

申請日期: <i>m. f. f.</i>	案號: <i>M 11 K f f o</i>
類別: <i>C07K 14/435, A61K 38/57</i>	公告本
(以上各欄由本局填註)	

發明專利說明書

528761

一、 發明名稱	中文	MPL配體類似物
	英文	MPL LIGAND ANALOGS
二、 發明人	姓名 (中文)	1. 史帝文 基 亞利特
	姓名 (英文)	1. STEVEN G. ELLIOTT
	國籍	1. 美國
	住、居所	1. 美國加州新伯利公園市金克里斯特路1040號
三、 申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 美商安美基公司
	姓名 (名稱) (英文)	1. AMGEN INC.
	國籍	1. 美國
	住、居所 (事務所)	1. 美國加州千橡市安美基中心大道1號
	代表人 姓名 (中文)	1. 史帝芬 M. 歐惲
	代表人 姓名 (英文)	1. STEVEN M. ODRE



本案已向

國(地區)申請專利	申請日期	案號	主張優先權
美國 US	1997/09/11	08/927,855	有

有關微生物已寄存於	寄存日期	寄存號碼
食品工業發展研究所	1996/06/01	CCRC 960043
食品工業發展研究所	1996/06/01	CCRC 960044
食品工業發展研究所	1996/06/01	CCRC 960045



五、發明說明 (1)

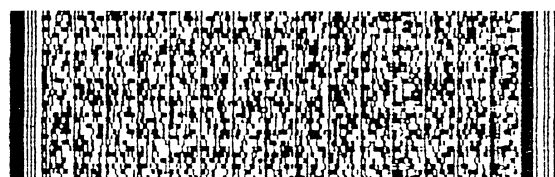
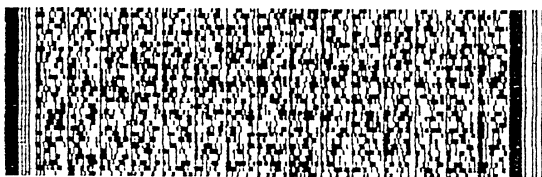
發明之範疇

本發明係關於一種mpl配體類似物，其具有至少一個被改變之O-或N-鍵結糖基化部位。本發明亦關於編碼該mpl配體類似物之DNA序列，以及供該類似物表現之重組質體及宿主細胞。

發明之背景

MGDF(巨核細胞生長及發育因子)為一種新近被選殖之細胞激素，其似乎為循環血小板濃度之主要調節因子。見Bartley, T.D. 等人, Cell 77:1117-1124 (1994); Lok, S. 等人, Nature 369:565-568 (1994); de Sauvage, F.J. 等人, Nature 369:533-538 (1994); Miyazake, H. 等人, Exp. Hematol. 22:838 (1994); Kuter, D.J. 等人, PNAS USA, 91: 11104-11108 (1994)。在Bartley, T.D. 等人, Cell 77:1117-1124 (1994)中所述之MGDF亦被稱做促血小板生成素(TPO)，mpl配體及促巨核細胞生成素。在本文中，術語「mpl配體」將被用於通稱會活化mpl受器之所有多肽，包括TPO及MGDF。mpl受器為一種細胞表面蛋白質，當其被活化時，會導致巨核細胞及血小板之製造及/或發育。見WO 92/07074。

「mpl配體類似物」為多肽，其在碳水化合物鍵結部位之數目、位置或類型上皆與天然序列不同。該多肽為本發明之一方面。成熟的天然人類mpl配體為總計具有332個胺基酸之蛋白質。該蛋白質之序列(與21個胺基酸長之前導序列相接)以及對應之cDNA被示於本文之圖1中(見序列識

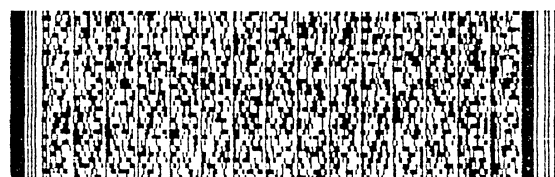


五、發明說明 (2)

別編號：1及2)。

在中國倉鼠卵巢(CHO)及大腸桿菌細胞二者中製造之重組mpl配體已被證明在小鼠(mice)、家鼠(rats)及猴子中，具有特異性刺激或增加活體內巨核細胞及/或血小板之生物活性。例如見Hunt, P. 等人, Blood 84 (10):390A (1994)。已被截短之人類mpl配體分子(與人體中被cDNA編碼之332個胺基酸蛋白質比較)，從圖1之胺基酸位置22開始延伸至少151個胺基酸者在活體中保有生物活性。圖2(序列識別編號：3及4)顯示被截短之mpl配體分子之一例，其為成熟形式，具有174個胺基酸以及具有生物活性。在圖2中，174個胺基酸長之蛋白質被顯示與21個胺基酸長之N-端前導序列連接。該分子在下段實例中被用於產生一些mpl配體類似物。其他類似物以圖1之胺基酸1-199，1-191及1-183為主體。成熟人類序列mpl配體蛋白質之N-端之最初6個胺基酸可以移除以及保有生物活性。所以生物活性似乎存在於圖1所示之人類mpl配體之成熟胺基酸序列之胺基酸7-151之中。

一般而言，許多細胞表面及真核細胞所產生之分泌蛋白質用一種或以上寡糖基修改。該修改(被稱為糖基化)可顯著影響蛋白質之物理性質，以及在蛋白質之安定性、分泌及細胞內之局部化上亦很重要。事實上，一些來自真核生物之基因，當在缺乏蛋白質糖基化製程之細菌(例如大腸桿菌)中表現時，產生之蛋白質由於未被糖基化而活性極微或無活性。

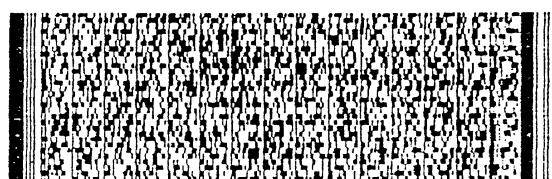
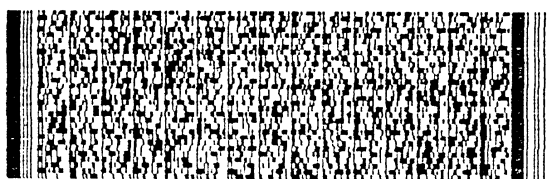


五、發明說明 (3)

糖基化在沿著多肽骨架之特異性位置或部位發生，且常具有二類型：O-鍵結之寡糖接在絲胺酸(Ser)或蘇胺酸(Thr)殘基上；而N-鍵結寡糖(鏈)，於天冬醯胺(Asn)為序列Asn-X-Ser/Thr(其中X可為脯胺酸以外之任何胺基酸)之一部份時，鍵結在(Asn)殘基上。X較佳為脯胺酸以外之19個天然產胺基酸之一。N-鍵結及O-鍵結寡糖之結構及在各類型中所發現之糖殘基不同。在此二類型中皆常被發現之一類型糖為N-乙醯基神經胺酸(下文被稱為唾液酸)。唾液酸通常為N-鍵結及O-鍵結寡糖二者之終端殘基，以及藉著其所攜帶之負電荷賦予糖蛋白酸性性質。

在本文中，糖基化「部位」為結構上能與糖殘基鍵結之胺基酸殘基，惟該部位事實上可與或不與糖基化殘基鍵結。如上述O-鍵結部位可為Ser或Thr殘基，而N-鍵結部位為Asn-X-Ser或Asn-X-Thr，其中X被定義為脯胺酸以外之任何胺基酸，較佳為脯胺酸以外之19個天然胺基酸之一。一特定部位是否被糖基鏈糖基化由表現該分子之宿主細胞、與該部位相鄰之胺基酸及其他因子決定。

在本文中，與特定mpl配體類似物相接之「鏈」之數目為與特定宿主細胞所表現之特定mpl配體分子相接之碳水化合物(即糖基)之平均數目。值得注意者，天然mpl配體及對應之重組mpl配體之糖基化部位通常相同，然而鏈之數目視被用於重組表現之特定宿主細胞是否將糖基鏈接在與天然來源者相同之部位而可能有所變化。在本文中，每當進行重組與天然mpl配體類似物之比較時，均是比較相



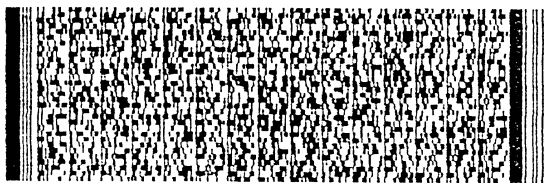
五、發明說明 (4)

同數目之胺基酸，不論天然來源是否事實上生產具有該長度之mpl配體分子。因此，「天然」係指特別種類(諸如人類)所用之序列，而非在該天然來源中實際上表現之分子之長度。

天然mpl配體為糖基化分子。天然mpl配體之糖基化模式與在mpl配體中已被發現之二關鍵區域有關。成熟人類mpl配體之最初約151個胺基酸之序列(對應於該分子之活性部分)，與促紅血球生成素(EPO)(一種促紅血球生成之細胞激素)，具顯著之同源性且被稱為人類mpl配體之「類EPO」區域。成熟蛋白質之剩餘胺基酸構成所謂「N-鍵結碳水化合物」區域，因為彼等包括即使不是全部也是大部分N-鍵結糖基化之天然部位。在人類mpl配體中，有6個N-鍵結糖基化部位，其全部被含在N-鍵結糖基化區域中。此二區域皆含有O-鍵結糖基化部位。據估計在該分子中有12-14個O-鍵結糖基化鍵。在CHO細胞中被重組表現之人類mpl配體DNA之實驗證據顯示在類EPO區域至少有二個O-鍵結部位被糖基化，即在位置1(Ser)及37(Thr)。

糖蛋白諸如mpl配體用諸如等電聚焦(IEF)之技術可被分成二不同帶電形式。舉例言之，數個團體曾報告粗製及部分純化之促紅血球生成製劑之IEF研究[Lukowsky等人, J. Biochem. 50:909 (1972); Shelton等人, Biochem. Med. 12:45 (1975); Fuhr等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 98:930 (1981)]。

儘管已有關於mpl配體分子之上述糖基化資料，但仍然



五、發明說明 (5)

需要具有不同糖基化模式且保有或具有改良生物活性之mpl配體分子。

所以，本發明之一目的為提供一種新穎糖基化mpl配體分子，其被稱為mpl配體類似物。本發明之再一目的為提供含有該分子之醫藥組合物，以及用本發明之mpl配體類似物治療可用mpl配體治療之病症之方法。

發明之概要

在一實施例中，本發明係關於一種mpl配體類似物，其所包含之胺基酸序列，與對應之天然mpl配體序列相較，包括至少一個被加入，至少一個被刪除，及/或至少一個被加入與被刪除之組合之供糖基化部位。供糖基化部位之被加入或被刪除可能造成比對應之天然mpl配體序列(尤其是人類mpl配體)更多或更少之碳水化合物鏈數目及更高或更低之唾液酸含量。舉例言之，類似物之一類型可包含刪除一個或以上N-或O-鍵結部位，以及在相同或另一位置加入一個或以上N-或O-鍵結部位。

在上述實施例之另一態樣中，本發明係關於一種mpl配體類似物，其所包含之胺基酸序列涵蓋用一個或以上非天然部位置換一個或以上N-或O-鍵結糖基化部位。因此，N-鍵結部位可用不同的N-鍵結部位置換；N-鍵結部位可用O-鍵結部位置換；O-鍵結部位可用不同的O-鍵結部位置換；以及O-鍵結部位可用N-鍵結部位置換。

任何上述改變之組合均被涵蓋在本發明之中。

本發明尚涵蓋編碼該mpl配體類似物之DNA序列，及供該



五、發明說明 (6)

類似物表現之重組質體及宿主細胞。

在所有上述場合，糖基化部位之改變造成所生成之mpl配體類似物之糖基鏈之數目、量、位置或類型(N-對O-)之改變且保有mpl配體之生物活性，即類似物仍然可以活化mpl受器。Mpl受器之活化意指在活體內巨核細胞生成增加，因而造成血小板增加。

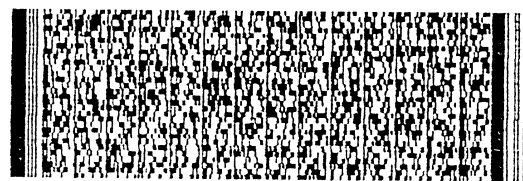
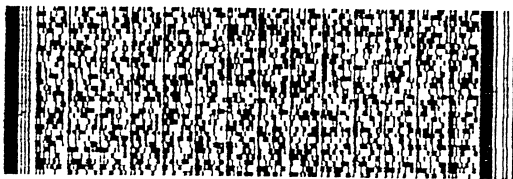
圖式之簡單說明

圖1顯示包括信號肽(胺基酸-21至-1)及成熟胺基酸序列(1-332)之天然人類mpl配體之DNA及胺基酸序列。

圖2顯示與接在21個胺基酸長之信號肽上之人類成熟mpl配體序列之胺基酸1-174對應之mpl配體之DNA及胺基酸序列。在編碼區之側翼之序列引進分別在5'及3'端之XbaI及SalI編碼部位。

圖3顯示用被大腸桿菌及CHO表現之mpl配體進行之西方氏吸漬。MK代表Met-Lys，其被加到供在大腸桿菌中表現之mpl配體之N-端中，以及可用二肽酶諸如組織蛋白酶C打斷。MK已被移除之分子被稱為desMK。用糖苷酶、神經胺酶及O-聚糖酶之處理被示出。

圖4顯示被大腸桿菌及CHO表現之mpl配體在正常小鼠中之活體內活性，其以血小板數目表示。該數據顯示被糖基化之mpl配體(CHO物質)之活性優於未被糖基化(大腸桿菌)物質者。此係由於糖基化物質之半衰期增加。舉例言之，CH0332代表在CHO細胞中被表現之人類mpl配體胺基酸1-332(圖1)。



五、發明說明 (7)

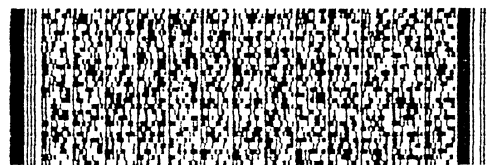
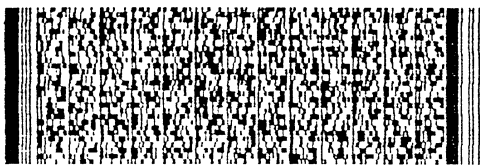
圖5顯示重組人類mpl配體及類似物4, 6, 7, 9, 10及11之COS細胞上清液之西方氏吸漬分析。類似物之構築被述於實例4中。類似物4, 7, 10具有至少一額外之碳水化合物鏈, 此可由凝膠移動性較慢證明。類似物編號對應於表1提供之類似物編號(11對應於類似物N11)。對照組為表1中之N1。

圖6顯示重組人類mpl配體以及類似物4, 5, 13, 14及15之COS細胞上清液之西方氏吸漬分析。類似物之構築被述於實例4中。類似物4, 13, 14及15具有至少一額外之碳水化合物鏈, 此可由凝膠移動性較慢證明。

圖7顯示人類mpl配體以及用所示之N-聚糖酶處理後之mpl配體類似物之COS細胞上清液之西方氏吸漬分析。結果顯示類似物具有不同的糖基化模式。

圖8顯示用mpl配體類似物進行之人類巨核細胞生長生物測定之結果。A格接受含37.5 微微克(pg)野生型(即天然序列)mpl配體1-174之COS-1條件培養基以及顯示顯著之巨核細胞生長。D格接受1.5微升 COS-1仿製條件培養基以及未顯示生長。B及C格分別為mpl配體1-174類似物7及10。B格接受含9.0 微微克 mpl配體之COS-1條件培養基而C格接受含27 微微克者, 二者皆顯示優異之巨核細胞生長。

圖9顯示CHO mpl配體1-174以及類似物N4及N15之西方氏吸漬分析(見表1)。較慢之凝膠移動性證明類似物N4(4B)具有一額外之寡糖而類似物N15(15-8)具有二額外之寡糖。



五、發明說明 (8)

圖10顯示由CHO細胞製造且用及未用所示之N-聚糖酶處理之mpl配體類似物之西方氏吸漬。用N-聚糖酶處理後凝膠移動性較慢證明N-鍵結寡糖之存在。

圖11顯示用各種形式之mpl配體以各種劑量處理之小鼠之血小板數目。此等數據證明增加量之N-及/或O-鍵結碳水化合物造成活體內活性增加。

圖12顯示COS-1產生之mpl配體1-174，以及類似物N10，N15，N33，N39，N31，N35及N40之西方氏吸漬分析。被加入之N-鍵結糖基部位之數目亦被示出。該圖顯示增加N-鍵結部位之數目由於使N-鍵結之碳水化合物之量增加而減少mpl配體之移動性。

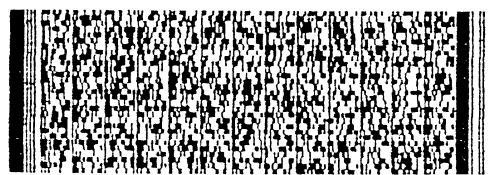
圖13顯示COS-1產生之mpl配體1-174，以及類似物N15，N29，N30及N38之西方氏吸漬分析。N-鍵結糖基鏈之數目亦被示出。

圖14顯示CHO mpl配體 1-174及1-199 (N31)以及類似物N40及N43之西方氏吸漬分析(見表8)。凝膠移動性證明類似物N40及N43具有等數目之額外寡糖。

圖15顯示CHO mpl配體 1-174及類似物N38，N41及N42之西方氏吸漬分析。凝膠移動性證明各類似物具有一個額外之寡糖。

發明之詳細說明

本發明提供mpl配體，其與具有對應序列之天然mpl配體相較，具有不同的糖基化部位。生成之分子較佳具有額外之糖基化部位且其在哺乳動物細胞(諸如COS，CHO，以及



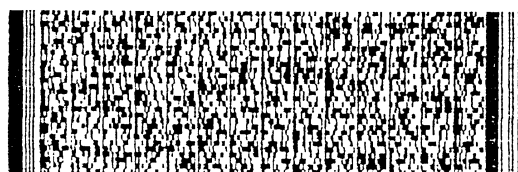
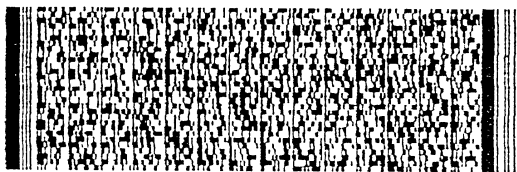
五、發明說明 (9)

