



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201500053 A

(43)公開日：中華民國 104 (2015) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：103132289

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 08 月 25 日

(51)Int. Cl. : *A61K38/22 (2006.01)*

A61P11/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/08/27 日本

2008-217721

(71)申請人：大塚製藥股份有限公司 (日本) OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：殊才孝則 KOTOSAI, KOUNORI (JP)；桐間一嘉 KIRIMA, KAZUYOSHI (JP)；定
金惠子 SADAKANE, KEIKO (JP)；大本安一 OHMOTO, YASUKAZU (JP)；藪內
洋一 YABUUCHI, YOICHI (JP)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：3 項 圖式數：2 共 44 頁

(54)名稱

用於治療肺部疾病之藥劑 (二)

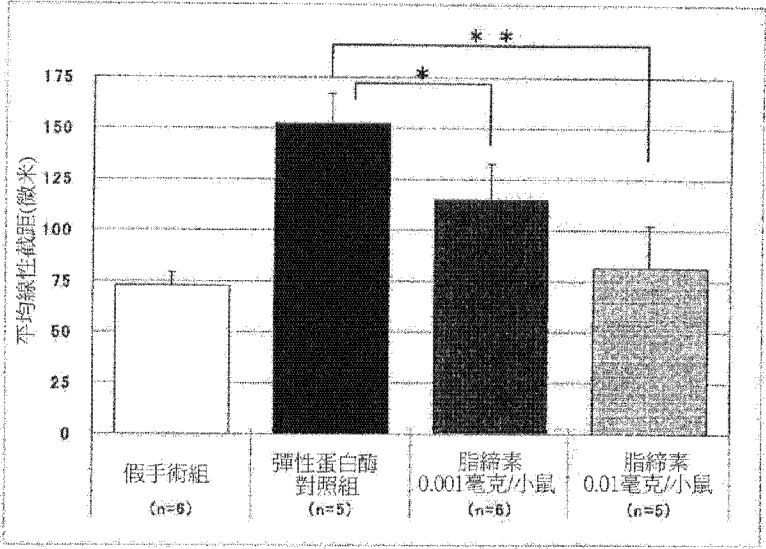
AGENT FOR TREATING PULMONARY DISEASE

(57)摘要

本發明提供用於抑制肺泡氣室擴張之一種含有脂締素(adiponectin)的藥劑或用於抑制肺泡壁破壞之一種含有脂締素的藥劑。本發明的肺部疾病治療劑係高度安全的藥物，其具有減少肺部功能惡化諸如氣流限制之極佳效用，及在治療伴隨不可逆性肺部功能惡化之肺部疾病方面展現極高的效用，及產生很少的不良副作用諸如噁心，嘔吐及胃酸分泌。

The present invention provides an agent for inhibiting alveolar airspace enlargement containing adiponectin or an agent for inhibiting alveolar wall destruction containing adiponectin. The pulmonary disease therapeutic agents of the present invention are highly safe drugs that possess an excellent effect of decreasing the deterioration of the pulmonary function, such as airflow limitation, and exhibit an extremely high effect of treating pulmonary disease accompanied by irreversible deterioration in pulmonary function, with fewer adverse side effects such as nausea, vomiting and gastric acid secretion.

第 1 圖



(平均值±標準偏差) * : $P<0.05$, ** : $P<0.01$ (唐奈特氏(Dunnett)檢定)

發明摘要

※ 申請案號：

107132289 (由98128513分割)

※ 申請日：

98.8.15

※IPC 分類：

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用於治療肺部疾病之藥劑(二)

AGENT FOR TREATING PULMONARY DISEASE

【中文】

本發明提供用於抑制肺泡氣室擴張之一種含有脂締素(adiponectin)的藥劑或用於抑制肺泡壁破壞之一種含有脂締素的藥劑。本發明的肺部疾病治療劑係高度安全的藥物，其具有減少肺部功能惡化諸如氣流限制之極佳效用，及在治療伴隨不可逆性肺部功能惡化之肺部疾病方面展現極高的效用，及產生很少的不良副作用諸如噁心，嘔吐及胃酸分泌。

【英文】

The present invention provides an agent for inhibiting alveolar airspace enlargement containing adiponectin or an agent for inhibiting alveolar wall destruction containing adiponectin. The pulmonary disease therapeutic agents of the present invention are highly safe drugs that possess an excellent effect of decreasing the deterioration of the pulmonary function, such as airflow limitation, and exhibit an extremely high effect of treating pulmonary disease accompanied by irreversible deterioration in pulmonary function, with fewer adverse side effects such as nausea, vomiting and gastric acid secretion.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

用於治療肺部疾病之藥劑(二)

AGENT FOR TREATING PULMONARY DISEASE

【技術領域】

發明領域

本發明係有關於用於治療肺部疾病之一藥劑，其抑制與慢性損傷所造成的肺泡壁破壞性變化相關聯之異常肺泡氣室擴張及/或抑制肺泡壁的破壞性變化。

【先前技術】

發明背景

已知的各種肺部疾病(PD)包括歸因於病毒或細菌所引起成的急性發炎之急性支氣管炎；主要由歸因於嗜伊紅白血球的呼吸道發炎反應所引起之支氣管性氣喘；歸因於肺泡上皮發炎所引起之間質性肺炎；因癌細胞所引起之肺癌；及慢性阻塞性肺部疾病(COPD)，其係一種已知的疾病，其特徵在於因不同因素特別是吸煙所引起之肺部慢性發炎，導致肺泡壁破壞及支氣管黏膜腺體肥大而造成呼吸短促、咳嗽與痰之增加等。尤其，一種先前稱作肺氣腫的疾病通常併發不同程度之先前稱作慢性支氣管炎的疾病。現今，與該二疾病相關的阻塞性肺部疾病係稱作COPD。

COPD之特徵據說在於氣流限制之漸進式發展(呼吸道阻塞)(非專利文件1)。

不同於其中呼吸道的分泌過多與感染並不涉及氣流限制之慢性支氣管炎，不可逆性氣流限制被認為係起因於周邊呼吸道病灶。除了前述包括肺氣腫與慢性支氣管炎的慢性阻塞性肺部疾病之外，該等肺部疾病包括囊狀纖維化症、支氣管擴張症、結核病、肺塵埃沈著症等。

迄今，有關用於肺部疾病包括伴隨不可逆性氣流限制的COPD之藥物療法，係使用諸如 β 2-興奮劑、抗膽鹼藥劑等具有支氣管擴張活性之藥物，以暫時阻止或抑制症狀。然而，該等具有支氣管擴張活性的藥物無法長期減少肺部功能之惡化，而肺部功能係最重要的臨床指標。

許多大型的臨床研究已檢視以吸入劑形式使用對於細胞激素製造作用具有強力抑制效應的類固醇療法之效用；然而，數項文件曾報導類固醇無法長期減少肺部功能的惡化(見非專利文件2至4)。

有關使用對於活性氧的製造具有抑制性作用之藥物的PD療法之效應，尚未曾進行可靠的臨床研究。

依據一臨床研究，具有與抑制活性氧製造的藥劑類似之一作用機制的一種抗氧化劑N-乙醯半胱胺酸，被認為可減少COPD急性惡化的頻率(非專利文件5)。然而，並無文件曾報導N-乙醯半胱胺酸展現減少肺部功能惡化的長期效應。

此外，為治療PD，曾論及使用抑制磷酸二酯酶IV活性之藥物。然而，據報導該等藥物具有諸如噁心、嘔吐及胃酸分泌的不良副作用(非專利文件6)。

如上述，尚未研發出在作為治療慢性肺部疾病的一藥物及減少肺部功能的不可逆性惡化方面，亦即在抑制與慢性損傷所引起的肺泡壁破壞性變化相關聯之異常肺泡氣室擴張及/或抑制肺泡壁的破壞性變化方面，達到令人滿意的效能之藥物。

非專利文件1：Pauwell, R. A. 等人於期刊“Am. J. Respir. Crit. Care Med.” 2001年(163期)第1256-1276頁乙文

非專利文件2：Pauwels RA, Lodahl CG, Laitinen LA, Schouten JP, Postma DS, Pride NB等人於期刊“N. Engl. J. Med.” 1999年(340期)第1948-1953頁乙文

非專利文件3：Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K 於期刊“Lancet” 1999年(353期)第1819-1823頁乙文

非專利文件4：Burge PS, Calverley PM, Jones PW, Spencer S, Anderson JA, Maslen TK於期刊“BMJ” 2000年(320期)第1297-1303頁乙文

非專利文件5：C. Stey, J. Steurer, S. Bachmann, T. C. Medici, M. R. Tramer於期刊“Eur. Respir. J.” 2000年(16期)第253- 262頁乙文

