該31 kd形式的蛋白質與該25 kd形式在編碼彼等蛋白質的基因之差示C-端順序，差示糖基化及／或差示接合等方面可能有不同。

除了上述序列資料外，在最化純化步驟（用逆相HPLC）之前，對25 kd分離帶的序列分析中測定出另一序列。該序列經發現係在非還原條件下而不是在還原性條件下與25 kd帶締合，顯示其為該25 kd蛋白質被切斷成兩部份（如，經由蛋白酶作用者）的結果，該兩部份係由二硫鍵維繫在一起的。該序列為：

Thr-Gln-Lys-Glu-Gln-Thr-Lys-Ala-Gln-Asp-Val-Leu-Gly-Ala-Val-Ala-Leu (SEQ ID NO: 3)

雖然SEQ ID NO:3在25 kd蛋白質序列中的正確位置尚不清礎，不過，類似於其他細胞活素，例如促紅血球生成素等者，該序列可能發生於25 kd蛋白質中胺基酸114之附近。必須提及者，有可能，雖則尚未證明者，SEQ ID NO: 3也發生於該31 kd蛋白質內，也許同樣地從胺基酸114附近起始。該序列資料在實施例7中會另外予以詳細討論。

自從如上文概述者，犬配體的初始純化實驗之後，至今已選殖出編碼該犬配體的基因。其結果為已定出如圖13A所示的該犬配體的全長度胺基酸順序。基於分子量計算，可預測該25 kd和31 kd犬配體為圖13A所示全長度配體的C-端處理形式。另外也得到一種老鼠Mpl配體，其具有

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

五、發明說明（27）

圖13B所示之順序。

彼等純化配體也可以用實施例2所述人類巨核細胞分析予以鑑定其比活性，而為至少約5.7 x 10⁹巨核細胞單位／毫克。一個巨核細胞單位的定義為導致產生與1微升APK9標準對照用實施例2所述分析法所得一樣多的巨核細胞之物質量。

這種純化配體的其他特徵為其在實施例4的Mpl-依賴性細胞生長分析中所得比活性至少約6.9 x 10⁹細胞生長單位／毫克。"細胞生長單位"的定義為在實施例4分析中導致200 1A6.1細胞生長所需配體量。

下面的表1列出根據本發明實際純化所得犬Mpl配體的其他特殊活性計算：

表 1

Mpl配體	1A6.1分析（單位／毫克）	人類Meg分析（單位／毫克）
31 kd	6.52 x 10⁹	5.7 x 10⁹
25 kd	10.5 x 10⁹	14 x 10⁹

總括上述資料，本發明的一些範例Mpl配體具有下列一或多項生化和生物性質：

(a) 彼等Mpl配體係從犬的再生不能性血漿分離出來的；

(b) 彼等Mpl配體具有依12-14%十二烷硫酸鈉聚丙烯醯

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

五、發明說明（28）

胺凝膠電泳法（SDS-PAGE）在非還原性條件下測得之約25 kd 或31 kd 的表觀分子量；

(c) 彼等Mpl 配體包含下列胺基酸序列：

於25 kd 蛋白質的情況中，SEQ ID NO:1 ；或

於31 kd 蛋白質的情況中，SEQ ID NO:2 ；

(d) 彼等Mpl 配體另包含胺基酸序列SEQ ID NO:3 （特別較佳者為在25 kd 蛋白質內者）；

(e) 彼等Mpl 配體會結合到麥芽外源凝集素；

(f) 彼等Mpl 配體會結合到經固定化的可溶型老鼠Mpl 受體；

(g) 彼等Mpl 配體的活性在活體外（in vitro）會被可溶性Mpl 受體所抑制；及

(h) 彼等Mpl 配體在約8-9 的pH值下會結合到陰離子交換管柱上。

本發明較佳Mpl 配體的生物活性係以其在實施例2 的巨核細胞生長促進分析中特定地刺激巨核細胞生長和發育之能力而展現的。於該分析中，在8 天培養期間，Mpl 配體刺激人類周圍血液CD34$^+$ 細胞（亦即，經免疫吸附所選出的CD-34 細胞）的分化。巨核細胞係用特定的抗－血小板抗原抗體予以染色鑑定並以顯微術計數者。Mpl 配體也刺激因子－依賴性細胞系，1A6.1 ，之生長。於沒有Mpl 配體之情況中，細胞會死亡。在用Mpl 配體培養2 天後，估算1A6.1 細胞數。

上述Mpl 配體具有如上面表1 所列之比活性。

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

五、發明說明（29）

Mpl 配體源已被測定過為再生不能性哺乳動物血液，血漿，或血清。不過，彼等配體的來源並不預期受限於這些已知來源而可能包括其他的哺乳動物體液，從彼等所得細胞等。

從哺乳動物源純化天然Mpl 配體的程序係根據下列兩種關鍵性純化步驟：

(a) 外源凝集素親和層析術，較佳者係用麥芽凝集素；及

(b) 經固定化的Mpl 受體親和層析術。

此外，可以包括其他步驟以進一步純化蛋白質，例如離子交換層析術，膠濾層析術，和逆相層析術等。

實際上用以從犬再生不能性血漿取得Mpl 配體的純化技術包含下列步驟（參看，實施例7）：

(a) 外源凝集素親和層析術（麥芽凝集素層析術為特別較佳者）；

(b) 可溶性Mpl 受體（Mpl-X)親和層析術（較佳者，使用經固定化的老鼠Mpl-X）；

(c) 離子（陰離子或陽離子）交換層析術（較佳者，用陰離子交換層析術；特別較佳者，用Mono Q管柱）；

(d) 膠濾層析術，係在解離狀況下進行的（較佳者，使用Superdex 200 + SDS）；及

(e) 逆相層析術（較佳者，使用C-4 管柱）。

對再生不能性血液，血清或血漿，或其他哺乳動物Mpl 配體源，例如，細胞或組織等來源施以上面的純化程序即

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（30）

可得到均一的哺乳動物Mpl配體，包括人類配體。這些步驟並不要求以特殊順序進行，不過仍以上面所列順序較為適當。培養可用來產生Mpl配體的細胞（或組織源）之程序係諳於此技者所已知且可用來，例如，擴大起始物的供給者。

Mpl配體或其一或多種肽片段也可以經由重組技術來產生。為了得到特別Mpl配體的DNA序列，要將純化Mpl配體物予以還原並視需要蛋白酶，如胰蛋白酶予以消化。用傳統技術分離出酵素分解片段並定其順序。另外，如本發明實施例所舉例說明者，可將整個純化蛋白質根據可得蛋白質的量直接定其序列到可能的程度，然後以類似於下述程序中的已定順序之胰蛋白酶分解片段使用該已定順序的區段。用遺傳密碼合成寡核苷酸探頭以預測編碼已定順序的片段所具胺基酸順序之所有可能順序。較佳者，產生幾種簡併性序列以作為探頭。用這些探頭篩選哺乳動物基因組庫或其他來源而鑑別出Mpl配體基因。此外，也可以用取自Mpl配體細胞源的mRNA製備cDNA庫，然後用探頭對其進行篩選以鑑別編碼Mpl配體多肽的cDNA。再者，可以用適當的引物以PCR技術來擴充cDNA序列。

使用這些探頭篩選基因組庫後，即可得到DNA系（clone）。為了得到全長度系，可以用根據所得DNA序列之探頭再篩選該庫並雜交到全長度Mpl配體DNA序列。

Mpl配體的人類cDNA也可以經由將全長度人類基因組系分殖到表現媒體內，將其轉移感染到COS細胞中，用這些

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

五、發明說明 (31)

轉移感染COS 細胞製備cDNA庫並經由雜交Mpl 配體cDNA進行篩選等程序製得。在完整cDNA經鑑定出後，可將該cDNA或其編碼Mpl 配體活性片段的任何部份等到多種表現媒體中的任何一種之內而製備成該Mpl 配體或其一或多種片段之表現系統。

經由重組技術的這種使用，可得到編碼Mpl 配體多肽的較佳DNA 序列。本發明也包括這些DNA 序列，其不和編碼其他蛋白質的DNA 序列相締合（亦即，其為隔離者），且其編碼具有Mpl 配體活性（亦即，巨核細胞生長及／或發展）的Mpl 配體多肽之表現。這些DNA 序列包括編碼整個Mpl 配體或其片段的序列及雜交，較佳者在嚴緊雜交狀態下雜交到cDNA序列之序列〔參看，T. Maniatis et al., Molecular Cloning (A Laboratory Manual); Cold Spring Harbor Laboratory)1982), 387 至389 頁〕。

範例嚴緊雜交條件為在62-67 ℃下，於4 X SSC 中雜交，接著在62-67 ℃下，於0.1 X SSC 中洗約1 小時。另外，範例嚴緊雜交條件為在40-45 ℃下，於45-55%甲醯胺，4 X SSC 中雜交。

於鬆弛雜交條件下雜交到Mpl 配體的序列且編碼具有Mpl 配體生物性質的Mpl 配體肽之DNA 序列也編碼本發明新穎Mpl 配體。這種經鬆弛嚴緊雜交條件的例子為在45-55 ℃下，4 X SSC ，或用30-40%甲醯胺在40-45 ℃下雜交。例如，與Mpl 配體序列共有明顯同系性區域，例如，糖基化或二硫鍵結等部位且編碼具有一或多種Mpl 配體

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

五、發明說明（ 32）

生物性質的蛋白質等之DNA序列顯然地編碼Mpl配體多肽，即使這種DNA序列不會嚴緊地雜交到該Mpl配體序列亦然。

此外，本發明也包括編碼Mpl配體肽序列的DNA序列之對偶基本變異體（在物種群中自然發生的可能會或不會導致胺基酸變化的鹼變化），及其類似物或衍生物。類似地，本發明也包含編碼Mpl配體多肽但因遺傳密碼簡併性促成密碼子使用的不同之DNA序列，或因點突變或誘導改質藉以增進所編碼多肽的活性，半生期或產生等所引起的Mpl配體DNA序列之變異體。

遵從後面實施例11所述選殖程序而導致本文所揭示的人類蛋白質MGDF-1，MGDF-2，和MGDF-3的胺基酸序列和cDNA序列。MGDF-1為圖11所示的胺基酸22-353且含有332個胺基酸。MGDF-2和MGDF-1的截取部份，而為在圖11中所列的胺基酸22-195。所以，MGDF-2含有174個胺基酸。MGDF-3為圖12中所列的胺基酸22-289而含有268個胺基酸。於本發明所揭示的每一MGDF中，包含信號肽的分子，例如圖11和12兩者之中的胺基酸1-21也為本發明多肽的一部份，不過，對於要展現的巨核細胞生長和發育活性而言，最好將其脫除掉。摘要而言，MGDF1-3的定義如下：

MGDF-1	胺基酸	22-353	圖11
MGDF-2	胺基酸	22-195	圖11
MGDF-3	胺基酸	22-289	圖12

於本發明所提諸分析中，MGDF-1和MGDF-2皆具活性而

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

五、發明說明（33）

MGDF-3則否。

基於本發明所提活性數據，假設人類MGDF係在活體內（in vivo）表現成實質地非活性或較低活性的前體多肽，其含有可變的C-端胺基酸。於切去C-端胺基酸（及信號肽）之後，該經處理形式的分子即持有活性或變得更具活性。從上述假說看來，相信MGDF-1為展現其活性可能需要處理（如，用蛋白酶切斷）。截取形式的MGDF-1（即，MGDF-2）具有活性之事實即可支持此假說。

用MGDF-1基因轉染過的人類腎293細胞之經調理過培養基（活體外原）在後面實施例4的細胞分析中確實展現出活性。另一方面，在其他細胞系，如32D細胞之中，則未看到該分子的活性。據信，這種結果可能代表293細胞能夠處理MGDF-1分子，也許是經由截取，使得基本上促成該活性的分子為經截取之形式，而32D細胞則不能處理該分子。

自上述假說來看，從MGDF-1序列（圖11）經截取後可能導致多種活性分子。在細胞活素族，如，促紅血球生成素(EPO)內保守住的構造特點包括四條α-螺旋束和四個半胱胺酸。參看MGDF-1序列，Cys 172為這些演化性地保守且機能性必要的構造之最C-端元件。所以，較佳的MGDF-1截取變形體為具有胺基酸173至353的C-端截取段（伴隨著信號肽之切斷）之任何者。較佳者，MGDF-1序列要從C-端除去50至185個胺基酸，特別較佳者，從C端除去90至172個胺基酸。如本發明所揭示者，信號肽的長度

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

五、發明說明 (34)

被認為是21個胺基酸；不過，根據MGDF-1的順序，該信號肽可能具有23個胺基酸。綜上所述，本發明也特別包括對應於本文所提但從圖11或12的位置24起始之多肽。

下面所列為可能具有活性（亦即，促成巨核細胞及／或血小板生長的能力；或對自然受體的抑制／刺激活性等）的某些特別較佳之MGDF-1變體：

MGDF-4	胺基酸	22-172	圖11
MGDF-5	胺基酸	22-177	圖11
MGDF-6	胺基酸	22-191	圖11
MGDF-7	胺基酸	22-198	圖11
MGDF-8	胺基酸	22-265	圖11
MGDF-11	胺基酸	22-184	圖11

於某些純系中，不含MGDF-1序列中的胺基酸133-136，因此，對應於上面所列，但不含這些胺基酸（而其C-端胺基酸編號向下減4調整）之序列也可能具有活性。

於一純系中，在位置192具有一終止密碼子，因此在圖11中的位置191處係以Ala殘基取代Thr殘基。所以，本發明包括MGDF分子中，位置191係以Ala取代Thr之變體。

MGDF-3係因脫除掉本文稱之為IVS-5（間插序列-5）的序列後所得者，以該序列是接合在原序列的第五外顯子內之故。由於IVS-5的5'端係發生在一密碼子之內，其脫除會導致剩餘MGDF序列的移碼，其可看出是從MGDF-3的位置160開始發生到該分子的末端為止。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（35）

至今為止，將MGDF-3本身轉染到293細胞內並用實施例4的細胞基分析檢驗所得經調理培養基的活性時，皆未發現有活性。顯然地，不像MGDF-1者，293細胞不能夠將MGDF-3處理成活性形式。雖然如此，根據上文與MGDF-1相關的截取假說，從MGDF-3截取掉C-端胺基酸也可能導致活性。例如，將MGDF-3截取掉C-端40至102個胺基酸即可導致活性。較佳者，除掉50至90個胺基酸。兩種特別較佳的MGDF-2變體為：

MGDF-9	胺基酸	22-179	圖12
MGDF-10	胺基酸	22-190	圖12

於本文所揭示的所有Mpl配體，包括上列範例MGDFs在內，N-端可能含甲硫胺醯殘基，尤其是在彼等多肽係在細菌宿主細胞內表現者之時。

Mpl配體多肽也可能經由已知的傳統化學合成予以製成。以合成手段構成本發明多肽的方法係諳於此技者所知悉者。經由合成方法構成的Mpl配體多肽序列，藉著與Mpl配體多肽共有的一級，二級或三級構造與構像特性，也可能具有與彼等相同的Mpl配體生物性質。因此，其可做為天然經純化Mpl配體多肽的生物活性或免疫學替代物以用於治療和免疫等程序中。

肽或編碼Mpl配體的DNA序列等之中的改質可由諳於此技者用已知技術完成。Mpl配體序列中的標的改質可包括密碼序列中所選胺基酸殘基的替換，嵌入或刪除。彼等替換，嵌入或刪除所用突變形成技術皆為諳於此技者所熟知

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（36）

者〔參看，例如，美國專利第4,518,584 號〕。最好是在1 至20胺基酸之保守性變化。較佳的肽可經由蛋白分解酵素，或經由直接化學合成而產生。這些種變體也包括在本發明Mpl 配體多肽和多核甘酸之意義內。

Mpl 配體多肽序列的特殊突變可能包括糖基化部位（如，絲胺酸，蘇胺酸，或天冬胺醯胺）之改質。在任何天冬胺醯胺－聯結糖基化辨識部位或在分子上經由添加O-聯結醣而改質的任何部位等所發生的胺基酸替換或刪除可導致糖基化的不存在或只部份糖基化。天冬胺醯胺－聯結的糖基化辨識部位包括被適當的細胞糖基化酵素所特定地辨識之三肽序列。這些三肽序列可為Asn-Xaa-Thr 或Asr-Xaa-Ser ，其中Xaa 可為Pro 以外的任何其他胺基酸。在糖基化辨識部位的第一或第三或兩者的胺基酸位置發生的多種胺基酸替換或刪除（及／或在第二位置的胺基酸刪除）會導致該經改質三肽序列的非糖基化。彼等變質核甘酸序列的表現會產生在該等位置未發生糖基化之變體。

其他的MGDF類似物／衍生物

MGDF序列（Mpl 配體）的其他類似物和衍生物，其可保留全部或部份的MGDF（Mpl 配體）活性者，也可以由諳於此技者從本發明揭示而製備成。彼等改質也包括在本發明之內。

更特別者，本發明也概括地包括化學改質MGDF組成物及製備和使用彼等之方法。本揭示顯露出可以改質MGDF並增進其性質。

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（37）

於一部份中，本發明係有關MGDF產物，其係由MGDF蛋白質聯結到至少一種水溶性聚合物部份體所構成者。

於另一部份中，本發明係有關MGDF產物，其中該MGDF蛋白質係聯結到至少一個聚乙二醇分子。

於另一部份中，本發明係有關經由醯基或烷基鍵結接著到至少一個聚乙二醇分子的MGDF分子。

MGDF的聚乙二醇化可用技藝中已知的任何聚乙二醇化反應進行。參看，例如："Focus on Growth Factors 3(2)：4-10 (1992) EP 0 154 316；EP 0 401 384；及本文所引與聚乙二醇化相關的其他文獻。較佳者，該聚乙二醇化係用反應性聚乙二醇分子（或類似的反應性水溶性聚合物）經由醯基化反應或烷基化反應進行的。至此於下文要更詳細地討論聚乙二醇衍化的這些較佳手段。

醯基化

經由醯基化的聚乙二醇化通常包括用聚乙二醇(PEG)的活性酯衍生物與MGDF蛋白質之反應。任何種已知的或以後發現的反應性PEG 分子都可用來進行MGDF的聚乙二醇化。較佳的活化PEG 酯為酯化到N-羥基丁二醯亞胺("NHS")之PEG 。如本文所用者，"醯基化"意欲包括但不侷限於下述類似的MGDF與水溶性聚合物，如PEG 之間的鍵結：醯胺，胺甲酸酯，胺酯等。參看Bioconjugate Chem. 5:133-140 (1994)。其反應條件可選自聚乙二醇化技藝中已知者或以後開發出者，不過必須避開會使要改質的MGDF物種抑活化之條件：如溫度，溶劑和pH等。下文要說

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（38）

明一般用於MGDFs的聚乙二醇化之反應條件。圖14示出用一甲氧基-PEG的NHS酯進行的範例反應。

經由醯基化進行的聚乙二醇化通常會導致多聚乙二醇化MGDF產物，其中離胺酸的ε-胺基係經由醯基聯結基被聚乙二醇化者。較佳者，該連接鍵結為醯胺。另外較佳者，所得產物實質地僅為（如，≧95%）一-，二-或三-聚乙二醇化。不過，通常會以與所用的特殊反應條件有關之量形成某些具有較高聚乙二醇化程度之物種（最高達到MGDF所含離胺基ε-胺基的最大數目加上MGDF胺基端的一個α-胺基）。必要時，可用標準純化技術，包括，例如，透析，鹽析，超濾，離子交換層析術，膠濾層析術和電泳等從混合物，特別者未反應物種之中分離出更純化的聚乙二醇化物種。

烷基化

經由烷基化的聚乙二醇化通常包括用PEG的末端醛衍生物與蛋白質，如MGDF，在還原劑存在中反應。如上文討論的醯基化一般，要在下文說明其反應條件。

經由烷基化的聚乙二醇化也可能導致多-聚乙二醇化MGDF。圖15示出MGDF的範例還原性烷基化反應，其產生多聚乙二醇化產物。此外，可以經由操縱本文所述反應條件以使聚乙二醇化有利於實質地只發生於MGDF物種N-端的α-胺基（亦即，單-聚乙二醇化物種）。圖16示出MGDF的一個範例還原性烷基化反應，其產生單-聚乙二醇化產物。於單-聚乙二醇化或多-聚乙二醇化任一情況中，該

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（39）

PEG 基最好是經由 $-CH_2-NH-$ 基接著到蛋白質上。特別指 $-CH_2-$ 基時，這類鍵結在本文中稱之為"烷基"鍵結。

經由還原性烷基化以產生單一聚乙二醇化產物之衍化反應係利用MGDF中可供衍化的不同類型一級胺基所具差別反應性（離胺酸相對於N-端）。該反應係在可利用離胺酸殘基的ε-胺基與蛋白質N-端殘基的α-胺基之間的pKa差異之pH值下進行的（參看下文）。經由這種選擇性衍化，即可控制具反應性基，如醛基的水溶性聚合物對蛋白質之接著：與該聚合物的接合主要係在蛋白質的N-端進行而對其他反應性基，如離胺酸的側鏈胺基，則未發生明顯的改質。於一重要部份中，本發明提出一聚合物／MGDF蛋白質接合分子（意即MGDF蛋白質上實質地只在單一位置（如，≧95%）接著一聚合物分子）之實質均一製備。更特定言之，若使用聚乙二醇時，本發明也提出一種聚乙二醇化MGDF蛋白質，其不具可能的抗原性聯結劑，且其係以聚乙二醇分子直接偶合到MGDF蛋白質上而形成者。

綜上所述，於一較佳部份中，本發明係有關聚乙二醇化MGDF，其中該PEG 基係經由醯基或烷基而接著的。如上文討論過者，這種產物可為一－聚乙二醇化或多－聚乙二醇化者（亦即，含有2-6 個，較佳者，2-5 個PEG 者）。該PEG 通常是接著到蛋白質所含胺基酸的α或ε胺基，不過，也包括PEG 接著到蛋白質所含任何胺基之上者；彼等胺基可在適當反應條件下具有足夠反應性而接著到PEG 基。

本發明一聚乙二醇化MGDF為一特別較佳的分子組合。相

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

五、發明說明（40）

對於多聚乙二醇化MGDF衍生物而言，一聚乙二醇化衍生物就多種理由看來都是較有利者。

一聚乙二醇化衍生物比多聚乙二醇化衍生物較容易純化，因而通常更為均一。如上所述者，一聚乙二醇化反應可以進行得使聚乙二醇部份體只接著到N-端胺基酸的α-胺基。於MGDF所含幾個離胺酸殘基中的任何一個，及可能的其他部位都可能發生額外的聚乙二醇接著。所以，多聚乙二醇化MGDF衍生物傾向於為更非均一混合物。一聚乙二醇化衍生物的產率通常也高於多聚乙二醇化衍生物的產率。

於醯基化和烷基化兩者之中所用的聚合物分子可選自水溶性聚合物或其混合物之中。所選聚合物必須是水溶性者，使其所接著的蛋白質不會在水環境，例如在生理環境中沉澱。所選聚合物最好必須經過改質以具有單一反應性基，例如供醯基化的活性酯，或供烷基化的醛，使得如本發明方法所提出者，可以控制聚合度。較佳的反應性PEG醛為聚二醇丙醛，其具有水安定性，或其-C_1-C_{10}烷氧基或芳氧基衍生物（參看，美國專利第5,252,714號）。該聚合物可為分支或不分支者。較佳者，對於末端產物製劑的治療用途而言，該聚合物須為醫藥可接受者。該水溶性聚合物可選自下列所成組合之中：聚乙二醇，一甲氧基－聚乙二醇，葡聚糖，聚（N-乙烯基吡咯烷酮）聚乙二醇，丙二醇均聚物，聚氧化丙烯／氧化乙烯共聚物，多氧乙基化多元醇（如，丙三醇）和聚乙烯醇等。對於醯基化反應，所選聚合物必須具有單一反應性酯基。而對於本發明還原

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (41)

性烷基化而言，所選聚合物必須具有單一反應性醛基。通常，該水溶性聚合物不會選自天然發生的糖基殘基，以其一般而言，可用哺乳動物重組表現系統更方便地製得之故。該聚合物可具任何分子量，且可為分支或未分支者。

可供本發明所用的一特別較佳之水溶性聚合物為聚乙二醇，縮寫為PEG 。如本發明所用者，聚乙二醇意欲包括已被用來衍化其他蛋白質之任何形式的PEG ，例如，一-(C_1-C_{10}) 烷氧基- 或芳氧基- 聚乙二醇。

如本發明所用者，MGDF係定義為包括本發明所述MGDF的各種形式。例如，全長度或經截取者，糖基化或未糖基化等形式的MGDF都包括在內。下面所列為要衍化的較佳MGDF分子（於各例中，其編號都是根據圖11的胺基酸編號）：

MGDF-1	胺基酸	22-353	圖11
MGDF-2	胺基酸	22-195	圖11
MGDF-4	胺基酸	22-172	圖11
MGDF-11	胺基酸	22-184	圖11
MGDF-12	胺基酸	22-353	圖11
MGDF-13	胺基酸	27-195	圖11
MGDF-14	胺基酸	27-172	圖11
MGDF-15	胺基酸	27-184	圖11

上述較佳物種可為經糖基化，未經糖基化，或去糖基化等者，最好是未經糖基化者。其可用細菌（如，大腸桿菌）或哺乳動物（如，CHO ）細胞等經重組方式製成。

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（42）

下面所列為本發明特別較佳的化學衍化分子小組（於各例中，其為有經由醯基或烷基而接著的一－或多－，如2-4 個PEG 部份體）：

聚乙二醇化MGDF-11

聚乙二醇化MGDF-4

聚乙二醇化MGDF-2。

一般而言，化學衍化可在用以使生物活性物質與活化聚合物分子進行反應之任何適當條件下進行。製備聚乙二醇化MGDF的方法概括地包含下列步驟：(a) 用MGDF多肽與聚乙二醇（例如PEG 的反應性酯或醛衍生物）在可使MGDF接到一或多個PEG 基之條件下反應，及(b) 取得該反應產物。通常，醯基化反應所用的最佳反應條件係依個案根據已知參數和所欲結果而定者。例如，PEG ：蛋白質比例越大，則多－聚乙二醇化產物的百分比越大。

製備實質均一群的一－聚合物／MGDF蛋白質接合分子所用之還原性烷基化通常包括下列步驟：(a) 用MGDF蛋白質與反應性PEG 分子在還原性烷基化條件下反應，其中所用pH值係適合於使該MGDF蛋白質胺基端的α- 胺基發生選擇性改質者；及(b) 取得反應產物。

為了得到實質均一群的一－聚合物／MGDF蛋白質接合分子，該還原性烷基化反應條件為可使水溶性聚合物部份體選擇性地接著到MGDF N- 端者。這種反應條件通常可提供離胺酸胺基與N-端α- 胺基之間的pK_a 差異（pK_a 為50%的胺基被質子化而另外50% 為否之pH值）。pH值也會影響

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（43）

所用的聚合物／蛋白質比例。概括而言，若pH愈低，則需要用到較大超量的聚合物／蛋白質比例（亦即，N-端α-胺基的反應性愈低，就需要愈多的聚合物以達到最適條件）。若pH越高，就不需要這種大的聚合物：蛋白質比例（亦即，可得愈多反應性基時，就需要較少的聚合物分子）。對本發明目的而言，該pH通常係在3-9，較佳者3-6範圍之內。