人類細胞)中表現時被糖基鏈佔據。

在第一實施例中，本發明係關於一種mpl配體類似物，其所包含之胺基酸序列，與對應之天然mpl配體序列相較，包括至少一個被加入，至少一個被刪除，及/或至少一個被加入與被刪除之組合之供糖基化部位。供糖基化部位之被加入或被刪除可能造成比對應之天然mpl配體序列(尤其是人類mpl配體)更多或更少之碳水化合物鏈數目及更高或更低之唾液酸含量。一部位之刪除與另一部位之加入之組合在部位之數目上無淨改變，但在部位之位置及/或類型上改變。該組合式改變之類似物亦被涵蓋在本發明內。

在上述實施例之另一態樣中，本發明係關於一種mpl配體類似物，其所包含之胺基酸序列包括用一個或以上非天然部位置換一個或以上N-或O-鍵結糖基化部位。因此，N-鍵結部位可用不同的N-鍵結部位置換；N-鍵結部位可用O-鍵結部位置換；O-鍵結部位可用不同的O-鍵結部位置換；以及O-鍵結部位可用N-鍵結部位置換。一部位用在大體相同位置之另一部位置換，可能造成在該部位之糖基化效率增加或其他作用。舉例言之，本文提供之證據顯示用Thr殘基置換Ser殘基可能使O-鍵結部位之糖基化效率增加。

本文所用術語「mpl配體」包括天然mpl配體，天然mpl配體之截短物以及非天然多肽，該非天然多肽具有之胺基酸序列及糖基化效率與天然mpl配體者具有足夠之複製性，以致具有特異性刺激巨核細胞及/或血小板生長、發



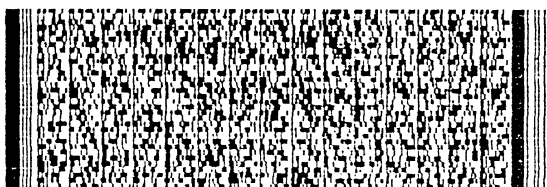
五、發明說明 (10)

育及/或生產之生物活性。Mpl配體類似物較佳至少以圖1之胺基酸7-151至胺基酸1-332為主體。

在一較佳之實施例中，mpl配體為一曾被轉染入真核宿主細胞中之外源DNA序列之表現之產物；亦即在較佳實施例中，mpl配體為「重組mpl配體」。較佳之真核細胞宿主為哺乳動物，以CHO細胞為尤佳。重組mpl配體宜按照本文以及本文所引用關於mpl配體之選殖及表現之文獻所述之方法製造。

一些額外之較佳mpl配體分子具有下列依據圖1之胺基酸序列：

mpl配體1-332	圖1之胺基酸1-332
mpl配體1-199	圖1之胺基酸1-199
mpl配體1-191	圖1之胺基酸1-191
mpl配體1-183	圖1之胺基酸1-183
mpl配體1-174	圖1之胺基酸1-174
mpl配體1-163	圖1之胺基酸1-163
mpl配體1-153	圖1之胺基酸1-153
mpl配體1-152	圖1之胺基酸1-152
mpl配體1-151	圖1之胺基酸1-151
mpl配體7-332	圖1之胺基酸7-332
mpl配體7-199	圖1之胺基酸7-199
mpl配體7-191	圖1之胺基酸7-191
mpl配體7-183	圖1之胺基酸7-183
mpl配體7-174	圖1之胺基酸7-174



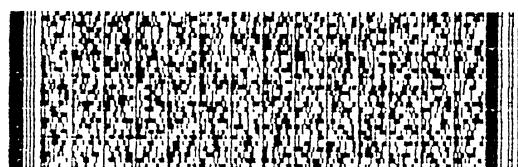
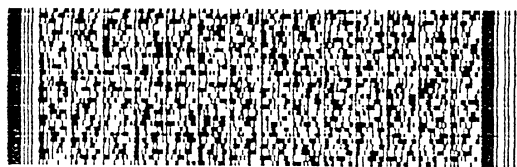
五、發明說明 (II)

mpl 配體 7-163	圖1 之 胺基酸 7-163
mpl 配體 7-153	圖1 之 胺基酸 7-153
mpl 配體 7-152	圖1 之 胺基酸 7-152
mpl 配體 7-151	圖1 之 胺基酸 7-151

應注意，例如mpl 配體 1-183，1-191，7-183 及 7-191，與較短序列相較，在其C-端具有一或二個額外之天然糖基化部位。在上述例子之每一個中，其N-端尚可包括 Met-Lys。

在本文中，試管內特異性活性係指試管內特異性活性之相對測量值而非試管內特異性活性之絕對測量值。就本申請案之目的言之，特異性活性僅被用於比較mpl 配體類似物之相對活性，此等mpl 配體類似物用相同之測定法及相同的條件(包括相同的內部標準，以及用相同的分析法分析用於計算特異性活性等之數據)測定。

在本文中，片語「mpl 配體之類似物」或「mpl 配體類似物」係指在mpl 配體之胺基酸序列上有一個或以上改變，而造成供碳水化合物連接之部位之類型(N-或O-鍵結，其可影響被連接之碳水化合物之量)、數目或位置改變之mpl 配體。在一較佳實施例中，糖基化部位之改變造成與mpl 配體分子相接之糖基鏈數目之改變。在一特佳實施例中，糖基化部位之改變造成至少1(通常為1-6，較佳1-5，以2-4為特佳)糖基鏈之加入，以經由N-鍵結加入為最佳。在另一特佳實施例中，如生物活性測定所測知者，mpl 配體類似物，與天然mpl 配體(例如人類mpl 配體)序列相較，至



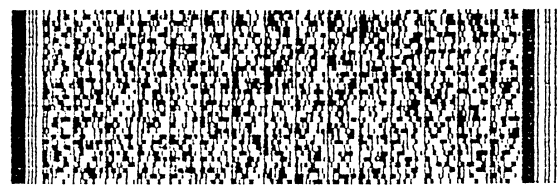
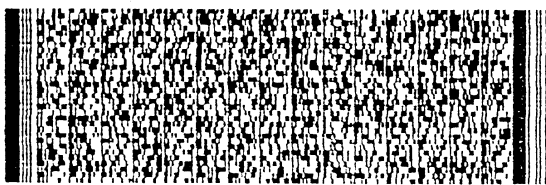
五、發明說明 (12)

少保有相等之活體內生物活性，且可能具有較高之活體內活性。該測定包括檢測巨核細胞或血小板之製造。

為了製備mpl配體知此等類似物，彼等較佳藉部位-指向突變產生，以造成胺基酸殘基之加入、刪除或置換，而加入、去除或更換糖基化部位。「更換」意指一部位已被刪除，同時在與被刪除部位相同之位置或另一位置加入另一部位。不過，熟悉本技藝者當了解，其他方法亦能製造編碼相同胺基酸序列之基因，以及此等方法被涵蓋在本發明中。生成之類似物可具有比天然人類/重組mpl配體更少或更多(以更多為較佳)之相接碳水化合物鏈。

將一個或以上碳水化合物(即糖基)鏈加到mpl配體上為本發明之一重要目的。mpl配體類似物中具有之碳水化合物鏈比在對應之天然胺基酸序列(例如1-332或1-174等)中所發現之碳水化合物鏈多者，藉加入糖基化部位而產生且該加入不會以減少生物活性之方式擾亂其二次或三次構形。本文所用之術語「天然」mpl配體係指具有相關類似物之對應胺基酸數目之胺基酸序列，即使特定長度之mpl配體實際上在天然物種中未被表現。mpl配體之類似物宜具有至多6個供N-糖基化或O-糖基化之額外部位，此造成添加1至6個額外之N-鍵結或O-鍵結碳水化合物鏈(或其組合)。

舉例言之，在位置30之Pro用Asn取代以及在位置32之Val用Thr取代而得到序列Asn-Glu-Thr，其為供N-糖基化之新穎部位(下文之類似物N4，見表1)。類似物亦可藉組



五、發明說明 (13)

合突變而構築成具有兩個或以上額外之N-鍵結鏈；舉例言之，表1所述之類似物N4及N10可被組合，而得到具有二個額外供碳水化合物加入之部位之類似物(即表1中之類似物N15)。具有三個或以上加入鏈之類似物可以相似方式構築。如熟悉本技藝者所了解者，本發明包括許多具有不同糖基化部位(在部位之數目、類型或位置上不同)之其他mpl配體類似物。無論如何，本發明之mpl配體類似物較佳以具有人類胺基酸序列(見圖1及2)之mpl配體為主體；不過，以來自其他種類(例如狗、豬、猴子、小鼠或家鼠)之mpl配體序列為主體之類似物亦被涵蓋在本發明之內。

插入胺基酸以創造糖基化部位亦被考慮。舉例言之，在位置57之Glu被Thr置換以及Asn被如下緊接地插在位置55之Met之後：

-Gln-Met-Glu-Glu-Thr-

54 55 56 57 58

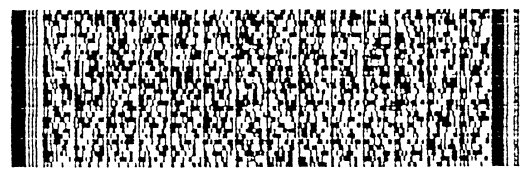
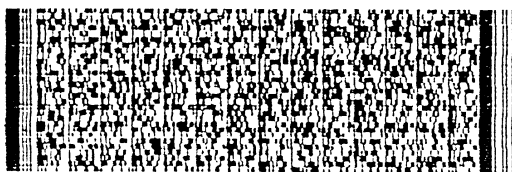
→

-Gln-Met-Asn-Glu-Thr-Thr-

54 55 55' 56 57 58

此加入一新穎之糖基化部位(胺基酸55'，56及57)。見下文之類似物N23。

在本發明之類似物之中，亦包括具有一個或以上自mpl配體之羧基終端延伸之胺基酸之類似物，其中羧基終端延伸部提供至少一額外之碳水化合物部位。Mpl配體之羧基終端視所用mpl配體之特殊形式而定(例如mpl配體1-332胺



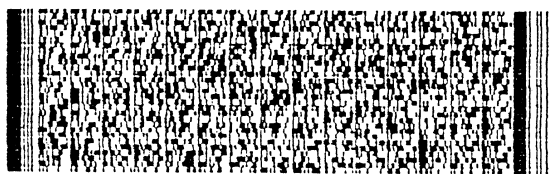
五、發明說明 (14)

基酸或mpl配體1-163胺基酸)。額外之碳水化合物部位，藉著將胺基酸(諸如含有一個或以上N-或O-鍵結之糖基化部位之胺基酸)加到羧基終端，而可被加到mpl配體之羧基終端。

表1及表6列出一些mpl配體類似物，其具有N-鍵結碳水化合物鏈之額外部位。該類似物在以人類胺基酸序列為主體之人類mpl配體多肽鏈之各種位置具有序列Asn-X-Ser或Asn-X-Thr，以創造N-鍵結部位。表4及表7列出加入至少一額外N-鍵結碳水化合物鏈之類似物，此可由SDS凝膠上糖蛋白之移動性證明(見實例6及圖3，5，6，7，9，10，12及13)。注意此等表亦包括一些被截短者(即N1，N16，N17及N31)，其非本文所界定之「類似物」。彼等被列在表中係顯示各種被截短之物種如何被製備。

本發明亦涵蓋編碼本文所揭示之mpl配體類似物之DNA序列，以編碼具有供N-鍵結鏈用之額外部位之類似物者為較佳。將修改引進mpl配體DNA序列中，以創造、刪除及/或更換碳水化合物之附接部位之步驟被揭示於實例4及14中。

此等mpl配體類似物可為外源DNA序列之表現產物(亦即經由DNA重組技術製造者)，彼等亦可為化學合成產物或藉組合方法製造者。外源DNA序列包含編碼mpl配體類似物之cDNA，染色體組DNA或化學合成DNA。本發明亦提供在表現此等類似物上之有用之重組DNA質體及真核宿主細胞。表現載體包括在真核宿主細胞中能表現選殖DNA序列之任何載



五、發明說明 (15)

體，尤其是供在COS及CHO細胞中表現之載體。該載體之例子包括質體pDSR α 及pDSR α 2，見Mol. Cell. Biol.

8:466-472 (1988)；WO 91/13160 (1991)；及WO

90/14363 (1990)。表現mpl配體類似物之COS及CHO宿主細胞之培育用熟悉本技藝者已知之標準步驟進行。

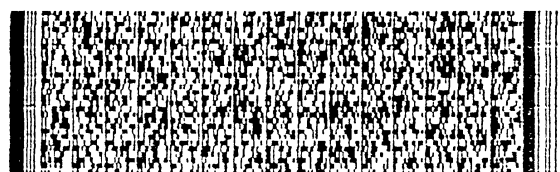
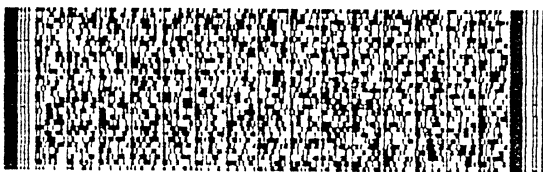
改變與mpl配體相接之碳水化合物鏈之數目、類型、位置或量可賦予有利之性質，諸如增加之溶解度、較大之蛋白質分解抗性、減少之免疫原性、增加之血清半衰期，以及增加或改變之生物活性。

得自表現mpl配體類似物N2-N15 (N1為人類mpl配體1-174，見圖2)之COS細胞之條件培養基在試管中之生物活性被加以分析，以及結果被示於表4中。

得自表現mpl配體類似物/截短物N5-N40之COS細胞之條件培養基在試管中之生物活性被加以分析，以及結果被示於表7中。

各種形式在活體中之生物活性結果被列於圖11中(見實例13)。本發明之另一具體例係關於一種哺乳動物(例如中國倉鼠卵巢，CHO)宿主細胞，其偏好合成mpl配體或合成每分子具有比特定數目多(例如比在真核細胞中天然或重組製造之mpl配體1-332，1-199，1-191，1-183，1-174，1-163，1-153，1-152或1-151中所發現者大)之唾液酸之mpl配體類似物。類似物N4及N15以及在CHO細胞中被表現之全長及各種截短物在試管中之活性被示於表5中。

Mpl配體分子之唾液酸含量可能影響其在活體中之生物



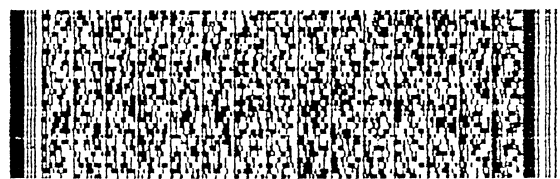
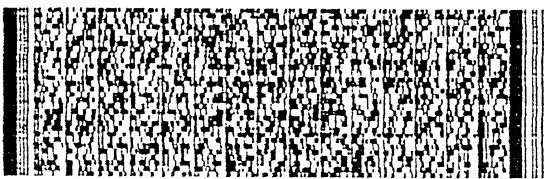
五、發明說明 (16)

活性。舉例言之，四分枝型N-鍵結寡糖最常提供4個可供唾液酸附接之部位，而二-及三-分枝型寡糖(其在天冬醯胺鍵結部位會置換四-分枝型寡糖)至多只具有2或3個唾液酸附接部位。O-鍵結寡糖通常提供2個唾液酸附接部位。因此，mpl配體分子中以N-鍵結碳水化合物置換O-鍵結碳水化合物者，若該N-鍵結寡糖為四分枝型，則每鍵可納入二額外之唾液酸。篩選哺乳動物細胞培養物，以選出偏好將四分枝型鍵加到重組mpl配體上之細胞，藉此使唾液酸附接之部位之數目達到最大。

缺乏二氫葉酸還原酶(DHFR)之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞為製造重組糖蛋白(包括重組mpl配體)所常用之宿主細胞。

包含治療有效量之mpl配體類似物以及適當稀釋劑、佐劑及/或載劑，而在mpl配體療法上有用之組合物被涵蓋於本發明中。本文所用之術語「治療有效量」係指對一特定病症及療法提供治療作用之量。

本發明之組合物經由腸道外全身性投藥。另外該組合物可經由靜脈內或皮下投藥。當全身性投藥時，本發明之治療組合物可為不含熱原、腸道外投藥允許之水溶液形式。具有適當pH值、等張性及安定性等之醫藥上允許之蛋白質溶液之製備在本技藝之技術範圍之內。所選擇之特異性途徑視被治療之病症而定。Mpl配體或mpl配體類似物較佳以調配物[含有適當載劑(諸如人類血清白蛋白)、適當稀釋劑(諸如緩衝食鹽水溶液)及/或適當佐劑]之一部份投藥。



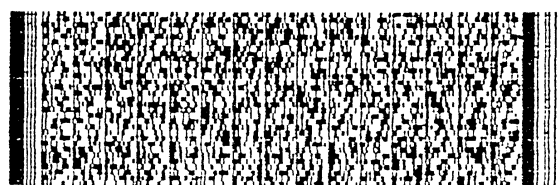
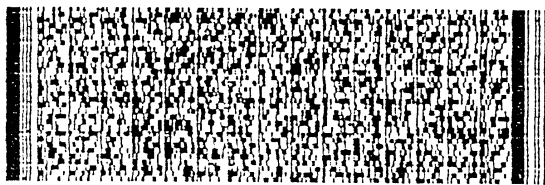
五、發明說明 (17)

所需之劑量為足以提高病人之血小板濃度之量以及視被治療之病症之嚴重度及所用投藥方法決定。

適於用本發明之方法及組合物治療之病症通常為涉及既存巨核細胞/血小板缺乏或未來預期巨核細胞/血小板會缺乏者(例如由於計劃手術者)。此等組合物及方法亦可在個體中增加循環血小板之數目，以增加可用來捐贈之血小板之數目。此等病症通常為活體中活性mpl配體缺乏(暫時性或永久性)之結果。血小板缺乏之通稱為血小板過少症，所以本發明之方法及組合物通常用於治療血小板過少症。

血小板過少症(血小板缺乏)可因各種理由而存在，此等理由包括化學治療，骨髓移植以及其他用各種藥物、輻射治療、手術、意外事件失血及其他特異性疾病狀況。涉及血小板過少症以及可以按照本發明治療之特異性疾病狀況之例子有：再生不能性貧血、體質特異性血小板過少症、造成血小板過少症之轉移性腫瘤、全身性紅斑性狼瘡、脾臟腫大、泛可尼氏症候群(Fanconi's syndrome)、維生素B12缺乏症、葉酸缺乏症、梅-漢格林(May-Hegglin)異常、威斯寇特-艾菊克(Wiskott-Aldrich)症候群，以及陣發性夜間血色素血症。再者，AIDS之某些治療(例如AZT)會造成血小板過少症。某些傷口癒合異常亦可因增加血小板數目而獲益。