非專利文件6：Peter J. Barnes於期刊“N. Engl. J. Med.”2000年(343期)第4號第269-280頁乙文

非專利文件7：Maeda, K. 等人，於期刊“Biocjem. Biophys. Res. Commun.” 1996年(221期)第286-289頁乙文

專利文件1：WO1996/39429

專利文件2：WO1999/21577

專利文件3：第3018186號日本專利

專利文件4：第4147220號日本專利

專利文件5：第2004-16074號日本未審核專利

【發明內容】

本發明之揭露內容

待本發明解決之問題

本發明的目標係提供適用於治療罹患肺部疾病及其肺部功能以不可逆方式惡化的一病患之一種高度安全的藥物。

解決問題之方式

本案發明者製備一種動物模式，其展現類似於伴隨不可逆性肺部功能惡化之COPD的臨床病理特性，及使用該動物模式進行詳盡的研究。結果，其等發現脂締素(adiponectin)抑制肺部肺氣腫及因彈性蛋白酶處理所造成的肺部功能疾患，已知脂締素係特別由脂肪細胞所分泌之一種類似膠原的分泌蛋白及在治療伴隨不可逆性肺部功能惡化的肺部疾病方面展現極高效用之一種高度安全的新穎治療劑，及具有很少的不良副作用諸如噁心、嘔吐及胃酸分泌。本發明係基於該等發現而完成。

本發明提供用於抑制肺泡氣室擴張之一種含有脂締素的藥劑，及用於抑制肺泡壁破壞之一種含有脂締素的藥劑。

第1項：一種用於抑制肺泡氣室擴張之藥劑，其包含脂締素。

第2項：如第1項之藥劑，其中脂締素的含量係有效抑

制與肺泡壁破壞性變化相關聯之肺泡氣室擴張。

第3項：如第1或2項之藥劑，其中脂締素的含量為0.01至70重量%。

第4項：如第1至3項中任一項之藥劑用於治療肺氣腫、慢性支氣管炎、囊狀纖維化症、支氣管擴張症、結核病、肺塵埃沈著症或慢性阻塞性肺部疾病之用途。

第5項：一種用於抑制肺泡壁破壞之藥劑，其包含脂締素。

第6項：如第5項之藥劑，其中脂締素的含量係有效抑制肺泡壁的破壞性變化。

第7項：如第5或6項中任一項之藥劑，其中脂締素的含量為0.01至70重量%。

第8項：如第5至7項中任一項之藥劑用於治療肺氣腫、慢性支氣管炎、囊狀纖維化症、支氣管擴張症、結核病、肺塵埃沈著症或慢性阻塞性肺部疾病之用途。

【圖式簡單說明】

第1圖係顯示脂締素對於因肺泡壁的進行性破壞性變化所造成之肺泡氣室擴張具有劑量依隨型抑制性活性之一圖。

第2圖顯示展現肺泡壁的進行性破壞性變化及脂締素對於進行性肺泡壁破壞的抑制性活性之組織切片。

【實施方式】

進行本發明之最佳模式

本發明用於抑制肺泡氣室擴張之藥劑的脂締素含量，

係有效抑制與肺泡壁破壞性變化相關聯之肺泡氣室擴張；及本發明用於抑制肺泡壁破壞之藥劑的脂締素含量，係有效抑制肺泡壁破壞。

脂締素係本發明用於抑制肺泡氣室擴張的藥劑或用於抑制肺泡壁破壞的藥劑之一活性成分，其係一種由脂肪細胞所分泌之類似膠原的蛋白質。

脂締素係本發明之用於抑制肺泡氣室擴張的藥劑或用於抑制肺泡壁破壞的藥劑(此後簡稱為“肺部疾病治療劑”)之一活性成分，其係一種可輕易取得及眾所周知的物質。商品化脂締素或藉由後述參考實例中所示的已知方法製備之脂締素，可通用於本發明中。

人類與小鼠的脂締素基因係如專利文件1中所揭露的人類Acrp30與小鼠Acrp30，而人類脂締素係如非專利文件7與專利文件2中所揭露的apM1。在本發明的肺部疾病治療劑中作為一活性成分之脂締素多肽的預計胺基酸序列係述於專利文件2中；然而，專利文件2僅提及該多肽對於平滑肌細胞生長之抑制性效應，及其作為用於預防或改善動脈硬化之一藥劑、用於預防或治療血管擴張術後的血管再狹窄化之一藥劑及一消炎藥劑之可利用性。

此外，專利文件3顯示脂締素作為一種消炎藥劑及一種用於類單核細胞的繁殖抑制劑之效用，其在巨噬細胞或淋巴細胞不存在下，抑制處於分化階段之比較成熟的骨髓類單核原始細胞之純系生長。此外，專利文件4教導脂締素的C-端側球域(對應於人類脂締素胺基酸序列的序列辨識編

號114至239及小鼠脂締素胺基酸序列的序列辨識編號111至242)，具有減少清道夫受體A的表現之效應，及可作為動脈硬化之一種預防與治療劑。同樣地，專利文件5提及脂締素的C-端側球域作為一種AMP活化型蛋白質激酶活化劑之可利用性。

下列脂締素可自拜爾凡德(Bio Vendor)公司以商品取得(捷克斯拉夫；<http://www.biovendor.com/products/proteins>)：球狀重組型脂締素(球狀人類(埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*))脂締素)、由埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)所製造之重組型脂締素(人類埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*))組胺酸脂締素)、由人類胚腎細胞所製造之重組型脂締素(人類HEK293 Flag脂締素)、由人類胚腎細胞所製造之三聚體重組型脂締素(人類脂締素三聚體形式(HEK))、由人類胚腎細胞所製造之低與高分子量脂締素(富含LMW與MMW寡聚物之人類脂締素(HEK))、由人類胚腎細胞所製造之中與高分子量脂締素(富含MMW與HMW寡聚物之人類脂締素(HEK))等。

在本發明的肺部疾病治療劑中作為一活性成分之多肽的特定實例係一種稱作“脂締素”之多肽，其係由PCR產物所編碼及示於後述實例中。人類脂締素的全長DNA序列之長度為4,517個鹼基對，及編碼一開放閱讀架構(ORF)的DNA序列之長度為732個鹼基對，如序列辨識編號2所示。由ORF所編碼的胺基酸序列係由244個胺基酸的序列所組成，如序列辨識編號1所示，及該基因序列已登錄為基因庫(GenBank)

登錄號NM_004797。此外，小鼠脂締素的全長DNA序列之長度為1,276個鹼基對，如序列辨識編號5所示，及編碼ORF的DNA序列之長度為741個鹼基對，如序列辨識編號4所示。由ORF所編碼的胺基酸序列係由247個胺基酸的序列所組成，如序列辨識編號3所示，及該基因序列已登錄為基因庫(GenBank)登錄號AF304466。此外，已辨識出對脂肪組織具專一性的人類與小鼠脂締素之基因表現。

人類脂締素與小鼠脂締素之間的胺基酸序列同源性為83.61%，而ORF的DNA序列同源性為79.78%。該顯著高的同源性水平意味著二者具有相同的活性。

本案發明者發現脂締素抑制與慢性損傷所引起的肺泡壁破壞性變化相關聯之異常肺泡氣室擴張，或展現藉由抑制肺泡壁破壞性變化所獲致之肺部功能改善，及其等的結論為脂締素可較佳地作為一藥物。

如上述，因脂締素可抑制與慢性損傷所引起的肺泡壁破壞性變化相關聯之異常肺泡氣室擴張，其可用於治療肺部疾病諸如肺氣腫、慢性支氣管炎、囊狀纖維化症、支氣管擴張症、結核病、肺塵埃沈著症及COPD。

專利文件1：WO1996/39429

專利文件2：WO1999/21577

非專利文件7：Maeda, K等人於期刊“B.B.R.C.”(1996年)第221期第2號第286-289頁乙文

現在陳述在本發明的肺部疾病治療劑中作為活性成分的脂締素之製造作用、使用脂締素作為一活性成分的肺部

疾病治療劑之製備作用等。

在本說明書中之胺基酸、肽、核苷酸序列、核酸等的縮寫係符合IUPAC-IUB所建議之命名法規則(期刊“Eur. J. Biochem.”第138期第9頁(1984年)之“**IUPAC-IUB生物命名法通訊**”乙文)、“草擬含有核苷酸序列或胺基酸序列資訊的說明書等之準則”(日本專利局編輯, 1998年7月)及相關技術領域的公約。

可藉由常規遺傳工程技術[如期刊“Science”第224期第1431頁乙文(1984年); 期刊“Biochem. Biophys. Res. Comm.”第130期第692頁乙文(1985年); 期刊“Proc. Natl. Acad. Sci., USA.”第80期第5990頁乙文(1983年)], 提供重組蛋白形式之脂締素。在該情況下, 可使用先前由本案發明者所建立之基因作為脂締素(apM1)基因[期刊“Biochem. Biophys. Res. Commun.”第221期第286-289頁乙文(1996年)]。

任擇地, 可依據由該基因所編碼的胺基酸序列之資訊, 藉由用於化學合成作用的習用方法, 製造脂締素。

可依據述於下列第1參考實例中之一方法, 藉由遺傳工程技術進行脂締素的製造作用。更詳細地, 該製造作用包括以編碼在宿主細胞中可表現的目標蛋白質之基因, 建構一重組型DNA, 將該DNA導入宿主細胞中以獲得一轉形體, 及培養該轉形體。