另一項重要的考慮為聚合物的分子量。通常，聚合物分子量越高，可接到蛋白質的聚合物分子數目愈少。同樣地，在最適化彼等參數之時，也必須考慮聚合物的分支。概括而言，分子量越高（或分支越多），則聚合物：蛋白質比例越高。一般而言，對於本發明所涵蓋的聚乙二醇化反應，較適當的平均分子量為約2 kDa至約100 kDa（"約"一字代表±1 kDa）。較佳的平均分子量為約5 kDa至約50 kDa，特別較佳者為約12 kDa至約25 kDa。水溶性聚合物對MGDF蛋白質的比例通常為1:1至100:1，較佳者（對於多－聚乙二醇化而言）為1:1至20:1及（對於一－聚乙二醇化而言）1:1至5:1。

使用上述條件時，還原性烷基化可使聚合物選擇性地接著到N端具有α-胺基的任何MGDF蛋白質，且提供實質均一的一聚合物／MGDF蛋白質接合物之製備。"一聚合物／MGDF蛋白質接合物"一詞在此係用以指含有單一個聚合物分子接著到一個MGDF蛋白質分子之組成物。該一聚合物／MGDF蛋白質接合物較佳者具有一個接到N-端而非離胺酸所

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（44）

具胺基側基上之聚合物分子。該製備較佳者有大於90%的一聚合物／MGDF蛋白質接合物，且更佳者有大於95%的一聚合物／MGDF蛋白質接合物，其餘可觀測到的分子為未反應者（亦即，沒有聚合物部份體的蛋白質）。下面的實施例提供含有至少約90%一聚合物／蛋白質接合物，和含10%未反應蛋白質之製備物。該一聚合物／蛋白質接合物具有生物活性。

對於本發明還原性烷基化而言，該還原劑必須是在水溶液中具安定性者且較佳者為只能夠還原在該還原性烷基化初始程序中形成的希夫（Schiff）酸。較佳的還原劑為選自硼氫化鈉，氰硼氫化鈉，二甲烷基硼烷，三甲胺基硼烷和吡啶硼烷等之中者。特別較佳的還原劑為氰硼氫化鈉。

其他反應參數，例如溶劑，反應時間，溫度等，及產物純化手段，都可根據公開的有關用水溶性聚合物衍化蛋白質之資料依個案分別決定（參看本文所引文獻）。範例細節將在下面的實施例節段中說明。

可以選擇經由醯基化及／或烷基化方法來製備聚合物／蛋白質接合分子，且本發明所提供的優點可以選擇混合物所含一聚合物／蛋白質接合物比例。因此，必要時，可以製備接著不同數目的聚合物分子之各種蛋白質的混合物（如，二－，三－，四－，等）並與用本發明方法製成的一聚合物／蛋白質接合物組合在一起，而得具有預定比例的一－聚合物／蛋白質接合物。

下面的操作實施例演示化學改質MGDF之製備和經由醯基

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(45)

化與烷基化予以聚乙二醇化的MGDF之製備。因此，本發明的其他部份係有關這些製備。

概括而言，經由給用本發明聚合物／MGDF可以減緩或舒解的病況包括上文有關MGDF分子通盤說明中提及者。不過，本發明揭示的聚合物／MGDF分子比未衍化分子而言可具有其他的活性，增加或減低的活性，或其他特性。

於本發明另一部份中，提出含有上述化學改質MGDF分子的醫藥組合物。這種醫藥組合物可含有本文所載有關未衍化MGDF分子的任何成份。

隨著後續研究的進行，有關治療不同病人的不同病況所需適當劑量水平之資料會陸續出現，且一般熟練工作者於考慮接受者的治療情況，年齡和一般健康情形等，即可確定適當的劑量。概括而言，其劑量為0.01微克／公斤體重（只計算蛋白質的質量，未包括化學改質）至300 微克／公斤（同上）之間。較適當的劑量通常為5 微克／公斤體重至100 微克／公斤體重，特別較佳者為10微克／公斤體重至75微克／公斤體重。

本發明也提出製備MGDF（亦即，Mpl 配體）多肽或其活性片段之方法。本發明的一種方法包括將編碼Mpl 配體多肽的cDNA導到表現媒體中以製備成Mpl 配體表現系統。用該媒體轉染所選宿主細胞並予以培養。因此，本發明方法包括培養適當的細胞或細胞系，其係用對於在已知調節序列的控制下進行Mpl 配體多肽的表現有編碼之DNA 序列轉染過者。該等調節序列包括啟動區序列，終止區片段及導

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

五、發明說明（46）

引／控制蛋白質在適當宿主細胞內的表現之其他適當序列。然後從培養基（或若係在細胞內表現時，從細胞）以諳於此技者所熟知的恰當手段收取，分離和純化表現出來的因子。此外，美國專利第5,272,071 號中揭示的方法也預期可用於本發明多核甘酸／多肽。

適當的細胞或細胞系可為哺乳動物細胞，例如田鼠卵巢細胞（CHO）或3T3細胞。適用哺乳動物宿主細胞的選擇及轉化，培養，擴大，篩選和產物生產與純化等方法都是技藝中已知者。參看，例如，Gething and Sambrook, Nature 293 : 620-625 (1981)；或另外，Kaufman et al., Mol. Cell Biol., 5 (7): 1750-1759 (1985)或Howley et al.,美國專利第4,419,446 號。其他適用的哺乳動物細胞系為猴子COS-1 和COS-7 細胞系，及CV-1細胞系。其他典型哺乳動物宿主細胞包括靈長類細胞系和嚙齒類細胞系，包括經轉化細胞系在內。正常二倍體細胞，初級組織活體化（in vitro）培養所衍生的細胞品系，以及原植物等也都適合所用。候選細胞可為在選擇基因中有基因型地缺乏者，或可含有顯性作用選擇基因者。其他適當的哺乳動物細胞系包括但不限於HeLa，小鼠L-929 細胞，衍生自瑞士Balb-c或NIH 小鼠的3T3 系，BHK 或HaK 倉鼠細胞系等。

類似地可用為適合於本發明的宿主細胞者為細菌細胞。例如，各種大腸桿菌品系（如，HB101 ，DH5α ，DH10，和MC1061等）皆為生物技術領域中所熟知的宿主細胞。另

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

五、發明說明(47)

外，枯草桿菌（B. subtilis），假單胞菌屬（Pseudomonas spp.），其他的桿菌屬（Bacillus spp.），鏈黴菌屬（Streptomyces spp.）等的各種品系也可以用於本發明方法中。

諳於此技者所知悉的多種酵母細胞品系也可用為宿主細胞以表現本發明的多肽。另外，於必要時，也可以用昆蟲細胞作為本發明方法中的宿主細胞。參看，例如，Miller et al., Genetic Engineering 8: 277-298 (1986)及其中所引參考文獻。

本發明也提出重組分子或媒體以用於新穎Mpl 配體多肽的表現方法中。這些媒體含有Mpl 配體DNA 序列且其單獨地或與其他序列組合地編碼本發明Mpl 配體多肽（有或無信號肽者）或其活性片段。另外，摻合上述改質序列的媒體也為本發明的實施例且可用於產生Mpl 配體多肽。本發明方法所用的媒體也含有經選擇的調節序列，其與編碼本發明序列的DNA 處於操作締合狀態且能夠在所選宿主細胞中導引其複製和表現。

有一媒體為pXM ，其特別適合於在COS 細胞中的表現〔Y.C. Yang et al., Cell 47:3-10 (1986) 〕。另一種適合於在哺乳動物細胞，如，CHO 細胞之中的表現之媒體為pEMC2B1 。本發明所述哺乳動物細胞表現媒體可用諳於此技者所熟知的技術予以合成。諸媒體所含諸成份，例如，複製子，選擇基因，強化因子，啟動區等，都可得自天然來源或用已知程序合成。參看，Kaufman et al., J.

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

五、發明說明 (48)

Mol. Biol. 159 : 511-521 (1982)；和 Kaufman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:689-693 (1985)。此外，媒體 DNA 可包含全部或部份的牛乳頭狀瘤病毒基因組〔Lusky et al., Cell 36:391-401 (1984)〕且可在細胞系，如 C127小鼠細胞等之內複製成穩定的附加體元素。這些媒體轉染到適當的宿主細胞後可導致 Mpl 配體多肽的表現。

有眾多類型係技藝中已知用於哺乳動物，昆蟲，酵母，真菌和細菌等的表現者之其他適當表現媒體也可以用於該目的。

本發明方法和組合物所要治療的病況通常為包含既存的巨核細胞／血小板缺乏或預期未來有巨核細胞／血小板缺乏者（例如，因為已計畫的手術者）。彼等病況通常具活體內活性 Mpl 配體缺乏（暫時性或永久性）的結果。血小板缺乏的一般術語為血小板減少症，因此，本發明方法和組合物概括地可用以治療血小板減少症。

血小板減少症（血小板缺乏）可因幾種原因而發生，包括用各種藥物進行的化學治療和其他治療，放射治療，手術，意外事故血液損失，與其他特殊的疾病情況等。包含血小板減少症且可根據本發明予以治療的代表性特殊病況有：再生不能性貧血，自發性血小板減少症，會導致血小板減少症的轉移性腫瘤，系統性紅斑狼瘡，脾腫大，方康尼氏徵候群（Fanconi Syndrome），維生素 B12 缺乏，葉酸缺乏，梅－黑格林畸型（May-Hegglin anomaly），Wiskott-Aldrich 徵候群，和陣發性睡眠性血紅蛋白尿症

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

五、發明說明（49）

等。此外，對於AIDS的某些治療也會導致血小板減少症（如，AZT）。某些創傷癒合症也可能從血小板數目的增加受益。

有關預期的血小板缺乏，例如，因未來的手術所致，可以在需要血小板之前的幾天到幾小時，先服用本發明的Mpl配體。對於緊急情況，如，意外事故和大量流血，可以將該Mpl配體與血液或純化血小板一起給用。

本發明Mpl配體也可以用來刺激巨核細胞以外的某些細胞類別，只要這種細胞係可表現Mpl受體者。與這種表現Mpl受體的細胞相關聯，且其對Mpl配體的刺激有反應之病況也在本發明範圍之內。

在本發明所提活性分析中本身不具活性的MGDF分子可在活體外或活體內用為Mpl受體的調整劑（如，抑制劑或刺激劑）。

本發明多肽可單獨使用，或與其他細胞活性，可溶性Mpl受體，造血因子，間白素，生長因子或抗體等組合使用於上述病況的治療之中。

綜上所述，本發明的另一部份為用以治療上述病況的治療組合物。這種組合物包含治療有效量的Mpl配體多肽或其具治療效用的片段，與醫藥可接受載劑。該載劑物質可為注射水，較佳者，補充其他常給哺乳動物施用的溶液所用物質。典型者，Mpl配體治療劑可用由純化蛋白質配合一或多種生理可接受的載劑，賦形劑，或稀釋劑所構成的組合物形式進行給藥。中性緩衝鹽水或混合著血清白蛋白

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

五、發明說明（ 50）

的鹽水皆為代表性適當載劑。較佳者，該產品係調配成與適當賦形劑（如，蔗糖）一起的冷凍乾燥物。其他標準載劑，稀釋劑，和賦形劑等也可視需要加入。別的代表性組合物有Tris緩衝劑，pH 8.0和乙酸鹽緩衝劑，pH 5.0，其於各例中，可更包含山梨糖醇。

本發明組合物可以非經腸地系統性給藥。另外，本發明組合物可經靜脈內或皮下給藥。以系統性給藥時，本發明所用治療組合物可為無熱原，非經腸地可接受之水溶液形式。這種醫藥可接受的蛋白質溶液之製備，就其pH，等滲性，安定性等而言，都是技藝所及者。

治療上述病況的方法中所用劑量之道決定於主治醫師，考慮可能改變藥物作用的各種因素後決定之，彼等因素包括，例如，病人年齡，病況，體重，性別和食物，任何感染的嚴重性，給藥時間和其他臨床因素等。一般而言，每日劑量要在0.1-1000微克Mpl 配體蛋白質或其片段／公斤體重。

本發明治療方法，組合物和多肽等也可以用來，單獨地或與其他細胞活素，可溶性Mpl 受體，造血因子，間白素，生長因子或抗體等配合而用於治療具有其他徵候及血小板缺乏等特徵之病況。據預期者，Mpl 配體分子經證明可與一般造血性刺激劑，如IL-3或GM-CDF等組合而用以治療某些形式的血小板減少症。其他巨核細胞刺激因子，如，■eg-CSF ，幹細胞因子（SCF），白血症抑制因子（LIF），制瘤素M （OSM），或其他具有巨核細胞刺激活性的分子等

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

五、發明說明（51）

也可以與Mpl配體一起使用。可用於這種共同施藥的其他代表性細胞活素或造血因子包括IL-1α，IL-1β，IL-2，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，IL-11，群落刺激因子-1（CSF-1），CM-CSF，粒狀細胞群落刺激因子（G-CSF），EPO，干擾素-α（IFN-α），IFN-β，或IFN-γ等。另外，可以同時地或依次地施用有效量的可溶性哺乳動物Mpl受體，其似乎具有使到達成熟形式的巨核細胞斷片成血小板之效應。依此，施用Mpl配體（以增進成熟巨核細胞的數目），接著施用可溶性Mpl受體（將配體抑活化並使成熟巨核細胞產生血小板）預期可為特別有效的刺激血小板產生之手段。上述劑量可經調整以補償治療組合物中的這種附加成份。被治療病人的進展可用傳統方法來監測。

這些新穎多肽的其他用途在於開發用標準方法產生的抗體。例如，包括可與本發明Mpl配體反應的抗體及彼等抗體的反應性片段。彼等抗體可為多株，單株，重組，嵌合型，單鏈及／或雙特定性等者。彼等抗體片段可為對本發明Mpl配體具有反應性的任何片段，例如，Fab'Fab'，等。此外，本發明也提出雜交瘤，其係用Mpl配體或其片段作為抗原給所選哺乳動物，接著用已知技術將該動物的細胞（如，脾細胞）與某些種癌細胞融合而產生永生化的細胞系。本發明也包括產生這種細胞系所用的方法及對抗本發明人類Mpl配體多肽的全部或部份之抗體。

該抗體可具有治療用途，例如抑制Mpl配體與其受體的

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（52）

結合等。該抗體更可用於活體內（in vivo）和活體外（in vitro）診斷用途，例如，以標示形式偵檢體液中Mpl配體之存在。

本發明提出下面的實施例以更完整地闡釋本發明。另外，這些實施例也提出本發明的較佳實施例，但除非另外指示，否則，這些實施例並不意欲用以限制本發明的範圍。下面實施例述及的許多程序所用標準方法，或適當的取代程序，皆在廣被公認的分子生物學手冊中有所提及，例如，Sambrook et al., "Molecular Cloning"，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987)和in Ausubel et al.,（編輯）"Current Protocols in Molecular Biology", Greene associates/Wiley Interscience, New York (1990)等。

實施例1

再生不能性犬血漿

依下面文獻中所述，但以450雷得的全身照射施加於接受者以製備經肝磷脂處理的犬再生不能性血漿（"APK9"）或正常犬血漿（"NK9"）：

1. Mazur, E. and South, K. *Exp. Hematol.* **13**:1164-1172 (1985).

2. Arriaga, M., South, K., Cohen, J.L., and Mazur, E.M. *Blood* **69**: 486-492 (1987).

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

五、發明說明（53）

3. Mazur, E., Basilico, D., Newton, J.L., Cohen, J.L., Charland, C., Sohl, P.A., and Narendran, A. *Blood* 76: 1771-1782 (1990).

實施例2

人類巨核細胞分析

分析APK9和分段APK9刺激從CD34+ 前身細胞的人類巨核細胞之發展。經CD34- 選過的細胞係依所述得自周圍血液細胞（Hokom, M.H., Choi, E., Nichol, J.L., Hornkohl, A., Arakawa, T., and Hunt, P. Molecular Biology of Haematopoiesis 3:15-31, 1994）並接注在下面的培養基中：Iscove's改質Dulbecco's培養基（IMDM；GIBCO，Grand Island, NY），其中補充著1%殺胺醯胺Pen-Strep（Irvine Scientific, Santa Ana, CA）和10% 肝燐素處理過，血小板貧乏性人類AB血漿。另外也包含2-氫硫基乙醇（10^{-4} M），丙酮酸（110 微克／毫升），膽固醇（7.8 微克／毫升），腺苷，鳥嘌呤，胞嘧啶核苷，尿嘧啶核苷，胸腺嘧啶核苷，2-去氧胞嘧啶，2-去氧腺嘌呤，2-去氧鳥嘌呤（各10微克／毫升，Sigma）；人類重組胰島素（10微克／毫升），人類鐵傳遞蛋白（300 微克／毫升），大豆脂質（1%，Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN）；人類重組酸性纖維母細胞生長因子（2 奈克（ng）／毫克，Genzyme, Cambridge, MA）；人類重組上皮細胞生長因子（15奈克／毫升），血小板（衍生）生長因子（10奈克／毫升，

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

五、發明說明（ 54）

Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA）。將CD34- 選擇細胞置於2 x 10^5 毫升培養基，15微升最後體積，的Terasaki- 型微滴板（Vanguard, Inc., Neptune, NJ）。將細胞置於37℃，5% CO_2／空氣的溼氣箱內，直接用1%戊二醛固定到培養洞，並接注單株抗體調合物（抗-GPIb，抗-GPIIb，（Biodesign）和抗-GPIb（Dako, Carpinteria, CA）後一起溫育8 天。用鏈抗生物素蛋白-β-半乳糖苷酶偵檢系統（HistoMark，Kirkegaard and Perry）展開免疫反應。在逆相顯微鏡下以100x放大率計數以藍色鑑別出來的巨核細胞。其結果表成平均巨核細胞數／洞±平均值標準誤差(SEM)。於某些例子中，將數據表成"巨核細胞單位／毫升"，其中係將某樣品誘導的巨核細胞發育程度相對於該實驗的陽性APK9標準樣而歸一化。一單位係定義成可導致與1 微升APK9標準樣相同巨核細胞數目所需物質量。若其可被5-10微克／毫升MPL-X（克溶性Mpl 受體）阻斷時，其活性即被認可係來自MPL配體者。

APK9係已被證明在該系統中含有可刺激人類巨核細胞發育的因子。CD34選擇細胞與10% NK9培育8天後，顯示可忽略數目的藍色染色巨核細胞，而CD34- 選擇細胞與10% APK9溫育8 天後，顯示非常大數目的藍色染色巨核細胞。

圖2 顯示出將逐增濃度的Mpl-X 加到人類巨核細胞培養系統時可逐增地阻斷巨核細胞發育。於Mpl-X 濃度大於5微克／毫升時，即完全抑制。於該實驗中，係用5% APK9

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

五、發明說明(55)

刺激CD34- 選擇細胞。其結果證明與Mpl-X （假定的Mpl配體）交互作用的活性對於人類巨核細胞發育係必需者，且顯示APK9本身含有Mpl 配體。

另外在此也證明對於人類巨核細胞發育為必需的Mpl 配體活性存在於APK9中。將APK9（135 毫升）稀釋6-倍到IScove培養基中，施加到Mpl-X 親和管柱上。未結合物（流出物）經收集並濃縮到原體積後，才進行分析。將結合物洗提到10毫升的1M NaCl 中，取20% 集液經透析並濃縮4-倍後，進行分析。CD34- 選擇細胞單獨培育在該培養基之中時不發育成巨核細胞。與5% APK9 一起培育的細胞（加到管柱的相同集液）則發育成48±8 個巨核細胞／洞。在10% 未結合物中培育的細胞不會發育成巨核細胞。在10% 洗提集液中培育的細胞發展成 120±44個巨核細胞／洞。管柱施加物與洗提集液兩者的活性都會被5 微克／毫升Mpl-X 在該分析中實質完全地抑制。

實施例3

將老鼠或人類Mpl 受體轉染到老鼠細胞系內

A. 老鼠Mpl 受體

將全長度老鼠Mpl 受體cDNA分殖到含有衍生自Moloney氏老鼠肉瘤病毒LTR 的轉錄啟動區之表現載體中。取5 微克該構成物與1微克可選擇標記質體pWLNeo (Stratagene) 共一電孔洞培養到IL-3依賴性老鼠細胞系之中（32D，純系23；Greenberger et al., PNAS 80:2931-2936 (1983)）。將細胞培養五天後，從程序中回收，再置於含

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

五、發明說明(56)

有800 微克／毫升Geneticin (G418, Sigma) 和1 奈克／毫升老鼠IL-3的選擇培養基中溫育。接著將存活細胞分成2 x 10^5 細胞庫並培養到長出可供進一步分析的群落為止。取六份群落用多株兔子抗肽血清以FACS分析進行Mpl 受體表面表現檢驗。選出一份群落用上述相同抗肽血清進行FACS揀選。經由在10% APK9和Geneticin 中生長而選擇出母細胞系的單細胞純系。在APK9中選擇35天後，將細胞保持在1 奈克／毫升老鼠IL-3之中。用其中的一分殖系，1A6.1 ，於該研究體中。

B. 人類Mpl 受體

將全長度人類Mpl 受體序列（Vigon, I. et al., PNAS 89:5640-5644 (1992)) 分殖到含有Moloney 氏老鼠肉瘤病毒轉錄啟動區的表現載體內（與老鼠受體相同的載體）。取6 微克該構成物和6 微克的兼性營養逆轉錄酶病毒包裝構成物（Landau, N.R., Littman, D.R., J. Virology 66:5110-5113 (1992)) 用$CaPO_4$ 哺乳動物轉染配套藥劑（Stratagene) 轉染到3 x 10^6 293 細胞中。於2 天後及再度於4 天後對相同的細胞重轉染。於最後轉染後的當天，將該293 細胞與IL-3依賴性老鼠細胞系（32D，純系23；Greenberger et al., PNAS 80:2931-2936 (1983)) 共同培養。於24小時後，在BSA 梯度中分離出32D 細胞帶（Path-o-cyte; Miles Inc.）。將該細胞於1 奈克／毫升老鼠IL-3中擴大，然後在20% APK9中選擇生長。用多株兔子抗肽血清以FACS進行該細胞的受體細胞表

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(57)

面表現之揀選。所得細胞所隨後即用於分析中。

實施例4

1A6.1 Mpl 配體分析

將1A6.1 細胞洗除IL-3培養物並在Terasaki- 型微滴板中於補充10% 胎牛血清(FCS)，Geneticin(800微克／毫升)，和1% pen/strep (Gibco)的αMEM (Gibco) 中以1:1 系列試樣稀釋進行再平板培養(1000細胞／15微升總體積／洞)。於48小時後，用顯微術測定每洞的活細胞數。一活性單位的定義於分析中加入5-10微克／毫升Mpl-X即可完全阻斷時，即視為係來自Mpl 配體者。在APK9中的Mpl 配體活性平均為4400±539 單位／毫升再生不能性血漿。除非另外指出，否則Mpl 配體活性單位係在1A6.1 分析中定義者。

用人類Mpl 受體基因感染過的細胞進行的分析(實施例3B) 基本上係以與用1A6.1 細胞者相同的方式進行。

實施例5

小鼠，狗，豬和人類等來源的再生不能性血漿或血清中含有Mpl-配體之證明

Mpl 配體存在於小鼠，犬，豬和人類來源的再生不能性血漿或血清中(表2)。從預照射及12天的後照射(500雷得)後之BDF1小鼠採集血漿。以1A6.1 分析檢驗該血漿證實有2000單位／毫升的活性，其可被Mpl-X (10微克／毫升)實質完全地抑制。經照射小鼠的血漿也在人類巨核細胞分析中呈陽性，顯示出有1833單位／毫升之活性。從

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

五、發明說明（58）

預照射和10天後照射（450雷得）處理過的狗採取血漿。於1A6.1分析和人類巨核細胞分析中檢驗該血漿。兩分析中都偵檢出活性且會被Mpl-X（10微克／毫升）完全抑制。從預照射及10天後照射（650雷得）處理過的豬收集血漿。於1A6.1分析和人類巨核細胞分析中檢驗該血漿。於兩分析中，都顯示出相當於犬再生不能性血漿中所發現的Mpl配體活性（可被10微克／毫升的Mpl-X所抑制）。取得人類再生不能性血清。該物係從骨髓移植病人身上取得者。將取自6個病人的血清以1A6.1分析檢驗，顯示出903單位／毫升之活性，其中有88%係來自Mpl配體（可用10微克／毫升的Mpl-X予以抑制）。此外，也用取自14個再生不能性病人的血清以人類巨核細胞分析檢驗之。整體地，其顯示出實質的活性，914巨核細胞單位／毫升，其可被10微克／毫升的Mpl-X予以完全抑制。另外加入小鼠IL-3數據以顯示出1A6.1分析的特定性。雖然這種重組細胞活性可誘導該細胞系的生長，但其不被10微克／毫升的Mpl-X所阻斷。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（59）

物種	1A6.1細胞分析（單位/毫升）		人類巨核細胞分析（巨核細胞單位/毫升）	
	培養基	+ Mpl-X	培養基	+Mpl-X
正常小鼠	0+/-0	0+/-0	0+/-0	0+/-0
再生不能性小鼠	2000	0	1833	未實施
正常犬	0+/-0	0+/-0	0+/-0	0+/-0
再生不能性犬	4400+/-539	0+/-0	792+/-128	0+/-0
正常豬	0+/-0	0+/-0	0+/-0	0+/-1
再生不能性豬	/ 0+/-0	0 0 / 0+/-0	1 8 + - 8 / 0+/-0	0 / 1 / 0+/-0
再生不能性人	903+/-64	114+/-33	941+/-178	0+/-0
murIL3	6000+/-565	6000+/-565	未實施	未實施

實施例6

Mpl配體刺激1A6.1細胞生長及人類巨核細胞發育

Mpl配體（於外源凝集素與親和層析術等程序後增濃至少約100,000-倍，參看實施例7）可刺激1A6.1細胞系的生長和來自CD34- 選擇過的周圍血球之人類巨核細胞發展，其係劑量相關性方式者。圖2和3顯示出來自Mpl配體的可反應出活性，因在兩分析中，其活性皆可被Mpl-X所

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

五、發明說明（60）

完全阻斷之故。

此外，本案發明人也證明FACS純化過的周圍血液CD34⁺細胞在與Mpl配體一起培育（於此例中為100單位／毫升，9天）時，會發育成基因型地正常成熟巨核細胞。此即確定純化Mpl配體具有與粗APK9相同的對巨核細胞之效應。此外，本實驗使用的是經純化的CD34⁺細胞（100% CD34⁺），而非通常只含30-50% CD34⁺的經CD34-選擇之細胞。

實施例7

犬Mpl配體之純化

Ⅰ．概述

純化出對Mpl受體顯示出配體預期的活性之蛋白質（25 kd和31 kd）。從受照射犬的血漿以採用麥芽凝集素（WGA）親和層析術，Mpl受體親和層析術，陰離子交換層析術，膠濾層析術，和C4逆相層析術等的程序純化出蛋白質。參看圖4有關該純化程序的綜覽。該25 kd和31 kd Mpl配體係經高度純化到表觀均一性且經測定為含有本文所揭示的胺基酸序列者。