關於被預期會血小板缺乏者，例如未來將接受手術或未來將接受會誘生血小板過少症之療法者，可以在需要血小板之前數日至數小時投與本發明之mpl配體類似物。關於

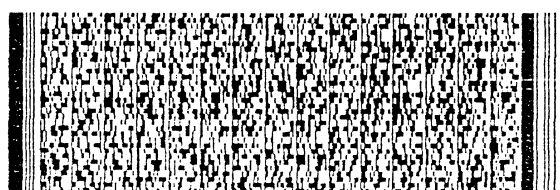
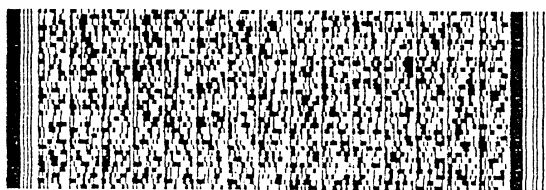


五、發明說明 (18)

急性狀況，例如意外及大量的失血，mpl配體類似物可與血液或純化血小板一起投與。

治療上述病症之方法所用之給藥法由看診醫師視影響藥物作用之各種因素(例如病人之年齡、狀況、體重、性別及飲食，任何感染之嚴重度，投藥時間及其他臨床因子)而定。一般而言，每日劑量在0.01-1000微克mpl配體類似物/公斤體重之範圍內，較佳為0.1-10微克/公斤體重。

本發明之治療方法、組合物及多肽亦可單獨使用或與其他用於治療以其他症狀為特徵之病症及血小板缺乏之物質[諸如細胞激素、可溶性mpl(即mpl配體)受器、促紅血球生成因子、間白素、生長因子或抗體組合]使用。可預期mpl配體類似物分子，與紅血球生成之一般刺激因子諸如IL-3或GM-CSF合用時，在治療某些形式之血小板過少症上有用。其他巨核細胞刺激因子，即meg-CSF、幹細胞因子(SCF)、白血病抑制因子(LIF)、腫瘤抑制素M(OSM)、或其他具有巨核細胞刺激活性之分子亦可與mpl配體一起使用。供一起投與之額外細胞激素或促血球生成因子之例子包括IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-11、群落刺激因子-1(CSF-1)、GM-CSF、顆粒球群落刺激因子(G-CSF)、EPO、干擾素- α (INF- α)、INF- β 或INF- γ 。同時或接續投與有效量之可溶性哺乳動物mpl受器可能有用，該mpl受器於巨核細胞一旦達到成熟形式後，似乎具有使巨核細胞分段成血小板之作用。因此投與mpl配體類似物(增加成熟巨核細胞之數目)繼而給予可溶



五、發明說明 (19)

性mpl受體(使類似物失活並允許成熟巨核細胞產生血小板)被預期為刺激血小板製造之特別有效方式。上述劑量被調整以代償治療組合物中之此等額外成分。被治療病人之進程可藉習知方法監測。

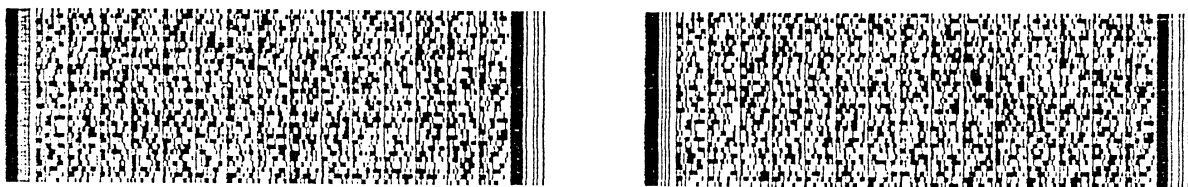
亦可進行本發明類似物之額外修飾，例如增加活性、安定性、半衰期等。舉例言之，可將pegylation(聚-或單-)經由蛋白質上之胺基或碳水化合物基團加到mpl配體類似物上。再者，脂肪酸或其他聚合物可被附接在蛋白質或碳水化合物基團上。

下列實例係用來更詳細地說明發明，但非用於為本發明之範圍設限。實例之生物測定所用之mpl配體標準為在大腸桿菌中表現、再摺疊成活性構形及被純化之重組mpl配體標準。因此，只有相對特異性活性被測得。

實例1

Mpl配體1-174之構築

編碼圖2之胺基酸1-174(以S-P-A-P-P-A...開始)之人類mpl配體基因，藉聚合酶鏈反應(PCR)自人類胎兒肝cDNA庫[Bartley等人, Cell 77:1117-1124 (1994)]產生。5' PCR引子編碼人類mpl配體之胺基終端、XbaI部位及最適化之Kozak序列。3'引子含有終結密碼子及SalI限制部位。將擴增之DNA片段用XbaI及SalI消化，然後與經XbaI及SalI切割之pDSR α 2黏接。生成之質體，pDSR α 2 mpl配體1-174被用於供哺乳動物細胞表現。生成基因之序列(包括信號肽)被示於圖2中。



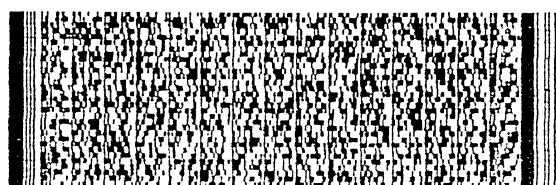
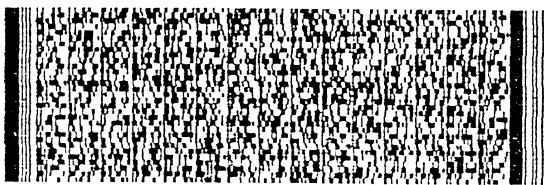
五、發明說明 (20)

含有mpl配體1-174之質體DNA用XbaI及SalI限制酶消化，生成之DNA片段接受瓊脂糖凝膠電泳，以及605 nt mpl配體1-174 DNA片段用GeneClean™套組及製造商 (BIO 101, Inc.) 供應之步驟自凝膠單離。將WO 90/14363 (1990) 所述之質體pDSR α 2亦用XbaI及SalI限制酶消化，以及回收載體片段。將二片段黏接，形成pDSR α 2 (mpl配體1-174)。

實例2

Mpl配體1-174在CHO細胞中之表現及純化

缺乏二葉酸還原酶(DHFR⁻)之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞用pDSR α 2 -mpl配體1-174轉染。於轉染前一日，將在CHO D-培養基[DMEM，10%牛胎血清，1%青黴素/鏈黴素/穀胺醯胺，1%非必需胺基酸(吉伯可)及1%HT補充物(吉伯可)]中培養之 1×10^6 CHO DHFR⁻細胞平面接種在100 mm組織培養皿中。進行四次轉染。對於每一次轉染，質體DNA(50 μ g)藉用PvuI及緩衝液H(柏林格曼海姆)消化而線性化。DNA沉澱物於是形成，將其逐滴加到哺乳動物細胞轉染套組(Speciality Media)之平皿中。在組織培養培育器中24小時後，將培養基用新鮮CHO D-培養基置換。24小時後，將細胞分裝在96凹槽組織培養皿中且每凹槽含有100 μ l之CHO選擇培養基(D-MEM，5%經透析之牛胎血清，1%青黴素/鏈黴素/穀胺醯胺，1%非必需胺基酸(吉伯可公司)，以及選擇轉型體。每星期改變培養基直至群落出現。二星期後，使用下文(見實例9)所述之32D細胞增殖測定法篩選

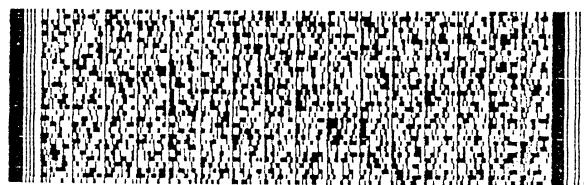
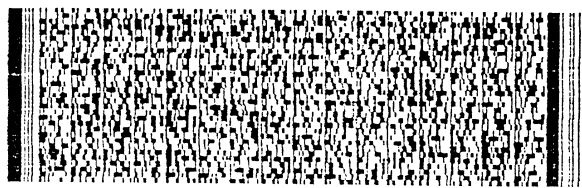


五、發明說明 (21)

mpl 配體表現。以超過 1×10^5 單位/ml 之量表現之純系被擴增及藉低溫貯存而冷凍。一純系被擴增以供瓶生產以及約8升之條件培養基被生產。

含有mpl 配體1-174 cDNA之質體pDSR $\alpha 2$ 如上述被轉染入缺乏DHFR之CHO細胞。將來自瓶(接種有表現mpl 配體1-174之CHO細胞)之2升不含血清之CHO細胞條件培養基[培養基: 50% D-MEM, 50% HAMS-F12, 1%青黴素/鏈黴素/穀胺醯胺, 1%非必需胺基酸(吉伯可公司)]用2L Amicon公司2000型攪拌槽及10,000道爾頓分子量畫分膜(YM10, 艾米孔公司)濃縮15倍。將45毫升經濃縮之條件培養基直接加載在4毫升使用Pharmacia FPLC之hu-MPL-X親和管柱上且流速為0.4毫升/分鐘。親和管柱, 按照廠商之建議, 藉每毫升被CNBr活化之瓊脂糖樹脂(法瑪西亞公司)與1.5-2.5毫克mpl-X(mpl受器之可溶性細胞外區域)偶合而構築。加載後, 管柱用16毫升磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS; 10mM Na_2HPO_4 , pH 6.8/ 150 mM NaCl)沖洗, 然後用24毫升之10 mM Tris, pH8.0/ 1M NaCl沖洗。Mpl 配體(1-174)用40毫升20 mM CAPS (3-[環己胺基]-1-丙磺酸) pH 10.5/ 1M NaCl/ 5mM CHAPS(3-[(3-膽胺丙基)二甲胺]-1-丙磺酸酯)溶析, 每溶析份為6毫升。第二溶析份在14% SDS凝膠上得到一單一帶。將該物質濃縮及對著0.9% NaCl之鹽水溶液緩衝交換, 以及其在試管中及在活體中具生物活性。被CHO細胞表現之mpl 配體之其他形式以相同方式純化。

實例3



五、發明說明 (22)

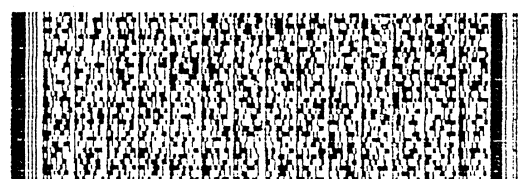
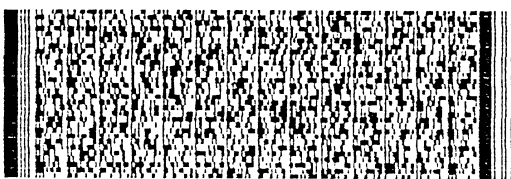
重組人類mpl配體在活體中之生物活性

測量用各種形式之mpl配體治療之小鼠之血小板數目。衍生自CHO之mpl配體1-332, 1-174, 1-163及1-153藉mpl-受器親和層析製造及純化。衍生自大腸桿菌之Met-Lys-mpl配體1-332、Met-Lys-mpl配體1-174、Met-Lys-mpl配體1-163及Met-Lys-mpl配體1-153藉習知層析製造及純化。

圖4顯示用CHO細胞-衍生(實線)或大腸桿菌-衍生(虛線)之重組人類mpl配體之各種形式治療之小鼠之血小板數目。將Balb/c正常雌鼠連續5日經由皮下注射所示濃度之mpl配體。最後一次注射後24小時,收集來自尾部靜脈側面小切口之血液以供試驗。用Sysmex電子血球分析器(加州艾爾飛市巴克斯特診斷公司)進行血球分析。數據以4隻動物之測定值之平均值 $\pm$ 平均值之標準偏差表示。其他血球參數諸如白血球總數或紅血球總數不受此等治療影響(數據未示出)。

結果顯示被CHO細胞表現之mpl配體之形式,與在大腸桿菌中製造之mpl配體之相同形式相較,具有增加之活體內活性。如實例6所述,被CHO細胞表現之mpl配體之所有形式皆含有N及/或O-鍵結之碳水化合物,而被大腸桿菌表現之mpl配體之形式則無。此表示碳水化合物增加mpl配體在活體內之活性。碳水化合物所提供之活體內活性增加為循環半衰期增加、安定性增加或二者組合之結果。

實例4



五、發明說明 (23)

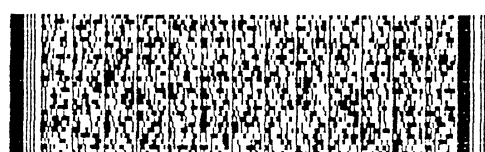
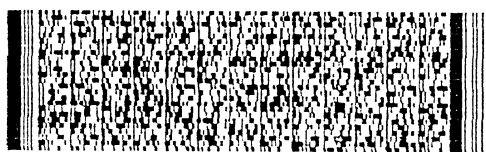
Mpl 配體類似物N2-N15之構築

使mpl配體產生額外糖基化部位之步驟被述於下。

下列寡核苷酸引子被合成，以供在試管內誘發突變而製備類似物N2-N14(此等類似物之結構見表1)：

N2 - CCCATGTCAATCACAGCAGACT	序列識別編號：5
N3 - CTTACAGCAACCTGAGCCAGT	序列識別編號：6
N4 - CAGTGCAACGAGACCCACCCTTTG	序列識別編號：7
N5 - GCCTACAAATGTCACGCTGCCTGCT	序列識別編號：8
N6 - CCCACTTGTAATCATCCCTC	序列識別編號：9
N7 - CAACTGAACGCCACTTGTCTCTCA	序列識別編號：10
N8 - ACTTGTCTCAACTCCACCCTGGGGGA	序列識別編號：11
N9 - CTCCTGGGGAACCTTTCTGGA	序列識別編號：12
N10 - GACCACAAATCACACCGATCCCAAT	序列識別編號：13
N11 - ACCCTTTGTCTACAAATGTCACGCTGCCTGCT	序列識別編號：14
N12 - TCTCTCAAACCTCACGGGGGAGCTT	序列識別編號：15
N13 - TGGAAAAATCAGACGGAGGAGAC	序列識別編號：16
N14 - TGGAGGAGAACAAGACACAGGACAT	序列識別編號：17

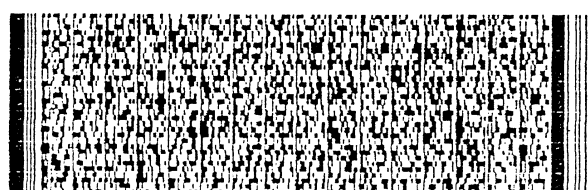
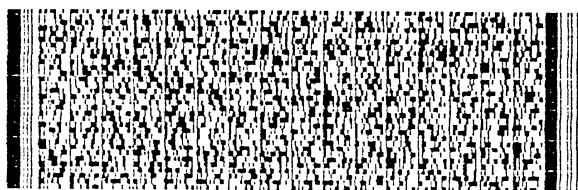
為了構築m13mpl8 mpl配體1-174，將圖2之基因引進經XbaI及SalI限制酶消化之m13mpl8 DNA。單股DNA，按照Kunkel等人，Methods in Enzymol. 154:367 (1987)及Messing, Methods in Enzymol. 101:20 (1983)所述，自被m13mpl8 (mpl配體1-174)感染之大腸桿菌RZ1032菌株之上清液回收。為了在試管中誘生突變，將約0.5微克單股DNA及0.125毫微莫耳上述合成引子之一與6微升之緩衝液[250 mM Tris, pH 7.8, 50 mM MgCl₂, 50 mM 二硫蘇糖醇及1%牛血清白蛋白(BSA-法瑪西亞)]混合。引子在加入



五、發明說明 (24)

之前，先用ATP及T4聚核苷酸激酶激活。為了將引子與模板黏接，將反應體積用水調整至10微升，將該混合物加熱至65℃歷5分鐘，然後讓其冷卻至室溫。為了進行延長反應，加入dTTP，dATP，dGTP及dCTP各2.5微升及ATP 1毫升(所有均為10 μ M)，繼而加入1微升(1單位)大腸桿菌DNA聚合酶(克來勞(Klenow)片段)及1微升(1單位)T4 DNA黏接酶。然後將混合物於14℃培育整夜及如上述用於轉型大腸桿菌JM 109 (Yanisch Perron 等人，Gene 33, 103 (1985))。

為了藉示差雜交鑑別突變純系，將營養瓊脂上之斑移至基因篩選濾器(新英格蘭核子公司)。該DNA藉在UV Stratalinker 1800型中，用自動交聯模式(史翠塔基因公司)照射而交聯至濾器上。然後將其於60℃，在含1% SDS之6x SSC (0.9M NaCl/0.09M 檸檬酸鈉)中培育1小時。為了雜交，將上述寡核苷酸引子(8微微莫耳)用T4聚核苷酸激酶及 $\gamma^{32}\text{P}$ -標記ATP進行終端標記以及與濾器在6x SSC，0.5% SDS及125微克/毫升鯡魚精子DNA中培育整夜。按照寡核苷酸熔點之估計值選擇雜交溫度。一般而言，雜交溫度約比熔點低10℃。第二天，將濾器用6x SSC/1% SDS在雜交溫度沖洗二次，繼而用6x SSC在雜交溫度沖洗二次，及接受自動放射線照相。若需要，繼而可將濾器在漸增溫度下用6x SSC沖洗，直至幾乎未或未檢測到與具有野生型mpl配體cDNA序列之斑發生雜交。於此等條件下發出陽性雜交訊號之純系被鑑別及被轉染入JM109中，以單離出純



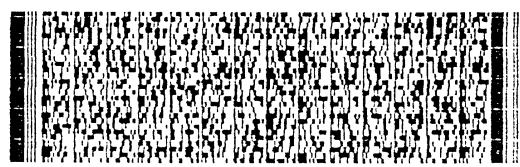
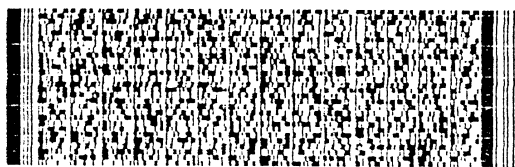
五、發明說明 (25)

系。二去氧鏈終端序列分析顯示存在突變。

攜帶期望改變之雙股mpl 3' 配體1-174 DNAs，用 QIAGEN 套組(加州切茲渥斯公司)及廠商供應之方法自被 JM 109 轉染之細胞中回收。將DNAs用XbaI及SalI消化以及單離出605 bp mpl 配體DNA片段。將pDSR α 2用XbaI及SalI消化。將載體片段單離出並黏接至上述mpl 配體片段。重組質體藉限制分析鑑定。生成之質體(被命名為mpl 配體 1-174 NX，其中NX為類似物編號)含有編碼mpl 配體類似物之DNA，該mpl 配體類似物在所示位置具有更換之胺基酸殘基。然後將生成之質體再次定序以證明存在期望之突變。