在說明書中, 聚核苷酸(DNA分子)不僅涵蓋雙股DNA, 亦涵蓋包括構成其等的訊息鏈與反訊息鏈之單股, 及不侷限於其長度。因此, 編碼脂締素的聚核苷酸包括含

有基因體DNA之雙股DNA、含有cDNA之單股DNA(訊息鏈)及具有與訊息鏈及其合成DNA片段互補的序列之單股DNA(反訊息鏈)，除非另外提及之。

聚核苷酸(DNA分子)在此並非由一功能區所界定，及可包括一表現抑制區、一編碼區、一引導序列、一外顯子與一內含子中之至少一者。

聚核苷酸亦包括RNA與DNA。包含特定的胺基酸序列之多肽及包含特定的DNA序列之聚核苷酸，係包括其片段、同源基因、衍生物及突變體。

聚核苷酸的突變體(突變體DNA)包括天然存在的對偶基因突變體、非天然存在的突變體及經歷刪除、取代、添加及插入作用的突變體。但是，該等突變體編碼的多肽所具有之功能，係與聚核苷酸在突變前所編碼的多肽之功能實質上相同。

多肽的突變作用(胺基酸序列的修飾作用)並非必定藉由天然存在者如突變作用或後轉譯修飾作用而發生，及可為該等藉由使用天然存在的蛋白質(如人類脂締素)而以人工方式製得者。上述的多肽突變體包括對偶基因變異體、同源基因及天然突變體，其與突變前的多肽之同源性至少為80%，較佳95%及更佳99%。

可藉由使用FASTA程式(Clustal, V.於期刊“Methods Mol. Biol.”第25期第307-318頁(1994年)乙文)測量，而分析多肽或聚核苷酸的同源性。就同源性分析之最佳與簡單的方法而言，該方法的可能例示係將序列儲存於電腦可讀取

的一媒體(如軟碟、CD-ROM、硬碟驅動器、外接硬碟、DVD等)，然後使用所儲存的序列，依據眾所周知的搜尋程序搜尋已知的序列資料庫。已知的序列資料庫之特定實例包括下列各者：

- 日本DNA資料庫(DDBJ)(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)；
- 基因庫 (Genbank)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/web/Genbank/Index.html>)；及
- 歐洲分子生物實驗室核酸序列資料庫(EMBL)(<http://www.ebi.ac.uk/ebidocs/embl/db.html>)。

嫻熟技藝者可取得用於同源性分析之眾多搜尋演算法。其中之一實例包括一種稱作BLAST之程式。在該程式中具有5個BLAST程序。其中之三個(BLASTN、BLASTX及TBLASTX)係設計用於檢核核苷酸序列。剩下二個係設計用於檢核蛋白質序列 (Coulson 於 期刊 “Trends in Biotechnology”第12期第76-80頁(1994年)乙文； Birren等人於期刊 “Genome Analysis”第1期第543-559頁(1997年)乙文)。

此外，在技藝中可取得用於分析所辨識的序列之附加程式，如一種序列排比程式及一種用於辨識分隔較遠的序列之程式。

突變體DNA係沈默(一突變的核酸序列所編碼之胺基酸殘基並未改變)，或對於其所的編碼胺基酸具保留性。保留性胺基酸取代作用之實例係如下所示。

原始胺基酸殘基
丙胺酸

保留性取代的胺基酸殘基
絲胺酸

精胺酸	離胺酸
天冬醯胺	穀胺醯胺或組胺酸
天門冬胺酸	穀胺酸
半胱胺酸	絲胺酸
穀胺醯胺	天冬醯胺
穀胺酸	天門冬胺酸
甘胺酸	脯胺酸
組胺酸	天冬醯胺或穀胺醯胺
異白胺酸	白胺酸或纈胺酸
白胺酸	異白胺酸或纈胺酸
離胺酸	精胺酸、天冬醯胺或穀胺酸
甲硫胺酸	白胺酸或異白胺酸
苯丙胺酸	甲硫胺酸、白胺酸或酪胺酸
絲胺酸	蘇胺酸
蘇胺酸	絲胺酸
色胺酸	酪胺酸
酪胺酸	色胺酸或苯丙胺酸
纈胺酸	異白胺酸或白胺酸

一般而言，編碼一個半胱胺酸殘基之一或多個密碼子影響該特定多肽的一個雙硫鍵。

一般認為影響蛋白質特性之胺基酸殘基取代作用包括下列各者：

a)以一親水性殘基取代一疏水性殘基，如以絲胺酸或蘇胺酸取代白胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸、纈胺酸或丙胺酸；

b)以半胱胺酸或脯胺酸取代半胱胺酸與脯胺酸以外的胺基酸殘基之取代作用；

c)以一個帶有負電的殘基如穀胺酸或天門冬胺酸取代帶有一正電側鏈的殘基如離胺酸、精胺酸或組胺酸；及

d)以不具有側鏈的胺基酸殘基如甘胺酸取代具有一個非常大的側鏈之胺基酸殘基如苯丙胺酸。

脂締素包含序列辨識編號1或3的胺基酸序列，或包含在序列辨識編號1或3的胺基酸序列中具有一或多個胺基酸刪除、插入、取代或添加作用之胺基酸序列，及具有抑制肺泡氣室擴張的活性及/或改善肺部功能的效用。

脂締素可為藉由基因重組技術在如後述實例所示之使用埃舍利希氏大腸桿菌(*Escherichiacoli*)的一種蛋白質表現系統或使用桿狀病毒(AcNPV)的一種蛋白質表現系統中表現之多肽，或為藉由化學合成所製得之多肽。

就脂締素之胺基酸序列的特定實例而言，可能由序列辨識編號1或3例示。脂締素的胺基酸序列並非侷限於序列辨識編號1或3中之一者，而可為該等具有一特定同源性者(同源者)。該等同源者可包括含有在序列辨識編號1或3的胺基酸序列中具有一或多個胺基酸刪除、插入、取代或添加作用的胺基酸序列之多肽，及具有抑制肺泡氣室擴張的活性及/或抑制肺泡壁破壞的活性，及具有改善肺部功能的效用(抑制與慢性損傷所引起的肺泡壁破壞性變化相關聯之異常肺泡氣室擴張之活性及/或抑制肺泡壁的破壞性變化之活性)。

特別地，脂締素改善肺部功能的效用，係包括改善或降低哺乳動物諸如人類之肺呼吸量的減少或呼吸道(特別是支氣管肺泡管道)呼吸阻力的增加之效用。

就宿主細胞而言，可使用衍生自真核生物與原核生物之細胞。真核細胞包括脊椎動物的細胞與真核微生物的細胞。就脊椎動物的細胞而言，通常使用猴細胞系COS(期刊

“Cell”第23期第175頁(1981年)乙文)、中國倉鼠卵巢細胞系及對應的二氫葉酸還原酶缺陷型細胞系(期刊“Proc. Natl. Acad. Sci., USA.”第77期第4216頁(1980年)乙文)等，但其等並非唯一的選擇。

就源自脊椎動物的表現載體而言，一般可使用具有一個位於待表現的基因上游的啓動子序列、RNA(前體)剪接位址、一個多聚腺苷酸化位址及一個轉錄作用終止序列之載體。若需要，該載體可進一步具有一個複製起始點。就該表現載體之一實例而言，可提及包含一個SV40的早期啓動子之pSV2dhfr(期刊“Mol. Cell. Biol.”第1期第854頁(1981年)乙文)。

就真核微生物而言，一般使用酵母菌。其中，較佳使用酵母菌屬(*Saccharomyces*)的酵母菌。就衍生自真核微生物諸如酵母菌之表現載體而言，可使用具有用於酸性磷酸酶基因的一啓動子之pAM82(期刊“Proc. Natl. Acad. Sci., USA.”第80期第1頁(1983年)乙文)。

就原核宿主而言，一般使用埃舍利希氏大腸桿菌(*Escherichia coli*)與枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)。當其等作為宿主及使用在宿主微生物中可複製的一質體載體時，可適宜地使用藉由納入一啓動子與SD(Shain與Dalgarano)序列及一個在基因上游起始蛋白質合成作用所需的起始密碼子(如ATG)所製得之一表現質體，藉此該基因可在該載體中表現。就該埃舍利希氏大腸桿菌(*Escherichia coli*)作為宿主而言，一般使用埃舍利希氏大腸桿菌(*E.coli*)K12，及一般使

用pBR322或其修飾產物作為載體。然而，其等並非唯一的選擇，可依類似方式使用各種已知的細菌品系及載體。可使用的啟動子實例為色胺酸(trp)啟動子、lpp啟動子、lac啟動子及PL/PR啟動子。

就用於昆蟲細胞的載體而言，可以其中已納入脂締素cDNA之一種桿狀病毒載體(Takara)例示。特別地，可藉由使用蠶的核多角體病毒(BmNPV)，將其中已納入脂締素cDNA的桿狀病毒表現載體導入所培養的BmN4細胞或蠶(桑蠶(*Bombyxmori*))的幼蟲中表現，及藉由層析法自培養基或蠶體液中分離，而得本發明的表現產物。

亦可藉由將脂締素的cDNA納入苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*)的核多角體病毒(AcNPV)、秋夜盜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的Sf9細胞或粉斑夜蛾(*Trichoplusia ni*)的Tn5細胞中表現，及同樣地藉由層析法，自培養上清液純化而得本發明的表現產物。

可依據已知方法，將所產生的重組型DNA導入宿主細胞，以進行轉形作用。

可依據標準方法培養所得的轉形體，藉此在細胞內、細胞外或在細胞膜上表現與製造(累積或分泌)標的重組型蛋白質。就用於培養的培養基而言，可依據所用的宿主細胞，適宜地選擇與使用通常所用的各種培養基。亦可在適於宿主細胞生長的條件下，進行培養。