Ⅱ．方法

A．血漿的澄清化

將得自被照射狗的冷凍血漿（總共20升）（參看實施例1）在4℃解凍隔夜；較大瓶子的解凍係在室溫起始數小時後，才放在冷房內。以11,000 x g離心6小時脫除不溶物。用含有0.01%疊氮化鈉的磷酸鹽緩衝鹽水，pH 7.3（

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明(61)

PBS／疊氮鹽）稀釋該血漿並以1.2微米濾器過濾。該澄清化程序典型地導致起始物約2-倍的稀釋。

B. 麥芽凝集素親和層析術

所有操作都在4℃下進行。將經澄清化的血漿（分成兩批）加到已在PBS／疊氮鹽中平衡過的固定化麥芽凝集素管柱（1升，10 x 12公分，EY實驗室）。於加上樣品後，用PBS／疊氮鹽從管柱洗出未結合物，接著用0.5 M NaCl／20 mM Tris-HCl，pH 8洗提。然後，用0.35 M N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)，0.5 M NaCl，20 mM Tris-HCl，pH 8洗提出被WGA管柱結合住的Mpl配體活性。在預流過或洗出液份中都不能偵檢出Mpl配體活性。

C. Mpl-X受體親和層析術

所用的可溶性老鼠Mpl受體（Mpl-X）係對應於該Mpl受體的整個細胞外域減去位置483的Trp（參看，Vigon, et al., 8:2607-2615 (1993)）。為了使Mpl配體對Mpl-X受體親和管柱的結合最適化，將WGA洗提集液用薄膜超濾器（10,000分子量截止值，YM-10，Amicon）及依序稀釋調整到0.2 M的NaCl予以濃縮。將濃縮後的WGA集液以0.9毫升／分的流速施加到20毫升m-Mpl-X（老鼠Mpl可溶性受體）／CNBr活化Sepharose管柱上（2.6 x 4.2公分，1.5毫克m-Mpl-X／毫升樹脂）。用40毫升PBS／疊氮鹽以1.5毫升／分洗該管柱，接著用10 mM Tris-HCl，1 M NaCl，1 mM CHAPS，pH 8.0進行高鹽洗滌（405毫升）。然後用20 mM CAPS，1 M NaCl，5 mM

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

五、發明說明（62）

CHAPS，pH 10.5 洗提該管柱。收集適當的液份。於每一液份加入Tris以中和其pH。

Mpl-X 受體親和管柱的洗提曲線經SDS-PAGE 和280nm吸光度分析都顯示在1-4 液份有早期蛋白質尖峰，而主要的Mpl 配體活性係在第5 液份後洗提出者。

D. Mono-Q陰離子交換層析術

將幾隻Mpl-X 受體親和管柱的最高純度洗提份合併，濃縮並相對於20 mM Tris-HCl，5 mM CHAPS，pH 8.7透濾到58.5毫升的最後體積。以280 nm吸光度估測集液的蛋白質濃度為0.12毫克／毫升（約7 毫克總蛋白質）。將該集液以0.5 毫升／分施加到已平衡在20 mM Tris-HCl，5 mM CHAPS，pH 8.7之中的Mono Q HR 5/5 管柱（Pharmacia）。於27分鐘期間，用在相同緩衝液中達到0.36 M NaCl的線形梯度洗提該管柱。然後用到0.54 M Nal的6 分鐘梯度洗該管柱，且最後以0.9 M NaCl進行一步驟洗滌。以1毫升洗提液份進行收集。

Mono Q管柱的洗提分佈顯示於預流液和洗滌液份中未偵檢到Mpl 配體，而只偵檢到可忽略的蛋白質。大部份的Mpl 配體活性是在起始NaCl梯度階段中的洗提液份5-7 中洗提出。在洗提份8-10觀察到活性"肩"，接著在洗提份11-15 出現第二個主要尖峰。

於活性洗提份中以SDS-PAGE（非還原性）觀察到一明顯的25 kd 帶。該帶的強度直接對應於洗提份中的Mpl 配體活性。於洗提液份3 和4 中不含該帶（無活性）。於洗提

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

五、發明說明（63）

份5和6中有明顯活性（1A6.1活性峰）且在洗提份11-14中有類似的強染色帶（1A6.1活性峰）。於洗提份15和16的集液中有弱帶，其對應於洗提份16中的明顯較低活性。

E. 凝膠洗提實驗

用Mono Q洗提份5和6或Mono Q洗提份13和14的液份進行凝膠洗提實驗。為這些實驗，製備洗提份5和6（各6微升）或13和14（各7.5微升）的集液，與SDS-PAGE樣品緩衝液（非還原性）混合後，加到12% SDS凝膠上。於電泳完畢後，切出標的電泳道（1毫米）並用刮鬍刀將該切條切成小片。將該切片轉移到1.5毫升微離心管內，其內已先裝著0.5毫升PBS／5 mM CHAPS，再於4℃下溫和攪拌隔夜。於第二天，稍微旋轉彼等管後，取出液份，再將該樣品相對於補充BSA作為載體蛋白質的Iscove氏培養基進行透濾。經透濾後的樣品即用於分析中。

其結果顯示出有兩個Mpl配體活性尖峰。一尖峰對應於凝膠的25 kd區，而第二個Mpl配體活性尖峰則出現在31 kd區內。

F. Superdex 200層濾

將Mono Q陰離子交換管柱所得13-16洗提液份，及第二Mono Q分離所得兩個相同洗提液份等合併並用薄膜超濾器（Centricon-10，Amicon）予以濃縮。加入SDS到0.1%的最後濃度，並將該樣品注射到Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia)管柱上。用0.3毫升／分流速將該管柱平衡

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（64）

到50 mM Tris-HCl，0.1% SDS，pH 7.5之中，並在室溫下操作。收集1分鐘洗提液。其結果為樣品中的大部份蛋白質係在洗提份32-40中洗提出，而在洗提份42-46偵檢到Mpl配體活性。SDS-PAGE洗提份分析顯示在活性洗提份中有明顯的25 kd帶。

G. C4逆向HPLC

將Superdex 200洗提份43-46合併液或單獨的洗提份42用薄膜超濾器（Microcon-10，Amicon）予以濃縮。將濃縮集液分別施加到1 x 100毫米C4逆相微孔洞管柱（SynChropak RP-4）上。將該管柱平衡在0.04% TFA／水中（緩衝液A）；緩衝液B為0.035% TFA／80%乙腈。於注射樣品之後，於4分鐘期間實施到45% B的線形梯度，接著，於40分鐘期間施以到75% B的線形梯度。其流速為75微升／分。洗提份42的純化結果表於圖5中。在其洗提份21-23中觀察到明顯的Mpl配體活性尖峰。用這些洗提份在14%聚丙烯醯胺凝膠上，於非還原與還原兩種條件下分析。洗提份21含有單一31 kd帶；洗提份23含有一單一寬25 kd帶；而洗提份22同時含25 kd和31 kd兩區的帶。未看到其他明顯的帶。要提及者，早期凝膠洗提實驗已認為兩區都有Mpl配體活性。於非還原性凝膠的所有洗提份都觀察到小的高分子量帶，但在還原性凝膠中則未能看到。

H. 25 kd和31 kd Mpl配體的N-端序列分析

在含有活性的C4 RP-HPLC洗提份上進行N-端序列分析。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（65）

這些蛋白質測出的序列都已列於前文。除了對應於25 kd帶的主要序列（為所加樣品總量的至少90%），序列分析另偵檢到兩個少量序列（其係與上面G中所述小雜質帶相結合者）。與已知序列比對之後顯示出該兩少量序列的犬Ig重鏈和k鏈。必要時，可以施用另一純化步驟，例如，較佳者，另一膠濾步驟，使這些少量雜質的量進一步減低。

I. C4純化洗提份中Mpl配體活性之比較

圖6數據顯示C4 RP-HPLC層析步驟所得洗提份22和23中的活性係實質地相等的。洗提份22含有25 kd和31 kd兩帶的混合物，而洗提份23只含有25 kd帶。取各洗提份的液份予以稀釋1:45000。稀釋後的洗提份實質地同樣可刺激1A6.1細胞生長（洗提份22，5400細胞／洞；洗提份23，6000細胞／洞）。將稀釋後的洗提份與逐增濃度的Mpl-X一起溫育。該等洗提份對Mpl-X的抑制作用有同等的敏感性，兩者都含被7-1.4微克／毫升所完全阻斷。這種結果顯示每一洗提份中的活性蛋白質為具有同等生物活性的Mpl配體物種。

實施例8

Mpl配體相對於其他因子對巨核細胞發育之比較

有許多重組因子或有機化合物，例如大戟二萜醇肉豆蔻酸乙酸酯（PMA）等據報導會影響巨核細胞生長或發育。因此，乃研究這些因子對於CD34- 選擇周圍血球的影響。於培養物中依所示加入人類重組間白素3（IL-3，1-2奈克

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

五、發明說明 (66)

／毫升），幹細胞因子（SCF，50奈克／毫升），間白素6（IL-6，25奈克／毫升），促紅血球生成素（EPO，1單位／毫升），白血病抑制因子（LIF，10奈克／毫升），和粒狀細胞－巨噬細胞群落－刺激因子（GM-CSF，25奈克／毫升，Amgen, Inc.）；間白素11（IL-11，25奈克／毫升，R+D 系統，Minneapolis, MN），大戟二萜醇肉豆蔻酸乙酸酯（PMA，10^{-10} M，Sigma）等。Mpl 配體的用量為275 單位／毫升，APK9的用量為5%（相當於220 單位／毫升）。組合試驗的因子係以個別試驗時的相同濃度使用。於培養8 天後，將細胞直接固定在洞中並染色巨核細胞（n=6 洞每狀況）或計數總細胞數目（n=3 洞每狀況）。數據係表為平均值±SEM。

圖7 顯示APK9和Mpl 配體都可導致最大數目的巨核細胞／洞。IL-3也導致巨核細胞發展，尤其是與SCF 組合使用時。IL-6，IL-11，或EPO 等，於單獨時或與IL-3組合時，對巨核細胞數目都很少影響。PMA，LIF 和GM-CSF都很少影響。圖8 為來自相同實驗的數據，顯示出每洞所得總細胞數（"細胞率"（Cellularity））。APK9和Mpl 配體對細胞率影響很少，而IL-3和SCF 具有中等影響。SCF 與IL-3組合時具有最大影響。用圖7 和8 所示數據來計算每洞的巨核細胞百分比，如圖9 中所示者。顯然地，可導致每培養洞最大巨核細胞百分比的因子為Mpl 配體－APK9中的活性成份。這種結果顯示出Mpl 配體對巨核細胞的特定性。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (67)

實施例9

Mpl 配體的巨核細胞促進活性與人類IL-3無關

Mpl 配體在用為實施例2 所述培養基的補充物時可刺激人類巨核細胞的發育。雖然IL-3不是該培養基的成份，但其在該培養基所含正常人類血漿中仍以不能測得之低水平存在。不過，即使在其存在，IL-3亦不涉及Mpl 配體一誘導巨核細胞生成之中。此點示於圖10之中。2 奈克／毫升的IL-3在人類巨核細胞分析中可導致14,900巨核細胞單位／毫升之活性。此活性會被抗-IL-3 (3.3微克／毫升；Genzyme, Cambridge, MA) 抑制97%。8203巨核細胞單位／毫升的Mpl 配體不會被抗-IL-3 所抑制。

實施例10

豬Mpl 配體之分析

I. 概述

具有Mpl 配體活性的受照射豬血漿所得蛋白質經WGA 親和層析術，Mpl 受體親和層析術，離子交換層析術和C4逆相HPLC等予以鑑定。該活性也經由從SDS-聚丙烯醯胺凝膠的切條洗提出來進行鑑定。

層析術	註釋
WGA 親和管柱	施加 4.4 x 10^6 單位
	回收 3.4 x 10^6 單位
Mpl 受體管柱	施加 2.7 x 10^6 單位
	回收 2.4 x 10^6 單位
Mono Q離子交換	施加 2.4 x 10^6 單位

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（68）

pH 6.0	回收4.4 x 10^6 單位
C4逆相HPLC	於洗提份23-25 回收到活性
凝膠洗提實驗	明顯區別出兩活性，其一出現在約18 kd，另一在約28 kd。

實施例11

人類Mpl-配體，人類MGDF之選殖

下面概述出兩種作法：

I．第一種代表性選殖作法

A．人類MGDF探頭之產生

根據犬蛋白質的胺基端序列設計許多簡併性PCR 引物。用不同的引物配對從人類基因體DNA 擴大該MGDF基因。在用有義引物5' GCN CCN CCN GCN TGY GA 3' (SEQ ID NO:4)，其編碼犬蛋白質的前五個胺基酸 (SEQ ID NO:1) 及反義引物：5' GCA RTG YAA CAC RTG NGA RTC 3' (SEQ ID NO:5)，其編碼SEQ ID NO:1 的胺基酸16至21，進行40個擴大循環之後，將PCR 產物於2.0%瓊脂糖凝膠上於TBE 緩衝液中洗提。

從瓊脂糖凝膠切出63 bp 帶並用相同的引物組再擴大。將該PCR 產物選殖在PCR II載體中（Invitrogen, San Diego)。經由DNA 序列分析篩選出眾多純系。使用編碼類似於犬MGDF蛋白質的肽之質體DNA 作為起源以產生用以篩選cDNA庫的放射性探頭。該基因所編碼的胺基酸序列如下所示：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（69）

Ala-Pro-Pro-Ala-Cys-Asp-Leu-Arg-Val-Leu-Ser-Lys-Leu-Leu-Arg-Asp-Ser-His-Val-Leu-His (SEQ ID NO: 6)

用含有人類MGDF的瓊脂糖帶以熱PCR產生該探頭。典型的100微升PCR反應含有下列成份。

模板DNA	2-3 μl
5'引物(SEQ ID NO:4)	1 μl, 20 pmoles
3'引物(SEQ ID NO:5)	1 μl, 20 pmoles
10 X 緩衝液	10 μl
dATP (0.1 mM)	2 μl
dTTP (10 mM)	2 μl
dGTP (10 mM)	2 μl
dCTP (0.1 mM)	2 μl
dCTP, p^{32} (10 uC/ul)	5 μl
dATP, p^{32} (10 uC/ul)	5 μl
Taq DNA 聚合酶	0.5 μl, 2.5 單位
水	77 μl
總體積	100 μl

擴大反應條件如下所列：

起始加熱	94℃，2分鐘
冷卻配對	53℃，30秒
擴展	72℃，30秒
變性	94℃，30秒

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

五、發明說明（ 70）

在Perkin Elmer GeneAmp System 9600中進行40個擴大循環。

將產物通過一推進管柱（Stratagene, San Diego）。取1 微升的探頭置於閃爍計數器內計數。於雜交混合物中加入含有1 至3 百萬計數／毫升之探頭。

B. 胎肝庫之構成

人類胎肝聚A+ RNA係購自Clontech實驗室。用約4 微克的RNA 進行cDNA合成，其中係用接著到含有Xba I 部位的寡核苷酸之無規六體物，5' GAT CGC GTT CTA GAN NNN NNT 3', (SEQ ID NO:7) 進行引發。

使用Gibco-BRL 程序來產生雙股cDNA。將Eco R I-Bst X I 轉接子（Invitrogen, San Diego）連接到雙股cDNA，接著用限制酵素，Xba I ，消化。在S500 Sephacryl 管柱（Life Technologies, Inc.）上進行cDNA的尺寸選擇。將大於400 bp的cDNA連接到已用Eco RI和Xba I 消化過的哺乳動物表現載體v19.8 （Martin, F., Cell 63:203-211 (1990)）。將勝任的大腸桿菌DH10細胞轉化並將所得cDNA庫分派成各為100,000 cDNA的7 個庫。

C. 篩選入庫

從Clontech購得在入gt11中的人類胎腎庫，效價為650 百萬pfu ／毫升。用PCR 產生的探頭（參看上文）篩選約2 百萬個菌斑。於56℃下，在6 X SSC ，5 X Denhardt，

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

五、發明說明(71)

0.1% SDS，100 微克／毫升，單股鮭精DNA 之中進行雜交15小時。

進行多次篩選。從單一菌斑擴大DNA 並用編碼SEQ ID NO:6中胺基酸7 至13的內引物5' AGT TTA CTG AGG ACT CGG AGG 3' (SEQ ID NO:8)進行雜交以鑑定真正的正樣。

D. cDNA端的3'快速擴大(RACE)

人類胎腎和胎肝的聚腺苷酸化RNA 係購自Clontech。取1 微克的RNA 用寡5' TTC GGC CGG ATA GGC CTT TTT TTT TTT TTT 3' (DEQ ID NO:9)作為引物進行逆轉錄。

用Gibco-BRL cDNA合成配套藥劑(Life Technologies Inc., Cat. # 18267-013) 產生第一股cDNA。最後體積為30微升。添加500 mM EDTA 到10 mM 最後濃度以停止該反應並保持在-20 ℃。

對於初始PCR ，每反應係用0.5 微升的cDNA作為模板。用引體SEQ ID NO:9 和競爭物寡5' TTC GGC CGG ATA GGC CTT TTT TTT TTT TT-P 3' (SEQ ID NO:10)作為反義引物，而用編碼SEQ ID NO:6 所含胺基酸5 到11的寡核苷酸5' TGC GAC CTC CGA GTC CTC AG 3' (SEQ ID NO:11)作為有義引物。用前述程序：94℃起始培育2 分鐘後，在94℃，30秒；65℃，30秒；72℃，30秒；進行40個擴大循環。使用Perkin Elmer GeneAmp System 9600進行該擴大。

用有義引物，編碼SEQ ID NO:6 所含胺基酸8 到14的5' GAG TCC TCA GTA AAC TGC TTC GT 3' (SEQ ID

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 訂

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（72）

NO:12），而用SEQ ID NO:9 和SEQ ID NO:10作為反義引物進行重疊。進行40個擴大循環，其中冷卻配對係在65℃下實施。在0.8%瓊脂糖凝膠上進行該PCR 產物的分離，並在UV光下照相。可看到在0.8 至1.2 kb附近有分離帶。

然後將PCR 產物選殖到載體PCR II（Invitrogen）之中。挑選出個別群落並用Qiagen配套藥劑cat #12143和12145 分離質體。用載體引物完成雙股染料引發的序列分析。使用各種類型的GCG 軟體分析該序列。

E. 5'和3'引物伸展

為了分離出全長度MGDF基因的序列，乃用不同的胎肝庫組合作為模板進行3'和5'引物伸展。對於cDNA 5' 引物的擴大，係從每一組合各取約20奈克的cDNA作為模板。使用對MGDF具特定性，編碼SEQ ID NO:6 所含胺基酸12至17的反義引物5' GGA GTC ACG AAG CAG TTT AC 3' (SEQ ID NO:13) 與5'載體v19.8 有義引物5' CCT TTA CTT CTA GGC CTG 3' (SEQ ID NO:14) 。進行30個擴大循環，其中冷卻配對係在53℃實施。用編碼SEQ ID NO:6 所含胺基酸1 至6 的反義引物5' GAG GTC ACA AGC AGG AGG A 3' (SEQ ID NO:15) 和載體引物SEQ ID NO:14進行30個重疊循環。

對於MGDF cDNAs 3' 端的引物伸展，係使用反義載體引物5' GGC ATA GTC CGG GAC GTC 3' (SEQ ID NO:16) 與對MGDF具特定性，編碼SEQ ID NO:6 所含胺基酸1 至6 的引物5' TCC TCC TGC TTG TGA CCT C 3' (SEQ ID NO:17

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

五、發明說明（73）

）。進行30個擴大循環，其中冷卻配對係在58℃實施。

用MGDF引物SEQ ID NO:12和載體引物SEQ ID NO:16進行30個循環的重疊擴大。特定性帶出現於組合編號1，7和8中，將其選殖於PCR II載體內。從單一群落純化所得質體DNA再經純化並分析出序列。

F. 全長度人類MGDF純系之分離

有許多起始純系缺乏MGDF胺基端的一部份，係因使用部份的MGDF序列進行引發和重疊之故。用依上述5'引物伸展實驗得到的序列－引物5' CCA GGA AGG ATT CAG GGG A 3' (SEQ ID NO:18) 作為有義引物。用載體引物SEQ ID NO:16作為反義引物。進行35個循環的擴大，其中冷卻配對係在58℃下進行。接著，使用對MGDF具特定性，含有Sal I部位的引物5' CAA CAA GTC GAC CGC CAG CCA GAC ACC CCG 3' (SEQ ID NO:19) 與載體引物（SEQ ID NO:15）進行35個循環的重疊。將所得PCR產物選殖於PCR II載體中並定其序列。

II. 第二個代表性選殖作用

A. 犬MGDF N-端cDNA之選殖

根據前面節段中所述犬MGDF N-端胺基酸序列設計簡併性寡核苷酸引物並用於聚合酶鏈型反應(PCRs)中作為引物以擴大編碼MGDF的cDNA序列。用犬腎樣品以Chomzynski和Sacchi的異硫氰酸胍法（Biochem. 162:156-159 (1987)）製備總RNA。用隨機引物－轉接子5' GGC CGG ATA GGC CAC TCN NNN NNT 3' (SEQ ID NO:20) 以MoMULV逆轉

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

五、發明說明（74）

錄酶製備第一股cDNA並作為模版用於後續PCRs中。

PCR 係在0.5 微升，約50奈克的cDNA上進行，其中使用編碼SEQ ID NO:1 所含胺基酸1-6 的有義股引物－引物A 5' GCN CCN CCN GCN TGY GA 3' (SEQ ID NO:4)，及引物B 5' GCA RTG NAG NAC RTG NGA RTC 3' (SEQ ID NO:5) 或引物C 5' GCA RTG YAA NAC RTG NGA RTC 3' (SEQ ID NO:21)，其為編碼SEQ ID NO:1 所含胺基酸16-21 的反義股引物，其在5'端有加上三個額外的核甘酸以增加冷卻配對安定性。用Taq 聚合酶的PCR 係進行35至45個循環，直到在瓊脂糖凝膠電泳分析上有明顯產物帶為止。對於前面兩個PCR 循環，其冷卻配對步驟係在37℃下進行2 分鐘；對於其餘的循環，係在50℃下冷卻配對1 分鐘。於每次反應中都觀察到多重產物帶。用巴斯德氏吸管尖端收集包含具有大略預期尺寸（66 bp)的帶之凝膠部份並用相同的引物配對再擴大。根據製造商的說明將DNA 產物選殖到載體PCR II（Invitrogen）之內。定出三純系序列並發現其係在一讀碼內，編碼預期的犬MGDF cDNA，殘基1-21。於這種方式得到獨特的犬MGDF cDNA 序列，其跨越密碼子6 的第三核甘酸到密碼子15的第三個核甘酸。用這些純系之一作為模板以製備經標示的犬MGDF cDNA 探頭。

B. 人類胎肝cDNA庫之構成

用人胎肝（International Institute for the Advancement of Medicine, Exton, PA) 經由將組織溶裂於5.5 M 硫氰酸胍中並以CsTFA（Pharmacia) 離心純化而

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

五、發明說明（75）

分離出RNA。用寡(dT)25 dynabeads選擇出聚腺苷酸化RNA（Dynal，根據製造商的說明）。用該RNA以供cDNA合成用的Superscript質體系統（Life Technologies, Inc.）製備雙股cDNA，但不同處在於使用不同的聯結子轉接子：5' TTG GTG TGC ACT TGT G 3' (SEQ ID NO:22)和5' CAC AAG TGC ACA CCA ACC CC 3' (SEQ ID NO:23)。於尺寸選擇之後，將該cDNA取向地嵌到哺乳動物表現載體pBCB的Bst XI和Not I部位（pBCB係衍生自質體Rc/CMV，Invitrogen，其含有puc19主鏈，CMV啟動區和BGH聚腺苷酸化部位）。將連接後的DNA電嵌入到電勝任性細菌株10B（Life Technologies, Inc.）之中。

C. 人胎肝cDNA篩選MGDF

將人胎肝庫的濾器複製體於64℃下與放射標示犬MGDF N-端cDNA PCR產物雜交18小時（5 X SSPE，2 X Denhardt's，0.05% 焦磷酸鈉，0.5% SDS，100微克／毫升酵母tRNA溶解產物和100微克／毫升的變性鮭精DNA）。將濾器置於64℃下，5 X SSPE，0.5% SDS之中洗滌並靜置隔夜。分離出雜交到該探頭的兩種不同純系並分析之。

D. 人類MGDF cDNA純系之表現

將從MGDF cDNA純系所純化出的DNA轉染到293 EBNA細胞（Invitrogen）內。用1.5微克的DNA與7.5微升的Lipofectamine（Life Technologies, Inc.）在100微升無血清DMEM中混合。在室溫下溫育20分鐘後，將該DNA-Lipofectamine混合物加到400微升DMEM，1%血清（

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（76）

Fetal Clone II）中達5 x 10^5 細胞／洞（24洞正方形Greiner 培養板）並在37℃培育6 小時。將500 微升的DMEM，20% 血清（Fetal Clone II）加到細胞上。16小時之後，吸取出培養基並加入500 微升的DMEM，1%血清（Fetal Clone II）。72小時後，收集調理過的培養基並離心通過0.22微米旋轉蒸發。分析該調理培養基所含MGDF生物活性。

Ⅲ．人類MGDF純系的描述和活性

根據上述選殖程序，得到圖11（MGDF-1和MGDF-2；SEQ ID NO:24，25；和26，27）與圖12（MGDF-3；SEQ ID NO:28，29）所示的人類cDNA純系。圖中所示這些序列各含一胺基酸1-21的推定信號序列，所以，各情況中，成熟蛋白質係從胺基酸22開始的。

用上面實施例4A所述細胞基分析以MGDF 1-3進行活性分析之結果列於下面的表3 和4 中。於表3 中，用各構成物轉染過的293 EBNA細胞，在2 天培養後收集其調理培養基，並在1A6.1 細胞（32D/mur-MPL$^+$）+/- 10微克／毫升mur-MPL-X 之上進行試驗。於表4 中，用各構成物轉染過的293 EBNA細胞，在4 天培養後，收集其調理培養基並在32D/mur-MPL$^+$細胞（實施例3A）和32D/hu-MPL$^+$ 細胞（實施例3B）之上試驗，可以看出，人類MGDF-1和MGDF-2對於表現老鼠和人類兩種形式的Mpl 之細胞系都有活性，而MGDF-3則無。表現人類MPl 受體的細胞系對於人類MGDF-1和MGDF-2的反應性大於表現老鼠Mpl 受體的細胞系

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

五、發明說明（77）

之反應性。

表 3

純系	U/ml (- mur-MPL-X)	U/ml (+ mur-MPLX)
培養基	0	0
PBCO（對照質體）	0	0
MGDF-1	12,800	800
MGDF-1（重複）	12,800	566
MGDF-2	4525	400
MGDF-2（重複）	12800	1131
MGDF-3	0	0
MGDF-3（重複）	0	0
APK9 對照	4400+/-400	0