類似物N15被構築成在位置30及120具有二額外之N-鍵結糖基化部位。含有Asn30及Thr32突變之pDSR α 2 mpl 配體 174-N4用XbaI及SalI限制酶消化以及單離出約385 nt DNA 片段。含有Asn120及Thr122突變之pDSR α 2 mpl 配體 174-N10用XbaI及SalI限制酶消化以及單離出約220 nt DNA 片段。pDSR α 2用XbaI及SalI消化。將載體片段單離出並黏接至上述mpl 配體片段。此形成pDSR α 2 mpl 配體 174-N15，其含有Asn30，Thr32，Asn120及Thr122置換。

此等通用步驟被用於構築表1所示之mpl 配體類似物。各類似物之DNA序列變化被示於下；另一方面被用於誘生突變之寡核苷酸引子具有與人類mpl 配體者互補之序列。



五、發明說明 (26)

類似物/物種編號	表 1 胺基酸置換	序列改變
N1	(1-174); Pro ¹⁷⁵ →Gly ³³² 刪除	CCA→TGA (終結密碼子)
N2	Leu ²² →Asn ²²	CCT→AAT
N3	Arg ²⁵ →Asn ²⁵	AGA→AAC
N4	Pro ³⁰ , Val ³² →Asn ³⁰ , Thr ³²	CCA, GTT →AAC, ACC
N5	Pro ³⁸ , Leu ⁴⁰ →Asn ³⁸ , Thr ⁴⁰	CCT, CTG →AAT, ACG
N6	Leu ⁸⁶ →Asn ⁸⁶	CTC→AAC
N7	Gly ⁸² , Pro ⁸³ →Asn ⁸² , Ala ⁸³	GGA, CCC→AAC, GCC
N8	Ser ⁸⁷ , Leu ⁸⁹ →Asn ⁸⁷ , Thr ⁸⁹	TCA, CTC→AAC, ACC
N9	Gln ⁹² →Asn ⁹²	CAG→AAC
N10	Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² →Asn ¹²⁰ , Thr ¹²²	GCT, AAG→AAT, ACC
N11	Pro ³⁶ , Pro ³⁸ , Leu ⁴⁰ → Ser ³⁶ , Asn ³⁸ , Thr ⁴⁰	CCT, CCT, CTG→ TCT, AAT, ACG
N12	Ser ⁸⁸ Leu ⁹⁰ →Asn ⁸⁸ , Thr ⁹⁰	TCC, CTG→AAC, ACG
N13	Thr ⁵³ , Met ⁵⁵ →Asn ⁵³ , Thr ⁵⁵	ACC, ATG→AAT, ACG
N14	Thr ⁵⁸ , Ala ⁶⁰ →Asn ⁵⁸ , Thr ⁶⁰	ACC, GCA→AAC, ACA
N15	Pro ³⁰ , Val ³² , Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² → Asn ³⁰ , Thr ³² , Asn ¹²⁰ , Thr ¹²²	CCA, GTT, GCT, AAG→ AAC, ACC, AAT, ACC



五、發明說明 (27)

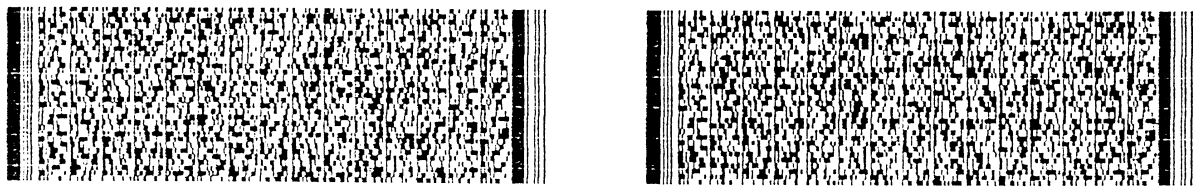
註：類似物N2-N15在本文中係指類似物2-15。再者，在本文中，例如，[Asn²²] mpl配體意指在被論及之特定mpl配體[較佳為至少具有圖1之胺基酸7-151之人類序列(包括本文所述之較佳人類mpl配體序列)]中已用天冬醯胺置換位置22之胺基酸。因此，用天冬醯胺殘基置換mpl配體1-174(人類序列)之位置22之白胺酸殘基所得到之mpl配體類似物以[Asn²²] mpl配體1-174代表。

被命名為pDSR α 2 1-174-NX之質體(其中NX為類似物編號)藉將mpl配體DNA插入pDSR α 2而構築。表現載體pDSR α 2被概述於W0 90/14363 (1990)中。pDSR α 2 mpl配體1-174-NX質體藉下法製備：用XbaI及SalI消化pDSR α 2。單離載體片段及將其與含有期望序列之約605 bp片段黏接。

實例5

Mpl配體及Mpl配體N1-N15在COS細胞中之表現

人類mpl配體以及表1所述之mpl配體類似物之cDNA純系藉電穿孔被移入COS-細胞(ATCC No. CRL-1650)中。將COS-1細胞自生長至半匯聚之皿中收穫，用培養基[含有10%牛胎血清及1% L-穀胺醯胺/青黴素/鏈黴素之都百可氏(Dulbecco's) 改質必需培養基(艾凡科技公司)]沖洗並以 6×10^6 細胞/毫升之濃度再懸浮。將半毫升細胞移入0.2公分電穿孔小杯(Bio-Rad)中並用BTX電穿孔系統之電池機械手600於650 μ F及130伏特下進行電穿孔，以及於低電壓設定下引進50微克編碼mpl配體類似物之質體DNA。將被電穿



五、發明說明 (28)

孔之細胞平面接種在含10毫升培養基之100 mm組織培養皿中。平面接種後12至24小時，將培養基用10毫升新鮮培養基置換。電穿孔後3至5日收集條件培養基。

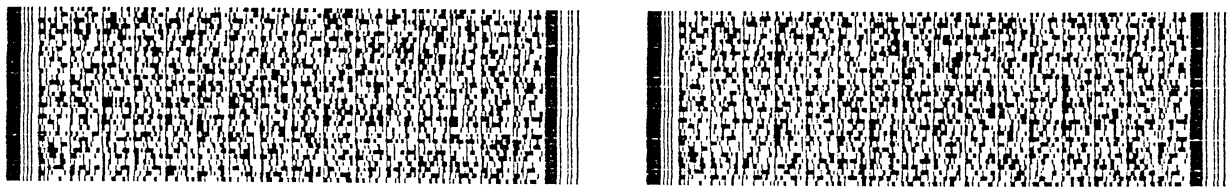
實例6

鑑定Mpl配體及Mpl配體N1-N15之特徵

A. 碳水化合物添加之測定

將1體積含有約30-60毫微克mpl配體或mpl配體類似物(來自實例5所述之用mpl配體類似物cDNAs轉染之COS細胞)之上清液，在室溫下用兔子抗-mpl配體多株抗體免疫沉澱整夜。在一些表現為低度之情況，約8-9毫升之最大體積被用於免疫沉澱。誘生對抗被大腸桿菌表現及純化之mpl配體1-163之抗體。將在磷酸緩衝食鹽水(PBS)(含有0.1%疊氮化鈉)中之1:1蛋白質A-瓊脂糖30微升加到免疫沉澱物中並讓其在室溫培育1小時。將樣品離心，用PBS沖洗及再懸浮於SDS樣品緩衝液(0.125 M Tris-HCl pH 6.8/4% SDS/20%甘油/10% β -巰基乙醇/0.001%溴酚藍)中。樣品藉12% SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳分析，移入硝基纖維素以及接受西方氏分析[Burnette et al., Anal. Biochem. 112:195-203 (1981); Elliott et al., Gene 79:167-180 (1989)]，其中使用對抗合成mpl配體肽(對應於圖1之胺基酸殘基47-62)之鼠抗-mpl配體單株抗體。含有該帶之mpl配體用ECL套組(阿美夏姆公司)顯現。

圖5顯示來自用類似物N4，N7及N10 DNA轉染之細胞之COS細胞上清液，與人類mpl配體174 (N1)序列相較，尺寸



五、發明說明 (29)

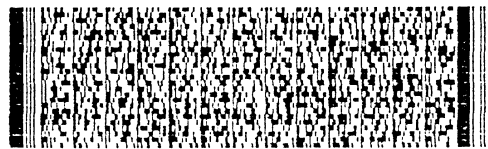
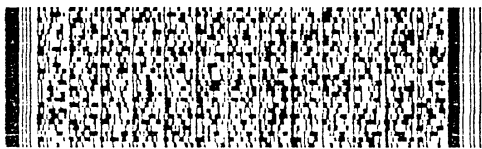
增加。圖6顯示來自用類似物N13, N14及N4 DNA轉染之細胞之COS細胞上清液, 與人類mpl配體序列相較, 亦具有增加之尺寸。該增加之尺寸指示存在額外之N-鍵結碳水化合物鏈。N15含有二額外之N-鍵結糖基化部位。圖6顯示該類似物之尺寸大於僅含一個額外之N-鍵結糖基化部位者。蛋白質之尺寸從其在SDS-PAGE上之移動性以及與具已知分子量之蛋白質標準品比較而評估。從圖6計算出之較大帶之估計尺寸被示於表2中。該結果顯示N15含有2額外之N-鍵結鏈。其他被選擇之類似物之西方氏吸漬分析亦被示於圖6中。

表 2

N-鍵結碳水化合物之估計值

Mpl 配體 類似物 (1-174)	分子量 (Da)	分子量變動(Da) (超過天然者)	潛在之 N-鍵結 鏈之數目 (@4 KDa/部位)
N1 (天然)	23500	0	0
N4	28700	5200	1
N7	27200	3700	1
N10	27200	3700	1
N13	26700	3200	1
N14	28700	5200	1
N15	33500	10000	2

進行實驗以顯示mpl配體類似物之增加之尺寸係由於N-鍵結之碳水化合物。將含有mpl配體之COS細胞條件培養基如上述予以免疫沉澱及用PBS沖洗。然後在各管中加入10微升0.5% SDS以及將各樣品煮沸3分鐘。然後加入下列成

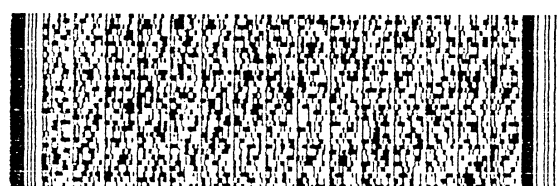
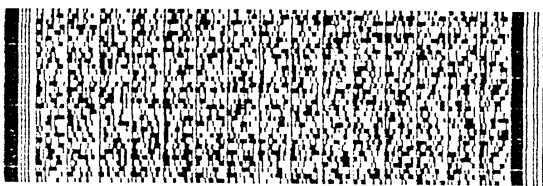


五、發明說明 (30)

分：10.8微升之0.5M $\text{Na} \cdot \text{PO}_4$ (pH 8.6)，5毫升7.5%諾乃洗滌劑P40及3微升之250單位/毫升N-聚糖酶(Genzyme)。N-聚糖酶處理係除去N-鍵結之碳水化合物。將樣品於37°C培育6小時。該反應藉加入SDS-PAGE樣品緩衝液而終止，然後如上述，用抗-mpl配體單株抗體及抗-鼠ECL西方氏檢測套組(阿美夏姆公司)進行SDS-PAGE西方氏分析(12%丙烯醯胺)。使用該法對於人類mpl配體及mpl配體類似物之N-鍵結鏈之分析被示於圖7中。在用N-聚糖酶處理之後，N4，N7及N10在西方氏吸漬中之移動性被減至與N1者相同。如所預期者，N1用N-聚糖酶處理對於移動性沒有作用，因為N1不具N-鍵結糖基化部位。此等結果顯示所觀察到之尺寸增加係由於加入N-鍵結碳水化合物。

B. mpl配體上O-鍵結之碳水化合物之分析

為了分析O-鍵結之碳水化合物對於人類mpl配體之貢獻，各種形式之蛋白質自上述CHO細胞條件培養基中純化。各形式接受+/- O-聚糖酶(糖肽 α -N-乙醯基半乳糖胺酶，牛津GlycoSystems)處理。O-聚糖酶自糖蛋白移除O-鍵結之碳水化合物。各形式被大腸桿菌表現之版本被用做未被糖基化之對照組。為了解析O-鍵結之碳水化合物所貢獻之分子量之差異首先必須移除任何N-鍵結之碳水化合物。既然全長版本(mpl配體1-332)含有N-鍵結之碳水化合物，被CHO細胞表現之全長樣本接受上述對於被COS細胞表現之mpl配體類似物所進行之N-聚糖酶(肽-N4-(N-乙醯基- β -葡萄糖胺基)天冬醯胺酶)處理，不過N-聚糖酶處理進



五、發明說明 (31)

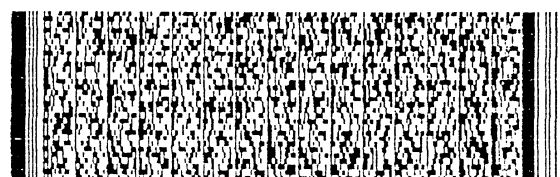
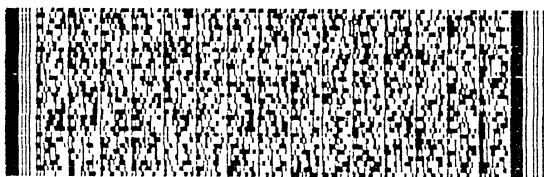
行整夜。

在對全長(1-332) mpl 配體進行O-聚糖酶處理之前，將樣本之pH範圍用1/15體積之100 mM 乙酸(pH2.2)調整至pH 6.0至pH 7.0。1微克之蛋白質藉在SDS中煮沸3分鐘而變性，以及於37℃與1 U/毫升神經胺酶(唾液酸酶，取自節桿菌(*Arthrobacter urefaciens*)，柏林格曼海姆公司)在1 mM 乙酸鈣(pH 8.6)及20 mM 磷酸鈉(pH 6.8)中培育60分鐘。

用O-聚糖酶之接續處理藉在終體積為100微升中加入5 mU 該酶，繼而於37℃培育整夜而進行。蛋白質(0.2微克/行)藉SDS-PAGE(15%丙烯醯胺)分離。移至0.2 μ m 硝基纖維素及與抗-mpl 配體多株抗體培育整夜後，mpl 配體蛋白質用抗-兔ECL西方氏檢測套組(阿美夏姆公司)顯現。

圖3顯示人類mpl 配體之四種不同形式之西方氏吸漬圖譜。1-3行為全長mpl 配體1-332，4-6行為mpl 配體1-174，7-9行為mpl 配體1-163，以及10-12行為mpl 配體1-153。在第2行之樣品為全長mpl 配體1-332。該蛋白質似乎被降解，可能由於在37℃，於糖解酶中之培育時間延長。所以，在第3行中被大腸桿菌表現之未糖基化版本被用於計算加至被CHO細胞表現之mpl 配體1-332中之O-鍵結碳水化合物之近似分子量。

此等結果一致顯示被測試之mpl 配體之所有被CHO表現之形式上存在碳水化合物。藉單醣組成之直接分析證實被CHO細胞表現之mpl 配體1-332，1-174及1-163存在O-鍵結



五、發明說明 (32)

碳水化合物。唾液酸、GalNAc 及Gal藉酸性水解自糖蛋白中釋出。單糖藉高壓陰離子交換層析及脈衝式電流測定而檢測。所有三種糖皆於mpl配體之每一形式中被檢測到。該結果顯示存在含有唾液酸之O-鍵結碳水化合物。該數據與在圖4中所見到之活體內數據一致，在圖4中mpl配體之被CHO細胞表現之形式，在活體中皆比被大腸桿菌表現之對等形式更具活性。因此，碳水化合物之存在增加mpl配體在活體中之活性。

表 3

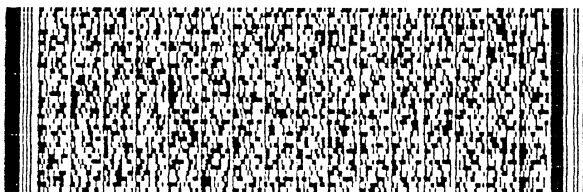
O-鍵結碳水化合物之計算值

Mpl 配體形式	O-聚糖酶 處理(+/-)	分子量 (Da)	分子量變動	潛在 O-鍵結 鍵之數目 (@950 Da/鍵)
1-332	-	54200	13600	14
"	(大腸桿菌版本)	40600		
1-174	-	24600	8600	9
"	+	16000		
1-163	-	18400	3900	4
"	+	14500		
1-153	-	15200	2300	2
"	+	12900		

實例 7

Mpl 配體之ELISA測定

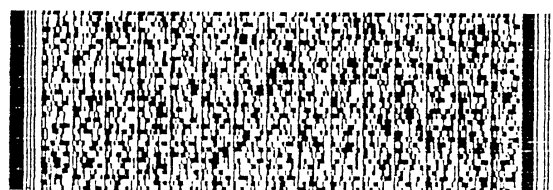
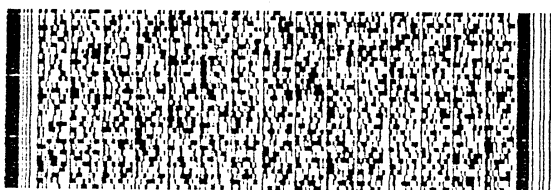
多株抗體製造-將新英格蘭白兔經三個月期間用大腸桿菌製造之重組人類mpl配體1-163過度免疫。將得自6隻顯示高抗體滴度之兔子之抗血清加以匯集以及特異性抗-mpl配體抗體被親和純化。



五、發明說明 (33)

親和純化-將重組人類mpl配體1-163依照廠商之指示共價連接在Actigel-ALD (立體基因生物分離公司)上。將兔子抗血清匯集物之試樣量加到mpl配體親和凝膠上,以及將該漿體於4-8℃在振搖平台上溫和振盪。將未結合之血清蛋白質用PBS從凝膠床上沖洗下來,而被特異性結合之抗-mpl配體抗體然後用ImmunoPure Gentle Ag/Ab溶析緩衝液(皮爾斯化學公司)溶析。被回收之抗體對著被更換數次之PBS透析,然後將抗體溶液在Amicon攪拌槽超過濾單元中濃縮,生成之抗體濃縮物為接下來用於塗佈凹槽及製備酶結合物之特異性抗-mpl配體抗體之來源。