若需要，可藉由利用其物理、化學及其他特性的各種分離程序，而分離與純化依上述方式所製得的脂締素(由日

本東京Kagaku Dojin, K.K.公司於1980年6月23日出版之“生化數據書(Biochemical Data Book)II”第一版首刷第1175-1259頁；期刊“Biochemistry”第25期(第25號)第8274頁(1986年)乙文；期刊“Eur. J. Biochem.”第163期第313頁(1987年)乙文等)。更詳細地，該分離與純化作用可藉由習用的重建處理；以一種蛋白質沈澱(鹽析)劑處理；離心作用；滲透壓衝擊方法；音波處理；超過濾；不同類型的液相層析法諸如分子篩層析法(凝膠過濾)、吸附層析法、離子交換層析法、親和層析法、高效液相層析法(HPLC)等；及單一或組合使用之透析作用而達成。

任擇地，亦可藉由以胺基酸序列資訊為基礎之通用的化學合成方法，製造上所提及的脂締素。該方法包括肽合成作用中所用之習用的液相與固相方法。更詳細地，該等方法中之各者包括所謂的逐步延伸技術，其包含依據胺基酸序列資訊將組成胺基酸一個接一個地縮合，以進行鏈伸長作用；及片段縮合作用技術，其包含事先合成各由數個胺基酸殘基所組成之肽片段，及依據該資訊將其等一個接一個地偶合在一起。

亦可依據標準方法，進行肽合成作用中所用的一種縮合方法。標準方法的實例包括疊氮法、混合型酸酐法、DCC法、活性酯法、氧化與還原法、DPPA(二苯基磷醯基疊氮化物)法、DDC+添加劑(1-羥基苯并三唑、N-羥基琥珀醯亞胺、N-羥基-5-降莖烯-2,3-二甲醯亞胺)方法及伍華德(Woodward)方法。

可用於該等方法中之溶劑，可適宜地選自眾所周知用於形成肽的縮合反應中之溶劑。其實例包括N,N-二甲基甲醯胺(DMF)、二甲基亞砷(DMSO)、六磷醯胺、二呋烷、四氫呋喃(THF)、乙酸乙酯等及其混合物。

在上述的肽合成反應之際，一般可藉由酯化作用，以諸如甲基酯、乙基酯與特-丁基酯之低級烷基酯形式及諸如苄基酯、對-甲氧基苄基酯與硝甲氧基苄基酯之芳烷基酯形式，保護未涉及該反應的胺基酸或肽的羧基。

在側鏈具有一官能基之胺基酸諸如酪胺酸殘基中的羥基，可被乙醯基、苄基、苄氧基羰基、特-丁基等保護，雖然該保護作用並非必定必需的。

此外，精胺酸殘基的胍基可被一個適宜的保護基諸如硝基、甲苯磺醯基、對-甲氧基苯磺醯基、亞甲基-2-磺醯基、苄氧基羰基、異冰片氧基羰基或金鋼烷氧基羰基保護。

自被保護的胺基酸或肽或自最終蛋白質除去該等保護基之反應，可依據通用方法諸如催化性還原作用方法或使用液態氨/鈉金屬、氟化氫、溴化氫、氯化氫、三氟乙酸、乙酸、甲酸、或甲磺酸等之方法進行。

依此方式所製得的脂締素可藉由各種方法純化，諸如使用離子交換樹脂、分配層析及凝膠層析之方法，及肽化學領域中通常所用之逆流分布法。

本發明的肺部疾病治療劑包含脂締素或其藥學上可接受的鹽類作為一活性成分。該鹽類包括該等與鹼金屬、鹼土金屬及銨之鹽類，諸如鈉、鉀、鋰、鈣、鎂、鋇及銨鹽。

可藉由技藝中眾所周知的方法製造該等鹽類。上所提及的鹽類進一步包括酸加成鹽類，其可依已知方式，藉由將脂締素與一適宜的有機或無機酸反應而製備。酸加成鹽類的實例為氫氯酸鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、硫酸氫鹽、乙酸鹽、草酸鹽、戊酸鹽、油酸鹽、月桂酸鹽、硼酸鹽、苯甲酸鹽、乳酸鹽、磷酸鹽、對-甲苯磺酸鹽(甲苯磺酸鹽)、檸檬酸鹽、順丁烯二酸鹽、反丁烯二酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、磺酸鹽、羥乙酸鹽、抗壞血酸鹽、苯磺酸鹽、萘磺酸鹽及類似鹽類。

本發明的肺部疾病治療劑一般係以含有一藥學上有效量的活性成分及一種適宜的藥學載劑之一種藥學製劑形式提供與使用。

可用於該等藥學製劑中之載劑包括各種的稀釋劑及/或賦形劑，諸如填料、增量劑、黏合劑、保濕劑、崩散劑、表面活性劑、潤滑劑等。依據所得配方之一單位劑型，選擇性地使用該等載劑。

依據治療目的，自各種形式中選擇藥學製劑的單位劑型。典型的實例包括固態形式諸如錠劑、丸劑、粉劑、細粉劑、粒劑與膠囊，及液態形式諸如液劑、懸液劑、乳劑、糖漿劑與酏劑。該等製劑係依投藥途徑分類為口服製劑、非經腸製劑、經鼻製劑、陰道製劑、直腸栓劑、舌下錠、軟膏等，及各可藉由常規藥學程序配製與模製或以其他方式加工處理。而且，該藥學製劑可含有可配製於一般藥學製劑中之各種添加劑，諸如安定劑、殺細菌劑、緩衝劑、

等張劑、螯合劑、pH值控制劑及表面活性劑。

安定劑包括人類血清蛋白與該等L-胺基酸、糖類及纖維素衍生物。其等可各單獨使用，或與一種表面活性劑等組合使用。尤其，該一組合物可助於增強活性成分的安定性。

對於L-胺基酸並無特別限制，及包括甘胺酸、半胱胺酸、穀胺酸等。

對於糖類並無特別限制，但包括單糖諸如葡萄糖、甘露糖、半乳糖與果糖；糖醇類諸如甘露糖醇、肌醇與木糖醇；雙糖諸如蔗糖、麥芽糖與乳糖；及多糖諸如葡聚糖、羥丙基澱粉、硫酸軟骨素與透明質酸；及其衍生物。

對於表面活性劑並無特別限制，及可使用離子性與非離子性表面活性劑。表面活性劑的實例為聚乙二醇脫水山梨糖醇烷基酯、聚氧乙烯烷基醚、脫水山梨糖醇單酯基酯及脂肪酸甘油酯。

對於纖維素衍生物並無特別限制，但包括甲基纖維素、乙基纖維素、羥基乙基纖維素、羥基丙基纖維素、羥基丙基甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉等。

可使用至少約0.0001毫克的糖類，及較佳位於每1微克活性成分約0.01至約10毫克之範圍內。可使用至少約0.00001毫克的表面活性劑，及較佳位於每1微克活性成分約0.0001至約0.01毫克之範圍內。可使用至少約0.0001毫克的人類血清蛋白，及較佳位於每1微克活性成分約0.001至約0.1毫克之範圍內。可使用位於每1微克活性成分約0.001

至約10毫克的範圍內之胺基酸。可使用至少約0.00001毫克的纖維素衍生物，及較佳位於每1微克活性成分約0.001至約0.1毫克之範圍內。

本發明之藥學製劑中的活性成分含量可適宜地選自一寬廣的範圍。適宜的活性成分量典型地約為0.00001至約70重量%，及較佳約為0.0001至約5重量%。

可選擇性地納入藥學製劑中之緩衝劑包括硼酸、磷酸、乙酸、檸檬酸、 ϵ -胺基己酸、穀胺酸及對應的鹽類(如與鹼金屬或鹼土金屬之鹽類諸如鈉、鉀、鈣與鎂鹽)。等張劑包括氯化鈉、氯化鉀、糖類與甘油。螯合劑包括乙二胺四乙酸鈉與檸檬酸。

可將本發明的藥學製劑製成一種液態製劑，及此外可製成藉由冷凍乾燥藥學配方所製得之冷凍乾燥劑型，其係藉由溶於含鹽的緩衝劑中而製備一適宜使用的濃度。

將本發明的藥學組成物模製成錠劑形式時，所使用之載劑可為各種賦形劑諸如乳糖、蔗糖、氯化鈉、葡萄糖、尿素、澱粉、碳酸鈣、高嶺土、結晶纖維素、矽酸及鉀磷酸鹽；黏合劑諸如水、乙醇、丙醇、單糖漿劑、葡萄糖溶液、澱粉溶液、明膠溶液、羧甲基纖維素、羥基丙基纖維素、甲基纖維素及聚乙烯基吡咯烷酮；崩散劑諸如羧甲基纖維素鈉、羧甲基纖維素鈣、低取代的羥基丙基纖維素、無水澱粉、褐藻酸鈉、洋菜粉、昆布糖粉、碳酸氫鈉及碳酸鈣；表面活性劑諸如聚氧乙烯脫水山梨糖醇脂肪酸酯、月桂基硫酸鈉與硬脂酸單甘油酯；崩散抑制劑諸如蔗糖、

硬脂、可可脂及氫化油；吸收促進劑諸如季銨鹼與月桂基硫酸鈉；保濕劑諸如甘油與澱粉；吸附劑諸如澱粉、乳糖、高嶺土、斑脫土與膠態矽酸；及潤滑劑諸如精製滑石、硬脂酸鹽類、硼酸粉劑與聚乙二醇。