表 4

純系	U/ml 32D/mur-MPL+	U/ml 32D/hu-MPL+
MGDF-1	1600	25,600
MGDF-2	6400	50,000
MGDF-2（重複）	6400	50,000-100,000

下面的表5顯示出人類MGDF-1和MGDF-2對32D/hu-MPL+細胞（實施例3B）的活性會被可溶性人類Mpl受體（

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

五、發明說明(78)

hu-MPL-X) 所實質完全地抑制。Hu-MPL-X係存在於從產生該蛋白質的CHO 細胞收集到的調理培養基內。該CHO hu-MPL-X調理培養基係經濃縮120-倍後，再加到培養物內，濃度為6.6%。從對照組CHO 培養物收集到的調理培養基對分析沒有影響。該分析係依實施例4B所示進行，不同處在於係在3 天後才評估存活細胞。

表 5

純系	U／毫升 (-Hu-MPL-X)	U／毫升 (+Hu-MPL-X)
MGDF-1	530	0
MGDF-2	270	0

人類巨核細胞分析

MGDF-1和MGDF-2都可誘導周圍血液CD34- 選擇細胞形成巨核細胞，但MGDF-3則否。表6 中所述實驗基本上是依實施例2 中所述者進行，不同處在於該周圍血球係經CD34-選擇過但未洗淨者且該培養物係在7 天後收取者。從每種293 EBNA MGDF 構成物所得調理培養基係以20% 最後體積+/- 30微克／毫升mur-MPL-X 之條件使用。APK9對照樣係以6%最後體積使用。

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

五、發明說明（79）

表 6

純系	巨核細胞／洞 (-mur-MPL-X)	巨核細胞／洞 (+mur-MPL-X)
載體對照樣	0	0
APK9對照樣	100 +/- 3	0
MGDF-1	142 +/- 48	17 +/- 2
MGDF-2	100 +/- 3	6 +/- 2
MGDF-2 重複	86 +/- 10	0
MGDF-3	2 +/- 2	0

實施例12

下面的實施例說明12種不同的聚乙二醇化MGDF分子，PEG9-PEG12和PEG14-PEG21，之合成。於各例中，被聚乙二醇化的MGDF分子為大腸桿菌衍生的MGDF-11（從信號肽開始編號時為胺基酸22-184；從成熟蛋白質開始編號時為胺基酸1-163）。下面的表7-10摘要出有關全部這些聚乙二醇化物種的細節。

12.1 用活化MePEG衍生物醯化MGDF而製備多-MePEG-MGDF接合物

多-MePEG(20kDa)-MGDF接合物(PEG 11)之製備

將冷卻過（4 ℃）的MGDF（2.5 毫克／毫升）／0.1 M BICINE緩衝液，pH 8之溶液加到10- 倍莫耳超量的固體MePEG 丁二醯亞胺基丙酸酯（MW 20 kDa）（Shearwater Polymers, Inc.）之中。溫和攪拌以溶解該聚合物並在室溫下繼續進行反應。

於反應過程中的蛋白質改質程度係用粒度排斥(SEC)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（80）

HPLC予以監測，其係使用Superdex 200 HR 10/30 管柱（Pharmacia Biotech），以0.1 M 磷酸鈉緩衝液pH 6.9，流速0.7 毫升／分進行的。

在30分鐘時點進行反應混合物的SEC HPLC分析時顯示反應混合物中未留下自由蛋白質。於該時點，加入無菌水使反應混合物中的蛋白質濃度減低到1 毫克／毫升並用數滴0.5 M 乙酸將混合物的pH值調整到4 。

然後用SP Sepharose HP (Pharmacia Biotech) 離子交換樹脂以離子交換層析術從過剩的MePEG 和其他反應副產物中分離出MePEG-MGDF接合物。

將反應混合物加到（2.5 毫克／毫升樹脂）管柱上，用3 個管柱體積的起始緩衝液A（20 mM磷酸鈉，pH 7.2，15% 甘油）洗提出未反應的MePEG 。之後，用10個管柱體積，0%至30% 終端緩衝液B（1 M NaCl／緩衝液A）的線形梯度洗提出MePEG-MGDF接合物。於280 nm監測洗提液。將含有多-MePEG-MGDF 接合物的洗提液合併，濃縮並無濾過濾。

將該純化過的多-MePEG-MGDF 接合物用TSK-GEL G4000SWXL 和G2000SWXL 兩串接在一起的膠濾管柱進行SEC HPLC分析。以280 nm的UV吸光度偵檢蛋白質。用BIO-RAD 膠濾標準品作為球形蛋白質分子量標誌物。

從圖17A 可以看出，SEC HPLC顯露出製備物中有兩個主要成份（約呈2 比1 比例），其洗提位置分別對應於370.9 kDa 和155.0 kDa 球形蛋白質。亦參看下面的表8

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

五、發明說明（81）

。

用MW=6-50 kDa 的MePEGs之丁二醯亞胺基酯進行MGDF醯化製備成的接合物PEG 9 ，PEG 10和PEG 12也是以類似方式進行。表7 摘列出這些製備所用的主要反應參數。

表8 列出這些接合物的SEC HPLC分析結果。

12.2 用MePEG 醛將MGDF還原性烷基化製備多-MePEG-MGDF接合物

多-MePEG(20kDa)-MGDF接合物（PEG 20）之製備

於經冷卻（4 ℃），攪拌中的MGDF（2 毫升，2.5 毫克／毫升）／100 mM磷酸鈉，pH 5／20 mM $NaCNBH_3$ 溶液中加入10- 倍莫耳過量的一甲氧基－聚乙二醇醛（MePEG）（平均分子量20 kDa）並將反應混合物置於相同溫度下繼續攪拌。

於反應過程中的蛋白質改質程度係用SEC HPLC監測者，其中使用Superdex 200 HR 10/30 管柱（Pharmacia Biotech），以0.1 M 磷酸鈉緩衝液pH 6.9，0.7 毫升／分流速進行洗提。

於16小時後，SEC HPLC分析顯示有起始量90% 以上的蛋白質被改質。此時，用無菌水稀釋反應混合物使反應混合物中的蛋白質濃度成為1 毫克／毫升並將其pH值調整到4（0.5 M 乙酸）。

用SP Sepharose HP (Pharmacia Biotech) 離子交換樹脂以離子交換層析術從剩餘的MePEG 和其他反應副產物中分離出MePEG-MGDF接合物。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（82）

將反應混合物施加到管柱上（2.5 毫克／毫升樹脂）並用3 個管柱體積的起始緩衝液A（20 mM磷酸鈉，pH 7.2，15% 甘油）洗提出未反應MePEG 。之後，用10個管柱體積，0%至30% 終端緩衝液B（1 M NaCl／緩衝液A）的線形梯度洗提出MePEG-MGDF接合物。於280 nm監測洗提液。將含有多-MePEG-MGDF 接合物的洗提液合併，濃縮及無菌過濾。

用串接在一起的TSK-GEL G4000SWXL 和G2000SWXL 膠濾管柱對經純化的多-MePEG-MGDF 接合物進行SEC HPLC分析。以280 nm UV 吸光度偵檢蛋白質。用BIO-RAD 膠濾標準品作為球形蛋白質分子量標誌物。

從圖17B 可以看出，SEC HPLC揭露出該製備物中有兩種主要成份（分別佔全量的52%和47%），其洗提位置分別對應於359.4 kDa 和159.3 kDa 球形蛋白質。亦參看表8 。

以類似方式，用MW=6-25 kDa 的MePEG 醛進行MGDF的還原性烷基化而製備得接合物PEG 18，PEG 19和PEG 21。表7 摘列出這些製備所用的主要反應參數。

表8 列出這些接合物的SEC HPLC分析結果。

12.3 接著部位在N-端α- 胺基酸的一甲氧基－聚乙二醇-MGDF 接合物之製備

一-MePEG(20kDa)-MGDF接合物(PEG 16) 之製備

於經冷卻（4 ℃），攪拌中的MGDF（2 毫升，2.5 毫克／毫升）／100 mM磷酸鈉，pH 5／20 mM $NaCNBH_3$ 溶液中加入5-倍莫耳超量的一甲氧基－聚乙醇醛（MePEG ）（平

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（83）

均分子量20 kDa）並於相同溫度下繼續攪拌反應混合物。

於反應過程中的蛋白質改質程度係用SEC HPLC監測者，其中使用Superdex 200 HR 10/30 管柱（Pharmacia Biotech），以0.1 M 磷酸鈉緩衝液pH 6.9，0.7 毫升／分流速進行洗提。

於16小時後，SEC HPLC分析顯示有起始量90% 以上的蛋白質被改質。此時，用無菌水稀釋反應混合物使反應混合物中的蛋白質濃度減低到1 毫克／毫升並將反應混合物的pH值調整到4 （0.5 M 乙酸）。

用SP Sepharose HP (Pharmacia Biotech) 離子交換樹脂以離子交換層析術從剩餘的MePEG 和其他反應副產物中分離出MePEG-MGDF接合物。

將反應混合物施加到管柱上（2.5 毫克／毫升樹脂）並用3 個管柱體積的起始緩衝液A（20 mM磷酸鈉，pH 7.2，15% 甘油）洗提出未反應的MePEG 。之後，用20個管柱體積，0%至25% 的終端緩衝液B（1 M NaCl／緩衝液A）線形梯度洗提出MePEG-MGDF接合物。於280 nm監測洗提液。將含有多-MePEG-MGDF 接合物的洗提液合併，濃縮及無菌過濾。

用4-20% 預澆鑄梯度凝膠(NOVEX) 以十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳法測定一-MePEG-MGDF 接合物之均一性。顯示出一個對應於46.9 kDa蛋白質位置的主要帶。

用串接在一起的TSK-GEL G4000SWXL 和G2000SWXL 膠濾

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

五、發明說明（ 84）

管柱對經純化的多-MePEG-MGDF 接合物進行SEC HPLC分析。以280 nm UV 吸光度偵檢蛋白質。用BIO-RAD 膠濾標準品作為球形蛋白質分子量標誌物。

從圖17C 可以看出，SEC HPLC揭露出該製備物中有一個主要成份，其洗提位置對應於181.1 kDa 球形蛋白質。亦參看表9 。

以類似方式，用MW=6-25 kDa 的MePEG 醛進行MGDF的還原性烷基化而製備得一-MePEG-MGDF 接合物PEG 14，PEG 15和PEG 17。表7 摘列出這些製備所用主要反應參數。

表9 列出這些接合物的SEC HPLC分析結果。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（85）

表 7

MGDF改質反應參數摘要

編碼	反應性 MePEG		反應條件			
	類別	MW	MGDF conc. mg/ml	pH	溫度，℃	時間，小時	莫耳比 MePEG/MGDF
PEG 9	NHS酯	6kDa	2.5	8	r.t.	0.5	15
PEG 10	NHS酯	6kDa	2.5	8	r.t.	0.5	10
PEG 11	NHS酯	20kDa	2.5	8	r.t.	0.5	10
PEG 12	NHS酯	50kDa	2.5	8	r.t.	0.5	5
PEG 14	醛	6kDa	2.5	5	4℃	16	5
PEG 15	醛	12kDa	2.5	5	4℃	16	5
PEG 16	醛	20kDa	2.5	5	4℃	16	5
PEG 17	醛	25kDa	2.5	5	4℃	16	10
PEG 18	醛	6kDa	5	5	4℃	16	10
PEG 19	醛	12kDa	5	5	4℃	16	10
PEG 20	醛	20kDa	5	5	4℃	16	10
PEG 21	醛	25kDa	5	5	4℃	16	10

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (86)

表 8

SEC HPLC鑑定多-MePEG-MGDF特性摘要

編碼	反應性	MePEG	表觀MW by SEC, kDa	成份量, %
PEG 9	NHS 酯	6kDa	87.9	75
			52.7	25(shoulder)
PEG 10	NHS 酯	6kDa	69.2	14(shoulder)
			42.9	86
PEG 11	NHS 酯	20kDa	370.9	68
			155.0	32
PEG 12	NHS 酯	50kDa	865.6	53
			368.0	47
PEG 18	醛	6kDa	84.6	60
			41.5	40
PEG 19	醛	12kDa	218.4	59
			106.7	41
PEG 20	醛	20kDa	359.4	52
			159.3	47
PEG 21	醛	25kDa	450.5	54
			218.4	46

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 87）

表 9

一-MePEG-MGDF接合物的表觀分子量

編碼	反應性	MePEG	表觀MW by SEC, kDa	表觀MW by SDS PAGE, kDa
	類別	MW		
PEG 14	醛	6 kDa	44.5	27.7
PEG 15	醛	12kDa	104.7	38.3
PEG 16	醛	20kDa	181.1	46.9
PEG 17	醛	25kDa	226.4	55.5

12.4 用甲氧基聚（乙二醇）醛將MGDF還原性烷基化而製備二MePEG(12 kDa)-MGDF接合物

下述程序導致本文稱之為PEG 22的純化分子。

將5-倍過量的甲氧基聚乙二醇醛（MePEG ；亦即，$OHC-(CH_2)_2O-(CH_2-CH_2O)_n-CH_3$ ；式中n=重複數使其分子量約為12 kDa）（Shearwater Polymers ）加到保持在5 ℃下的2.5 毫克／毫升MGDF溶液（大腸桿菌衍生物，1-163）／100 mM 乙酸鈉，pH 5.0之中。於混合10分鐘後，加入足量的氰硼氫化鈉（Aldrich ）使其在反應混合物內達到20 mM 濃度。

將該混合物置於約5 ℃下攪拌16小時。於該時間結束時，加入足量的純化水，USP ，使MGDF濃度成為1 毫克／毫

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（88）

升。將其濾過0.2 微米真空濾器。以這種方式製得90毫克的反應產物。於該反應產物混合物中加入少量的1.0 M-鹼價磷酸鹽和1N氫氧化鈉等溶液使其達到10 mM 磷酸鹽，pH 6.8 溶液。

將該接合物在陽離子交換管柱上純化。製備具有7.5 公分床高的40毫升SP-Sepharose高性能管柱。用平衡緩衝液（10 mM 磷酸鹽，pH 6.9，含15% 甘油）平衡該管柱。以0.15管柱體積（CV）／分鐘的速率裝填管柱到2.2 毫克／毫升樹脂。接著用平衡緩衝液洗到基線。用10個管柱體積的緩衝液A（20 mM磷酸鹽，pH 7.2，含15% 甘油）到緩衝液B （緩衝液A 加0.3 M NaCl）線形梯度洗提該管柱。流速都保持在前後皆為0.15 CV ／分。於280 nm監測洗提液。

以SDS-PAGE凝膠分析洗提份，將含DiPEG 接合物的洗提份合併再濾過0.2 微米單元。

實施例13

聚乙二醇化MGDF分子的生物活性

A. PEG-9－PEG-12和PEG-14－PEG-21

測量用重組人類MGDF處理過的小鼠之血小板計數，其結果列於圖18中。將上圖說明所示濃度的未聚乙二醇化CHO一衍生22-353（空心菱形），未聚乙二醇化的大腸桿菌22-184（空心圓）和一一聚乙二醇化的大腸桿菌22-184（實心圓）等經皮下注射到正常Balb/c小鼠內，每天一次，注射5 天。本實驗所用的聚乙二醇化MGDF為PEG 16（亦即

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（89 ）

，20 kd 的一－聚乙二醇化MGDF 22-184（圖1），係產生自大腸桿菌者）。於最後一次注射的24小時後，從尾部靜脈的小側切口採集試驗血液。用Sysmex電子血球分析儀（Baxter Diagnostics, Inc. Irvine, CA ）進行血球分析。數據係表成4 隻動物的測定平均值+/- 平均值的標準偏差。其他血球參數，例如，總白血球計數或紅血球計數等不受這種處理所影響。

其他形式的重組人類MGDF亦如上述進行檢驗。下面的表10列出用50微克／公斤／天或10微克／公斤／天的所示形式之γ-HuMGDF 處理過的小鼠之血小板計數。數據4 隻動物的平均值，其標準誤差以斜體表示。

表 10

	50微克／公斤／天		10微克／公斤／天	
形式	平均值(N=4)	*sem*	平均值(N=4)	*sem*
CHO 22-353	4343	*309*	2571	*80*
E. coli 22-184	2021	*29*	1439	*18*
PEG 9	2728	*56*	2369	*34*
PEG 10	2431	*291*	1556	*126*
PEG 11	3778	*59*	1861	*73*
PEG 12	3885	*156*	1740	*88*
PEG 14	3567	*80*	2020	*63*
PEG 15	4402	*57*	2834	*99*
PEG 16	4511	*239*	3215	*11*
PEG 17	4140	*188*	3113	*261*
PEG 18	4586	*59*	2931	*129*
PEG 19	3980	*330*	4189	*80*
PEG 20	3942	*285*	3054	*339*
PEG 21	4195	*145*	4002	*91*
基線	939	*25*		

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

五、發明說明（90）

表10註解

於下面所列中，被聚乙二醇化的MGDF分子為大腸桿菌衍生的MGDF-11（從信號肽開始編碼時的胺基酸22-184，或為從成熟蛋白質開始編號的胺基酸1-163），如前面實施例12中所述者。

名稱	聚乙二醇化	PEG平均分子量	合成用的反應性PEG分子
PEG 9	多聚乙二醇化	6 kDa	MePEG的NHS酯
PEG 10	多聚乙二醇化	6 kDa	MePEG的NHS酯
PEG 11	多聚乙二醇化	20kDa	MePEG的NHS酯
PEG 12	多聚乙二醇化	50kDa	MePEG的NHS酯
PEG 14	一-聚乙二醇化	6 kDa	MePEG醛
PEG 15	一-聚乙二醇化	12kDa	MePEG醛
PEG 16	一-聚乙二醇化	20kDa	MePEG醛
PEG 17	一-聚乙二醇化	25kDa	MePEG醛
PEG 18	多-聚乙二醇化	6 kDa	MePEG醛
PEG 19	多-聚乙二醇化	12kDa	MePEG醛
PEG 20	多-聚乙二醇化	20kDa	MePEG醛
PEG 21	多-聚乙二醇化	25kDa	MePEG醛

基線計數為沒有施用任何物質的正常動物所得值。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（91）

顯然地，重組人類MGDF的聚乙二醇化對於該分子增加接受動物的血小板計數之能力沒有不良影響，且事實上可能使大腸桿菌產物22-184的活性增高到與CHO-衍生22-353分子的活性同大或較大。

B. PEG-22

圖24列出PEG-22所得結果。值得注意者，PEG-22所得血小板計數的正常化對全長度CHO 衍生MGDF，PEG-16或PEG-17等都較早數天即發生。

實施例14

重組人類MGDF［1-163］在大腸桿菌中的表現

要在大腸桿菌內表現γ-HuMGDF 時，要將編碼成熟蛋白質前163 個胺基酸的序列用最佳的大腸桿菌密碼子予以化學合成。此外，在基因的5'端加入編碼胺基酸－甲硫胺酸和離胺基－的DNA 序列。如此，該序列所編碼的γ-HuMGDF 蛋白質長度為從Met-Lys 開始的165 個胺基酸。

γ-HuMGDF (1-163) 基因的合成分幾個步驟完成。第一，用最佳的大腸桿菌密碼子化學合成表出基因接合片段的互補寡核苷酸（長度60-70 bp）。於該合成期間，在成熟基因的5'端加上甲硫胺酸和離胺酸兩胺基酸的密碼子而在基因的3'端放置一停止密碼子。此外，分別在基因的極5'和3'端加上供限制酵素XbaI 和HindIII用的切斷部位，且在起始甲硫胺酸上游適當距離處加上一合成核糖體結合部位。第二，將各基因片段的互補寡核苷酸予以冷卻配對。第三，用聚合酶鏈型反應擴大這些個別合成基因片段。

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

五、發明說明（92）

第四，然後將經擴大的片段分殖到適當載體內。第五，確定分殖片段的序列。第六，將個別片段連接在一起並再分殖到適當載體內，重新構成全長度γ-HuMGDF (1-163) 基因。最後，確認重構成基因的序列。

在5'和3'兩端分別側接Xba I 和Hind III限制部位的合成γ-HuMGDF 基因片段含有核糖體結合部位，ATG 起始密碼子，編碼成熟Met Lys γ-HuMGDF 蛋白質的序列，及停止密碼子。

將上述片段選殖到乳糖誘導性表現載體pAMG11的Xba I 和Hind III兩部位。該pAMG11載體為具有pR100-衍生複製源的低複本數質體。表現質體pAMG11可以從質體pCFM1656（ATCC # 69576，1994年2 月24日登錄）經由PCR 重疊寡突變形成製造一系列部位導向鹼基變化而衍生成。從緊接到質體複製啟動區PcopB 的5'之BgIII 部位（質體bp # 180）開始且向質體複製基因進展，其鹼對變動如下：

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

五、發明說明（93）

pAMG11 bp #	pCFM1656中的bp	改變成pAMG11中的bp
# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/C
# 509	G/C	A/T
# 617	- -	嵌入兩個 G/C bp
# 679	G/C	T/A
# 980	T/A	C/G
# 994	G/C	A/T
# 1004	A/T	C/G
# 1007	C/G	T/A
# 1028	A/T	T/A
# 1047	C/G	T/A
# 1178	G/C	T/A
# 1466	G/C	T/A
# 2028	G/C	bp 刪除
# 2187	C/G	T/A
# 2480	A/T	T/A
# 2499-2502	AGTG TCAC	GTCA CAGT
# 2642	TCCGAGC AGGCTCG	bp 刪除
# 3435	G/C	A/T
# 3446	G/C	A/T
# 3643	A/T	T/A
# 4489-4512	- -	嵌入 bps GAGCTCACTAGTGTCGACCTGCAG CTCGAGTGATCACAGCTGGACGTC

(SEQ ID NOS: 30 和 31)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 94）

且將獨特的AatII 和ClaI兩限制部位之間的DNA 序列用下示寡核苷酸予以取代：

```
   AatII (#4358)
5'      CTCATAATTTTTAAAAAATTCATTTGACAAATGCTAAAATTCTT-
3' TGCAGAGTATTAAAAATTTTTTAAGTAAACTGTTTACGATTTTAAGAA-

  -GATTAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAATTTAT   3'
  -CTAATTATAAGAGTTAACACTCGCGAGTGTTAAATAGC 5'
                                    ClaI (#4438)
```

(SEQ ID NOS: 32 和 33)

選殖到pAMG11內的γ-HuMGDF 之表現係由具有下示序列的合成乳糖誘導性啟動區，如，Ps4 ，所驅動者：

```
5'  GACGTCTCATAATTTTTAAAAAATTCATTTGACAAATGCTAAA-
      -ATTCTTGATTAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAATTTATCGAT  3'.
```

(SEQ ID NO: 34)

該Ps4 啟動區會被大腸桿菌lacI基因的產物，乳糖阻遏物（LacI）所阻遏。

接著將pAMG11-γ-HuMGDF質體轉形到含有lacI^q 等位基因的大腸桿菌K-12品系中。lacI^q 等位基因為lacI啟動區內的一突變，其可增加LacI的表現，且導致Ps4 啟動區的蛋白質表現之更嚴緊控制。所以，在該品系中，於沒有乳糖之情況中，γ-HuMGDF 的表現會被LacI所阻遏。於添加

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（95）

乳糖後，LacI蛋白質對Ps4啟動區上的操縱基因（operator）部位之結合會減低，因而起始從Ps4的γ-HuMGDF之轉錄。本實施例所用大腸桿菌宿主細胞係在1994年11月30日登錄為ATCC # 69717者。

用pAMG11-γ-HuMGDF質體轉形該大腸桿菌宿主ATCC # 69717並根據下列醱酵說明予以生長。將大腸桿菌品系接種到Luria肉湯中，然後在30℃下培育約12小時。接著將該細胞無菌地轉移到裝著批料培養基（20克／升酵母萃取物；3.4克／升檸檬；15克／升K_2HPO_4；15毫升Dow p2000；5克／升葡萄糖；1克／升$MgSO_4.7H_2O$；5.5毫升／升微量金屬，5.5毫升／升的維生素）的醱酵器內。該程序的批次相繼續到培養物在600 nm的光密度為5.0±1.0為止。然後用第一進料培養基（700克／升葡萄糖；6.75克／升$MgSO_4.7H_2O$）起始而開始進料一批次相。於每一確定時程中每隔2小時調整進料速率。當培養物在600 nm的光密度到達20－25時，即開始第二進料培養基（129克／升胰蛋白酶腺；258克／升酵母萃取物）的起始。將第二進料培養基保持在固定流速，而第一進料培養基則要繼續調整。於整個醱酵過程中的溫度都保持在約30℃下。該培養物於需要時，添加酸或鹼以維持在約pH 7。經由調整醱酵器內的攪動及空氣輸入速率和氧氣輸入速率以維持所需的溶氧水平。當培養物在600 nm的光密度到達57-63時，起始第三進料培養基的添加。以固定流速將第三進料培養基（300克／升乳糖）導到醱酵器內；中斷第一進料

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

五、發明說明（96）

培養基的添加並將第二進料培養基的流速改成新的固定速率。於第三進料培養基起始添加後，持續醱酵10小時。於醱酵結束時，將培養物冷卻到15±5 ℃。離心收取細胞。將所得細胞糊包裝後，貯存在< -60 ℃。

依上文所述在大腸桿菌中生產的重組MGDF，其純化係依下文所述進行。將1800克的細胞糊懸浮在約18升的10 mM EDTA中，並以15,000 psi通過高壓勻化器。將破裂的細胞懸浮液離心並將沉著丸再懸浮於10升的10 mM EDTA中。離心該懸浮液並將200 克的沉著丸溶解在2 升的10 mM Tris，8 M 胍氫氯化物，10 mM DTT ，5 mM EDTA ，pH 8.7之中。將該溶液慢慢地稀釋到200 升的10 mM CAPS，3 M 脲，30% 甘油，3 mM胱胺，1 mM光胱胺酸，pH 10.5之中。

在室溫下，將稀釋溶液慢慢攪拌16小時後，將pH值調整到6.8 。將已調整pH的溶液澄清化後，加到已用10 mM 磷酸鈉，1.5 M 脲，1.5%甘油，pH 6.8平衡過的2 升CM Sepharose 管柱上。於加完後，用10 mM 磷酸鈉，15% 甘油，pH 7.2洗該管柱。然後，用0 至0.5 M 氯化鈉梯度，10 mM 磷酸鈉，pH 7.2洗提MGDF。

將CM洗提液濃縮後，用10,000分子量截止率的薄膜與10 mM 磷酸鈉，pH 6.5進行緩衝液交換。對所得濃度約2 毫克／毫升的濃縮溶液用組織蛋白酶C 在周溫下處理90分鐘（500 比1 莫耳比）。

然後將該溶液加到已用10 mM 磷酸鈉，15% 甘油，pH

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

五、發明說明 (7)

7.2 平衡過的1.2 升SP高性能Sepharuse 管柱上。加完後，用0.1 至0.25 M氯化鈉梯度，10 mM 磷酸鈉，pH 7.2洗提出MGDF。

於SP高性能管柱的洗提液中加入硫酸銨至0.6 M 。將洗提液加到已用10 mM 磷酸鈉，0.6 M 硫酸銨，pH 7.2平衡過的1.6 升Phenyl Toyopearl管柱上。用0.6 至0 M 硫酸銨梯度，10 mM 磷酸鈉，pH 7.2洗提出MGDF尖峰。