ELISA試劑-Immulon 4 Removawell Strips(丹納技術實驗室)用被親和純化之兔抗-mpl配體抗體塗佈。被親和純化之抗體用0.1 M碳酸氫鈉(新鮮製備時,pH為約8.2)稀釋至濃度為2.5微克/毫升。各凹槽接受10微升抗體以及將皿在被密封及濕化之室中於室溫培育24小時。然後將由1%牛胎血清及5%蔗糖溶於TEN(50 mM Tris 7.4/10 mM EDTA/150 mM NaCl)所組成之封阻溶液200微升加到各凹槽中,並將皿在被密封及濕化之室中於室溫再培育24小時。將合併之塗佈及封阻溶液自凹槽中移除。可以包括另一面塗佈/封阻步驟:將300微升在PBS中之SuperBlock封阻緩衝液(皮爾斯化學公司)加到各凹槽中。於室溫靜置約5分鐘後,將該溶液移除並讓凹槽於室溫風乾24小時。將被塗佈之凹槽貯存在4-8℃之密封塑膠袋中,直至供mpl配體之ELISA使用。

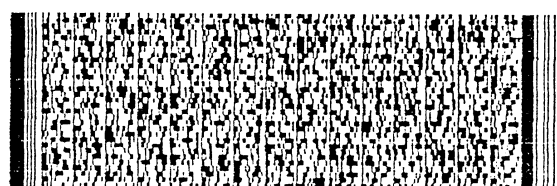
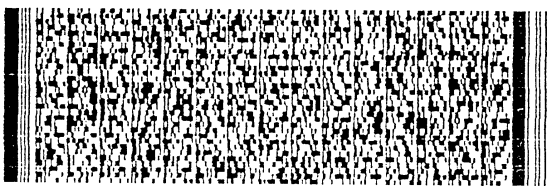


五、發明說明 (34)

來自兔抗血清匯集物之經親和純化之抗-mpl配體抗體與辣根過氧化物酶(HRPO)共價偶合，以用做信號產生抗體。將經親和純化之抗體用亞胺硫五圓HCl(福路卡化學公司)衍化。另一方面，HRPO用N-琥珀醯亞胺基6-順丁烯二醯亞胺基己酸酯(福路卡化學公司)衍化。將二被活化之蛋白質混合以允許共價偶合，然後將反應混合物在FPLC Superose 6(法瑪西亞)管柱上層析，以單離出具期望分子量(即約200 kD)之抗體：HRPO結合物。將含有期望結合物之溶析份合併及在Centricon 30(艾米孔分公司，W.R. Grace & Co.)中濃縮，然後以50%甘油溶液於-20℃貯存。將該抗-mpl配體Ab:HRPO濃縮物用在PBS中之2%牛胎血清稀釋，以供ELISA使用。在ELISA中所用結合物之終濃度為250-500毫微克/毫升。

在大腸桿菌細胞中製得之重組人類mpl配體1-163被用於製備標準品。該mpl配體用在TEN緩衝液(含0.05%做為保存劑之硫柳汞)中之2%牛胎血清(西格瑪化學公司)稀釋。製得之標準品含有1.0, 0.5, 0.25, 0.125及0.062毫微克/毫升mpl配體。

測定-100微升之mpl配體標準品或樣品被加到凹槽中，然後在密封及濕化室中於室溫培育18-24小時。然後將凹槽內容物及殘餘溶液移除並將凹槽用沖洗溶液(在TEN緩衝溶液中之0.05% Tween 20)沖洗。將抗-mpl配體Ab:HRPO結合溶液(100微升)加到各凹槽中，然後在密封及濕化室中於室溫培育2小時。將凹槽之內容物移出，然後用在TEN緩



五、發明說明 (35)

衝液中之0.05% Tween 20沖洗4次。

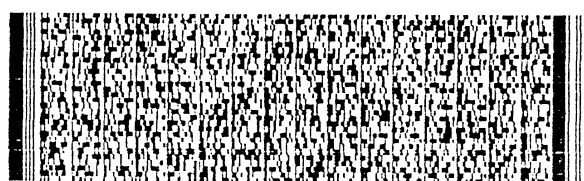
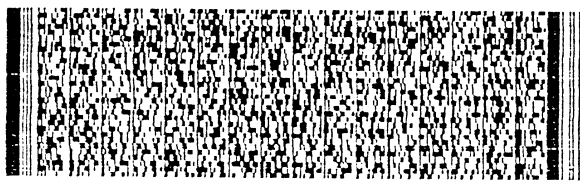
為了顯色，加入100微升TMB/過氧化物受質溶液(Kirkegaard & Perry溶液A & B以1:1混合)並於室溫培育20分鐘。反應藉加入100微升終止溶液(0.5N硫酸)而終止，以及在微滴定皿讀數器上讀出於450 nm之吸光度。樣品中mpl配體之濃度從用曲線求律程式產生之標準曲線計算。

實例8

在短期液體培養巨核細胞測定中

Mpl配體1-174類似物之生物活性

Mpl配體1-174之類似物如前述製備及測定其在液體培養基中刺激巨核細胞生長之能力。將自人類白血球除去法之CD34經選擇細胞(Nichol等人, Stem Cells 12:494-505 (1994))以 2×10^5 /毫升之濃度平面接種在培養基(IMDM/1% Pen-Strep 穀胺醯胺/1% 非必需胺基酸/1% MEM 維生素/10% 去離子BSA/10% 正常人類AB血漿/ $10 \mu\text{M}$ α -琥珀醯磺胺噻甘油/20微克/毫升L-天冬醯胺)中。此外，將含有mpl配體(1-174)或mpl配體1-174類似物之COS-1條件培養基1.5微升加到各凹槽中。在Terasaki型微滴定組織培養皿(芬加得國際公司)中之終體積為15微升。將細胞在濕化箱內，於37°C及5% CO₂中培育8日，用1%戊醛將其直接固定在培養凹槽上，然後與抗-GPIb、抗-GPIIb(生物設計公司)及抗-GPIb(加州卡平泰里之達可公司)所組成之單株抗體混合物一起培育。免疫反應藉使用抗生蛋白鏈菌素- β -



五、發明說明 (36)

半乳糖苷檢測系統(Histo-Mark, Kirkegaard及Perry)顯現。巨核細胞，藉較暗顏色鑑別(在實際照片中為藍色)而顯現於圖8中。

圖8之A格及D格分別為陽性及陰性對照組。A格圖示之凹槽接受含37.5 微微克野生型mpl配體1-174之COS-1條件培養基以及顯示顯著之巨核細胞生長。D格接受1.5微升COS-1仿製條件培養基以及未顯示生長。圖8之B及C格分別為mpl配體1-174類似物N7及N10。B格接受含9.0 微微克mpl配體之COS-1條件培養基而C格接受含27 微微克者，二者皆顯示優異之巨核細胞生長。

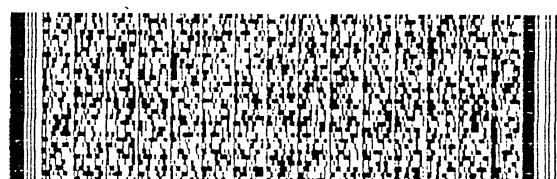
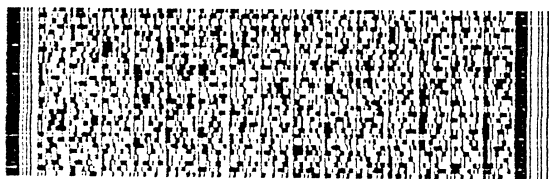
該實驗顯示被測試之mpl配體類似物能刺激試管中人類巨核細胞之生長。

實例9

在一試管內細胞增殖測定中

Mpl配體1-174類似物之生物活性

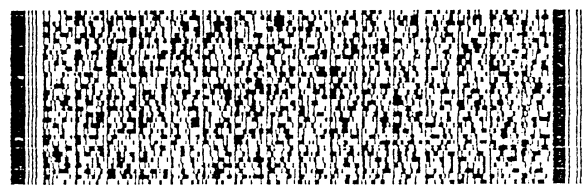
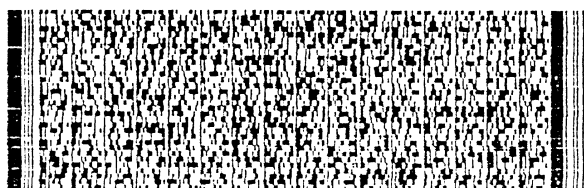
Mpl配體1-174之類似物按照上述製備以及測定其刺激32D-mpl細胞增殖之能力。為了構築32D-mpl細胞，將全長人類mpl受器序列(Vigon, I. 等人, PNAS 89:5640-5644 (1992))次選殖入含有Moloney鼠肉瘤病毒之轉錄啟動子之表現載體中。將6微克該構築體及6微克雙面營養性反錄套裝構築體(Landau, N.R., Littman, D.R., Journal of Virology 66:5110-5113 (1992))用CaPO₄哺乳動物轉染套組(史翠塔基因公司)轉染入 3×10^6 293細胞中。相同之細胞於2日後及4日後分別被再轉染。最後一次轉染後，將



五、發明說明 (37)

293 細胞與 IL-3 依賴性鼠細胞系 (32D, 純系 23 ; Greenberger 等人, PNAS 80:2931-2936 (1983)) 一起培育。24 小時後, 32D 細胞在 BSA 梯度 (Path-o-cyte ; 麥爾斯公司) 中被回收。將細胞在 1 毫微克/毫升鼠 IL-3 中擴增, 然後按照在 20% APK9 血清 (Bartley 等人, Cell 77:1117-1124 (1994)) 中之生長而選擇。使用多株兔抗肽 (MPL) 血清及藉 FACS, 按照受器之細胞表面表現而選擇細胞。此等細胞激素依賴性鼠 32D-mpl 細胞對於 mpl 配體具反應性。令 32D-MPL 細胞在含 10% 胎兒純系 II 血清 (海克隆實驗室) 及 1.0 毫微克/毫升鼠 muIL3 之 MEM 培養基中生長至細胞密度為 1×10^6 細胞/毫升。細胞藉離心收集 (約 $500 \times G$) 以及用缺乏 muIL3 之生長培養基沖洗二次並以 1×10^5 細胞/毫升之濃度再懸浮。

用 mpl 配體 1-163 及在 5000-1 微微克/毫升之範圍內製備經延伸之 12 點 mpl 配體標準曲線。將標準 mpl 配體或測定樣品之各稀釋液 100 微升加到含有 100 微升被再懸浮細胞之 96 凹槽微滴定組織培養平皿之適當凹槽 (10,000 細胞/凹槽) 中, 以及在濕化培育器中於 $37^\circ C$ 及 10% CO_2 之條件下培育。48 小時後, 將 40 微升 MTS 試劑 (水性非放射活性細胞增殖套組, 普羅美加公司) 加到各凹槽中, 14-18 小時後將平皿在平皿讀數器上於 490 nm 讀出。樣品在試管內之活性從各樣品之劑量反應曲線計算。一單位被界定為在各樣品中達到最大刺激之 50% 所需之 mpl 配體之量。比活性藉將 mpl 配體 ELISA 測得之生物活性 (單位/毫升) 除以 mpl 配體濃度



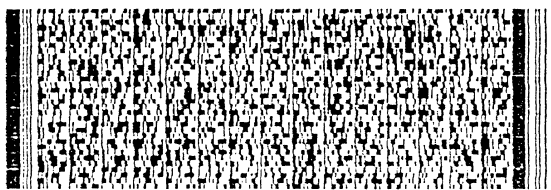
五、發明說明 (38)

(毫微克/毫升)而得到。

在COS細胞中被轉染及表現之mpl配體類似物之比生物活性被示於表4中。胺基酸置換對於碳水化合物添加之影響亦被摘要。被純化之人類序列mpl配體在試管中具有活性，以及如上述測定所測得者為200-300單位/微微克。從表4顯然可知含有額外N-鍵結碳水化合物部位之mpl配體類似物例如N4及N10，即使當彼等攜帶額外之碳水化合物鏈時，亦與具天然序列之mpl配體一樣被表現(如實例6，A節所測得者)。此二類似物亦保有完整之試管內生物活性。所以，含有N-鍵結之碳水化合物之mpl配體類似物在哺乳動物中可被正常表現，以及其可具有正常或增加之試管內生物活性。

表4

Mpl配體形式 (胺基酸長度)	序列	N-鍵結鏈之 數目	Elisa (毫微克/毫升)	試管內活性 (單位/毫升)	比活性 (單位/毫微克)(d)
		(a)	(b)	(c)	
仿製組	無	0	<0.08	<10	<125
N1 (174)	天然	NA	25	5375	215
N1 (174)	天然	0	31.4	8800	280
N1 (174)	天然	0	31.75	NA	NA
N2 (174)	N22	0	NA	NA	NA
N3 (174)	N25	NA	1.85	636	344
N4 (174)	N30T32	1	38	8830	232
N4 (174)	N30T32	1	24	NA	NA
N5 (174)	N38T40	0	1.2	<10	<8
N6 (174)	N86	0	0.44	<10	<22
N7 (174)	N82A83	0 to 1	6	2660	443
N7 (174)	N82A83	0 to 1	4.7	3080	655
N9 (174)	N92	0	10.5	1970	188
N10 (174)	N120T122	1	20.4	5943	291
N10 (174)	N120T122	1	33.7	9690	288
N11 (174)	S36N38T40	NA	<0.625	<10	<16
N11 (174)	S36N38T40	0	1.3	<10	<8
N13 (174)	N53T55	0 to 1	67	18000	269
N14 (174)	N58T60	0 to 1	17.9	4850	271
N15 (174)	N30T32N120T122	0 to 2	26	6420	247



五、發明說明 (39)

註

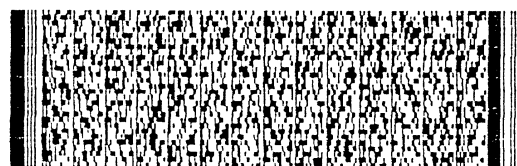
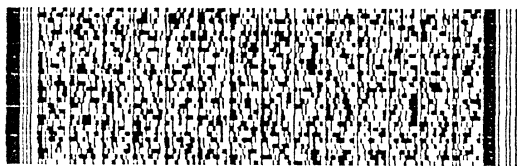
- (a) 額外之N-鍵結鏈之數目，依據實例6所述之類似物多肽在SDS凝膠中之移動性而估計。
- (b) 在CHO細胞上清液中mpl配體類似物之量，藉實例所述之ELISA測定法而測定。
- (c) 在試管中之活性藉測量在32D細胞(生長依賴mpl配體)中胸苷攝取量之刺激度而測定。
- (d) 藉增殖測定測得之mpl配體類似物之試管內活性與藉mpl配體ELISA測得之mpl配體類似物之量之比。
- N.A. 無數據。

實例10

Mpl配體1-174，N4及N15在CHO細胞中之表現及純化
將含有mpl配體1-174、N4及N15 cDNA之pDSR α 2用實例2所述之方法轉染入缺乏DHFRCHO細胞中，不過進行下列修改。

對每一類似物進行一次轉染。轉染之後三星期，mpl配體表現藉mpl配體ELISA篩選。對於每一形式，三個表現純系以低溫貯存冷凍。各類似物之最高表現純系被擴增以供輥瓶製造。對於N4，製造7.4升之條件培養基[50% D-MEM，50% HAMS-F12，1%青黴素/鏈黴素/穀胺醯胺，1%非必需胺基酸(吉伯可公司)及1% HT補充物(吉伯可公司)]，以及對於N15，製造4.6升條件培養基。

將來自輥瓶(接種有表現mpl配體1-174 (2.9升)、N4 (7.4升)、N15 (4.4升)之CHO細胞)之不含血清之CHO細胞

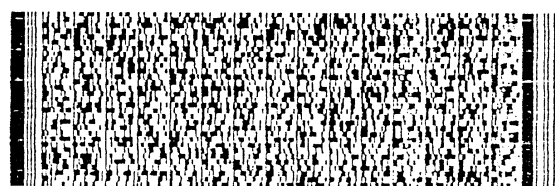
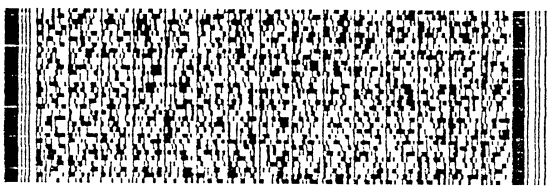


五、發明說明 (40)

條件培養基用S1Y10 (以10,000道爾頓分子量來畫分)Amicon 螺旋超過濾筒分別濃縮12-、19-及12-倍。將150毫升經濃縮之條件培養基直接加載在3.3毫升hu-MPL-X (受器)親和管柱上且流速為0.3毫升/分鐘。親和管柱,按照廠商之建議,藉將1.0-1.5毫克mpl-X (mpl受器之可溶性細胞外區域)與每毫升被CNBr活化之瓊脂糖樹脂(法瑪西亞公司)偶合而構築。加載後,管柱用30毫升磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS; 10 mM NaPO_4 , pH 6.8/150 mM NaCl)沖洗,然後用60毫升之10 mM Tris, pH 8.0/1M NaCl/1 mM CHAPS沖洗。Mpl配體(1-174)用30毫升20 mM CAPS (3-[環己胺基]-1-丙磺酸)pH 10.5/1M NaCl/1 mM CHAPS(3-[(3-膽胺丙基)二甲胺]-1-丙磺酸酯)溶析。

溶析份藉將0.6毫升1M Tris pH 7.0加到各被溶析出之部分中而被中和。SDS-PAGE分析顯示在10 mM Tris, pH 8.0/1M NaCl/1 mM CHAPS沖洗期間, mpl配體1-174似乎「滲出」(bleeding)。溶析部分藉SDS-PAGE分析。將此等含有mpl配體1-174之部分匯集。然後重覆該親和純化,惟做下列改變: 0.5毫升/分鐘加載及溶析,以及免除10 mM Tris, pH 8.0/1M NaCl/1 mM CHAPS沖洗。

將所有含單一mpl配體帶之部分在轉接至中心旋流器之50毫升攪拌槽中,用YM10 (以10,000道爾頓分子量來畫分)膜濃縮。將該0.5毫升濃縮物直接加載在用PBS平衡之Pharmacia Superdex 200 HR 10/30凝膠過濾管柱上,以0.25毫升/分鐘之速率收集,每份0.25毫升。將所有含單



五、發明說明 (41)

一mpl配體帶(依據SDS-PAGE分析)之溶析份匯集。

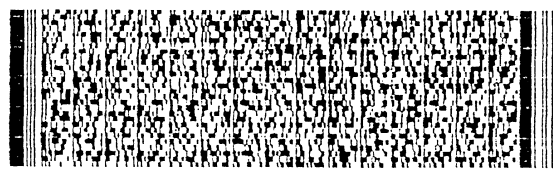
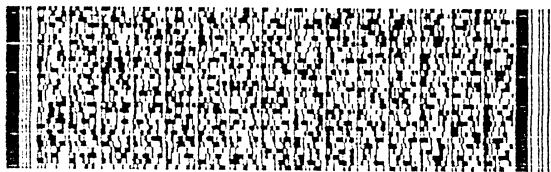
被CHO細胞表現之mpl配體之其他形式(N4及N15)以相同方式純化(匯集二親和純化物及在Superdex 200凝膠過濾管柱上操作)。