而且，若需要，可使用習用塗料塗覆所製得的錠劑，以提供糖衣錠、膠衣錠、腸衣錠、膜衣錠或雙層或多層錠劑。

當製備丸劑時，所使用之載劑可為賦形劑諸如葡萄糖、乳糖、澱粉、可可脂、氫化植物油、高嶺土與滑石；黏合劑諸如阿拉伯膠粉劑、黃蓍樹膠粉劑、明膠與乙醇；及崩散劑諸如昆布糖與洋菜。

一般而言，可依據一常用方法，藉由將活性成分與上所提及的載劑混合，將前者封入一硬式明膠膠囊、軟式明膠膠囊等中，而製備膠囊。

用於口服投藥的液態製劑包括液劑、乳劑、懸液劑、糖漿劑及酏劑。可使用一種習用的惰性稀釋劑，例如包括水在內之一種藥學上可接受的載劑，而製備各者。該液態製劑可進一步補加各種助劑諸如潤濕劑、乳化劑及/或懸浮劑，及可藉由常規程序製備。

用於非經腸投藥的液態製劑，例如一種無菌的含水或非水液劑、乳劑或懸液劑，可藉由使用一種稀釋劑諸如水、乙醇、丙二醇、聚乙二醇、乙氧基化異硬脂醇、聚氧基化異硬脂醇、聚乙氧基化脫水山梨糖醇脂肪酸酯及植物油諸如橄欖油而製備。該液態製劑可補加一種可注射或輸注的

有機酯，諸如油酸乙酯。該製劑可進一步補加助溶劑、緩衝劑、潤濕劑、乳化劑、懸浮劑、防腐劑、分散劑及其他添加劑。

該藥學製劑可藉由過濾通過細菌過濾器、納入殺細菌劑、輻照處理、熱處理等而滅菌。此外，該藥學製劑可各以無菌固態組成物的形式提供，其可溶於無菌水或一種適宜的可滅菌式培養基以進行即席的滅菌作用。

可使用載劑諸如聚乙二醇、可可脂、高級醇、高級醇酯、明膠及半合成甘油酯，製備直腸栓劑與陰道製劑。

可使用如白石蠟脂、石蠟、甘油、纖維素衍生物、丙二醇、聚乙二醇、聚矽氧、斑脫土及植物油諸如橄欖油之一或多種稀釋劑，製備軟膏諸如糊劑、乳霜劑與凝膠劑。

可依習用方式使用一或多種眾所周知的標準賦形劑，而製備用於經鼻或舌下投藥的藥學製劑。

而且，若需要，本發明的藥學製劑可添加著色劑、防腐劑、香料、調味料、甜味劑或其他藥學組成物。

對於該藥學製劑的投藥方法並無限制，但依據劑型、病患年齡、性別及其他條件及疾病狀態而選擇。例如錠劑、丸劑、液劑、懸液劑、乳劑、粒劑及膠囊係以口服方式投藥。注射液係以靜脈內方式單獨或與一般的輸注液諸如葡萄糖與胺基酸混合投藥；及若需要，可以肌內、皮內、皮下或腹膜內方式單獨投藥。栓劑係以直腸內方式投藥。陰道製劑係在陰道內投藥，鼻用製劑係在鼻內投藥，舌下製

劑係在口腔內投藥，而軟膏係以經皮方式局部投藥。

為將本發明的活性成分製成一粉劑形式，可依據常用方法將成分磨碎。例如，可使用乳糖、澱粉等磨碎該活性成分，然後攪拌而得一均質混合物。

就投藥方法而言，肺部投藥作用(吸入作用)係優於口服投藥作用，因為肺泡為治療之標的器官，及可能直接導向受損的肺泡組織位址，而避免普遍性副作用。

對於本發明的治療劑中之脂締素含量並無限制，及可適宜地選自一寬廣範圍。藥學組成物中的脂締素含量一般約為0.01至約70重量%，較佳約0.1至約50重量%，及更佳約0.3至約30重量%。

對於該藥學製劑與劑量中的活性成分含量並無特別限制，但可依據所欲的治療效用、投藥方法、治療期間及病患年齡、性別及其他條件而選自一寬廣範圍。所選擇的劑量通常使得活性成分的血液濃度較佳約為0.1至約500微克/毫升，及更佳約為1至約50微克/毫升。該製劑可一次投藥，或在一天中分成數個劑量投藥。

依據使用方法、病患年齡、性別及其他條件及疾病嚴重性，而適宜地選擇本發明的治療劑之劑量。通常，脂締素的量可為約0.1微克至約20毫克。

本發明之效用

本發明用於抑制肺泡氣室擴張之含有脂締素的藥劑或用於抑制肺泡壁破壞之含有脂締素的藥劑，具有減少肺部功能惡化諸如氣流阻塞之極佳效用，及在治療伴隨不可逆

性肺部功能惡化的肺部疾病方面非常有效。

本發明用於抑制肺泡氣室擴張之含有脂締素的藥劑或用於抑制肺泡壁破壞之含有脂締素的藥劑係一種高度安全的藥物，其具有很少的不良副作用諸如噁心、嘔吐、胃酸分泌等。

第1製備實例

藉由在0.01 M檸檬酸-檸檬酸鈉緩衝劑(pH值為6.0)中添加與混合100微克/毫升的人類脂締素(具有序列辨識編號1的胺基酸序列)、0.01毫克/毫升的吐溫(Tween)80(聚氧乙烯(20)脫水山梨糖醇單油酸酯；聚山梨酸酯(Polysorbate)80)、15毫克/毫升的葡聚糖40、0.1毫克/毫升的半胱胺酸及1.0毫克/毫升的HSA(人類血清蛋白)，過濾該混合物(使用一個0.22微米的膜過濾器)，然後以無菌方式在管形瓶中注入1毫升的濾液，及進行冷凍乾燥，而製備本發明之藥學組成物的可注射配方形式。可藉由溶於1毫升的鹽水而使用該配方。

第2製備實例

藉由在各管形瓶的注射用蒸餾水中，添加10微克/0.1毫升的人類脂締素(具有序列辨識編號1的胺基酸序列)、5毫克的氧化半胱胺酸及1毫克的人類血清蛋白(HSA)，將管形瓶中所得的溶液加至1毫升及進行冷凍乾燥，而製備本發明之藥學組成物的可注射配方形式。

第3製備實例

藉由在10毫升的注射用蒸餾水中添加0.5毫克的脂締

素、80毫克的氯化鈉、20毫克的甘露糖醇、34.5毫克的鈉磷酸鹽及45毫克的PEG，接著進行無菌過濾作用，接著將1毫升的濾液注入無菌管形瓶中，及進行冷凍乾燥，而製備本發明之藥學組成物的可注射配方形式。

第1參考實例

重組型人類脂締素之製造

(1)人類脂締素在埃舍利希氏大腸桿菌(*Escherichia coli*)中之表現

1)人類脂締素之聚合酶鏈反應(PCR)

人類脂締素基因及藉此所編碼的胺基酸序列已分別以寄存編號NM_004797與D45371寄存在基因庫(GenBank)。編碼區(CDS)係如核苷酸序列的第27至第761序列所示。其所導譯的胺基酸序列係示於序列辨識編號1。在該序列中，第1至第14個殘基構成一訊息肽，及第15至第244個殘基代表成熟的人類脂締素。

使用大阪大學醫學院第二內科部的Funahashi博士所捐贈之質體作為模板，藉由PCR擴增人類脂締素基因。

設計及藉此以5'端的一個NdeI位址與3'端的一個BamHI位址擴增人類脂締素自第69至第761核苷酸序列的693鹼基對序列，使用自動化DNA合成儀製造PCR引子。PCR引子序列係示於序列辨識編號6(正向)及編號7(反向)。

2)人類脂締素(apM1)基因之次選殖作用

將上述步驟1)中所製得的PCR產物次選殖進入pT7布魯(Blue)T-載體(諾華基因(Novagen)公司)，及確認在其核苷

酸序列(pT7-apM1)中並無突變作用。

3)表現載體之建構作用

以 NdeI 與 BamHI 剪切表現載體 pET3c(諾華基因(Novagen)公司)，以獲得一個約4600鹼基對的片段。另一方面，以 NdeI 與 BamHI 剪切在上述步驟1)中所製得的 pT7-apM1，以獲得一個約700鹼基對的片段。將該等片段接合，及將依此方式所製得的表現載體命名為 pET3c-apM1。

4)在埃舍利希氏大腸桿菌(*Escherichia coli*)中之表現

以上述步驟3)所建構的 pET3c-apM1，進行宿主埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)品系 BL21(DE3) pLysS 之轉形作用，及在 2xT.Y.Amp.(胰蛋白胨16克、酵母菌萃取物10克及氯化鈉5克)中培養。當生物體進入對數生長階段時，添加 IPTG(異丙基基 β -D-硫代半乳糖苷)以誘發重組型人類脂締素(apM1)的製造作用。對於該IPTG誘發作用前後的埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)細胞及該IPTG誘發作用後的包涵體(埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)的不可溶部份)進行採樣，及經 SDS-PAGE 與西方墨點法處理，以確認人類脂締素之表現。