將該Phenyl Toyopearl洗提液濃縮並用10,000分子量截止薄膜進行緩衝液交換至10 mM Tris，5%山梨糖醇，pH 7.5 之中。

實施例15

γ-HuMGDF （大腸桿菌1-163 ）的活體內生物性質

用依上面實施例14所述製得的γ-HuMGDF （大腸桿菌1-163 ）進行老鼠體內的生物效能評估。於五個連續天內以逐增劑量的γ-HuMGDF 皮下注射到正常的雄Balb/c小鼠體內。所用劑量範圍為15微克／公斤／天到1500微克／公斤／天。於最後注射後24小時，用電子血球計數器（Sysmex, Baxter）測量血球計數。結果觀察到隨著細胞活素濃度對數地遞增，其血小板計數有線型增加。在該系統中，血小板計數在1500微克／公斤／天時增加到基線值的300%。其他血球參數，例如白血球或紅血球等的計數，或血球容積等都不受此處理所影響。

從皮下注射300 微克／公斤／天γ-HuMGDF （大腸桿菌1-163 ）六天的老鼠收取血小板並評估其對應於ADP 的凝

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（98）

集能力。其數據顯示取自被處理動物的血小板與取自對照動物的血小板實際上是不能區別者，其中兩組群對於血小板激動劑，ADP，都有同等的敏感性。

此外，也評估γ-HuMGDF消除與化學治療及／或輻射相關的血小板減少症之能力。於這些研究中使用會引起人類明顯血小板減少症的化學治療劑，carboplatin。於研究開始時，用1.25毫克carboplatin皮下注射Balb/c小鼠。於24小時後，在研究的剩餘天數，每天用100微克／公斤／天γ-HuMGDF（大腸桿菌1-163），或賦形劑，注射小鼠。到第9天時，賦形劑處理的小鼠之血小板計數降到正常值的約15%，但用γ-HuMGDF處理的小鼠，則仍保留在基線水平（圖20）。對於照射研究，對小鼠施以500雷得γ-輻射（鈷源）之單一劑量。其為次致死劑量，可在第11天時，導致90%血小板計數減低程度。到第21天為止，血小板計數仍未回復到正常值。在第1天到第20天中，每天給被照射小鼠給用γ-HuMGDF（大腸桿菌1-163）（100微克／公斤／天）時，血小板計數降低情況比用賦形劑處理的小鼠較不嚴重且更快速回復到基線水平（圖21）。為了在極端且長期血小板減少模式中試驗γ-HuMGDF，乃組合施用Carboplatin和輻射（圖22）。在這種情況中，血小板計數降低到極低水平，（正常值的3-5%），且大部份的動物（7/8）在此處理中都不能存活。不過，當研究期間，每天以皮下注射100微克／公斤／天的γ-HuMGDF處理這些動物時，血小板減少症有明顯地消除，更快速地回

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

五、發明說明（99）

復到基線計數，且所有經γ-HuMGDF-處理的動物（8/8）都存活。

另外，也在恆河猴體內評估γ-HuMGDF。於10天（第0天至第9天）期間，對正常恆河猴施以皮下注射2.5或25微克／公斤／天。於較低劑量組中，血小板計數在第12天增加400%，而在較高劑量組中，其亦在第12天增加700%。於停止注射後，在第25-30天，血小板計數回復到正常值。白血球計數和紅血球計數都不受此處理所影響。

其外，也在嚴重血小板減少症的靈長類模型中試驗γ-HuMGDF（大腸桿菌1-163）（圖23）。動物接受照射（700雷得，鈷源）後，在第15天導致血小板計數減低到正常值的1-2%。到第35-40天時，血小板計數回復到正常值。相反地，每天用γ-HuMGDF（25微克／公斤／天）處理的經照射動物，其血小板計數只降低到正常值的10%且平均不低於20,000／微升－血小板減少症病人進行血小板注輸的制動點。於經γ-HuMGDF－處理動物中，也更快速回復到基線計數值；在第20天即發生。

齧齒類和靈長類兩種研究所得這些活體內數據可完全地支持下述概念，亦即γ-HuMGDF（大腸桿菌1-163）為一種強力治療劑，具有明顯地影響臨床相關性血小板減少症之能力。

實施例16

CHO細胞培養產生γ-HuMGDF 1-332之方法

用可表現編碼MGDF1-332的cDNA之經轉染田鼠卵巢細胞

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

五、發明說明 (100)

在適當啟動區並聯結到編碼可擴大選擇標誌，DHFR，的基因等之下產生糖基化γ-HuMGDF 1-332。可供CHO細胞內表現出MGDF的適當啟動區為SRα。參看Mol. Cell. Biol. 8:466-472 (1988)和WO 91/13160 (1991)。可供CHO細胞內表現出MGDF的適當載體為pDSRα2。參看WO 90/14363 (1990)。代表性CHO細胞系可在標準細胞培養基內產生分泌出的MGDF，其產量可為10-20毫克／升，不過可增加到25至≧100毫克／升。要用典型細胞系來產生MGDF時，可將培養液擴大，其方式為將其以黏附生長方式通入具有下列組成的培養基之懸浮液或組織培養容器內：等比例的Dulbecco氏改質Eagle氏培養基（DMEM）和Ham's F12 (DMEM/F12, Gibco)，加上5到10%胎牛血清(FBS)或經透析胎牛血清和methotrexate (MTX)（必要時：MTX的典型濃度為200-600 nM）以維持選擇壓力。該培養基必須補充額外的非必需胺基酸（NEAA's）和穀胺醯胺。懸浮培養物可以容易地從接種（分配）密度1-4 x 10^5細胞／毫升繁殖到最大密度～1 x 10^6細胞／毫升，於該點將培養液經由稀釋到較大體積，使起始細胞濃度為所指定的分配密度而擴大培養。

要在滾瓶中產生MGDF時，必須用磁攪拌旋轉容器放置到溫控環境（37±1 ℃），或有儀器設備，經控制的攪拌槽生物反應器系統中以產生適當的懸浮液體積和細胞密度。滾動瓶（例如，850立方公分Falcon滾動瓶）必須以每瓶1.5至3 x 10^7細胞的起始密度接種並補充添加生長培養

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

五、發明說明 (101)

基（DMEM／F12，加5-10% FBS，1 X NEAA和1 X L-穀胺醯胺），其量要適合於在3-4天內產生匯集單層（150-300毫升／瓶）。該生長培養基必須用碳酸氫納適當地緩衝到pH 6.7至7.2以與60-90 mmHg分壓的二氧化碳平衡。瓶子必須通入10% CO_2／空氣並置於滾動架（～1 rpm）上，於37±1℃下培養3-4天。於匯集後，須將滾動瓶經由傾注或抽吸生長培養基而轉換成無血清的生產培養基；用等滲緩衝液，例如Dulbecco's磷酸鹽緩衝鹽水（D-PBS），洗滌該瓶，50-100毫升／瓶；然後加入適當體積的碳酸氫鹽緩衝，無血清DMEM/F12 (1:1)（200-300毫升／瓶），其中補充著NEAA's和6-穀胺醯胺及硫酸銅以減少共價聚集（1-20 μM）。瓶子必須通入10% CO_2／空氣並在滾動架（～1 rpm）上，37±1℃下培育6±1天，或直到代謝活性驅使葡萄糖水平到低於0.5克／升及／或pH水平低於6.6為止。從瓶內倒出或抽出以收集調理培養基並補充如上所述的新鮮無血清生產培養基以供其他的收集之用。這種程序可進行到該細胞不再持續無血清生產及滾動瓶泥濘為止。

收集到的調理培養基可經由通過0.45微米及／或0.2微米濾器（Sartorius Sartobran pH or Poll）進行間端微濾純化處理。濾後的調理培養基必須冷卻到4℃，然後，暫時貯存在4℃，或立即用交叉流動超濾系統（如，Filtron YM-50）予以濃縮和透析到低離子強度。超濾和透濾必須在4℃下進行以減少蛋白質降解。調理培養基必

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

五、發明說明（102）

須用緩衝水溶液（如，10 mM 磷酸鉀，pH 6.8）透析後才進行層析術純化步驟。

調理培養基中的產物品質可用非還原性SDS-PAGE西方點染法予以監測；該法可顯露出樣品中的含聚集，單體，和蛋白分解降解MGDF的相對量。

另一種用CHO 細胞產生MGDF的方法為將表現MGDF的細胞系調適到無血清培養基；如Gibco S-SFM II之中。可以經由系列地通到含有最低或無血清補充的培養基內而調適細胞。若該細胞系可在這種培養基內持續生長同時產生充分量的分泌MGDF時，即可經由系列地通入遞增地較大培養體積內擴大接種培養，然後接注到適當生產容器內（儀控攪拌槽生物反應器）並在最佳生長條件（pH，養份，溫度，氧氣，剪切速率）之下增生到其最大存活密度而進行生產。於最佳生產點（經由測量產物量和品質而實驗地決定），即從該生物反應器收集培養物，並利用微米－尺寸深度過濾或次微米交叉流動微濾而從調理培養基脫除掉細胞。若將用深度過濾時，必須用次微米間端過濾將培養基進一步澄清後，才依上文所述予以濃縮和透析。

* * *

雖然本發明已在上文經概括地及以其較佳實施例而說明過，不過，要了解者，請於此技藝者可從上述說明而加以變異和修改。所以，後附申請專利範圍意欲將所有這些變異涵蓋在本發明所申請的專利範圍之內。

此外，為了闡明有關本發明的背景及於特別情況中，提

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

修正補充

五、發明說明（10）

414799

供有關其操作的其他細節等所引述的文獻和其他資料都併於本文中以為參考。

微生物於台灣之寄存

質體pBCB(MGDF2)(於大腸桿菌AbleC中)已於84年3月28日寄存於食品工業發展研究所(FIRDI)，寄存編號：CCRC 940086。

質體pBCB(MGDF1)(於大腸桿菌AbleC中)已於84年3月28日寄存於FIRDI，寄存編號：CCRC 940087。

表現質體pAMG 11R-Hu Met Lys MGDF(於大腸桿菌FM15中)已於84年3月28日寄存於FIRDI，寄存編號：CCRC 940088。

大腸桿菌K12 FM15已於84年3月28日寄存於FIRDI，寄存編號：CCRC 950002。

中國倉鼠卵巢細胞株P0012 60nM已於84年3月28日寄存於FIRDI，寄存編號：CCRC 960025。

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
請委員明示，本案修正後是否變更原實質內容

五、發明說明（104）

序列表

(1) 一般資訊：

(i) 申請人：AMGEN INC.

(ii) 發明名稱：刺激巨核細胞生長與分化之組合物與方法

(iii) 序列數：34

(iv) 通訊地址：

(A) 收信人：Amgen Inc.

(B) 街名：1840 Dehavilland Drive

(C) 市名：Thousand Oaks

(D) 州名：加利佛尼亞

(E) 國名：美國

(F) 郵遞區號：91320-1789

(v) 計算機可讀形式

(A) 媒體類型：軟碟

(B) 計算機：IBM PC可相容

(C) 操作系統：PC-DOS/MS-DOS

(D) 軟體：PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) 現有申請數據：

(A) 申請號：

(B) 申請日期：

(C) 分類：

(viii) 代理人／事務所資訊：

(A) 名稱：Cook, Robert R.

(C) 參考／檔號：A-290-C

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（105）

(2) SEQ ID NO:1 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：31胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

（ii） 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:1:

Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Met Leu Arg Asp
1 5 10 15

Ser His Val Leu His Xaa Arg Leu Xaa Gln Xaa Pro Asp Ile Tyr
20 25 30

(2) SEQ ID NO:2 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：21胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

（ii） 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:2:

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（106）

Ala Pro Pro Ala Xaa Asp Pro Arg Leu Leu Asn Lys Met Leu Arg Asp
1 5 10 15

Ser His Val Leu His
20

(2) SEQ ID NO:3 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：17胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

（ii） 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:3:

Thr Gln Lys Glu Gln Thr Lys Ala Gln Asp Val Leu Gly Ala Val Ala
1 5 10 15

Leu

(2) SEQ ID NO:4 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：17鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

（ii） 分子類別：cDNA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（107）

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:4:

GCNCCNCCNG CNTGYGA 17

(2) SEQ ID NO:5 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：21鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:5:

GCARTGYAAC ACRTGNGART C 21

(2) SEQ ID NO:6 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：21胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:6:

Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp
1 5 10 15

Ser His Val Leu His
20

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（108）

(2) SEQ ID NO:7 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：21鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

（ii） 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:7:

GTACGCGTTC TAGANNNNNN T 21

(2) SEQ ID NO:8 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：21鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

（ii） 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:8:

AGTTTACTGA GGACTCGGAG G 21

(2) SEQ ID NO:9 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：30鹼對

(B) 類型：核酸

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (109)

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:9:

TTCGGCCGGA TAGGCCTTTT TTTTTTTTTT 30

(2) SEQ ID NO:10 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：29鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:10:

TTCGGCCGGA TAGGCCTTT TTTTTTTTT 29

(2) SEQ ID NO:11 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：20鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:11:

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（110）

TGCGACCTCC GAGTCCTCAG 20

(2) SEQ ID NO:12 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：23鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

（ii） 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:12:

GAGTCCTCAG TAAACTGCTT CGT 23

(2) SEQ ID NO:13 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：20鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

（ii） 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:13:

GGAGTCACGA AGCAGTTTAC 20

(2) SEQ ID NO:14 的資料：

（i） 序列特性：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（111）

(A) 長度：18鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:14:

CCTTTACTTC TAGGCCTG 18

(2) SEQ ID NO:15 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：19鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:15:

GAGGTCACAA GCAGGAGGA 19

(2) SEQ ID NO:16 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：19鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（112）

（ii） 分子類別：cDNA

（xi） 序列說明：SEQ ID NO:16:

GGCATAGTCC GGGACGTCG 19

(2) SEQ ID NO:17 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：19鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

（ii） 分子類別：cDNA

（xi） 序列說明：SEQ ID NO:17:

TCCTCCTGCT TGTGACCTC 19

(2) SEQ ID NO:18 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：19鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

（ii） 分子類別：cDNA

（xi） 序列說明：SEQ ID NO:18:

CCAGGAAGGA TTCAGGGGA 19

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（113）

(2) SEQ ID NO:19 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：30鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

（ii） 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:19:

CAACAAGTCG ACCGCCAGCC AGACACCCCG 30

(2) SEQ ID NO:20 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：24鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

（ii） 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:20:

GGCCGGATAG GCCACTCNNN NNNT 24

(2) SEQ ID NO:21 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：21鹼對

(B) 類型：核酸

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（114）

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:21:

GCARTGYAAN ACRTGNGART C 21

(2) SEQ ID NO:22 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：16鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:22:

TTGGTGTGCA CTTGTG 16

(2) SEQ ID NO:23 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：20鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:23:

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（115）

CACAAGTGCA CACCAACCCC 20

(2) SEQ ID NO:24 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：1342鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

（ii） 分子類別：cDNA

（ix） 特點：

(A) 名稱／關鍵詞：CDS

(B) 位置：99-1094

（xi） 序列說明：SEQ ID NO:24:

```
CAGGGAGCCA CGCCAGCCAA GACACCCCGG CCAGAATGGA GCTGACTGAA TTGCTCCTCG      60

TGGTCATGCT TCTCCTAACT GCAAGGCTAA CGCTGTCC AGC CCG GCT CCT CCT          113
                                          Ser Pro Ala Pro Pro
                                            1               5
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (116)

```
GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC          161
Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val
                10                  15                  20

CTT CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA          209
Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr
            25                  30                  35

CCT GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC          257
Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr
        40                  45                  50

CAG ATG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT          305
Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu
    55                  60                  65

CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC          353
Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys
70                  75                  80                  85

CTC TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT          401
Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu
                90                  95                  100

GGG GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG          449
Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg
            105                 110                 115

ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC          497
Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His
        120                 125                 130

CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC          545
Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr
    135                 140                 145

CTC TGC GTC AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA GCT GTC CCC AGC AGA ACC          593
Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr
150                 155                 160                 165

TCT CTA GTC CTC ACA CTG AAC GAG CTC CCA AAC AGG ACT TCT GGA TTG          641
Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu
                170                 175                 180

TTG GAG ACA AAC TTC ACT GCC TCA GCC AGA ACT ACT GGC TCT GGG CTT          689
Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu
            185                 190                 195

CTG AAG TGG CAG CAG GGA TTC AGA GCC AAG ATT CCT GGT CTG CTG AAC          737
Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn
        200                 205                 210

CAA ACC TCC AGG TCC CTG GAC CAA ATC CCC GGA TAC CTG AAC AGG ATA          785
Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile
    215                 220                 225
```


本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明 (117)

```
CAC GAA CTC TTG AAT GGA ACT CGT GGA CTC TTT CCT GGA CCC TCA CGC          833
His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg
230                 235                 240                 245

AGG ACC CTA GGA GCC CCG GAC ATT TCC TCA GGA ACA TCA GAC ACA GGC          881
Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly
                250                 255                 260

TCC CTG CCA CCC AAC CTC CAG CCT GGA TAT TCT CCT TCC CCA ACC CAT          929
Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His
            265                 270                 275

CCT CCT ACT GGA CAG TAT ACG CTC TTC CCT CTT CCA CCC ACC TTG CCC          977
Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro
        280                 285                 290

ACC CCT GTG GTC CAG CTC CAC CCC CTG CTT CCT GAC CCT TCT GCT CCA         1025
Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro
    295                 300                 305

ACG CCC ACC CCT ACC AGC CCT CTT CTA AAC ACA TCC TAC ACC CAC TCC         1073
Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser
310                 315                 320                 325

CAG AAT CTG TCT CAG GAA GGG TAAGGTTCTC AGACACTGCC GACATCAGCA            1124
Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly
                330

TTGTCTCGTG TACAGCTCCC TTCCCTGCAG GGCGCCCCTG GGAGACAACT GGACAAGATT       1184

TCCTACTTTC TCCTGAAACC CAAAGCCCTG GTAAAAGGGA TACACAGGAC TGAAAAGGGA       1244

ATCATTTTTC ACTGTACATT ATAAACCTTC AGAAGCTATT TTTTTAAGCT ATCAGCAATA       1304

CTCATCAGAG CAGCTAGCTC TTTGGTCTAT TTTCTGCA                               1342
```

(2) SEQ ID NO:25 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：332 胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:25:

```
Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu
  1               5                  10                  15

Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val
            20                  25                  30

His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu
        35                  40                  45
```


本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（118）

Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu
50 55 60

Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln
65 70 75 80

Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln
85 90 95

Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu
100 105 110

Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
115 120 125

Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
130 135 140

Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
145 150 155 160

Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro Asn
165 170 175

Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr
180 185 190

Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys Ile
195 200 205

Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly
210 215 220

Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe
225 230 235 240

Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly
245 250 255

Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser
260 265 270

Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu
275 280 285

Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro
290 295 300

Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr
305 310 315 320

Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly
325 330

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (119)

(2) SEQ ID NO:26 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：1342 鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(ix) 特點：

(A) 名稱／關鍵詞：CDS

(B) 位置：99..621

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:26:

```
CAGGGAGCCA CGCCAGCCAA GACACCCCGG CCAGAATGGA GCTGACTGAA TTGCTCCTCG      60

TGGTCATGCT TCTCCTAACT GCAAGGCTAA CGCTGTCC AGC CCG GCT CCT CCT          113
                                          Ser Pro Ala Pro Pro
                                            1               5

GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC        161
Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val
                10                  15                  20

CTT CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA        209
Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr
            25                  30                  35

CCT GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC        257
Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr
        40                  45                  50

CAG ATG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT        305
Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu
    55                  60                  65

CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC        353
Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys
70                  75                  80                  85

CTC TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT        401
Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu
                90                  95                  100
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（120）

```
GGG GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG          449
Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg
            105                 110                 115

ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC          497
Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His
        120                 125                 130


TG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC           545
Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr
    135                 140                 145

CTC TGC GTC AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA GCT GTC CCC AGC AGA ACC          593
Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr
150                 155                 160                 165

TCT CTA GTC CTC ACA CTG AAC GAG CTC C CAAACAGGAC TTCTGGATTG              641
Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu
                170

TTGGAGACAA ACTTCACTGC CTCAGCCAGA ACTACTGGCT CTGGGCTTCT GAAGTGGCAG        701

CAGGGATTCA GAGCCAAGAT TCCTGGTCTG CTGAACCAAA CCTCCAGGTC CCTGGACCAA        761

ATCCCCGGAT ACCTGAACAG GATACACGAA CTCTTGAATG GAACTCGTGG ACTCTTTCCT        821

GGACCCTCAC GCAGGACCCT AGGAGCCCCG GACATTTCCT CAGGAACATC AGACACAGGC        881

TCCCTGCCAC CCAACCTCCA GCCTGGATAT TCTCCTTCCC CAACCCATCC TCCTACTGGA        941

CAGTATACGC TCTTCCCTCT TCCACCCACC TTGCCCACCC CTGTGGTCCA GCTCCACCCC        1001

CTGCTTCCTG ACCCTTCTGC TCCAACGCCC ACCCCTACCA GCCCTCTTCT AAACACATCC        1061

TACACCCACT CCCAGAATCT GTCTCAGGAA GGGTAAGGTT CTCAGACACT GCCGACATCA        1121

GCATTGTCTC GTGTACAGCT CCCTTCCCTG CAGGGCGCCC CTGGGAGACA ACTGGACAAG        1181

ATTTCCTACT TTCTCCTGAA ACCCAAAGCC CTGGTAAAAG GGATACACAG GACTGAAAAG        1241

GGAATCATTT TTCACTGTAC ATTATAAACC TTCAGAAGCT ATTTTTTTAA GCTATCAGCA        1301

ATACTCATCA GAGCAGCTAG CTCTTTGGTC TATTTTCTGC A                            1342
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（121）

(2) SEQ ID NO:27 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：174 胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(D) 拓樸學：線形

（ii） 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:27:

```
Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu
 1               5                  10                  15

Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val
            20                  25                  30

His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu
        35                  40                  45

Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu
    50                  55                  60

Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln
65                  70                  75                  80

Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln
                85                  90                  95

Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu
            100                 105                 110

Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
        115                 120                 125

Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu
    130                 135                 140

Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
145                 150                 155                 160

Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu
                165                 170
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (122)

(2) SEQ ID NO:28 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：1164 鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(ix) 特點：

(A) 名稱／關鍵詞：CDS

(B) 位置：97..894

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:28:

```
AGGGAGCCAC GCCAGCCAGA CACCCCGGCC AGAATGGAGC TGACTGAATT GCTCCTCGTG        60

GTCATGCTTC TCCTAACTGC AAGGCTAACG CTGTCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT          114
                                        Ser Pro Ala Pro Pro Ala
                                          1               5

TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC CTT          162
Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu
             10                  15                  20

CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT          210
His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro
         25                  30                  35

GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG          258
Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln
     40                  45                  50

ATG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT CTG          306
Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu
 55                  60                  65                  70

CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC CTC          354
Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu
                 75                  80                  85

TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT GGG          402
Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly
             90                  95                  100
```


（請先閱請背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（123）

```
GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC          450
Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr
        105                 110                 115

ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG          498
Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu
    120                 125                 130

CTC CGA GGA AAG GAC TTC TGG ATT GTT GGA GAC AAA CTT CAC TGC CTC          546
Leu Arg Gly Lys Asp Phe Trp Ile Val Gly Asp Lys Leu His Cys Leu
135                 140                 145                 150

AGC CAG AAC TAC TGG CTC TGG GCT TCT GAA GTG GCA GCA GGG ATT CAG          594
Ser Gln Asn Tyr Trp Leu Trp Ala Ser Glu Val Ala Ala Gly Ile Gln
                155                 160                 165

AGC CAA GAT TCC TGG TCT GCT GAA CCA AAC CTC CAG GTC CCT GGA CCA          642
Ser Gln Asp Ser Trp Ser Ala Glu Pro Asn Leu Gln Val Pro Gly Pro
            170                 175                 180

AAT CCC CGG ATA CCT GAA CAG GAT ACA CGA ACT CTT GAA TGG AAC TCG          690
Asn Pro Arg Ile Pro Glu Gln Asp Thr Arg Thr Leu Glu Trp Asn Ser
        185                 190                 195

TGG ACT CTT TCC TGG ACC CTC ACG CAG GAC CCT AGG AGC CCC GGA CAT          738
Trp Thr Leu Ser Trp Thr Leu Thr Gln Asp Pro Arg Ser Pro Gly His
    200                 205                 210

TTC CTC AGG AAC ATC AGA CAC AGG CTC CCT GCC ACC CAA CCT CCA GCC          786
Phe Leu Arg Asn Ile Arg His Arg Leu Pro Ala Thr Gln Pro Pro Ala
215                 220                 225                 230

TGG ATA TTC TCC TTC CCC AAC CCA TCC TCC TAC TGG ACA GTA TAC GCT          834
Trp Ile Phe Ser Phe Pro Asn Pro Ser Ser Tyr Trp Thr Val Tyr Ala
                235                 240                 245

CTT CCC TCT TCC ACC CAC CTT GCC CAC CCC TGT GGT CCA GCT CCA CCC          882
Leu Pro Ser Ser Thr His Leu Ala His Pro Cys Gly Pro Ala Pro Pro
            250                 255                 260

CCT GCT TCC TGACCCTTCT GCTCCAACGC CCACCCCTAC CAGCCCTCTT                  931
Pro Ala Ser
        265

CTAAACACAT CCTACACCCA CTCCCAGAAT CTGTCTCAGG AAGGGTAAGG TTCTCAGACA       991

CTGCCGACAT CAGCATTGTC TCGTGTACAG CTCCCTTCCC TGCAGGGCGC CCCTGGGAGA      1051

CAACTGGACA AGATTTCCTA CTTTCTCCTG AAACCCAAAG CCCTGGTAAA AGGGATACAC      1111

AGGACTGAAA AGGGAATCAT TTTTCACTGT ACATTATAAA CCTTCAGAAG CTA             1164
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (124)

(2) SEQ ID NO:29 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：265 胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:29:

```
Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu
 1               5                  10                  15

Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val
            20                  25                  30

His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu
        35                  40                  45

Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu
    50                  55                  60

Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln
65                  70                  75                  80

Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln
                85                  90                  95

Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu
            100                 105                 110

Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe
        115                 120                 125

Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Asp Phe Trp Ile Val Gly
    130                 135                 140

Asp Lys Leu His Cys Leu Ser Gln Asn Tyr Trp Leu Trp Ala Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Ala Ala Gly Ile Gln Ser Gln Asp Ser Trp Ser Ala Glu Pro Asn
                165                 170                 175
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（125）

```
Leu Gln Val Pro Gly Pro Asn Pro Arg Ile Pro Glu Gln Asp Thr Arg
            180                 185                 190

Thr Leu Glu Trp Asn Ser Trp Thr Leu Ser Trp Thr Leu Thr Gln Asp
        195                 200                 205

Pro Arg Ser Pro Gly His Phe Leu Arg Asn Ile Arg His Arg Leu Pro
    210                 215                 220

Ala Thr Gln Pro Pro Ala Trp Ile Phe Ser Phe Pro Asn Pro Ser Ser
225                 230                 235                 240

Tyr Trp Thr Val Tyr Ala Leu Pro Ser Ser Thr His Leu Ala His Pro
                245                 250                 255

Cys Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ser
            260                 265
```

(2) SEQ ID NO:30 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：24鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

（ii） 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:30:

GAGCTCACTA GTGTCGACCT GCAG 24

(2) SEQ ID NO:31 的資料：

（i） 序列特性：

(A) 長度：24鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（126）

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:31:

CTGCAGGTCG ACACTAGTGA GCTC 24

(2) SEQ ID NO:32 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：80鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:32:

CTCATAATTT TTAAAAAATT CATTTGACAA ATGCTAAAAT TCTTGATTAA TATTCTCAAT 60

TGTGAGCGCT CACAATTTAT 80

(2) SEQ ID NO:33 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：86鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:33:

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明 (127)

CGATAAATTG TGAGCGCTCA CAATTGAGAA TATTAATCAA GAATTTTAGC ATTTGTCAAA 60

TGAATTTTTT AAAAATTATG AGACGT 86

(2) SEQ ID NO:34 的資料：

(i) 序列特性：

(A) 長度：89鹼對

(B) 類型：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線形

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO:34:

GACGTCTCAT AATTTTTAAA AAATTCATTT GACAAATGCT AAAATTCTTG ATTAATATTC 60

TCAATTGTGA GCGCTCACAA TTTATCGAT 89

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：刺激巨核細胞生長與分化之組合物與方法）

本發明揭示一種新穎蛋白質，稱為巨核細胞生長和發育因子（MGDFs；通常也稱為Mpl配體），其具有刺激巨核細胞生長及增大巨核細胞分化或成熟，最後導致血小板的產生等之生物活性。此外，也揭示接著到水溶性聚合物，例如聚乙二醇等的MGDF分子所構成之MGDF衍生物，及其製備方法。另外，也揭示從天然來源製得均質形式的MGDFs之方法及從哺乳動物，包括人類經由重組遺傳工程技術製備彼等之方法。

英文發明摘要（發明之名稱：COMPOSITIONS AND METHODS FOR STIMULATING MEGAKARYOCYTE GROWTH AND DIFFERENTIATION）

Disclosed are novel proteins, referred to as megakaryocyte growth and development factors (MGDFs; also generally referred to as Mpl ligands), that have a biological activity of stimulating the growth of megakaryocytes and augmenting the differentiation or maturation of megakaryocytes, ultimately to result in the production of platelets. MGDF derivatives comprising MGDF molecules attached to water soluble polymers, such as polyethylene glycol, are also disclosed, along with methods for their preparation. Also disclosed are processes for obtaining the MGDFs in homogeneous form from natural sources and producing them by recombinant genetic engineering techniques from mammals, including humans.