實例11

被CHO細胞表現之N4及N15中碳水化合物加入之測定

為了測定在CHO細胞中表現之mpl配體形式是否含有N-鍵結碳水化合物，藉實例6所述之SDS-PAGE西方氏吸漬法分析條件培養基，不過做下列修改。

使用來自靱瓶之CHO D-條件培養基。將樣品加到Centricon-10離心濃縮器(麻薩諸塞州百佛里市艾米孔公司)中，以及在Beckman J2-HS離心機中用固定角轉子(JA 20.1)於6000 RPM旋轉1小時。將一體積含有約100毫微克mpl配體類似物之經濃縮樣品，連帶SDS樣品緩衝液(如實例6所述)，一起加載在SDS PAGE凝膠上。被大腸桿菌表現且不含碳水化合物之mpl配體MK1-174亦被加載。圖9顯示在移動性上之差異，其與碳水化合物之預期量一致。移動最快速者為Met-Lys (1-174)大腸桿菌mpl配體，繼而接續為mpl配體1-174 (CHO)，N4 (CHO)及N15 (CHO)。見圖9。與未糖基化mpl配體相較尺寸增加最可能之解釋為在mpl配體1-174 (CHO)上具有額外之O-鍵結碳水化合物，在N4 (CHO)上具有額外之O-鍵結碳水化合物及一額外之N-鍵結寡糖，以及在N15 (CHO)上具有額外之O-鍵結碳水化合物及二額外之N-鍵結寡糖。



五、發明說明 (42)

為了確證分子量之增加確實係由於加入N-鍵結之碳水化合物鏈，將樣品用N-聚糖酶處理，以移除任何實例6所述之N-鍵結碳水化合物。各樣品含有約100毫微克自條件培養基純化之mpl配體類似物。

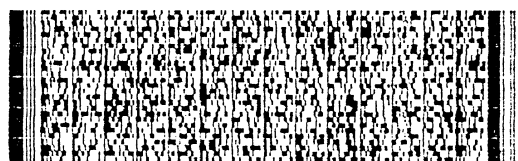
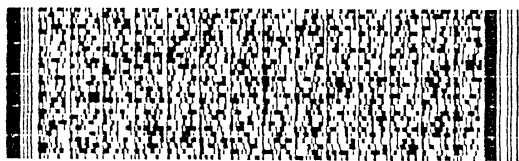
用N-聚糖酶處理之後，N4 (CHO)及N15 (CHO)之移動性被減至與mpl配體1-174 (CHO)者一樣。Mpl配體MK 1-174 (大腸桿菌)或mpl配體1-174 (CHO)用N-聚糖酶之處理不會影響移動性，因為此二形式皆未含任何N-鍵結之碳水化合物。N-聚糖酶處理與未處理之比較顯示N4在尺寸上之差異對應於一個N-鍵結碳水化合物鏈之尺寸，以及N5在尺寸上之差異對應於二個碳水化合物鏈之尺寸。因此，此二mpl配體形式由於加入N-鍵結糖基化部位，而使得其在CHO細胞中被表現時形成額外的N-鍵結碳水化合物。

實例12

在CHO細胞中製得之

Mpl配體類似物在試管內之生物活性

用因子依賴性細胞系32D-MPL及實例9所述之測定法，分析純化mpl配體及在CHO細胞或大腸桿菌中表現及純化之類似物之試管內生物活性，不過活性係從以CHO細胞中製得之mpl配體1-332為標準所得之曲線計算。各種形式之試管內比生物活性被示於表5中。從該表顯然可知含有額外碳水化合物之mpl配體類似物(在CHO細胞中被表現)具有試管內生物活性。



五、發明說明 (43)

表 5

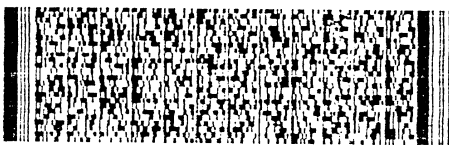
MPL 配體之試管內活性

MPL 配體形式	N-鍵結鏈之數目	試管內活性
		U/毫克 X 10E6
MK174 (大腸桿菌)	0	13
1-163 (CHO)	0	86
1-174 (CHO)	0	85
N4 (CHO)	1	60
N15 (CHO)	2	92
1-332(CHO)	6	41

實例13

Mpl 配體類似物之活體內生物活性

測量用mpl配體之各種形式治療之小鼠之血小板數目以及結果被示於圖11中。衍生自CHO之mpl配體1-332，1-174，N4及N15藉mpl-受器親和層析製造及純化。衍生自大腸桿菌之Met-Lys-mpl配體1-174藉習用層析法製造及純



五、發明說明 (44)

化。將所示濃度之各形式經由皮下投給Balb/c正常雌鼠中，每日一次，共5日。最後一次注射後24小時，收集來自尾部靜脈側面小切口之血液以供試驗。用Sysmex電子血球分析器(加州艾爾飛市巴克斯特診斷公司)進行血球分析。數據以4隻動物之測定值之平均值 $\pm$ 平均值之標準偏差表示。其他血球參數諸如白血球總數或紅血球總數不受此等治療影響(數據未示出)。

所有形式皆會刺激血小板數目之增加。不過，不同形式之活性不同。相對活體內活性為：mpl配體MK 1-174 (大腸桿菌) < mpl配體 1-174 (CHO) < N4 (CHO) < mpl配體 1-332 (CHO) < N15 (CHO)。結果顯示非天然之N-鍵結碳水化合物之加入造成活體內活性增加。其亦顯示碳水化合物之量增加造成活體內活性呈比例之增加。

實例14

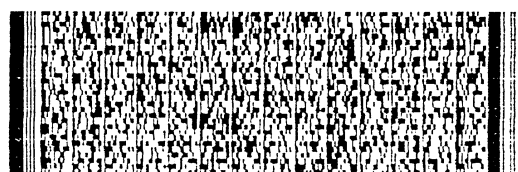
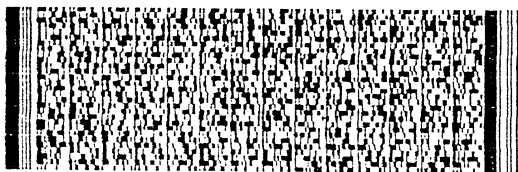
Mpl配體類似物及截短物N16-N40藉交疊PCR構築

類似物N16至N40 (此等類似物之結構見表6)，使用Cheng等人，PNAS 91, 5695 (1994)所述之方案藉交疊PCR (聚合物酶鏈反應) 構築。通常，一至二個突變被引進各構築體中。

合成下列寡核苷酸引子以製備類似物N16-N40：

5' F CCCTCTAGACCACCATGGAACTGACTGAATTGCTCCTC 序列識別編號：18

3' R (1-174) CCCGTCGACTCAGAGCTCGTTCAGTGTG 序列識別編號：19



五、發明說明 (45)

N16 - 3' R	CCCGTCGACTCACTCCAACAATCCAGAAG	序列識別編號 : 20
N17 - 3' R	CCCGTCGACTTATCTGGCTGAGGCAGTGA	序列識別編號 : 21
N18 - F	CACGTCCTTAACAGCAGCCTGAGCCAGTG	序列識別編號 : 22
N18 - R	CACTGGCTCAGGCTGCTGTAAAGGACGTG	序列識別編號 : 23
N19 - F	CCCTTTGCCTAACGGTTCCCTGCTGCCTGCTGT	序列識別編號 : 24
N19 - R	ACAGCAGGCAGCAGGGAACCGTTAGGCAAAGGG	序列識別編號 : 25
N20 - F	TGCCTACACCTAACCTGTGCGCTGCTGTGGA	序列識別編號 : 26
N20 - R	TCCACAGCAGGCGACAGGTTAGGTGTAGGCA	序列識別編號 : 27
N21 - F	GGAAAACCAATATGTCGGAGACCAAGGCACA	序列識別編號 : 28
N21 - R	TGTGCCTTGGTCTCCGACATATTGGT'TTTCC	序列識別編號 : 29
N22 - F	TGGGAGAATGGAACACCACGATGGAGGAGACC	序列識別編號 : 30
N22 - R	GGTCTCCTCCATCGTGGTGTTCCAT'TCTCCCA	序列識別編號 : 31
N23 - F	AAAACCCAGATGAACGAGACGACCAAGGCACA	序列識別編號 : 32
N23 - R	TGTGCCTTGGTTCGTCTCGTTCATCTGGGTTTT	序列識別編號 : 33
N24 - F	CCCAGATGGAGAACACCTCGGCACAGGACAT	序列識別編號 : 34
N24 - R	ATGTCCTGTGCCGAGGTGTTCTCCATCTGGG	序列識別編號 : 35
N25 - F	CACGGGGACAAAACGGAACCACTTGCTCTCA	序列識別編號 : 36
N25 - R	TGAGAGGCAAGTGGTTCCGTTTTGTCCCCGTG	序列識別編號 : 37
N26 - F	CAGGGCAGGAACACATCTCACAAGGATCCCA	序列識別編號 : 38
N26 - R	TGGGATCCTTGTGAGATGTGTTCTGCCCTG	序列識別編號 : 39
N27 - F	GGGCAGGACCAACGCTAGCAAGGATCCCAAT	序列識別編號 : 40
N27 - R	ATTGGGATCCTTGCTAGCGTTGGTCTGCC	序列識別編號 : 41
N29 - F pair1	CAGTGCAACGAGTCCCACCCTTGG	序列識別編號 : 42
N29 - R pair1	CAAAGGGTGGGACTCGTTGCACT'G	序列識別編號 : 43
N29 - F pair2	GACCACAAATCACTCCGATCCCAA	序列識別編號 : 44
N29 - R pair2	TTGGGATCGGAGTGATTTGTGGTC	序列識別編號 : 45
N30 - F	GTCCCCACCAACACCTCTCTAGTCCTC	序列識別編號 : 46
N30 - R	GAGGACTAGAGAGGTGTTGGTGGGGAC	序列識別編號 : 47
N31 - 3' R	CCCGTCGACTCACTTCAGAAGCCCAGAGCCAGT	序列識別編號 : 48



五、發明說明 (46)

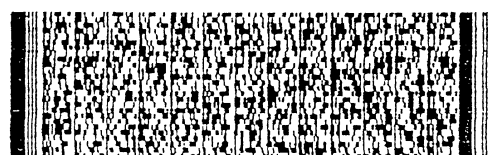
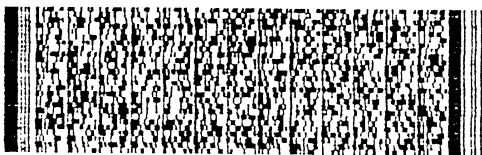
N36(1) - F	GAAAACCCAGAACGAGACCACCAAGGCACAG	序列識別編號 : 49
N36(1) - R	CTGTGCCTTGGTGGTCTCGTTCTGGGTTTTTC	序列識別編號 : 50
N36(2) - F	CACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAG	序列識別編號 : 51
N36(2) - R	CTCCCAGAATGTCCTGTGCCTTGGTG	序列識別編號 : 52
N37 - F	GAAAACCCAGATGAACGAGACCAAGGCACAG	序列識別編號 : 53
N37 - R	CTGTGCCTTGGTCTCGTTCATCTGGGTTTTTC	序列識別編號 : 54
N38 - F	GTCCCCACCAACACCACTCTAGTCCTC	序列識別編號 : 55
N38 - R	GAGGACTAGAGTGGTGTGGTGGGGAC	序列識別編號 : 56

F = 正向

R = 逆向

引進一新穎糖基化部位之構築以二接續步驟進行。在步驟1中，二反應用四種不同的寡核苷酸進行。此等寡核苷酸包括5'-正向引子、逆向突變引子、正向突變引子(通常與逆向突變引子互補)以及逆向3'引子。逆向3'引子所含之序列引進終止密碼子，其隨後為SalI限制部位。終結密碼子在位置175、184、192及200被引進。因此，可以製備長度為1-174，1-183 (N16)，1-191 (N17)及1-199 (N31)之形式。PCR1使用模板DNA (含有mpl配體1-174序列或全長mpl配體1-332序列之pDSR α 2)，5'正向引子及逆向突變引子。PCR2使用模板DNA，3'反向引子及正向突變引子。然後進行二PCR反應以及被擴增之DNA片段藉瓊脂糖凝膠電泳而分離。含有具正確尺寸之DNA片段之瓊脂糖小片從凝膠切下。

將得自PCR1及PCR2之DNA片段混合在一起，以及用5'正向及3'逆向引子進行第三次PCR反應。因此，將含有被插



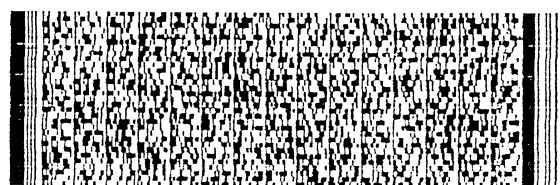
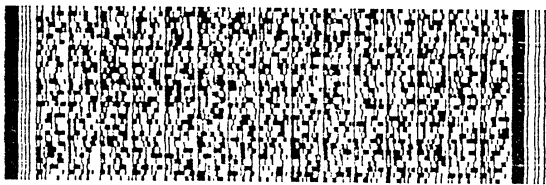
五、發明說明 (47)

入mpl配體之期望突變之全長DNA片段擴增。

被擴增之片段再次藉瓊脂糖凝膠電泳分離，具正確尺寸之DNA片段用Geneclean™套組，按照廠商提供之步驟(Bio 101, Inc.)純化。被純化之DNA用XbaI及SalI消化，然後用Geneclean™套組再次純化。將該片段黏接至經XbaI及SalI切割之pDSR α 2。被黏接之DNA於存在載體tRNA下，在0.3M NaOAc pH 5.2中用二體積之乙醇沉澱，並被轉型入大腸桿菌中。純系藉限制分析及瓊脂糖凝膠電泳測試，以鑑定含有正確尺寸之DNA插子者。然後製備經純化之質體DNA以及將mpl配體插子定序，以確證存在期望之突變以及確保無額外之胺基酸改變被引進。

在數個例子中，二個或以上突變被同時組合，即N29，N33，N34，N35，N39及N40。其藉在已含有改變之DNA中引進新穎置換而達成。舉例言之，N33藉在N15中引進N23改變而製成。在該例中，上述方法藉使用N23突變引子及N15模板DNA而進行。在另一方法中，二改變可被同時引進模板DNA中。模板DNA可含有天然序列，或含有編碼已含改變之mpl配體形式之序列。在此等例子中，步驟1包含3次PCR反應及6個寡核苷酸。此等寡核苷酸包括5'正向引子，2對正向及逆向突變引子以及逆向3'引子。各對引子彼此互補以及含有被設計成引進一新穎糖基化部位之序列。

PCR1包括模板DNA，5'正向引子及來自對1之逆向突變引子。PCR2包括模板DNA，來自對1之正向突變引子及來自對2之逆向突變引子，其中對2引子在對1引子之3'。PCR3包



五、發明說明 (48)

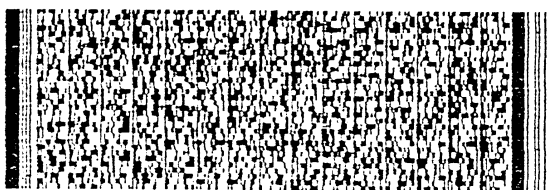
括模板DNA，來自對2之正向突變引子及逆向3'引子。

來自各PCR反應之DNA片段藉瓊脂糖凝膠電泳而分離以及如前述切割。然後將3 DNA片段組合在一起以及在只使用5'正向及3'逆向引子下藉PCR再次擴增。

然後將編碼含有二新穎糖基化部位之序列之完整基因之DNA片段純化，用XbaI及SalI切割，以及如前述黏接入經XbaI及SalI切割之pDSR α 2中。多個突變亦可以藉使用已含突變之模板進行PCR反應而組合。舉例言之，N39藉將N36及N38改變引進N15模板DNA中而製造。此使用與製造N36者(N36(1))不同套組之引子(N36(2))來製造。見上述引子。此二組引子引進相同之突變。

較長之mpl配體形式亦可被製造。因此，N40以與N39相同之方式製造，不過在PCR3中使用3'逆向引子(步驟1)以及在步驟2中之PCR引子為被用於製造N31之引子。該引子在位置200引進終止密碼子，接下來為SalI限制部位。此外，供PCR 3使用之模板DNA含有編碼全長mpl配體(1-332)之序列。

典型的PCR反應混合物含有：4微升各正向及逆向引子(5微微莫耳/微升)，1微升模板(50毫微克)，10微升5X LP緩衝液(100 mM Tricine pH 8.7/ 25% 甘油/425 mM KOAc)，10微升dNTP貯存液(dATP，dTTP，dCTP及dGYP各1 mM)，0.8微升rtTH聚合酶(柏金艾莫公司；2.5U/微升，及2微升Vent聚合酶(NEB；以1X LP緩衝液1：100新鮮稀釋後為0.01U/微升)。加入水以使終體積為50微升。所有成分



五、發明說明 (49)

按照所示順序加在一起，以及當第一循環之溫度藉加入1微升50 mM MgOAc而超過60℃時，PCR被啟動。反應條件為：2循環之94℃，10秒/45℃，1分鐘/68℃，5分鐘，繼而為25循環之94℃，10秒/55℃，1分鐘/68℃，5分鐘。

此等一般步驟被用於構築表6所示之mpl配體類似物及截短物N16至N40。各形式之DNA序列改變被標示。

表6：

具有 N-鍵結碳水化合物鏈用之部位之 MPL 配體類似物

類似物/物種編號	胺基配置換	序列改變
N16	(1-183); Thr ¹⁸⁴ →Gly ³³² 刪除	ACA→TGA (終止密碼子)
N17	(1-191); Thr ¹⁹² →Gly ³³² 刪除	ACT→TAA (終止密碼子)
N18	His ²³ , Arg ²⁵ →Asn ²³ , Ser ²⁵	CAC, AGA→AAC, AGC
N19	Thr ³⁷ , Pro ³⁸ , Val ³⁹ → Asn ³⁷ , Gly ³⁸ , Ser ³⁹	ACA, CCT, GTC →AAC, GGT, TCC
N20	Val ³⁹ , Leu ⁴¹ →Asn ³⁹ , Ser ⁴¹	GTC, CTG→AAC, TCG
N21	Gln ⁵⁴ , Glu ⁵⁶ →Asn ⁵⁴ , Ser ⁵⁶	CAG, GAG→AAT, TCG
N22	Lys ⁵² , Gln ⁵⁴ →Asn ⁵² , Thr ⁵⁴	AAA, CAG→AAC, ACG
N23	Glu ⁵⁷ →Asn ^{55'(i)} , Thr ⁵⁷	GAG→AAC(i), ACG
N24	Glu ⁵⁷ , Lys ⁵⁹ →Asn ⁵⁷ , Ser ⁵⁹	GAG, AAG→AAC, TCG