5)結果與討論

在埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)中依上述方式所製得的表現產物，係對應於¹⁵甘胺酸至²⁴⁴天冬醯胺之一個230殘基的蛋白質，其係除掉訊息序列之人類脂締素胺基酸序列及加上衍生自N-終端的起始密碼子之甲硫胺酸。

以 SDS-PAGE 分析上述程序所製得的埃舍利希氏大腸

桿菌(*E. coli*)。結果，可在埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)細胞及在IPTG誘發作用後的包涵體中確認一個約30kD的帶狀。

然後，使用二種抗體(多株抗體(合成肽))進行西方墨點法。二種抗體皆與該約30kD的帶狀反應，及完全未偵測到與宿主埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)之反應。

將上述約30kD的帶狀切除，以研究其在N終端的10個胺基酸殘基之序列。該序列係與所預期的序列相同，及發現在少數族群中已刪除N終端的甲硫胺酸。

上述結果清楚地顯示，重組型人類脂締素係表現為一種約30 kD的蛋白質。大部分所表現的重組型人類脂締素係以包涵體形式在細胞內累積。

(2)自埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)純化重組型人類脂締素(apM1)

藉由下列五個步驟之程序，進行自埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)之重組型人類脂締素純化作用。

1)埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)之培養

經表現載體pET3c-apM1轉形的埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)BL21(DE3) pLysS (諾華基因(Novagen)公司)，在2xT.Y.Amp.Cm.(胰蛋白胨16克、酵母菌萃取物10克、氯黴素25微克/毫升及氯化鈉5克)中預培養(37°C，振盪培養)。次日，該培養以100倍體積的2xT.Y.Amp.稀釋，及進一步培養。在培養2至3小時後，當培養液的OD550變成0.3至0.5時，添加IPTG至最終濃度為0.4 mM，以誘發重組型人類脂

締素(apM1)的製造作用。在添加IPTG後約3至5小時，將培養液離心(5000 rpm，20分鐘，4℃，及將依此方式所製得的埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)片狀沈澱物冷凍保存。

2)自埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)之包涵體製備作用

將埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)片狀沈澱物懸浮於50 mM Tris-HCl (pH值為8.0)中，及於37℃以溶菌酶處理1小時。然後添加Triton X-100 (Katayama Kagaku公司)至最終濃度為0.2%。該溶液進行音波處理(必能信(Branson)超音波細胞破碎儀，輸出控制為5，30秒)及離心(12000 rpm，30分鐘，4℃)，及回收片狀沈澱物。將該片狀沈澱物懸浮於補加50 mM Tris-HCl (pH值為8.0)之25毫升的0.2% Triton X-100中，及懸液劑進行音波處理(在如上的相同條件下)。

將所得的溶液離心，及以上述相同程序清洗片狀沈澱物。依此方式所製得的片狀沈澱物即作為包涵體。

3)包涵體之重新摺疊

以一少量的7M胍鹽酸鹽、100 mM Tris-HCl (pH值為8.0)及1% 2ME溶解該包涵體。將該溶液逐滴添加至200倍體積的2M尿素、20 mM Tris-HCl (pH值為8.0)中，加以稀釋，及讓其於4℃靜置三晚。

4)經重新摺疊的溶液之濃縮作用

將上述重新摺疊後的溶液離心(9000 rpm，30分鐘，4℃)，及藉由使用一種艾美康恩(Amicon) YM-10膜之超過濾作用，將上清液濃縮至約1/100。該濃縮物對20 mM Tris-HCl (pH值為8.0)透析，及將透析液過濾通過一個0.45微米

的過濾器。

5) DEAE-5PW陰離子交換 HPLC

將上述步驟4)所製得的試樣分離，及藉由使用DEAE-5PW(東曹株式會社(Tosoh Corporation))之陰離子交換高效液相層析法(HPLC)加以純化。使用20 mM Tris-HCl (pH值為7.2)作為起始緩衝劑，及在偵測280 nm吸光度下，以氯化鈉梯度(0至1M氯化鈉/60毫升)進行洗提。將洗提液分成1毫升的分液收集，及藉由SDS-PAGE分析各分液。

6)結果與討論

因為重組型人類脂締素(apM1)已在埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)中表現為一種包涵體形式，藉由溶解與重新摺疊包涵體而進行其純化作用。結果，將重組型人類脂締素溶解，及在陰離子交換管柱上分離。藉由SDS-PAGE分析高峰分液(第30至37號分液)。結果，觀察到一個約30kD的帶狀。在該分析中，在背景偵測到一個不明顯的彌散帶狀，但鑑於大部分的蛋白質被認為是重組型人類脂締素(apM1)，該約30kD的帶狀(重組型人類脂締素)在後續的兔與小鼠免疫接種作用中作為抗原，及作為本發明的肺部疾病治療劑之活性成分。

(3)抗人類脂締素多株與單株抗體之製備作用

1)多株抗體之製備作用

將100微克/個體的重組型人類脂締素以1：1比例與完全佐劑混合，及在二週期間以該混合物免疫接種五隻兔子八次，以獲得一種抗人類脂締素多株抗體(辨識碼為

OCT9101-OCT9105)。

2)單株抗體之製備作用

將20微克/個體的重組型人類脂締素以1：1比例與完全佐劑混合，及在二週期間以該混合物免疫接種小鼠三次。然後，在細胞融合之三天前，在無佐劑的情況下進行最後的免疫接種。藉由PEG方法，進行小鼠脾臟細胞與骨髓瘤細胞之間的細胞融合，及在HAT培養基中挑選融合瘤。

製造人類脂締素抗體之細胞系，係藉由使用經抗原(重組型人類脂締素)塗覆的免疫平皿之ELISA進行篩選，及藉由極限稀釋法選殖該融合瘤。

依上述方式，製得命名為KOCO9101-KOCO9111之11種製造抗人類脂締素抗體的融合瘤系。其中之一種融合瘤係於1998年6月8日(原始寄存日期)寄存(授與寄存者的辨識碼為KOCO9108)於日本國際貿易與產業部的國家生物科學與人類科技研究院(NIBH，日本茨城筑波市東1-1-3)，及依布達佩斯(Budapest)條約於1998年10月7日提出轉換寄存之要求。最後寄存的寄存編號為FERMBP-6542。

單株形式的融合瘤分別以腹膜內方式投藥至事先以降植烷(pristane)處理的小鼠中，及收集腹水(辨識碼為ANOC9101-9111)。

3)抗體之純化作用

分別使用一種蛋白質A管柱，純化兔抗血清(多株抗體)與小鼠腹水(單株抗體)。

4)人類脂締素於動物細胞中之表現

以EcoRI切除脂締素的cDNA，及插入表現載體pCIneo(普洛麥格公司(Promega Corp.))的EcoRI位址。使用LipofectAMINE(吉柏科(GIBCO BRL)公司)，以上述的pCIneo-人類脂締素轉染COS-1細胞(ATCC CRL1650)，及在72小時後採集培養上清液與細胞。

5)人類脂締素之西方墨點法

首先，以2ME(+)SDS-PAGE處理脂肪組織萃取物、COS-1細胞、COS-1細胞培養上清液、健康人類血漿及重組型人類脂締素，及轉移至一個硝基纖維素膜。

該膜與抗人類脂締素單株抗體(ANOC9104)反應，然後與具HRP標記的抗體反應，及以ECL(阿默舍姆(Amersham)公司之西方墨點偵測試劑)進行偵測。

結果，在脂肪組織萃取物、pCIneo-人類脂締素/COS-1細胞及健康人類血漿偵測到一個約35kD的帶狀，但在pCIneo/COS-1細胞或pCIneo/COS-1細胞培養上清液未觀察到。

在pCIneo-人類脂締素/COS-1細胞的培養上清液可確認一個35kD的帶狀，雖然其強度太弱而非可容易辨別的。

第2參考實例

將表現N終端組胺酸-標記融合小鼠脂締素的CHO細胞(第5號殖株)大規模培養，及收集所得的上清液。使用一種Ni-NTA樹脂，純化具組胺酸標記的脂締素。

第3參考實例

將如序列編號5所示之小鼠脂締素的全長DNA殖入一

表現載體中，及在埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)中表現，而提供大量之所表現的小鼠脂締素。將破碎的埃舍利希氏大腸桿菌(*E. coli*)之上清液施用至一個DEAE-瓊脂糖凝膠(Sepharose)開口管柱，及使用0M至1M的氯化鈉梯度進行洗提。然後收集洗提出的分液，及以30%飽和硫酸銨進行份化處理。將上清液施用至一個丁基-Toyopearl開口管柱，及以自30%至0%的飽和硫酸銨梯度進行洗提。最後，進行凝膠過濾作用，以純化小鼠脂締素。

第1例

使用因彈性蛋白酶處理而產生肺疾患之模式小鼠(C57BL/6J)，檢視脂締素對於特徵在於不可逆性氣流限制的慢性阻塞性肺部疾病之治療效用。

一旦模式小鼠的肺泡壁因在氣管內單次投予彈性蛋白酶而受到破壞之後，肺泡壁破壞作用長期地持續，使得肺氣腫病灶擴大(第2圖中之對照組)。該變化係由一般所用的評估指標平均線性截距(Dunnill, M. S.於期刊“Thorax”(1962年)第17期第320-328頁乙文)所示。藉由測量個別肺泡的尺寸而評估肺泡壁破壞程度。