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

六、申請專利範圍

公告本

修正補充 年 月 日 88.7.31

1. 一種單聚乙二醇化巨核細胞生長發育(MGDF)多肽，其具有下示胺基酸序列(圖11)中第22-184個之胺基酸且聚乙二醇基團係連接於該多肽之N端：

圖11

```
1    CAGGGAGCCACGCCAGCCAAGACACCCCGGCCAGAATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTC   59
1                                    MetGluLeuThrGluLeuLeuLeu       8

60   GTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGT  119
9    ValValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCys  28

120  GACCTCCGAGTCCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCCTTCACAGCAGACTGAGC  179
29   AspLeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSer  48

180  CAGTGCCCAGAGGTTCACCCTTTGCCTACACCTGTCCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGC  239
49   GlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSer  68

240  TTGGGAGAATGGAAAACCCAGATGGAGGAGACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAGCAGTG  299
69   LeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaVal  88

300  ACCCTTCTGCTGGAGGGAGTGATGGCAGCACGGGGACAACTGGGACCCACTTGCCTCTCA  359
89   ThrLeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSer  108

360  TCCCTCCTGGGGCAGCTTTCTGGACAGGTCCGTCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTC  419
109  SerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeu  128

420  CTTGGAACCCAGCTTCCTCCACAGGGCAGGACCACAGCTCACAAGGATCCCAATGCCATC  479
129  LeuGlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIle  148

480  TTCCTGAGCTTCCAACACCTGCTCCGAGGAAAGGTGCGTTTCCTGATGCTTGTAGGAGGG  539
149  PheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysValArgPheLeuMetLeuValGlyGly  168

540  TCCACCCTCTGCGTCAGGCGGGCCCCACCCACCACAGCTGTCCCCAGCAGAACCTCTCTA  599
169  SerThrLeuCysValArgArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeu  188

600  GTCCTCACACTGAACGAGCTCCCAAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCACT  659
189  ValLeuThrLeuAsnGluLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThr  208

660  GCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGGATTCAGAGCCAAG  719
209  AlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLys  228
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

公告本

修正補充 年 月 日 88.7.31

1. 一種單聚乙二醇化巨核細胞生長發育(MGDF)多肽，其具有下示胺基酸序列(圖11)中第22-184個之胺基酸且聚乙二醇基團係連接於該多肽之N端：

圖11

```
1    CAGGGAGCCACGCCAGCCAAGACACCCCGGCCAGAATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTC   59
1                                    MetGluLeuThrGluLeuLeuLeu       8

60   GTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGT  119
9    ValValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCys  28

120  GACCTCCGAGTCCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCCTTCACAGCAGACTGAGC  179
29   AspLeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSer  48

180  CAGTGCCCAGAGGTTCACCCTTTGCCTACACCTGTCCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGC  239
49   GlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSer  68

240  TTGGGAGAATGGAAAACCCAGATGGAGGAGACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAGCAGTG  299
69   LeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaVal  88

300  ACCCTTCTGCTGGAGGGAGTGATGGCAGCACGGGGACAACTGGGACCCACTTGCCTCTCA  359
89   ThrLeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSer  108

360  TCCCTCCTGGGGCAGCTTTCTGGACAGGTCCGTCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTC  419
109  SerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeu  128

420  CTTGGAACCCAGCTTCCTCCACAGGGCAGGACCACAGCTCACAAGGATCCCAATGCCATC  479
129  LeuGlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIle  148

480  TTCCTGAGCTTCCAACACCTGCTCCGAGGAAAGGTGCGTTTCCTGATGCTTGTAGGAGGG  539
149  PheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysValArgPheLeuMetLeuValGlyGly  168

540  TCCACCCTCTGCGTCAGGCGGGCCCCACCCACCACAGCTGTCCCCAGCAGAACCTCTCTA  599
169  SerThrLeuCysValArgArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeu  188

600  GTCCTCACACTGAACGAGCTCCCAAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCACT  659
189  ValLeuThrLeuAsnGluLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThr  208

660  GCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGGATTCAGAGCCAAG  719
209  AlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLys  228
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

```
720  ATTCCTGGTCTGCTGAACCAAACCTCCAGGTCCCTGGACCAAATCCCCGGATACCTGAAC   779
229  IleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsn   248

780  AGGATACACGAACTCTTGAATGGAACTCGTGGACTCTTTCCTGGACCCTCACGCAGGACC   839
249  ArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThrArgGlyLeuPheProGlyProSerArgArgThr   268

840  CTAGGAGCCCCGGACATTTCCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCAACCTC   899
269  LeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeu   288

900  CAGCCTGGATATTCTCCTTCCCCAACCCATCCTCCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCT   959
289  GlnProGlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPhePro   308

960  CTTCCACCCACCTTGCCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCCTGCTTCCTGACCCTTCT  1019
309  LeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeuProAspProSer  328

1020 GCTCCAACGCCCACCCCTACCAGCCCTCTTCTAAACACATCCTACACCCACTCCCAGAAT  1079
329  AlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsn  348

1080 CTGTCTCAGGAAGGGTAAGGTTCTCAGACACTGCCGACATCAGCATTGTCTCGTGTACAG  1139
349  LeuSerGlnGluGlyEnd                                            353
1140 CTCCCTTCCCTGCAGGGCGCCCCTGGGAGACAACTGGACAAGATTTCCTACTTTCTCCTG  1199
1200 AAACCCAAAGCCCTGGTAAAAGGGATACACAGGACTGAAAAGGGAATCATTTTTCACTGT  1259
1260 ACATTATAAACCTTCAGAAGCTATTTTTTTAAGCTATCAGCAATACTCATCAGAGCAGCT  1319
1320 AGCTCTTTGGTCTATTTTCTGCA  1342
```

2. 根據申請專利範圍第1項之單聚乙二醇化MGDF多肽，其中該聚乙二醇基具有2至100千道耳頓的平均分子量。

3. 根據申請專利範圍第1或2項之單聚乙二醇化MGDF多肽，其中多肽部份係已於大腸桿菌中生產者。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

4414799

圖 1

巨核細胞和血小板的發育

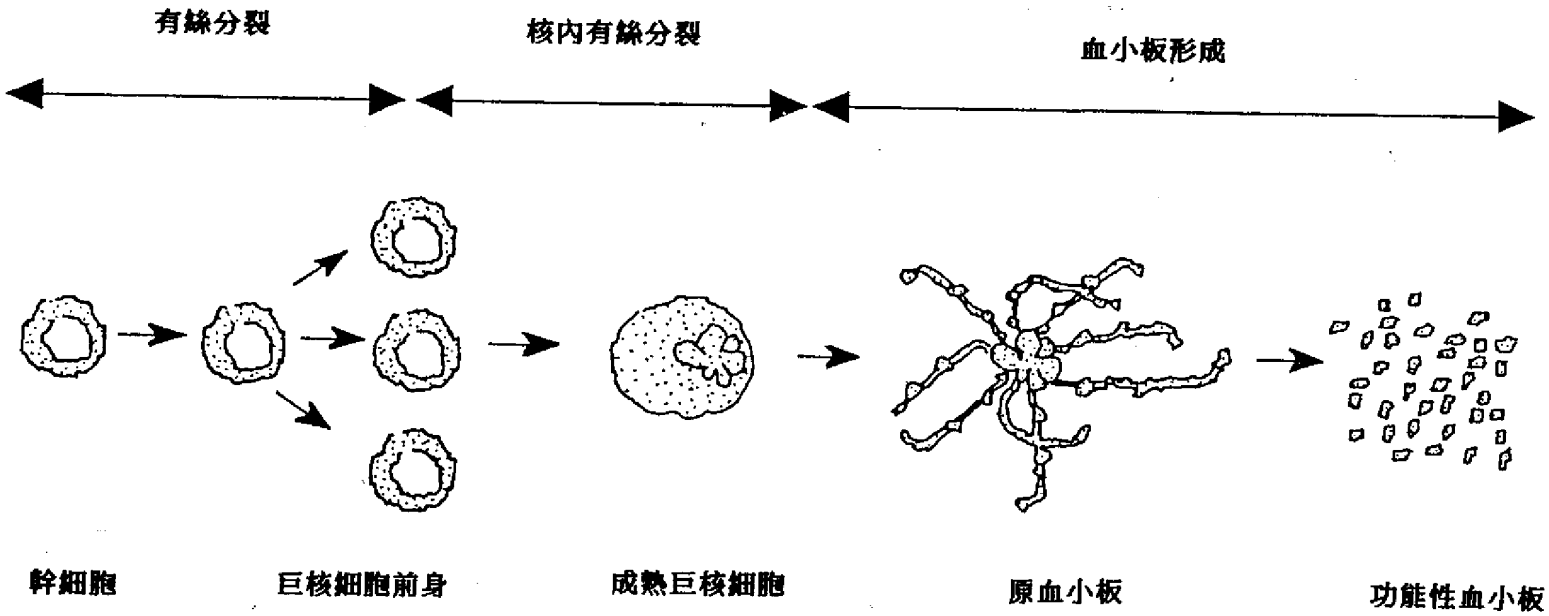
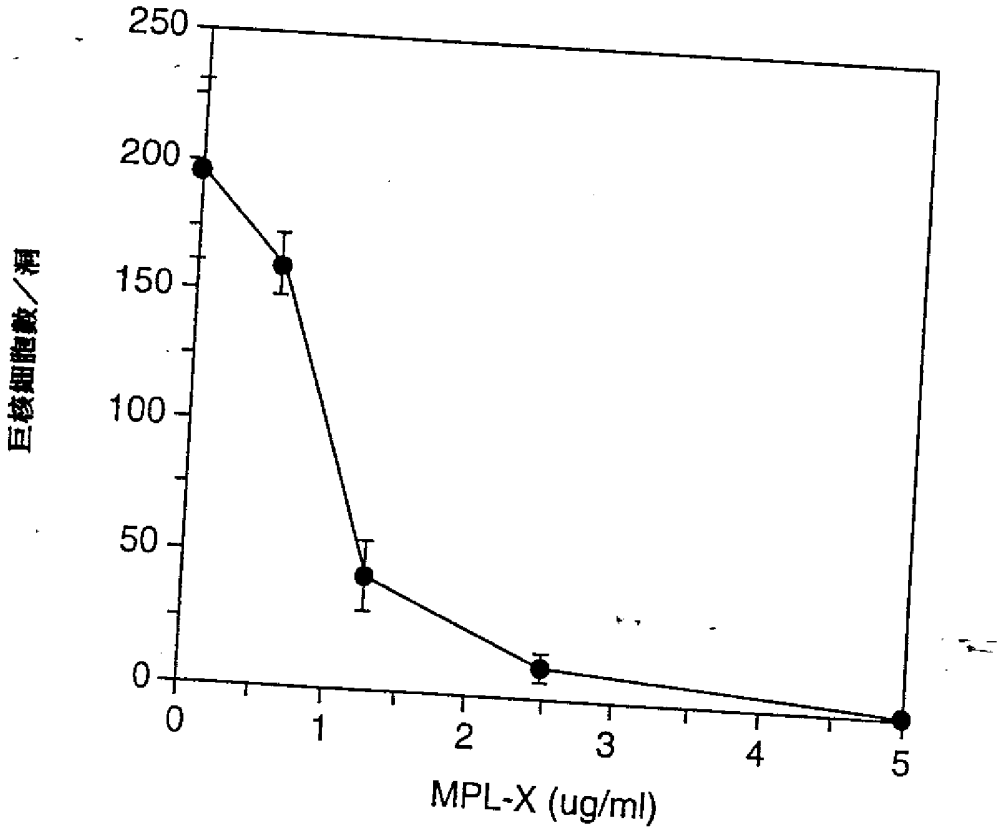


図 2



414799

圖 3

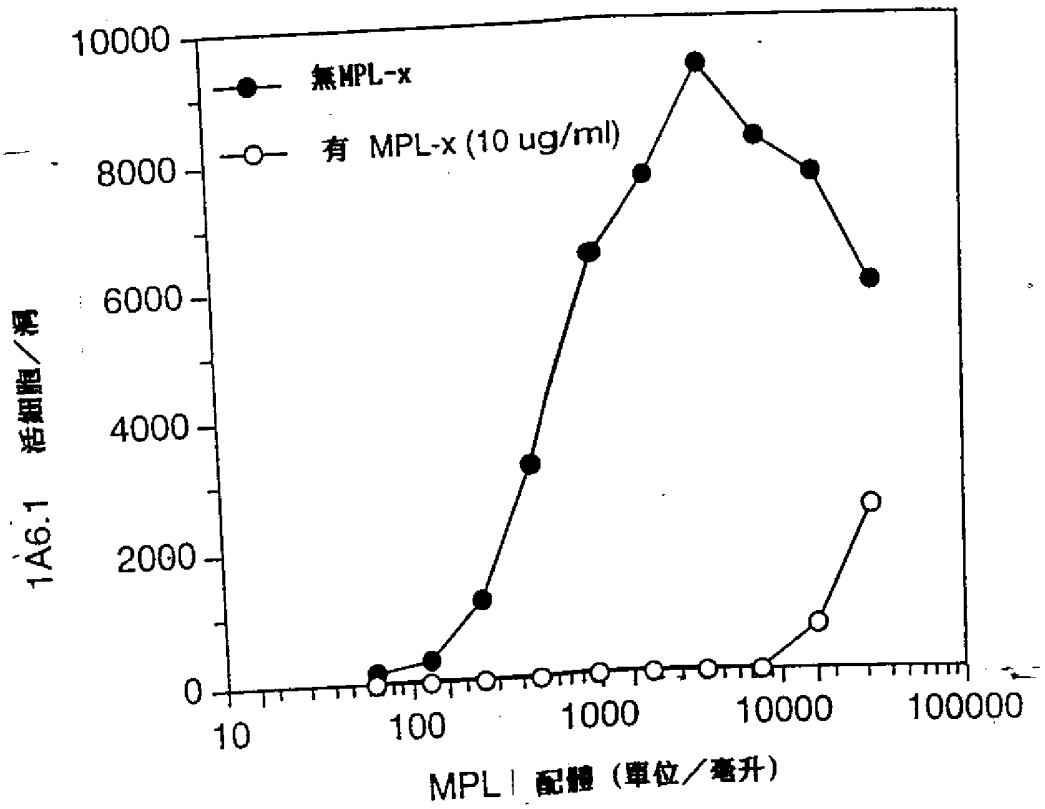

10000
8000
6000
4000
2000
0
無MPL-x
有 MPL-x (10 ug/ml)
1A6.1 活細胞／洞
10
100
1000
10000
100000
MPL I 配體（單位／毫升）

圖　4

Mpl配體之純化

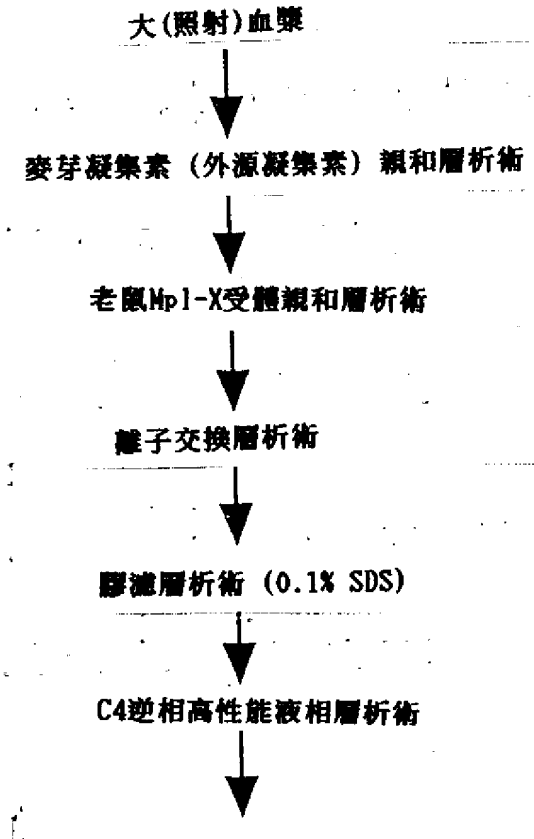

大(照射)血漿
麥芽凝集素（外源凝集素）親和層析術
老鼠Mpl-X受體親和層析術
離子交換層析術
膠濾層析術（0.1% SDS）
C4逆相高性能液相層析術
純化Mpl 配體

圖 5A

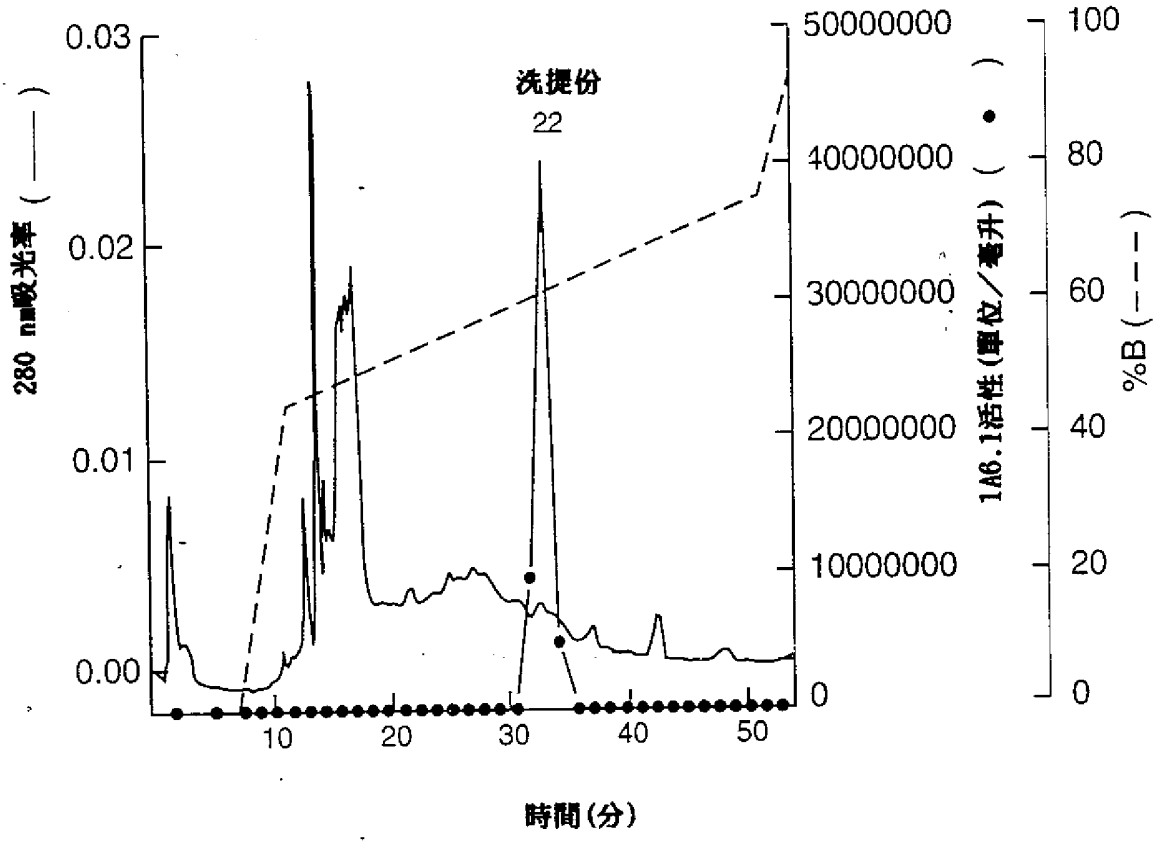
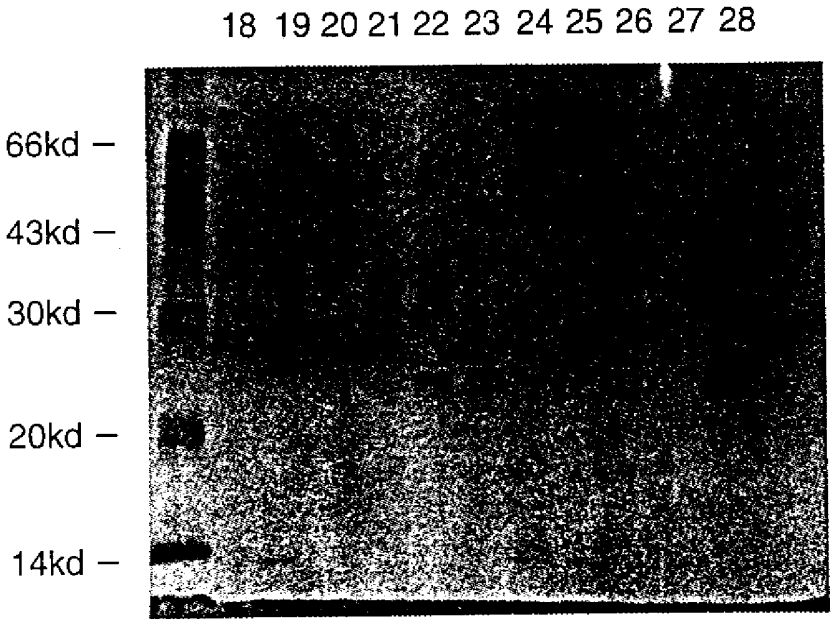


圖 5B



SDS-PAGE 14% 非還原性

圖 6

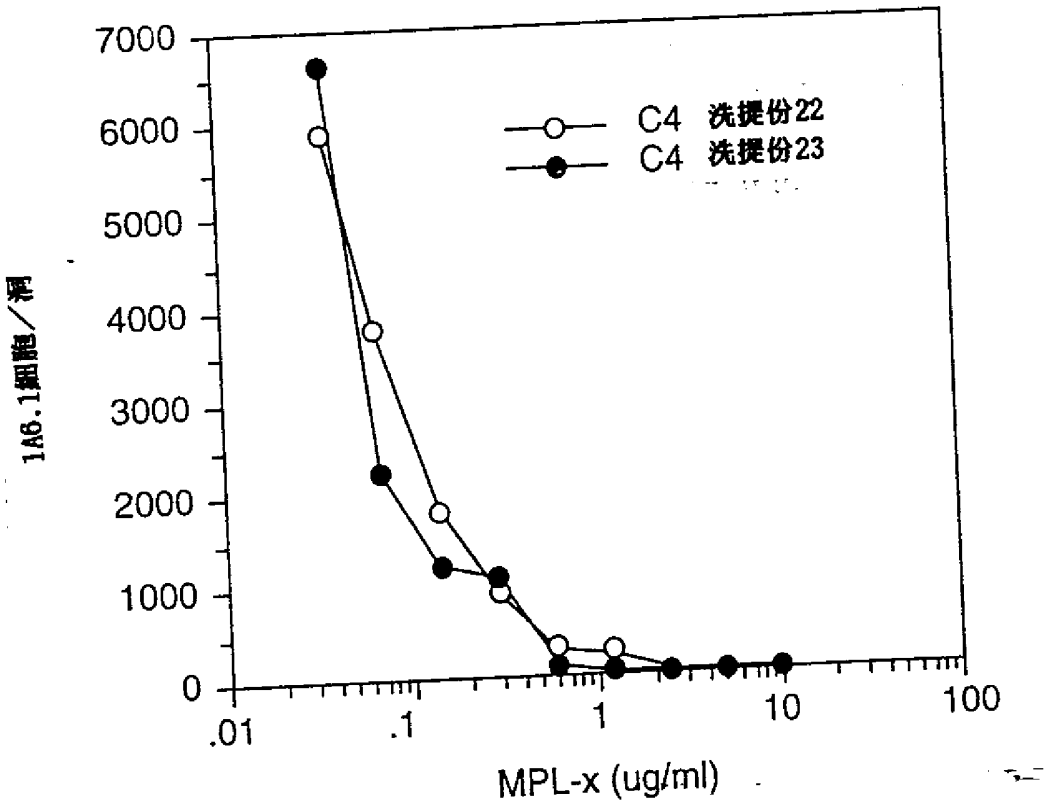

7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
1A6.1細胞／洞
.01
.1
1
10
100
MPL-x (ug/ml)
C4 洗提份22
C4 洗提份23