五、發明說明 (50)

N25	Leu ⁸¹ , Pro ⁸³ →Asn ⁸¹ , Thr ⁸³	CTG, CCC→AAC, ACC
N26	Thr ¹¹⁸ , Ala ¹²⁰ →Asn ¹¹⁸ , Ser ¹²⁰	ACC, GCT→AAC, TCT
N27	Thr ¹¹⁹ , His ¹²¹ →Asn ¹¹⁹ , Ser ¹²¹	ACA, CAC→AAC, AGC
N29	Pro ³⁰ , Val ³² , Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² → Asn ³⁰ , Ser ³² , Asn ¹²⁰ , Ser ¹²²	CCA, GTT, GCT, AAG→ AAC, TCC, AAT, TCC
N30	Ser ¹⁶³ , Arg ¹⁶⁴ →Thr ¹⁶³ , Asn ¹⁶⁴	AGC, AGA→ACC, AAC
N31	(1-199); Trp ²⁰⁰ →Gly ³³² 刪除	TGG→TGA (終止密碼子)
N33	Pro ³⁰ , Val ³² , Glu ⁵⁷ , Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² → Asn ³⁰ , Thr ³² , Asn ^{55'} (i), Thr ⁵⁷ Asn ¹²⁰ , Thr ¹²²	CCA, GTT, GAG, GCT, AA G→ AAC, TCC, AAC(i), ACG , AAT, TCC
N34	Pro ³⁰ , Val ³² , Glu ⁵⁷ , Ser ¹⁶³ , Arg ¹⁶⁴ → Asn ³⁰ , Thr ³² , Asn ^{55'} (i), Thr ⁵⁷ , Thr ¹⁶³ , Asn ¹⁶⁴	CCA, GTT, GAG, AGC, AG A→ AAC, TCC, AAC(i), ACG , ACC, AAC
N35	N4+N23+N30+N31 (1-199)	- -
N36	Met ⁵⁵ , Glu ⁵⁷ →Asn ⁵⁵ , Thr ⁵⁷	ATG, GAG→AAC, ACC
N37	Glu ⁵⁶ →Asn ⁵⁶	GAG→AAC
N38	Ser ¹⁶³ , Arg ¹⁶⁴ , Ser ¹⁶⁶ →Thr ¹⁶³ , Asn ¹⁶⁴ , Thr ¹⁶⁶	AGC, AGA, TCT →ACC, AAC, ACT



五、發明說明 (51)

N39 N4+N10+N36+N38 (1-174) - -

N40 N4+N10+N36+N38+N31 (1-199) - -

在上表中符號"(i)意指參照之胺基酸已被插入。舉例言之，「Glu⁵⁷→Asn^{55'(i)}, Thr⁵⁷」(表6中之類似物N23)意指位置57之Glu已用Thr置換，此外，Asn已被插在位置55之Met之緊鄰後方，以及Asn已被編號為55'，以致接續之胺基酸保有其接續之編號。

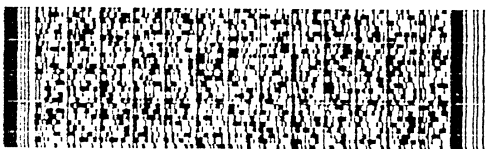
包括所有來自先前實例之改變之實例以特定類似物編號加上"+"記號表示。見類似物N35，N39及N40。此等類似物之胺基酸鏈之長度被示於括弧內。因此，類似物N35含有類似物N4，N23，N30及N31中所有改變之組合。N31所示之改變意指類似物N35為199個胺基酸長。表6中之所有類似物為174個胺基酸長，不過有特別指定者具有不同長度(或者在胺基酸已被插入之例子中，總長隨被插入胺基酸之數目而增加)。

實例15

鑑定Mpl配體類似物及截短物N16至N40之特徵

A. Mpl配體類似物之表現度及試管內生物活性之測定

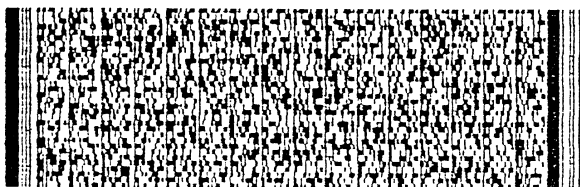
將類似物N16至N40用電穿孔法(實例5)或CaPO₄法(哺乳



五、發明說明 (52)

動物細胞轉染套組；Specialty培養基)轉染入COS細胞。將不含細胞之條件培養基於3-4日後收集，取試樣並貯存在 -70°C 。表現度如實例7所述藉ELISA測定法測定。上清液亦按照實例9所述測定生物活性，不過有一處修改。活性從標準曲線計算，該標準曲線以被CHO細胞表現且被純化之mpl配體1-332做為標準而得到。

結果被示於表7中。如表7所示，大部分mpl配體類似物被表現及分泌。一些類似物似乎分泌增加。對此等樣品之生物測定顯示其大多數之生物活性與未經改質之形式相當。一些類似物含有多個N-鍵結之碳水化合物鏈(見下文)。此顯示碳水化合物添加可能造成類似物之分泌增加及保有正常之試管內活性。



五、發明說明 (53)

表 7

Mpl 配體形式 (胺基酸長度)	序列	N-鍵結鏈 之數目	Elisa (毫微克 /毫升)	試管內 活性 (單位/毫升)	比活性 (單位/ 毫微克) (d)
		(a)	(b)	(c)	
N1 (174)	天然	0	28	3991	143
N15 (174)	N30T32N120T122	0-2	45	7003	156
N16 (183)	1-183	0	85	9276	NA
N17 (191)	1-191	NA	<0.3	11	NA
N18 (174)	N23S25	0	2	5	2.5
N19 (174)	N37G38S39	NA	<0.3	NA	NA
N20 (174)	N39S41	NA	<0.3	<10	NA
N21 (174)	N54S56	0-1	30	4380	146
N22 (174)	N52T54	0-1	2	856	428
N23 (174)	N55'(i)T57	1	11	1059	96
N24 (174)	N57S59	0	5.3	458	86
N25 (174)	N81T83	NA	0.22	123	559
N26 (174)	N118S120	NA	0.9	96	106
N27 (174)	N119S121	0	4.5	338	75
N29 (174)	N30S32N120S122	0-2	15	1627	108
N30 (174)	T163N164	0-1	128	15592	122
N31 (199)	1-199	至少 1	156	19000	122
N33 (174)	4+10+23	3	78	10057	129
N34 (174)	4+23+30	至少 2	112	13536	120
N35 (199)	34 +31	4 或以上	172	13112	76
N36 (174)	N55T57	0-1	48	5808	121
N37 (174)	N56	1	32	4504	141
N38 (174)	T163N164T166	0-1	25	3904	156
N39 (174)	N4+N10+N36+N38	3 to 4	127	17661	139
N40 (199)	N4+N10+N36+N38+N31	至少 5	134	19735	147

註

(a) 額外之N-鍵結鏈之數目，依據類似物多肽在SDS凝膠中之移動性而估計。



五、發明說明 (54)

(b) 在COS細胞上清液中mpl配體類似物之量，藉EIA測定法而測定。

(c) 在試管中之活性藉測量32D-MPL細胞(生長依賴mpl配體)之增殖而測定。

(d) 藉增殖測定測得之mpl配體類似物之試管內活性與藉mpl配體ELISA測得之mpl配體類似物之量之比。

i- 插入

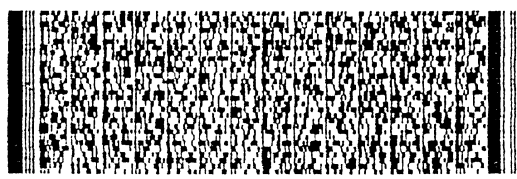
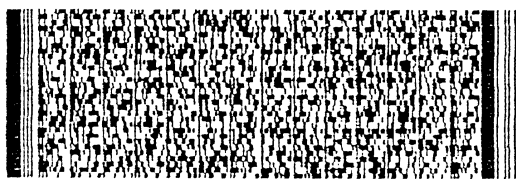
NA無數據。

B. 碳水化合物加入之測定

測試在表6中所示之類似物，以觀察其是否藉著使用實例6所述之步驟加入N-鍵結之碳水化合物。

一些類似物(N21, N22, N30, N33及N36)亦用經修改之步驟測試。此有其需要，因為被用於產生西方氏吸漬之單株抗體由包括胺基酸殘基47至62之肽誘生，而表6所述之類似物中有一些含有之置換會影響與該抗體之免疫反應性，例如N21。所以，為了分析此等類似物上清液，用在小鼠中所誘生之對抗被大腸桿菌細胞表現之mpl配體1-163之單株抗體予以免疫沉澱。

通常15微克抗體被用於免疫沉澱50毫微克mpl配體類似物。用被免疫沉澱之物質，按照實例6所述，進行西方氏吸漬，不過被免疫沉澱之帶係藉吸漬物與兔抗-mpl配體多株抗體(通常為1微克/毫升；由被大腸桿菌細胞表現之mpl配體1-163誘生)及抗兔ECL套組(阿美夏姆公司)一起培育而顯現。各種實驗之結果被示於表7。一些類似物具有增



五、發明說明 (55)

加之尺寸，其顯示存在N-鍵結之碳水化合物(N21，N22，N23，N29，N30，N31，N33，N34，N35，N36，N38，N39及N34)。此等類似物之亞群為具有1個以上N-鍵結鏈者，例如N29，N33，N34，N35，N39及N40。此等類似物以正常或較高之濃度分泌，以及具有與mpl配體1-174相當之試管內生物活性。此顯示多官能N-鍵結糖基化部位可被引進mpl配體中且不會對表現或生物活性有不利之影響。

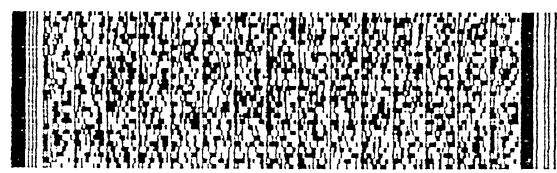
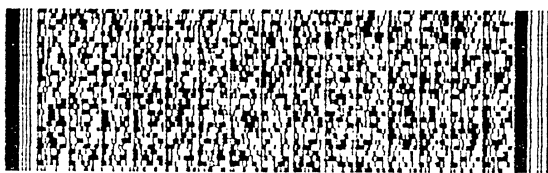
為了證明多個寡糖鏈可被加到mpl配體中，按照實例6所述，藉西方氏吸漬法分析各種在COS細胞中被表現之類似物。圖12顯示類似物之移動性隨著被加入之N-鍵結糖基化部位之數目增加而減少。具有四個新穎部位之類似物被顯示，即N39及N40。具有最多N-鍵結部位之類似物具有最緩慢之移動性。該結果可從Mpl配體之1-174及1-199二形式觀察到。此顯示至少四個類似物被組合在一起而生成具有多個N-鍵結碳水化合物鏈之新穎類似物。

實例16

含有Asn-X-Ser之糖基化部位

與含有Asn-X-Thr者之比較

N-鍵結糖基化部位不是包括Asn-X-Thr，就是包括Asn-X-Ser，其中X為Pro以外之20個天然胺基酸之任一者。吾人希望測定在第三個位置是否以Ser或Thr為較佳。所以檢查二組類似物(其中各組含有mpl配體糖基化類似物，該類似物在序列之第三位置不是含有Ser，就是含有Thr)，以觀察此對於N-鍵結糖基化部位之佔有百分率是否



五、發明說明 (56)

有影響。N15 含有 2 個 Asn-X-Thr 部位而 N29 則在同一位置含有 2 個 Asn-X-Ser 部位。同樣地，N30 含有 Asn-X-Ser 而 N38 在同一位置含有 Asn-X-Thr。

為了比較此二組類似物，將彼等在 COS 細胞中表現，以及被分泌之 mpl 配體按照實例 6 所述進行西方氏分析。結果顯示於圖 13 中。N15 與 N29 相較，被糖基化之 mpl 配體之比率顯著增加。相對地，當將 N30 與 N38 比較時，被糖基化與未被糖基化之 mpl 配體之比率只有極微差異。此等結果顯示 Asn-X-Ser 及 Asn-X-Thr 二者皆被引進 mpl 配體中，以及此二者皆可做為加入 N-鍵結碳水化合物之部位。此外，在一些例子中，Asn-X-Thr 可能較佳（即其可能被較有效率地糖基化）。

實例 17

Mpl 配體類似物及截短物 N41-N43 藉交疊 PCR 構築

類似物 N41，N42 及 N43（此等類似物之結構見表 8），使用 Cheng 等人，PNAS 91，5695（1994）所述之方案藉交疊 PCR（聚合物酶鏈反應）構築。

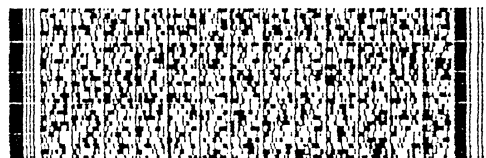
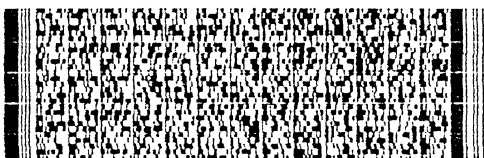
合成下列寡核苷酸引子以製備類似物 N41-N43：

5' F CCCTCTAGACCACCATGGAAGTGAATTGCTCCTC 序列識別編號：18

3' R (1-174) CCCGTCGACTCAGAGCTCGTTCAGTGTG 序列識別編號：19

3' R (1-199) CCCGTCGACTCACTTCAGAAGCCCAGAGCCAGT 序列識別編號：57

N41 - F TCCCCAGCAACACCTCTCTAGTC 序列識別編號：58
N41 - R AGGTGTTGCTGGGGACAGCTGTG 序列識別編號：59



五、發明說明 (57)

N42 - F TCCCCAACAGAACCTCTCTAGTC
 N42 - R AGGTTCTGTTGGGGACAGCTGTG

序列識別編號：60

序列識別編號：61

N37 - F GAAAACCCAGATGAACGAGACCAAGGCACAG
 N37 - R CTGTGCCTTGGTCTCGTTCATCTGGGTTTTTC

序列識別編號：53

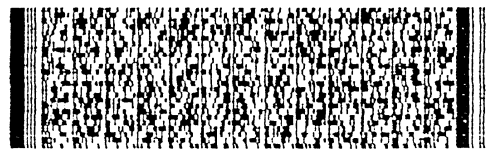
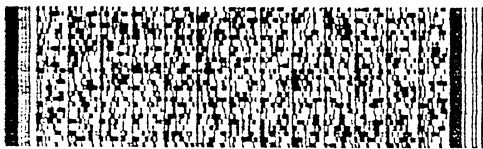
序列識別編號：54

F = 正向

R = 逆向

Mpl 配體N41及N42，使用上述之對應PCR引子對以及序列識別編號18及序列識別編號19外部引子，按照實例14所述之2-步驟PCR方案構築。對於各構築體，步驟2使用5'引子(序列識別編號18)及3'引子(序列識別編號19)，其生成1-174形式。

N43藉著使用PCR法，按照實例14所述之2-步驟方案，將2個N-鍵結部位引進已含其他N-鍵結部位之模板中而構築。在步驟1之3個分開PCR反應中，使用三個不同之DNA模板(N15，N10及1-332)。PCR反應1使用模板N15及序列識別編號18及序列識別編號54引子。該反應將N37置換引進已含N4置換之DNA片段中。PCR反應2使用模板N10及序列識別編號53及序列識別編號59引子。該反應將N37及N41突變引進已含N10置換之DNA片段中。PCR反應3使用1-332模板及序列識別編號58及序列識別編號57引子。該反應將N41置換引進已含1-199C終端之DNA片段中。各DNA片段藉瓊脂糖凝膠電泳純化。然後將3個DNA片段在1試管中混合在一起以及藉著用序列識別編號18及序列識別編號57引子進行PCR而接合在一起。此生成之DNA片段為含有N4，N37，N10



五、發明說明 (58)

及N41置換之mpl配體1-199形式。然後如實例14所述，將DNA片段選殖入PDSR α 2中。對於N41，N42之交疊PCR反應以及對於N43之步驟1三反應之第一個反應之條件為：1循環之94℃，4分鐘；25循環之94℃，10秒鐘/68℃，2分鐘；1循環之68℃，5分鐘。

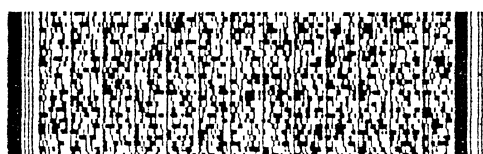
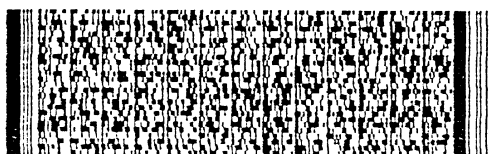
對於N43之最終PCR反應條件為：1循環之94℃，4分鐘；5循環之94℃，10秒鐘/44℃，30秒鐘；25循環之94℃，10秒鐘/68℃，2分鐘；1循環之68℃，5分鐘。

Mpl配體類似物純系N41-N43首先藉群落PCR篩選，以鑑別出含有正確尺寸及類型之DNA插子。用無菌接種環檢選被轉型之細菌(大腸桿菌)群落以及將其再懸浮於1X Tag緩衝液(柏林格曼海姆公司)中。將Tag聚合物酶以1.25U/50微升之濃度加到反應混合物中，連帶加入最終0.2 mM之dNTP混合物及最終0.2微莫耳之二載體引子。群落PCR反應條件為1循環之95℃；35循環之94℃，30秒鐘/52℃，30秒鐘/72℃，30秒鐘；1循環之72℃，5分鐘。PCR產物藉凝膠電泳分析以及定序。

表 8

具有供 N-鍵結碳水化合物鏈用之部位之 MPL 配體類似物

類似物/物種編號	胺基酸置換	序列改變
N41	Arg ¹⁶⁴ → Asn ¹⁶⁴	AGA → AAC
N42	Ser ¹⁶³ → Asn ¹⁶³	AGC → AAC
N43	N4 + N10 + N37 + N41 + N31 (1-199)	- -



五、發明說明 (59)