因此，在模式小鼠中，彈性蛋白酶之處理造成肺泡壁的破壞，藉此造成肺泡直徑增大，其係相當於肺氣腫病灶與肺部功能受損。

在小鼠氣管內單次投予彈性蛋白酶造成肺泡壁的破壞及因而發生的血管毀損，而引發肺泡中之暫時性出血與嗜中性白血球浸潤；然而，該發炎作用在三天內消失。因此，

在實驗中可驗證脂締素的效用並非衍生自彈性蛋白酶抑制性作用。

如第1表所示，使用分層隨機法(賽仕電腦軟體日本分公司(SAS Institute Japan) R8.1版)，以體重為基礎將6或7週大的雌性小鼠(C57BL/6L，日本查爾斯河股份有限公司(Charles River Co.,Ltd.))分派至4個組(A至D，每一組6隻小鼠)。各小鼠經戊巴比妥麻醉處理。

第1表

組別	彈性蛋白酶處理	投予物質 (濃度)	脂締素劑量 (毫克/小鼠) (50 微升)	小鼠 數目
A	未進行	-	-	6
B	進行	生理鹽 溶液	-	6
C	進行	脂締素 (0.02 毫克/毫升)	0.001	6
D	進行	脂締素 (0.2 毫克/毫升)	0.01	6

之後，使用一噴霧器(潘恩世紀股份有限公司(Penn Century Inc.)之產品)，將生理鹽溶液(由大塚(Otsuka)製藥股份有限公司所製造之大塚(Otsuka)生理鹽液)與人類嗜中性白血球彈性蛋白酶(由彈力素產品股份有限公司(Elastin Products Co., Inc.)所製造)，以50微升/小鼠的體積，經由喉而以氣管內投藥方式分別投藥至A組小鼠及B至D組的小鼠。彈性蛋白酶的劑量為20單位/小鼠。自氣管內投予彈性蛋白酶之三天後開始，每天以氣管內投藥方式對於C組小鼠以0.001毫克/小鼠之劑量及對於D組小鼠以0.01毫克/小鼠

之劑量投予脂締素一次，共投藥18天。將上述第2參考實例所製得之衍生自CHO細胞的小鼠脂締素溶於一溶劑(50 mM Tris-HCl (pH值為8.0) 0.5M氯化鈉)，而製得投藥用的脂締素。以一適宜量的生理鹽溶液，將脂締素稀釋至0.2毫克/毫升或0.02毫克/毫升之使用濃度。將各濃度的溶液分成每日劑量單位，及於-20℃冷凍保存直至投藥日。在使用時，將冷凍溶液解凍。在彈性蛋白酶對照組(B組)中，在相同期間投予生理鹽溶液以取代脂締素。在吸入異氟烷的麻醉作用下，使用一噴霧器，經由喉將50微升/小鼠的體積之脂締素或生理鹽溶液以氣管內方式投藥至小鼠。在18天之連續的氣管內投藥作用後，各小鼠在吸入異氟烷的麻醉作用下，自腹主動脈流血而安死。將肺摘除，及以10%中性緩衝的福馬林溶液進行灌注固定。固定後的肺組織然後在生物病理股份有限公司(Bio Pathology Institute Co., Ltd)進行石蠟包埋、薄層切片、曼森氏(Masson)三色染色法及HE染色法。藉由測量平均線性截距而評估病理組織，平均線性截距係肺泡損傷的一客觀指標。

使用公式 $Lm = N \times L / m$ ，計算平均線性截距(Lm)，其中 N 為橫線數目， L 為一橫線長度，及 m 為與該橫線相交的肺泡壁總數。

統計分析

為檢視藥物活性，藉由比較彈性蛋白酶對照組(B組)與C及D組而進行唐奈特氏(Dunnett)檢定。各檢定係依據雙尾檢定進行，及顯著水準設於5%。使用SAS軟體(賽仕電腦軟

體日本分公司(SAS Institute Japan) R8.1版)進行檢定。結果示於第1圖。

在B組所測得的線性截距為 152.5 ± 14.7 微米，而在C組為 115.2 ± 17.3 微米及在D組為 81.7 ± 20.4 微米。依據脂締素劑量驗證顯著的抑制性活性(平均值 $\pm$ 標準偏差， $P < 0.05$)。在A組中，線性截距為 73.0 ± 6.6 微米。

結果揭示，脂締素之連續肺部投藥作用具有減少因彈性蛋白酶處理所造成的平均線性截距增加之劑量依隨型活性。

特別地，確認脂締素的連續投藥作用抑制因肺泡壁的進行性破壞性變化所造成之肺泡氣室擴張。

第2圖顯示展現肺泡壁的進行性破壞性變化之組織切片。其揭示在領受脂締素的連續投藥作用之組別(C與D組)中，進行性肺泡壁破壞受到抑制的程度明顯高於對照組(B組)，及該抑制性活性在D組中較高。

特別地，確認脂締素的連續投藥作用抑制肺泡壁破壞性變化之發展。

【符號說明】

(無)

【生物材料寄存】

(無須寄存)

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列清單

<110> 大塚製藥股份有限公司(OTSUKA PHARMACEUTICAL CO.,LTD.)
<120> 用於治療肺部疾病之藥劑
<130> 20096B
<150> JP 2008-217721
<151> 2008-08-27
<160> 7
<170> 專利申請軟體 PatentIn 3.1 版

<210> 1
<211> 244
<212> PRT
<213> 智人(homo sapiens)
<400> 1

Met	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Pro	Gly	His
1				5					10					15	
Asp	Gln	Glu	Thr	Thr	Thr	Gln	Gly	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Pro
			20					25					30		
Lys	Gly	Ala	Cys	Thr	Gly	Trp	Met	Ala	Gly	Ile	Pro	Gly	His	Pro	Gly
		35					40					45			
His	Asn	Gly	Ala	Pro	Gly	Arg	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly	Thr	Pro	Gly	Glu
	50					55				60					
Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Ile
65					70					75				80	
Gly	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Pro	Arg	Gly	Phe	Pro	Gly
			85					90						95	
Ile	Gln	Gly	Arg	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Val	Tyr	Arg
			100					105					110		
Ser	Ala	Phe	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Thr	Tyr	Val	Thr	Ile	Pro	Asn	Met
		115				120						125			
Pro	Ile	Arg	Phe	Thr	Lys	Ile	Phe	Tyr	Asn	Gln	Gln	Asn	His	Tyr	Asp
	130					135					140				
Gly	Ser	Thr	Gly	Lys	Phe	His	Cys	Asn	Ile	Pro	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Phe
145					150					155					160
Ala	Tyr	His	Ile	Thr	Val	Tyr	Met	Lys	Asp	Val	Lys	Val	Ser	Leu	Phe
				165					170					175	
Lys	Lys	Asp	Lys	Ala	Met	Leu	Phe	Thr	Tyr	Asp	Gln	Tyr	Gln	Glu	Asn
		180						185					190		
Asn	Val	Asp	Gln	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	His	Leu	Glu	Val	Gly
		195				200						205			
Asp	Gln	Val	Trp	Leu	Gln	Val	Tyr	Gly	Glu	Gly	Glu	Arg	Asn	Gly	Leu
	210					215					220				
Tyr	Ala	Asp	Asn	Asp	Asn	Asp	Ser	Thr	Phe	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Tyr
225					230					235					240
His	Asp	Thr	Asn												

<210> 2
<211> 735
<212> DNA



<213> 智人(homo sapiens)
<220>
<221> CDS
<308> 基因庫(Genbank)編號 D45371
<400> 2

atgctgttgc	tgggagctgt	tctactgcta	ttagctctgc	ccgggcatga	ccaggaaacc	60
acgactcaag	ggcccggagt	cctgcttccc	ctgcccgaagg	gggcctgcac	aggttggatg	120
gcgggcatcc	cagggcatcc	gggccataat	ggggccccag	gccgtgatgg	cagagatggc	180
acccttggtg	agaaggggtga	gaaaggagat	ccaggctctta	ttgggtcctaa	gggagacatc	240
ggtgaaaccg	gagtaccggg	ggctgaagggt	ccccgaggct	ttccgggaat	ccaaggcagg	300
aaaggagAAC	ctggagaagg	tgcctatgta	taccgctcag	cattcagtgt	gggattggag	360
acttacgtta	ctatcccca	catgcccatt	cgctttacca	agatcttcta	caatcagcaa	420
aaccactatg	atggctccac	tggtaaattc	cactgcaaca	ttcctgggct	gtactacttt	480
gcctaccaca	tcacagtcta	tatgaaggat	gtgaagggtca	gcctcttcaa	gaaggacaag	540
gctatgctct	tcacctatga	tcagtaccag	gaaaataatg	tggaccaggc	ctccggctct	600
gtgctcctgc	atctggagggt	gggcgaccaa	gtctgggtcc	agggtgtatgg	ggaaggagag	660
cgtaatggac	tctatgctga	taatgacaat	gactccacct	tcacaggctt	tcttctctac	720
catgacacca	actga					735