圖 7

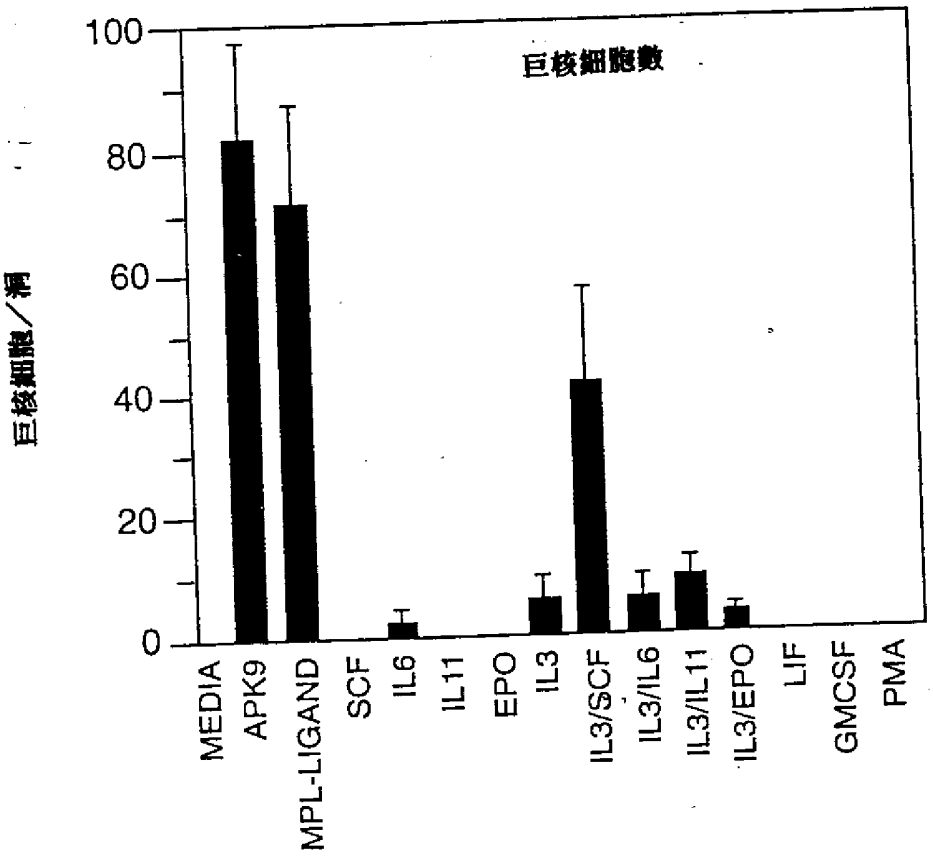

巨核細胞數
巨核細胞／滴
100
80
60
40
20
0
MEDIA
APK9
MPL-LIGAND
SCF
IL6
IL11
EPO
IL3
IL3/SCF
IL3/IL6
IL3/IL11
IL3/EPO
LIF
GMCSF
PMA

図 8

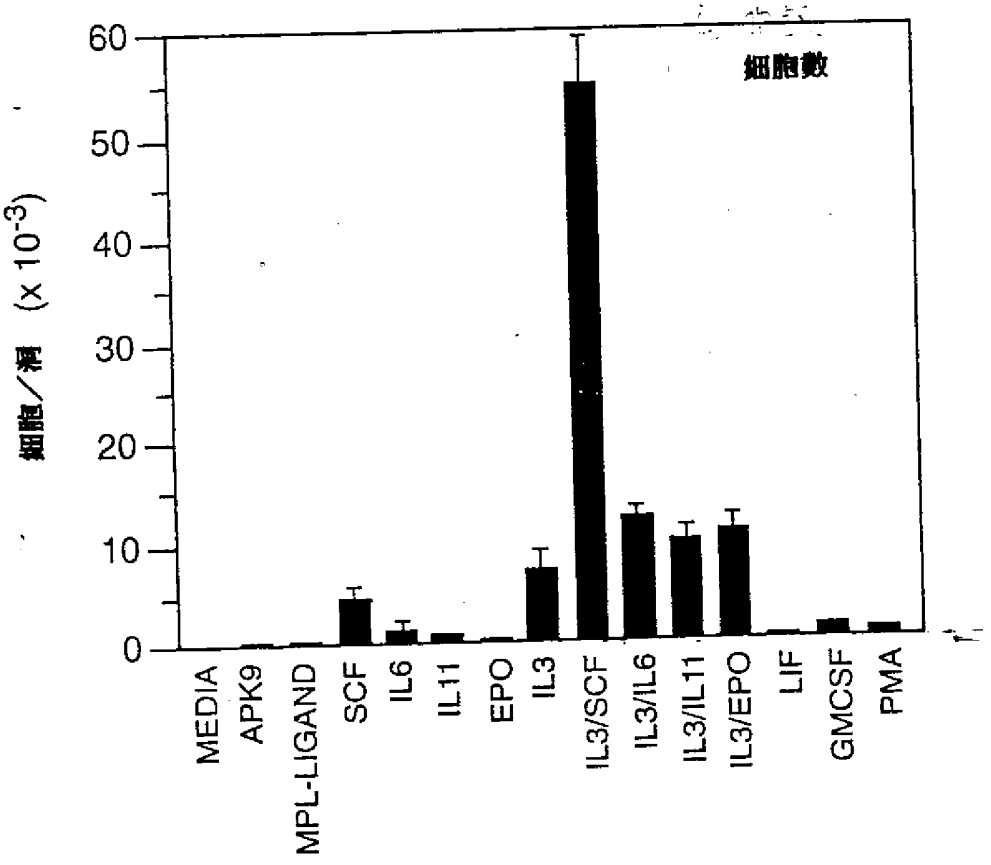

細胞数
細胞／滴 (x 10-3)
60
50
40
30
20
10
0
MEDIA
APK9
MPL-LIGAND
SCF
IL6
IL11
EPO
IL3
IL3/SCF
IL3/IL6
IL3/IL11
IL3/EPO
LIF
GMCSF
PMA

圖 9

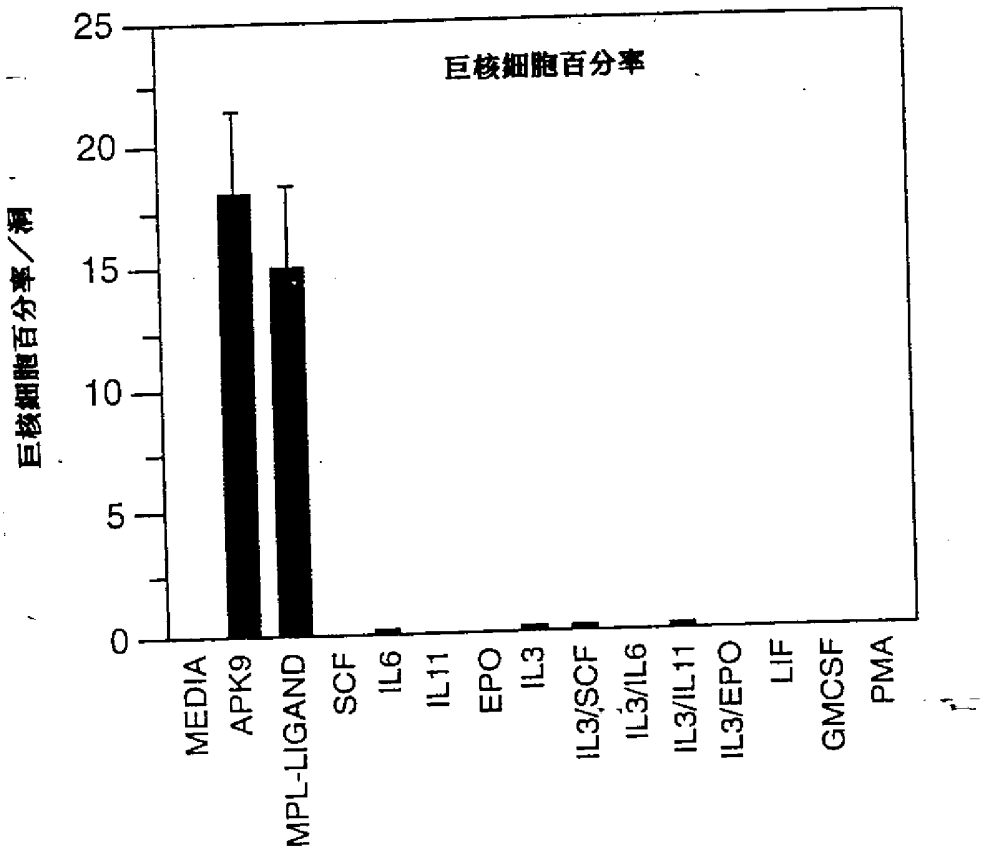

巨核細胞百分率
巨核細胞百分率／洞
25
20
15
10
5
0
MEDIA
APK9
MPL-LIGAND
SCF
IL6
IL11
EPO
IL3
IL3/SCF
IL3/IL6
IL3/IL11
IL3/EPO
LIF
GMCSF
PMA

圖 10

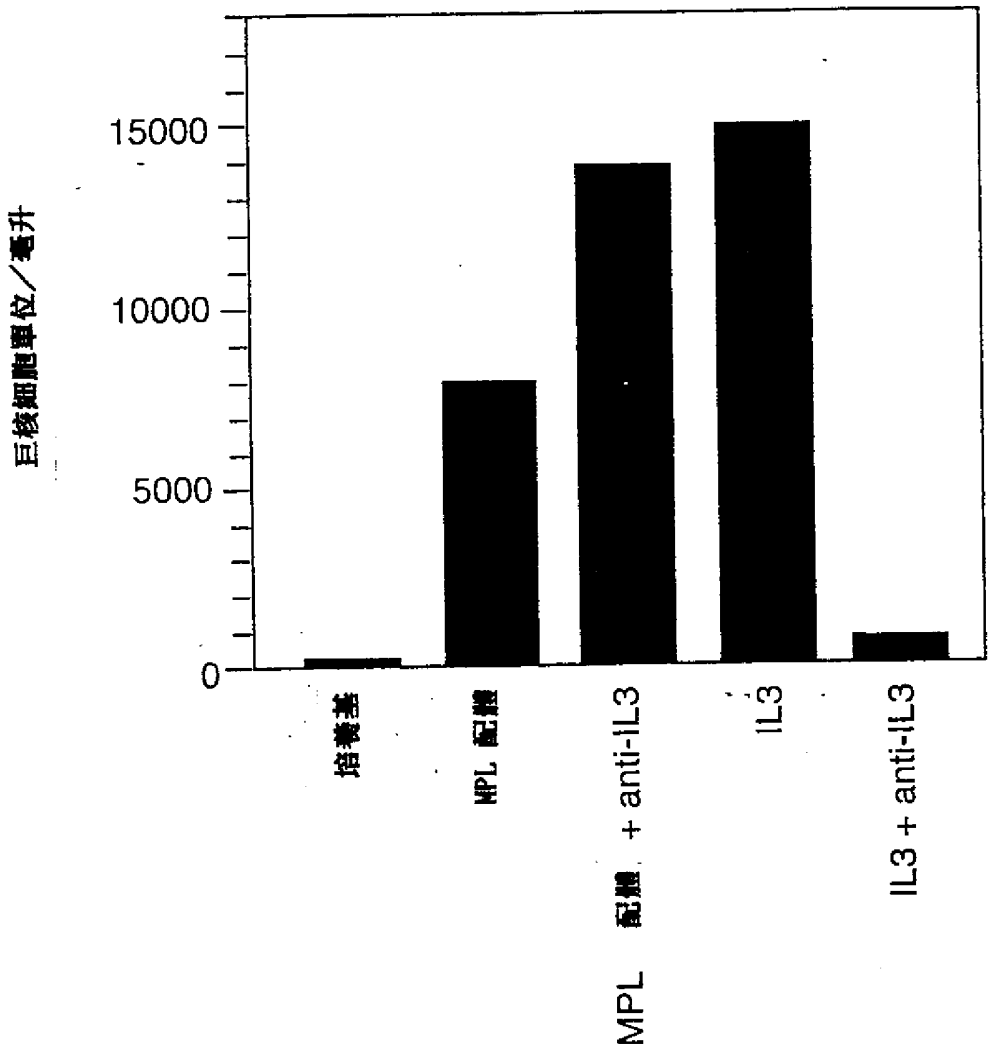

巨核細胞單位／毫升
15000
10000
5000
0
培養基
MPL 配體
MPL 配體 + anti-IL3
IL3
IL3 + anti-IL3

FIG 11A

```
1    CAGGGAGCCACGCCAGCCAAGACACCCCGGCCAGAATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTC   59
1                                          MetGluLeuThrGluLeuLeuLeu    8

60   GTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGT  119
9    ValValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCys   28

120  GACCTCCGAGTCCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCCTTCACAGCAGACTGAGC  179
29   AspLeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSer   48

180  CAGTGCCCAGAGGTTCACCCTTTGCCTACACCTGTCCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGC  239
49   GlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSer   68

240  TTGGGAGAATGGAAAACCCAGATGGAGGAGACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAGCAGTG  299
69   LeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaVal   88

300  ACCCTTCTGCTGGAGGGAGTGATGGCAGCACGGGGACAACTGGGACCCACTTGCCTCTCA  359
89   ThrLeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSer  108

360  TCCCTCCTGGGGCAGCTTTCTGGACAGGTCCGTCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTC  419
109  SerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeu  128

420  CTTGGAACCCAGCTTCCTCCACAGGGCAGGACCACAGCTCACAAGGATCCCAATGCCATC  479
129  LeuGlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIle  148

480  TTCCTGAGCTTCCAACACCTGCTCCGAGGAAAGGTGCGTTTCCTGATGCTTGTAGGAGGG  539
149  PheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysValArgPheLeuMetLeuValGlyGly  168

540  TCCACCCTCTGCGTCAGGCGGGCCCCACCCACCACAGCTGTCCCCAGCAGAACCTCTCTA  599
169  SerThrLeuCysValArgArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeu  188

600  GTCCTCACACTGAACGAGCTCCCAAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCACT  659
189  ValLeuThrLeuAsnGluLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThr  208

660  GCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGGATTCAGAGCCAAG  719
209  AlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLys  228

720  ATTCCTGGTCTGCTGAACCAAACCTCCAGGTCCCTGGACCAAATCCCCGGATACCTGAAC  779
229  IleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsn  248

780  AGGATACACGAACTCTTGAATGGAACTCGTGGACTCTTTCCTGGACCCTCACGCAGGACC  839
249  ArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThrArgGlyLeuPheProGlyProSerArgArgThr  268

840  CTAGGAGCCCCGGACATTTCCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCAACCTC  899
269  LeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeu  288
```

FIG 11B

```
 900  CAGCCTGGATATTCTCCTTCCCCAACCCATCCTCCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCT   959
 289  GlnProGlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPhePro   308

 960  CTTCCACCCACCTTGCCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCCTGCTTCCTGACCCTTCT  1019
 309  LeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeuProAspProSer   328

1020  GCTCCAACGCCCACCCCTACCAGCCCTCTTCTAAACACATCCTACACCCACTCCCAGAAT  1079
 329  AlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsn   348

1080  CTGTCTCAGGAAGGGTAAGGTTCTCAGACACTGCCGACATCAGCATTGTCTCGTGTACAG  1139
 349  LeuSerGlnGluGlyEnd                                             353
1140  CTCCCTTCCCTGCAGGGCGCCCCTGGGAGACAACTGGACAAGATTTCCTACTTTCTCCTG  1199
1200  AAACCCAAAGCCCTGGTAAAAGGGATACACAGGACTGAAAAGGGAATCATTTTTCACTGT  1259
1260  ACATTATAAACCTTCAGAAGCTATTTTTTTAAGCTATCAGCAATACTCATCAGAGCAGCT  1319
1320  AGCTCTTTGGTCTATTTTCTGCA  1342
```

FIG 12A

```
1   GGGAGCCACGCCAGCAGACACCCCGGCCAGAATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTCGTG   60
                                    MetGluLeuThrGluLeuLeuLeuVal    9

61  GTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGTGAC  120
10  ValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCysAsp   29

121 CTCCGAGTCCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCCTTCACAGCAGACTGAGCCAG  180
30  LeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSerGln   49

181 TGCCCAGAGGTTCACCCTTTGCCTACACCTGTCCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGCTTG  240
50  CysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSerLeu   69

241 GGAGAATGGAAAACCCAGATGGAGGAGACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAGCAGTGACC  300
70  GlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaValThr   89

301 CTTCTGCTGGAGGGAGTGATGGCAGCACGGGGACAACTGGGACCCACTTGCCTCTCATCC  360
90  LeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSerSer  109

361 CTCCTGGGGCAGCTTTCTGGACAGGTCCGTCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTCCTT  420
110 LeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeuLeu  129

421 GGAACCCAGCTTCCTCCACAGGGCAGGACCACAGCTCACAAGGATCCCAATGCCATCTTC  480
130 GlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIlePhe  149

481 CTGAGCTTCCAACACCTGCTCCGAGGAAAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCAC  540
150 LeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysAspPheTrpIleValGlyAspLysLeuHis  169

541 TGCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGGATTCAGAGCCAA  600
170 CysLeuSerGlnAsnTyrTrpLeuTrpAlaSerGluValAlaAlaGlyIleGlnSerGln  189

601 GATTCCTGGTCTGCTGAACCAAACCTCCAGGTCCCTGGACCAAATCCCCGGATACCTGAA  660
190 AspSerTrpSerAlaGluProAsnLeuGlnValProGlyProAsnProArgIleProGlu  209

661 CAGGATACACGAACTCTTGAATGGAACTCGTGGACTCTTTCCTGGACCCTCACGCAGGAC  720
210 GlnAspThrArgThrLeuGluTrpAsnSerTrpThrLeuSerTrpThrLeuThrGlnAsp  229

721 CCTAGGAGCCCCGGACATTTCCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCAACCT  780
230 ProArgSerProGlyHisPheLeuArgAsnIleArgHisArgLeuProAlaThrGlnPro  249

781 CCAGCCTGGATATTCTCCTTCCCCAACCCATCCTCCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCC  840
250 ProAlaTrpIlePheSerPheProAsnProSerSerTyrTrpThrValTyrAlaLeuPro  269
```

FIG 12B

```
 841  TCTTCCACCCACCTTGCCCACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCCTGCTTCCTGACCCTTC   900
 270  SerSerThrHisLeuAlaHisProCysGlyProAlaProProProAlaSerEnd         289

 901  TGCTCCAACGCCCACCCCTACCAGCCCTCTTCTAAACACATCCTACACCCACTCCCAGAA   960
 961  TCTGTCTCAGGAAGGGTAAGGTTCTCAGACACTGCCGACATCAGCATTGTCTCGTGTACA  1020
1021  GCTCCCTTCCCTGCAGGGCGCCCCTGGGAGACAACTGGACAAGATTTCCTACTTTCTCCT  1080
1081  GAAACCCAAAGCCCTGGTAAAAGGGATACACAGGACTGAAAAGGGAATCATTTTTCACTG  1140
1141  TACATTATAAACCTTCAGAAGCTA  1164
```

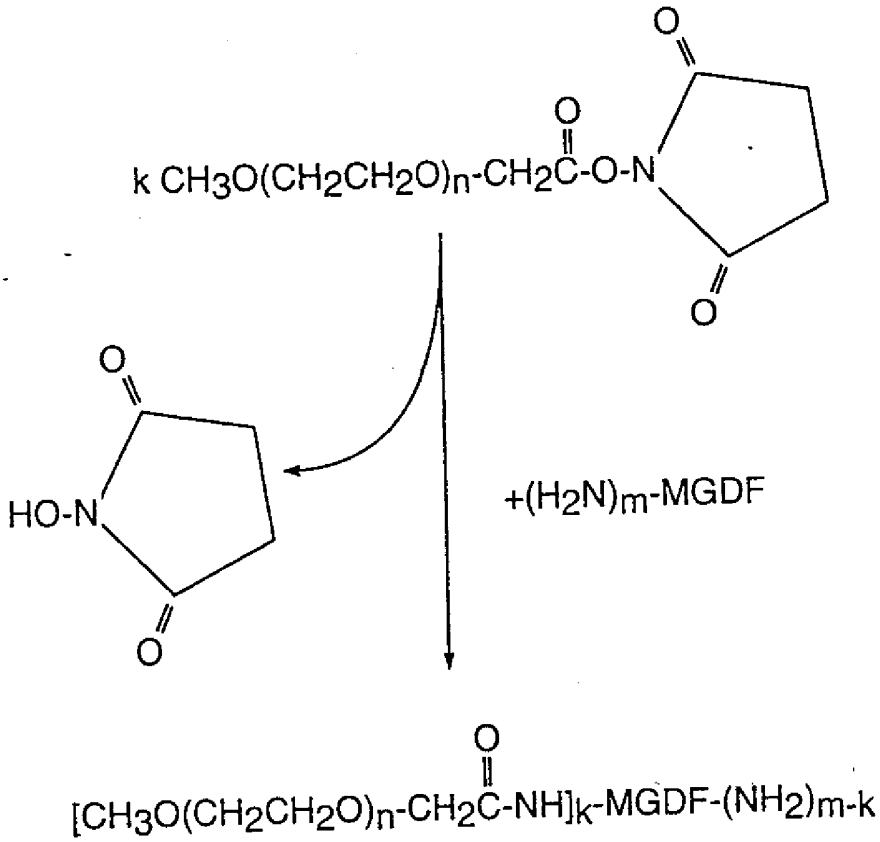
FIG 13A

```
canine   1 MELTELLLVVMLLLTARLDPCLPAPPACDPRLLNKMLRDSHVLHSRLSQC 50
           ||||||||||||||||||. : ||||||| |:|.|:|||||||||||||||
human    1 MELTELLLVVMLLLTARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQC 50

          51 PDIYPLSTPVLLPAVDFSLGEWKTQKEQTKAQDVWGAVALLLDGVLAARG 100
             |::.||.||||||||||||||||||.|:||||::|||.|||:||:|||||
          51 PEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARG 100

         101 QLGPSCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQGLLGTQLPPQGRTTTHKDPNAIFL 150
             ||||.|||||||||||||||||||:|||||||||||||.||||||||||
         101 QLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFL 150

         151 SFQQLLRGKVRFLLLVAGPTLCAKQSQPTTAVPTNTSLFLTLRKLPNRTS 200
             |||:||||||||||:||:|.|||.:...||||||..|||.|||..||||||
         151 SFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPSRTSLVLTLNELPNRTS 200

         201 GLLETNSSISARTTGSGLLKRLQGFRAKIPGLLNQTSRSLNQTPGHLSRT 250
             |||||| . |||||||||||: |||||||||||||||||||:|.||.|.|.
         201 GLLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRI 250

         251 HGPLNGTHGLLPGLSLTALGAPDIPPGTSDMDALPPNLWPRYSPSPIHPP 300
             |: ||||:||:|| |  .||||||..|||| :.||||| | |||||.|||
         251 HELLNGTRGLFPGPSRRTLGAPDISSGTSDTGSLPPNLQPGYSPSPTHPP 300

         301 PGQYTLFSPLPTSPTPQNPLQPPPPDPSA.TANSTSPLLIAAHPHFQNLS 349
             .||||||.  || |||  .|:|  ||||| |:..||||| ....| ||||
         301 TGQYTLFPLPPTLPTPVVQLHPLLPDPSAPTPTPTSPLLNTSYTHSQNLS 350

         350 QEE 352
             ||:
         351 QEG 353
```

FIG 13B

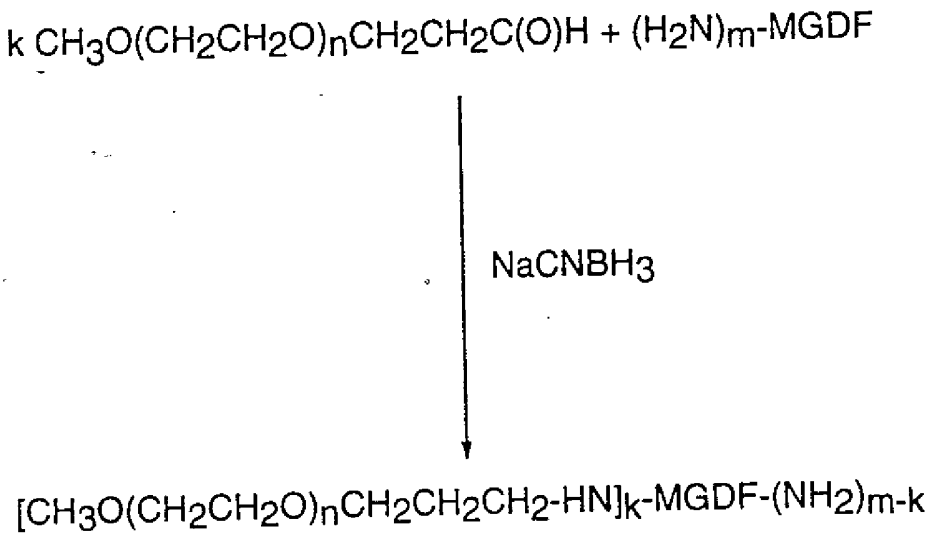
```
  1 MELTDLLLAAMLLAVARLTLSSPVAPACDPRLLNKLLRDSHLLHSRLSQC 50
    ||||:|||..||| .|||||||||.:|||| |:|.|||||||:|||||||||
  1 MELTELLLVVMLLLTARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQC 50

 51 PDVDPLSIPVLLPAVDFSLGEWKTQTEQSKAQDILGAVSLLLEGVMAARG 100
    |:|.||..|||||||||||||||||| |:.||||||||.||||||||||||
 51 PEVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILGAVTLLLEGVMAARG 100

101 QLEPSCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQGLLGTQLPLQGRTTAHKDPNALFL 150
    ||:|.|||||||||||||||||||:||||||| |||||||||||||:||
101 QLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRTTAHKDPNAIFL 150

151 SLQQLLRGKVRFLLLVEGPTLCVRRTLPTTAVPSSTSQLLTLNKFPNRTS 200
    |:|:|||||||||:||:|.||||||. |||||||.|| :||||.:||||||
151 SFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPSRTSLVLTLNELPNRTS 200

201 GLLETNFSVTARTAGPGLLSRLQGFRVKITPGQLNQTSRSPVQISGYLNR 250
    |||||||...|||.|.|||.: ||||.|| || ||||||| ||.||||||
201 GLLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKI.PGLLNQTSRSLDQIPGYLNR 249

251 THGPVNGTHGLFAGTSLQTLEASDISPGAFNKGSLAFNLQGGLPPSPSLA 300
    .|: :|||:|||:|.| .||:|.|||.|. :.|||: |||.|..|||. :
250 IHELLNGTRGLFPGPSRRTLGAPDISSGTSDTGSLPPNLQPGYSPSPTHP 299

301 PDGH.TPFPPSPALPTTHGSPPQLHPLFPDPSTTMPNSTAPHPVTMYPHP 349
    |.|: | || .|.||| ...|||||:||||.. |..|.| | |.|.
300 PTGQYTLFPLPPTLPT...PVVQLHPLLPDPSAPTPTPTSPLLNTSYTHS 346

350 RNLSQET 356
    .|||||.
347 QNLSQEG 353
```