<210> 3
<211> 247
<212> PRT
<213> 小鼠
<400> 3

Met	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Ile	Leu	Pro	Ser	His
1				5				10						15	
Ala	Glu	Asp	Asp	Val	Thr	Thr	Thr	Glu	Glu	Leu	Ala	Pro	Ala	Leu	Val
			20					25					30		
Pro	Pro	Pro	Lys	Gly	Thr	Cys	Ala	Gly	Trp	Met	Ala	Gly	Ile	Pro	Gly
			35				40					45			
Ile	Pro	Gly	Ile	His	Val	Gly	Thr	Pro	Gly	Arg	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly
	50					55				60					
Thr	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Asp	Ala	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro
65				70				75						80	
Lys	Gly	Glu	Thr	Gly	Asp	Val	Gly	Met	Thr	Gly	Ala	Glu	Gly	Pro	Arg
			85				90						95		
Gly	Phe	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Arg	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala
			100				105						110		
Tyr	Val	Tyr	Arg	Ser	Ala	Phe	Ser	Val	Gly	Leu	Glu	Thr	Arg	Val	Thr
	115					120						125			
Val	Pro	Asn	Val	Pro	Ile	Arg	Phe	Thr	Lys	Ile	Phe	Tyr	Asn	Gln	Gln
	130				135					140					
Asn	His	Tyr	Asp	Gly	Ser	Thr	Gly	Lys	Phe	Tyr	Cys	Asn	Ile	Pro	Gly
145			150					155						160	
Leu	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Tyr	His	Ile	Thr	Trp	Met	Lys	Asp	Val	Lys	Val
			165					170					175		
Ser	Leu	Phe	Lys	Lys	Asp	Lys	Ala	Val	Leu	Phe	Thr	Tyr	Asp	Gln	Tyr
			180				185						190		
Gln	Glu	Lys	Asn	Val	Asp	Gln	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	His	Leu
	195					200						205			
Glu	Val	Gly	Asp	Gln	Val	Trp	Leu	Gln	Val	Tyr	Gly	Asp	Gly	Asp	His
	210				215					220					
Asn	Gly	Leu	Tyr	Ala	Asp	Asn	Val	Asn	Asp	Ser	Thr	Phe	Thr	Gly	Phe
225					230					235					240

Leu Leu Tyr His Asp Thr Asn
245

<210> 4
<211> 744
<212> DNA
<213> 小鼠
<220>
<221> CDS
<400> 4

atgctactgt	tgcaagctct	cctgttcctc	ttaatcctgc	ccagtcattgc	cgaagatgac	60
gttactacaa	ctgaagagct	agctcctgct	ttgggtccctc	cacccaaggg	aacttgtgca	120
ggttggatgg	caggcatccc	aggacatcct	ggccacaatg	gcacaccagg	ccgtgatggc	180
agagatggca	ctcctggaga	gaagggagag	aaaggagatg	caggtcttct	tggtcctaag	240
ggtagagacag	gagatgittg	aatgacagga	gctgaagggc	cacggggctt	ccccggaacc	300
cctggcagga	aaggagagcc	tggagaagcc	gcttatgtgt	atcgctcagc	gttcagtgtg	360
gggctggaga	cccgcgtcac	tgttcccaat	gtacccattc	gctttactaa	gatcttctac	420
aaccaacaga	atcattatga	cggcagcact	ggcaagtctt	actgcaacat	tccgggactc	480
tactacttct	cttaccacat	cacgggtgtac	atgaaagatg	tgaagggtgag	cctcttcaag	540
aaggacaagg	ccgttctctt	cacctacgac	cagtatcagg	aaaagaatgt	ggaccaggcc	600
tctggctctg	tgctcctcca	tctggagggtg	ggagaccaag	tctggctcca	gggtgatggg	660
gatggggacc	acaatggact	ctatgcagat	aacgtcaacg	actctacatt	tactggcttt	720
cttctctacc	atgataccaa	ctga				744

<210> 5
<211> 1276
<212> DNA
<213> 小鼠
<220>
<221> CDS
<222> (39) ... (782)
<400> 5

ctctaaagat	tgtcagtggga	tctgacgaca	ccaaaagggc	tcaggatgct	actgtttgcaa	60
gctctcctgt	tcctctttaat	cctgcccagt	catgccgaag	atgacgttac	tacaactgaa	120
gagctagctc	ctgcttttgt	ccctccaccc	aagggaactt	gtgcaggttg	gatggcaggc	180
atcccaggac	atcctggcca	caatggcaca	ccaggccgtg	atggcagaga	tggcactcct	240
ggagagaagg	gagagaaagg	agatgcagggt	cttctttgggtc	ctaagggtga	gacaggagat	300
gtttggaatga	caggagctga	agggccacgg	ggcttccccg	gaaccccttg	caggaaagga	360
gagcctggag	aagccgctta	tatgtatcgc	tcagcgttca	gtgtggggct	ggagacccgc	420
gtcactgttc	ccaatgtacc	cattcgcttt	actaagatct	tctacaacca	acagaatcat	480
tatgacggca	gcactggcaa	gttctactgc	aacattccgg	gactctacta	cttctcttac	540
cacatcacgg	tgtacatgaa	agatgtgaag	gtgagcctct	tcaagaagga	caaggccgtt	600
ctcttcacct	acgaccagta	tcaggaaaag	aatgtggacc	aggcctcttg	ctctgtgctc	660
ctccatctgg	aggtgggaga	ccaagtctgg	ctccagggtg	atggggatgg	ggaccacaat	720
ggactctatg	cagataacgt	caacgactct	acatttactg	gctttcttct	ctaccatgat	780
accaactgac	tgcaactacc	catagcccat	acaccaggag	aatcatggaa	cagtcgacac	840
actttcagct	tagttttgaga	gattgatatt	attgcttagt	ttgagagtcc	tgagtattat	900
ccacacgtgt	actcacttgt	tcattaaacg	actttataaa	aaataatttg	tgttcctagt	960
ccagaaaaaa	aggcactccc	tggctctccac	gactcttaca	tggtagcaat	aacagaatga	1020
aaatcacatt	tggatatggg	gcttcacaat	attcgcatga	ctgtctggaa	gtagaccatg	1080
ctatttttct	gtcactgtga	cacaaatatt	gttcacataa	accctataat	gtaaatatga	1140
aatacagtga	ttactcttct	cacaggctga	gtgtatgaat	gtctaaagac	ccataagtat	1200
taaagtggta	gggataaatt	ggaaaaaaa	aaaaaaaaa	agaaaaactt	tagagcacac	1260
tggcgccgt	tactag					1276

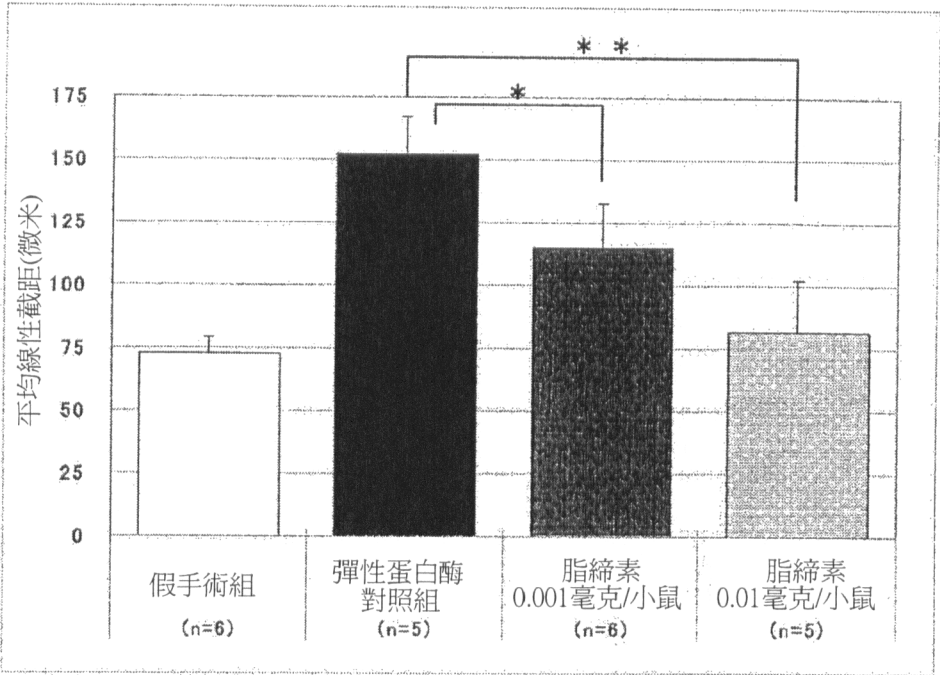
<210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<223> 寡核苷酸作為用於脂締素的引子(正向)序列
<400> 6
aacatatggg gcatgaccag gaaaccacg 29

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<223> 寡核苷酸作為用於脂締素的引子(反向)序列
<400> 7
aaggatcctc agttggtgtc atggtagag 29

申請專利範圍

1. 一種用於抑制肺泡壁破壞之藥劑，其包含脂締素。
2. 如申請專利範圍第1項之藥劑，其中該脂締素的含量為0.01至70重量%。
3. 如申請專利範圍第1或2項之藥劑，用於治療肺氣腫、慢性支氣管炎、囊狀纖維化症、支氣管擴張症、結核病、肺塵埃沈著症或慢性阻塞性肺部疾病之用途。

第 1 圖



(平均值±標準偏差) * :P<0.05, * * :P<0.01 (唐奈特氏(Dunnett)檢定)

第 2 圖