圖 14



k，m 和n 都與圖15中所定義者相同。

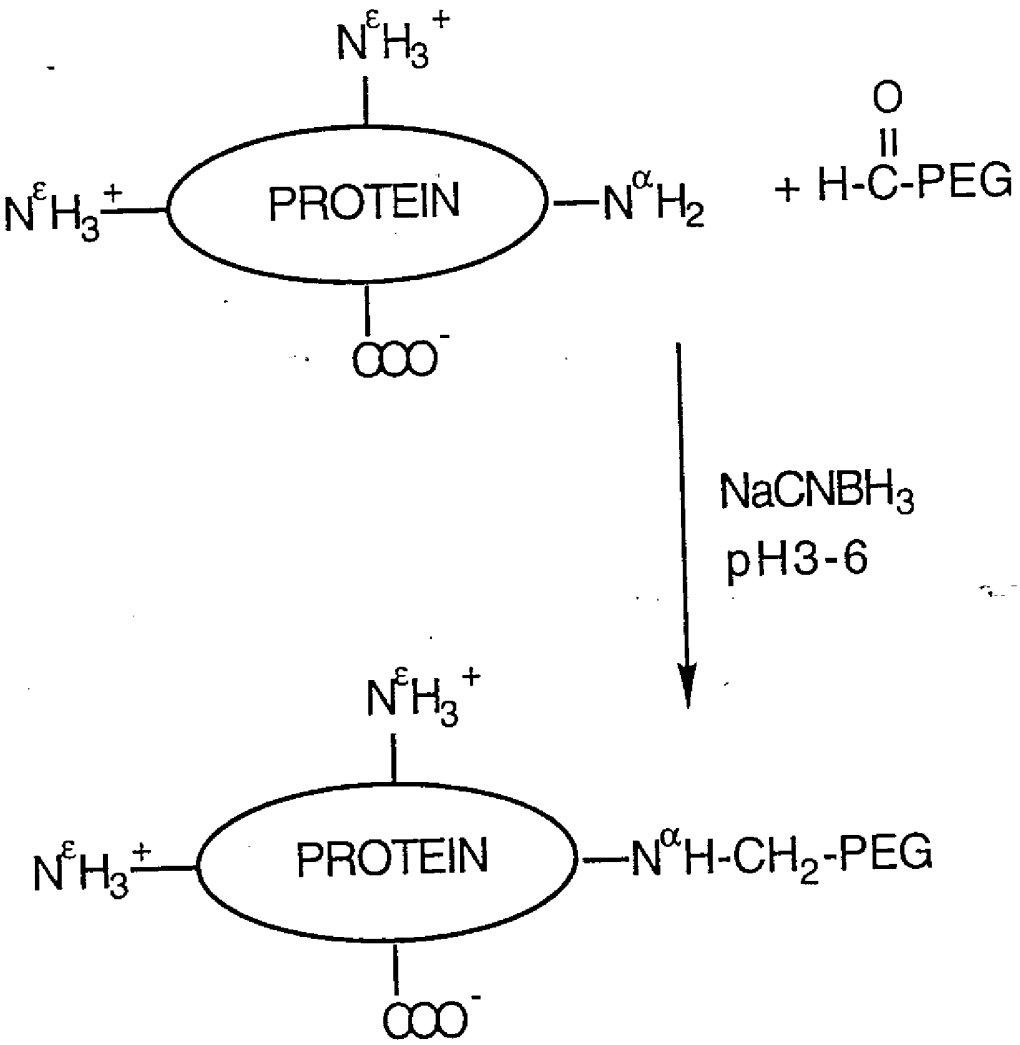
圖 15



k - 與一分子MGDF反應的PEG分子之數目

n - 反應中所用PEG的聚合度；
如，MW=100 kD的PEG，
n=2000，MW=2 kD的PEG，n=40。

m - 每MGDF分子所含一級胺基總數。


$N^{\varepsilon}H_3^+$
$N^{\varepsilon}H_3^+$
PROTEIN
$-N^{\alpha}H_2$
COO^-
O
II
+ H-C-PEG
$NaCNBH_3$
pH3-6
$N^{\varepsilon}H_3^+$
$N^{\varepsilon}H_3^+$
PROTEIN
$-N^{\alpha}H\text{-}CH_2\text{-}PEG$
COO^-

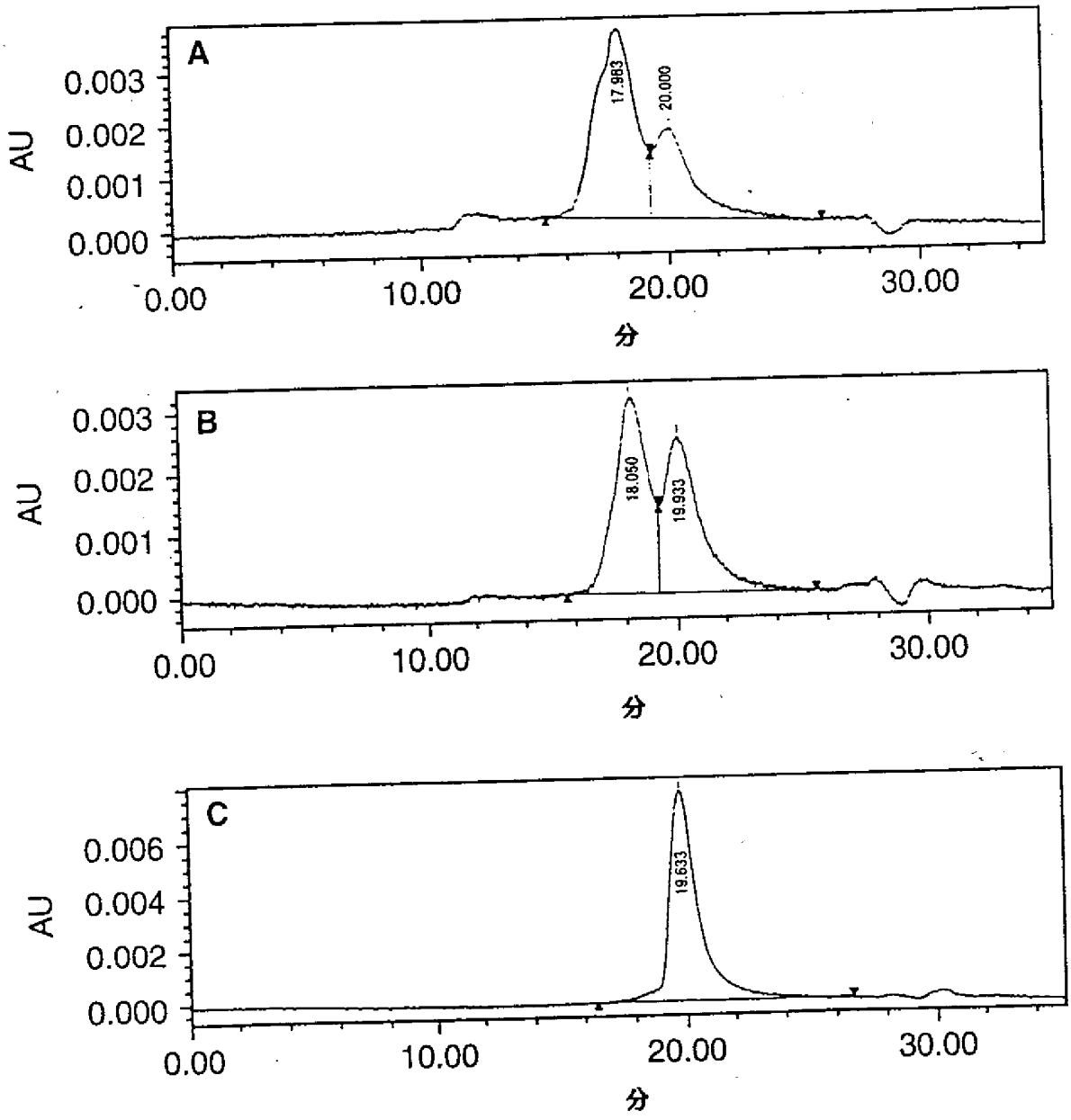

A
AU
0.003
0.002
0.001
0.000
17.983
20.000
0.00
10.00
20.00
30.00
分
B
AU
0.003
0.002
0.001
0.000
18.050
19.933
0.00
10.00
20.00
30.00
分
C
AU
0.006
0.004
0.002
0.000
19.633
0.00
10.00
20.00
30.00
分

圖 18

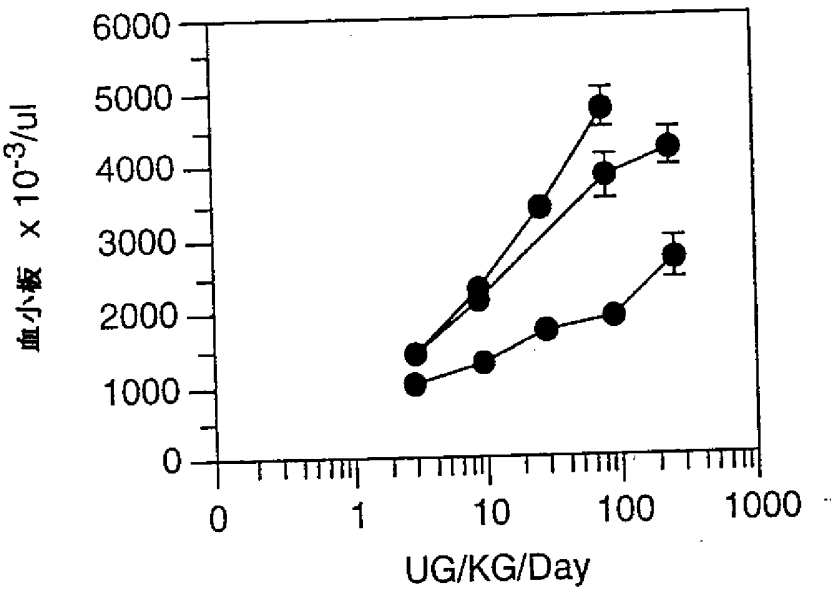

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
血小板 x 10-3/ul
0
1
10
100
1000
UG/KG/Day

圖 19

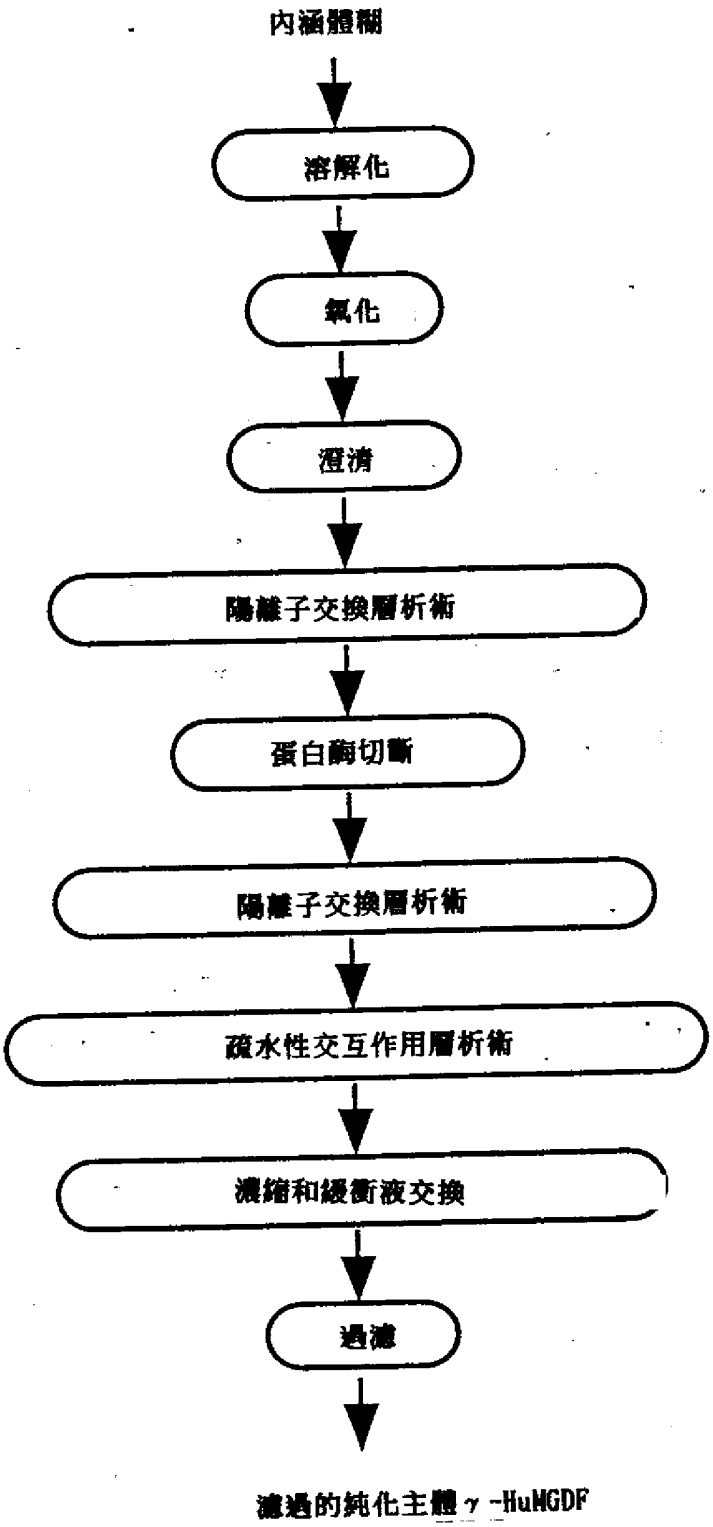

內涵體糊
溶解化
氧化
澄清
陽離子交換層析術
蛋白酶切斷
陽離子交換層析術
疏水性交互作用層析術
濃縮和緩衝液交換
過濾
濾過的純化主體γ-HuMGDF

圖 20

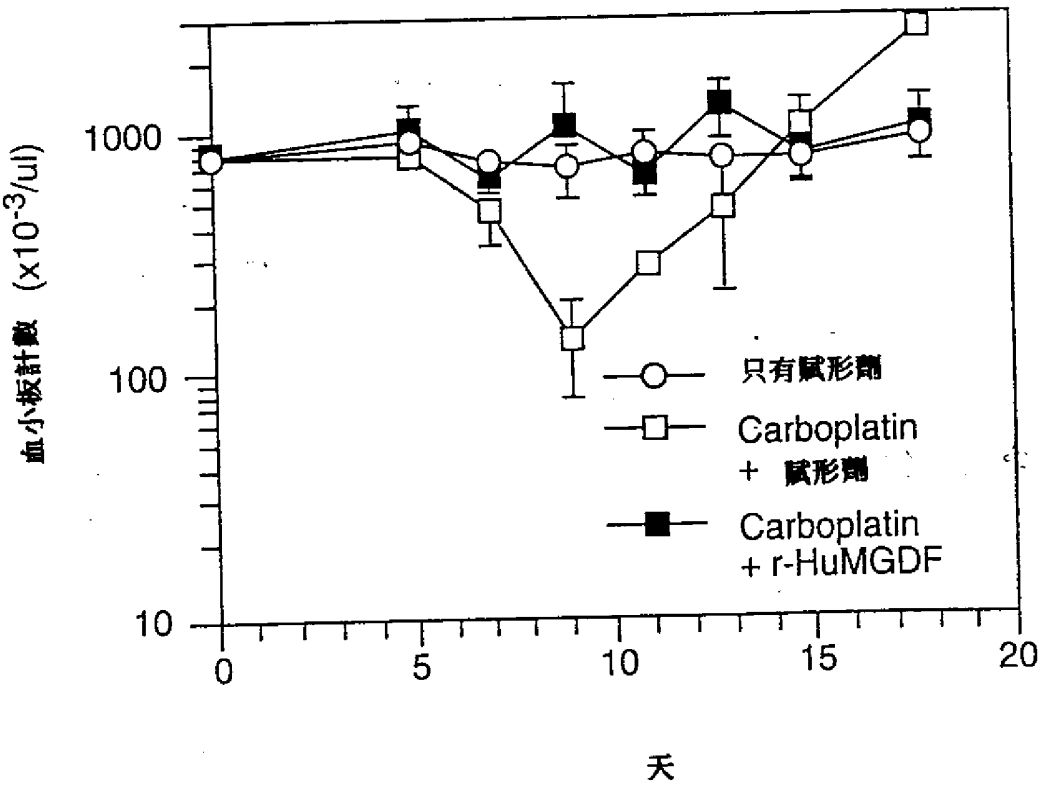

血小板計數 (x10-3/ul)
1000
100
10
0
5
10
15
20
只有賦形劑
Carboplatin
+ 賦形劑
Carboplatin
+ r-HuMGDF
天

圖 21

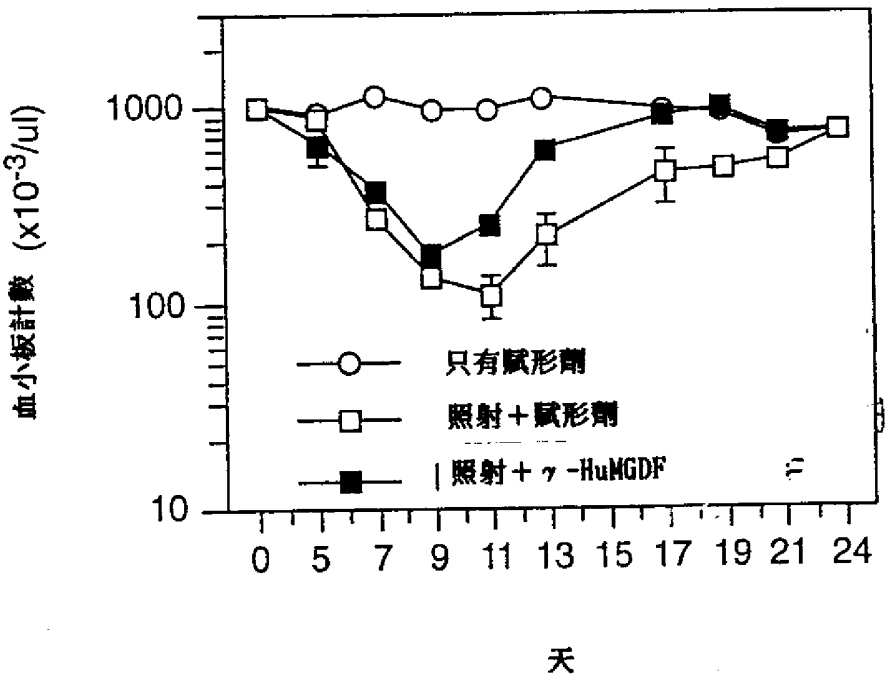

血小板計數 (x10^{-3}/ul)
1000
100
10
0 5 7 9 11 13 15 17 19 21 24
只有賦形劑
照射＋賦形劑
照射＋ヶ-HuMGDF
天

圖 22

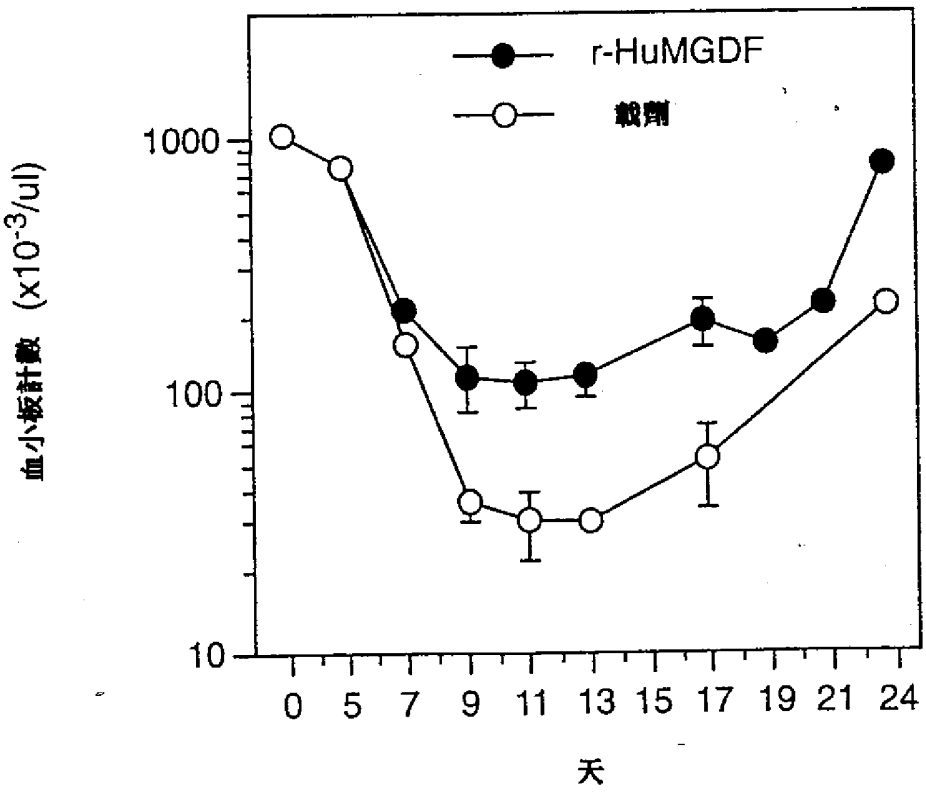


圖 23

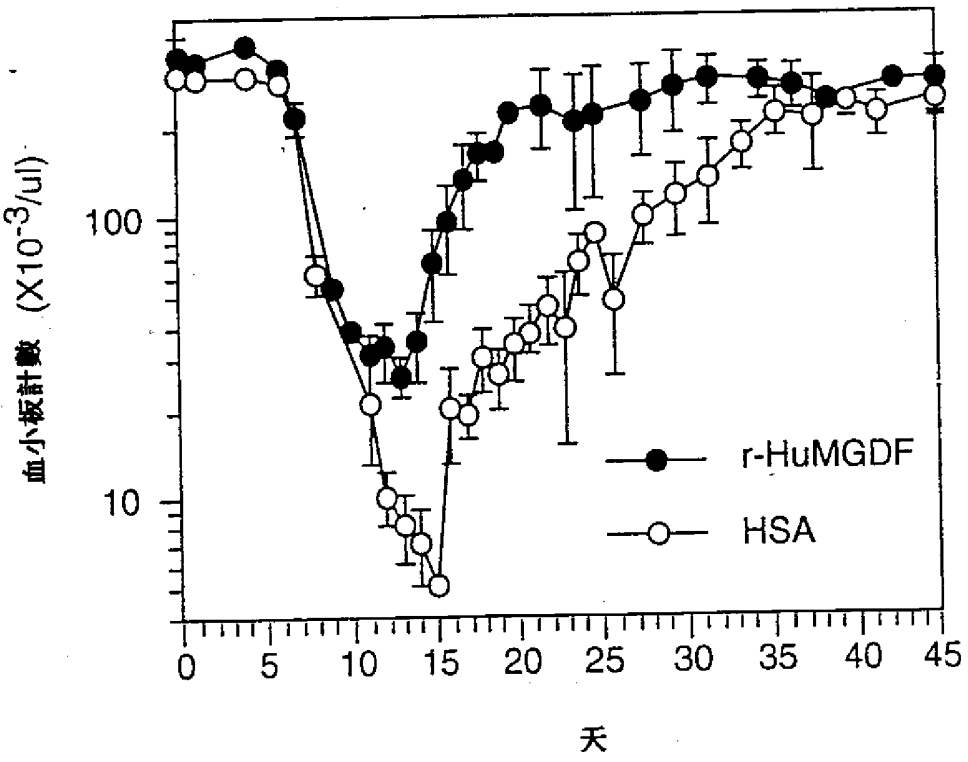
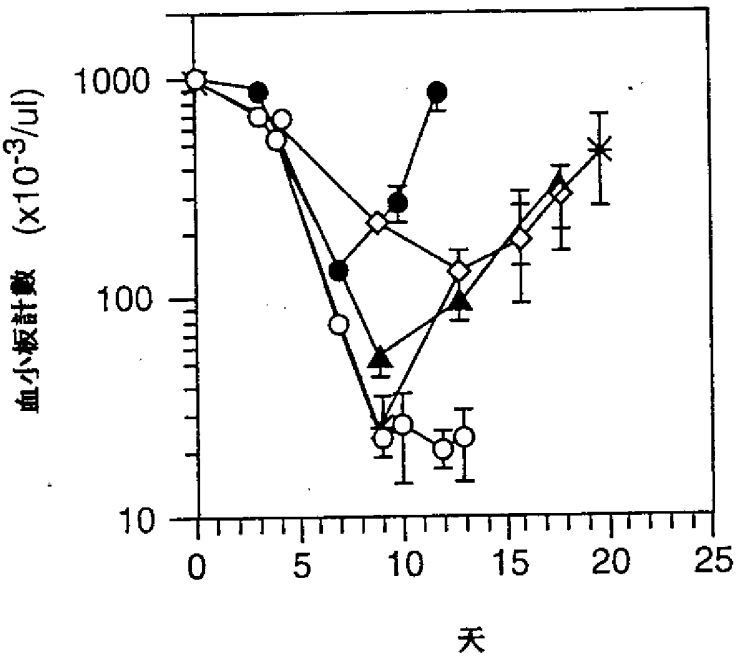


圖 24



大腸桿菌1-163(12kd dipeg) (PEG 22)

CHO 1-332

大腸桿菌1-163 (25kd monopeg) (PEG 17)

大腸桿菌1-163 (20kd monopeg) (PEG16)

對照

ATG AAA AGT CCT GCA CCA CCT GCA TGT GAT TTA CGG GTC CTG
MET LYS SER PRO ALA PRO PRO ALA CYS ASP LEU ARG VAL LEU

TCT AAA CTG CTG CGC GAC TCT CAC GTG CTG CAC TCT CGT CTG
SER LYS LEU LEU ARG ASP SER HIS VAL LEU HIS SER ARG LEU

TCC CAG TGC CCG GAA GTT CAC CCG CTG CCG ACC CCG GTT CTG
SER GLN CYS PRO GLU VAL HIS PRO LEU PRO THR PRO VAL LEU

CTT CCG GCT GTC GAC TTC TCC CTG GGT GAA TGG AAA ACC CAG
LEU PRO ALA VAL ASP PHE SER LEU GLY GLU TRP LYS THR GLN

ATG GAA GAG ACC AAA GCT CAG GAC ATC CTG GGT GCA GTA ACT
MET GLU GLU THR LYS ALA GLN ASP ILE LEU GLY ALA VAL THR

CTG CTT CTG GAA GGC GTT ATG GCT GCA CGT GGC CAG CTT GGC
LEU LEU LEU GLU GLY VAL MET ALA ALA ARG GLY GLN LEU GLY

CCG ACC TGC CTG TCT TCC CTG CTT GGC CAG CTG TCT GGC CAG
PRO THR CYS LEU SER SER LEU LEU GLY GLN LEU SER GLY GL

GTT CGT CTG CTG CTC GGC GCT CTG CAG TCT CTG CTT GGC ACC
VAL ARG LEU LEU LEU GLY ALA LEU GLN SER LEU LEU GLY THR

CAG CTG CCG CCA CAG GGC CGT ACC ACT GCT CAC AAG GAT CCG
GLN LEU PRO PRO GLN GLY ARG THR THR ALA HIS LYS ASP PRO

AAC GCT ATC TTC CTG TCT TTC CAG CAC CTG CTG CGT GGC AAA
ASN ALA ILE PHE LEU SER PHE GLN HIS LEU LEU ARG GLY LYS

GTT CGT TTC CTG ATG CTG GTT GGC GGT TCT ACC CTG TGC GTT
VAL ARG PHE LEU MET LEU VAL GLY GLY SER THR LEU CYS VAL

CGT CGG GCG CCG CCA ACC ACT GCT GTT CCG TCT TAA
ARG ARG ALA PRO PRO THR THR ALA VAL PRO SER STOP