實例18

鑑定Mpl配體類似物及截短物N41至N43之特徵

A. Mpl配體類似物之表現度及試管內生物活性之測定

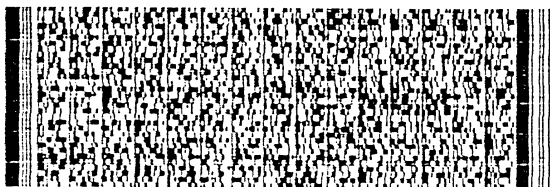
將類似物N41至N43用實例5所述之電穿孔法轉染入COS細胞。使用25微克編碼mpl配體類似物之質體DNA。將被電穿孔之細胞平面接種在含7毫升培養基之100 mm組織培養皿中。於電穿孔後3日收集條件培養基，取試樣及貯存在-70℃。

表現度藉實例7所述之ELISA測定法測定。上清液亦按照實例9所述測定生物活性，不過有一處修改。活性從標準曲線計算，該標準曲線以被CHO細胞表現且被純化之mpl配體1-332做為標準而得到。

結果被示於表9中。

表9

Mpl 配體形式 (胺基酸長度)	序列	N-鍵結鏈 之數目	Elisa (毫微克/ 毫升)	試管內 活性 (單位/ 毫升)	比活性 (單位/ 毫微克)
		(a)	(b)	(c)	(d)
N1 (174)	天然	0	28	5400	193
N31 (199)	天然	至少1	156	15000	96
N38 (174)	T163N164T166	0-1	55	6000	110
N40 (199)	N4+N10+N36+N38+N31	至少5	134	8100	135
N41 (174)	N163	0-1	109	17500	161
N42 (174)	N164	0-1	51	9300	182
N43 (199)	N4+N10+N37+N41+N31	至少5	153	30500	199



五、發明說明 (60)

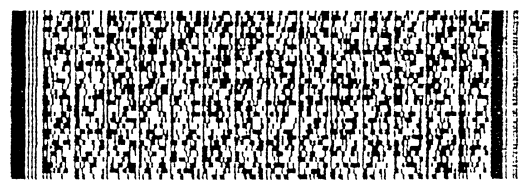
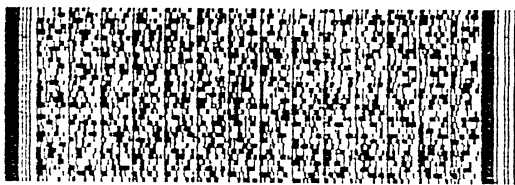
註

- (a) 額外之N-鍵結鏈之數目，依據類似物多肽在SDS凝膠中之移動性而估計。
- (b) 在COS細胞上清液中mpl配體類似物之量，藉EIA測定法而測定。
- (c) 在試管中之活性藉測量³²D-MPL細胞(生長依賴mpl配體)之增殖而測定。
- (d) 藉增殖測定測得之mpl配體類似物之試管內活性與藉mpl配體ELISA測得之mpl配體類似物之量之比。

B. 碳水化合物加入之測定

測試在表8中所示之類似物，以觀察其是否加入N-鍵結之碳水化合物。將約0.5毫微克mpl配體或來自用類似物cDNA轉染之COS細胞之mpl配體類似物，與含有 β -巰基乙醇之SDS樣品緩衝液混合及煮沸。樣品藉12% SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳分析，移至硝基纖維素及接受西方氏分析。被免疫沉澱之帶係藉吸漬物與兔抗-mpl配體多株抗體(通常為1微克/毫升；由被大腸桿菌細胞表現之mpl配體1-163誘生)及抗兔ECL套組(阿美夏姆公司)一起培育而顯現。

圖14顯示mpl配體之3種不同變型，即使在位置及環繞糖基化部位之序列上有所不同，皆會被糖基化。N38含有T163，N164及T166突變。N41只具有N164突變。該類似物具有N-鍵結部位，因為位置166上既存之Ser產生序列Asn-X-Ser。類似物N38及N41被同樣地糖基化。此顯示在



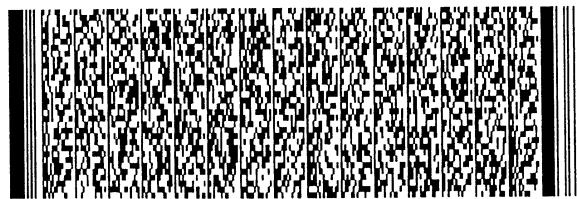
五、發明說明 (61)

mpl 配體中之一些位置能耐受序列顯著改變，而可被有效之糖基化。如表9所示，此二類似物在試管內生物活性上相似。相對地，N42具有Asn 163置換。該類似物含有N-鍵結糖基化部位，因為位置165上既存之Thr產生Asn-X-Thr糖基化部位。其亦被糖基化，但比N38或N41效率低。

圖15顯示mpl配體N40與N43之比較。二mpl配體含有6個糖基化部位。彼等在用來引進N-鍵結部位之胺基酸改變之數目上不同(N43有6個胺基酸改變，而N40有9個)以及在部位之位置上不同。N43在凝膠上之移動性與N40者相同。此顯示該二mpl配體被糖基化至相似程度。如表9所示，該二類似物亦具有相似之試管內生物活性。此顯示不同的類似物可被組合在一起產生新穎的mpl配體，其具有相似之性質(諸如N-鍵結鏈之數目)以及相似之試管內生物活性。

雖然本發明已在其較佳實施例中被說明，但其並不限於所揭示之實施例，相反地，本發明意欲包括在隨附之申請專利範圍之精神及範疇內之各種修改及對等物，申請專利範圍係按照其最廣義來解讀，以致涵蓋所有此等修改及對等物。

本發明相關之微生物，質體pDSRa2-MPL-LIG-N1轉感染之中國倉鼠細胞株，質體pDSRa2-MPL-LIG-N4轉感染之中國倉鼠細胞株及質體pDSRa2-MPL-LIG-N15轉感染之中國倉鼠細胞株，已於85年7月23日寄存於中華民國新竹市食品工業發展研究所，寄存編號分別為CCRC960043，CCRC960044及CCRC960045。



五、發明說明 (62)

序列表

(1) 一般資訊

(i) 申請人：艾利爾特，史帝芬 G.

(ii) 發明之名稱：MPL 配體類似物

(iii) 序列之數目：61

(iv) 相關地址：

(A) 收件者：阿姆根公司

(B) 街道：1840 德拉維蘭大道

(C) 城市：千橡市

(D) 州：加州

(E) 國家：美國

(F) 郵遞區號：91320-1789

(v) 電腦可讀形式

(A) 媒體類型：軟碟

(B) 電腦：IBM PC 相容型

(C) 操作系統：PC-DOS/MS-DOS

(D) 軟體：PatentIn Release #1.0，版本 #1.30

(vi) 目前申請資料：

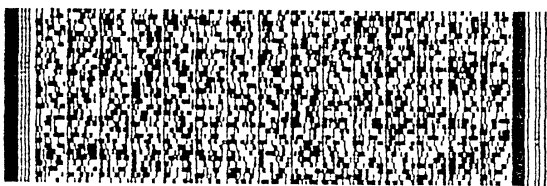
(A) 申請案號碼：

(B) 申請日期：

(C) 分類：

(vii) 先前申請案資料：

(A) 申請案號碼：US 591,070



五、發明說明 (63)

(B) 申請日期：1995 年 2 月 9 日

(viii) 律師/代理人資料：

(A) 姓名：柯克，羅伯 R

(B) 註冊號碼：31,602

(C) 參考/備忘錄號碼：A-337C

(2) 序列識別編號：1 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：1342 鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構形：直鏈形

(ii) 分子類型：cDNA

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：CDS

(B) 位置：36..1094

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：成熟肽

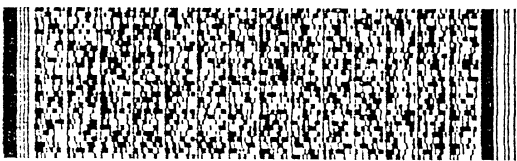
(B) 位置：99..1094

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：信號肽

(B) 位置：36..98

(xi) 序列說明：序列識別編號：1



五、發明說明 (64)

CAGGGAGCCA CGCCAGCCAA GACACCCCGG CCAGA ATG GAG CTG ACT GAA TTG	53
Met Glu Leu Thr Glu Leu	
-21 -20	
CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA AGG CTA ACG CTG TCC AGC	101
Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser	
-15 -10 -5 1	
CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT	149
Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg	
5 10 15	
GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC	197
Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His	
20 25 30	
CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA	245
Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly	
35 40 45	
GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA	293
Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly	
50 55 60 65	
GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG	341
Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu	
70 75 80	
GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC	389
Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val	
85 90 95	
CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT	437
Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro	
100 105 110	
CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG	485
Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu	
115 120 125	
AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG CTT GTA	533
Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val	
130 135 140 145	
GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA GCT GTC	581
Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val	
150 155 160	



五、發明說明 (65)

CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC CTC ACA CTG AAC GAG CTC CCA AAC AGG Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro Asn Arg 165 170 175	629
ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC TTC ACT GCC TCA GCC AGA ACT ACT Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr Thr 180 185 190	677
GGC TCT GGG CTT CTG AAG TGG CAG CAG GGA TTC AGA GCC AAG ATT CCT Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys Ile Pro 195 200 205	725
GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTG GAC CAA ATC CCC GGA TAC Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly Tyr 210 215 220 225	773
CTG AAC AGG ATA CAC GAA CTC TTG AAT GGA ACT CGT GGA CTC TTT CCT Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe Pro 230 235 240	821
GGA CCC TCA CGC AGG ACC CTA GGA GCC CCG GAC ATT TCC TCA CGA ACA Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly Thr 245 250 255	869
TCA GAC ACA GGC TCC CTG CCA CCC AAC CTC CAG CCT GGA TAT TCT CCT Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser Pro 260 265 270	917
TCC CCA ACC CAT CCT CCT ACT GGA CAG TAT ACG CTC TTC CCT CTT CCA Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu Pro 275 280 285	965
CCC ACC TTG CCC ACC CCT GTG GTC CAG CTC CAC CCC CTG CTT CCT GAC Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro Asp 290 295 300 305	1013
CCT TCT GCT CCA ACG CCC ACC CCT ACC AGC CCT CTT CTA AAC ACA TCC Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr Ser 310 315 320	1061
TAC ACC CAC TCC CAG AAT CTG TCT CAG GAA GGG TAAGGTTCTC AGACACTGCC Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly 325 330	1114
GACATCAGCA TTGTCTCGTG TACAGCTCCC TTCCCTGCAG GGCGCCCCTG GGAGACAAC	1174



五、發明說明 (66)

GGACAAGATT TCCTACTTTC TCCTGAAACC CAAAGCCCTG GTAAAAGGGA TACACAGGAC 1234
 TGAAAAGGGA ATCATTTTTC ACTGTACATT ATAAACCTTC AGAAGCTATT TTTTAAAGCT 1294
 ATCAGCAATA CTCATCAGAG CAGCTAGCTC TTTGGTCTAT TTTCTGCA 1342

(2) 序列識別編號：2 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：353 個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：蛋白質

(xi) 序列說明：序列識別編號：2

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala
 -21 -20 -15 -10

Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val
 -5 1 5 10

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser
 15 20 25

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala
 30 35 40

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys
 45 50 55

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
 60 65 70 75

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly
 80 85 90

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu
 95 100 105

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp
 110 115 120

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val
 125 130 135



五、發明說明 (67)

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala
 140 145 150 155
 Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu
 160 165 170
 Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr
 175 180 185
 Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly
 190 195 200
 Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu
 205 210 215
 Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly
 220 225 230 235
 Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro
 240 245 250
 Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu
 255 260 265
 Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr
 270 275 280
 Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu
 285 290 295
 His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser
 300 305 310 315
 Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu
 320 325 330
 Gly



五、發明說明 (68)

(2) 序列識別編號：3 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：605 鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構形：直鏈形

(ii) 分子類型：cDNA

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：CDS

(B) 位置：12..596

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：成熟肽

(B) 位置：75..596

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：信號肽

(B) 位置：12..74

(xi) 序列說明：序列識別編號：3

TCTAGACCAC C ATG GAG CTG ACT GAA TTG CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC	50
Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu	
-21 -20 -15 -10	
CTA ACT GCA AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC	98
Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp	
-5 1 5	
CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAC GTC CTT CAC AGC	146
Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser	
10 15 20	



五、發明說明 (69)

AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG	194
Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu	
25 30 35 40	
CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG	242
Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu	
45 50 55	
GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG	290
Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu	
60 65 70	
GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC	338
Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser	
75 80 85	
CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG	386
Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu	
90 95 100	
CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT	434
Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala	
105 110 115 120	
CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA	482
His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg	
125 130 135	
GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC	530
Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val	
140 145 150	
AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA GCT GTC CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC	578
Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val	
155 160 165	
CTC ACA CTG AAC GAG CTC TAGGTCGAC	605
Leu Thr Leu Asn Glu Leu	
170	



五、發明說明 (70)

(2) 序列識別編號：4 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：195 個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：蛋白質

(xi) 序列說明：序列識別編號：4

```

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala
-21 -20                      -15                -10

Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val
-5                      1                      5                10

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser
15                      20                      25

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala
30                      35                      40

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys
45                      50                      55

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
60                      65                      70                75

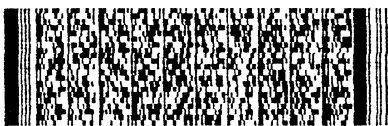
Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly
80                      85                      90

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu
95                      100                     105

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp
110                     115                     120

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val
125                     130                     135

```



五、發明說明 (71)

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala
 140 145 150 155

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu
 160 165 170

Asn Glu Leu

(2) 序列識別編號：5 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：22 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：5

CCCATGTCAA TCACAGCAGA CT

22

(2) 序列識別編號：6 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：22 個鹼基對

(B) 類型：核酸

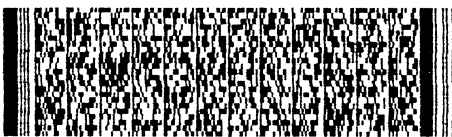
(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：6



五、發明說明 (72)

CTTCACAGCA ACCTGAGCCA GT

22

(2) 序列識別編號：7 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：24 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = "核酸"

(xi) 序列說明：序列識別編號：7

CAGTGCAACG AGACCCACCC TTTG

24

(2) 序列識別編號：8 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：25 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = "核酸"

(xi) 序列說明：序列識別編號：8

GCCTACAAAT GTCACGCTGC CTGCT

25

(2) 序列識別編號：9 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：21 個鹼基對



五、發明說明 (73)

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：9

CCCCTTGTA ACTCATCCCT C

21

(2) 序列識別編號：10 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：24 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：10

CAACTGAACG CCACTTGTCT CTCA

24

(2) 序列識別編號：11 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：26 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸



五、發明說明 (74)

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 11

ACTTGTCTCA ACTCCACCCT GGGGGA

26

(2) 序列識別編號 : 12 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 21 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 12

CTCCTGGGGA ACCTTTCTGG A

21

(2) 序列識別編號 : 13 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 25 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

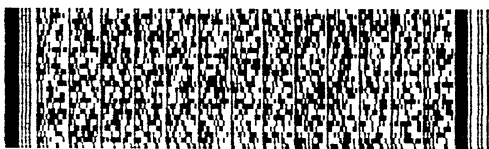
(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 13

GACCACAAAT CACACCGATC CCAAT

25

(2) 序列識別編號 : 14 之資料 :



五、發明說明 (75)

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 32 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 14

ACCCTTTGTC TACAAATGTC ACGCTGCCTG CT

32

(2) 序列識別編號 : 15 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 25 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 15

TCTCTCAAAC CTCACGGGGG AGCTT

25

(2) 序列識別編號 : 16 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 23 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股



五、發明說明 (76)

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：16

TGGAAAAATC AGACGGAGGA GAC

23

(2) 序列識別編號：17 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：25 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：17

TGGAGGAGAA CAAGACACAG GACAT

25

(2) 序列識別編號：18 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：38 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：18



五、發明說明 (77)

CCCTCTAGAC CACCATGGAA CTGACTGAAT TGCTCCTC

38

(2) 序列識別編號：19 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：28 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼 (1..28)

(xi) 序列說明：序列識別編號：19

GTGTGACTTG CTCGAGACTC AGCTGCCC

28

(2) 序列識別編號：20 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：29 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

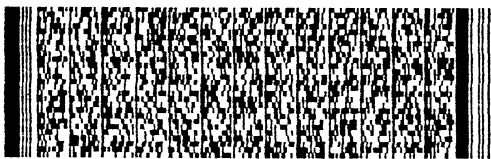
(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-



五、發明說明 (78)

(B) 位置：補碼 (1..29)

(xi) 序列說明：序列識別編號：20

GAAGACCTAA CAACCTCACT CAGCTGCCC

29

(2) 序列識別編號：21之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：29 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼 (1..29)

(xi) 序列說明：序列識別編號：21

AGTGACGGAG TCGGTCTATT CAGCTGCCC

29

(2) 序列識別編號：22之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：29 個鹼基對

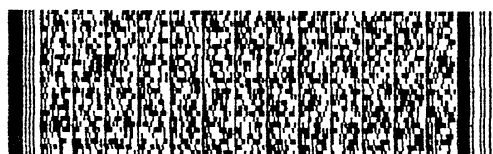
(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "



五、發明說明 (79)

(xi) 序列說明：序列識別編號：22

CACGTCCTTA ACAGCAGCCT GAGCCAGTG

29

(2) 序列識別編號：23 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：29 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = "核酸"

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼 (1..29)

(xi) 序列說明：序列識別編號：23

GTGCAGGAAT TGTCGTCGGA CTCGGTCAC

29

(2) 序列識別編號：24 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：33 個鹼基對

(B) 類型：核酸

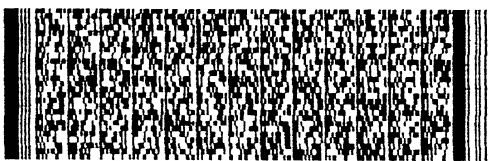
(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = "核酸"

(xi) 序列說明：序列識別編號：24



五、發明說明 (80)

CCCTTTGCCT AACGGTTCCC TGCTGCCTGC TGT

33

(2) 序列識別編號：25 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：33 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼 (1..33)

(xi) 序列說明：序列識別編號：25

GGGAAACGGA TTGCCAAGGG ACGACGGACG ACA

33

(2) 序列識別編號：26 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：31 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：26

TGCCTACACC TAACCTGTCG CCTGCTGTGG A

31



五、發明說明 (81)

(2) 序列識別編號：27 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：31 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼 (1..31)

(xi) 序列說明：序列識別編號：27

ACGGATGTGG ATTGGACAGC GGACGACACC T

31

(2) 序列識別編號：28 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：31 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

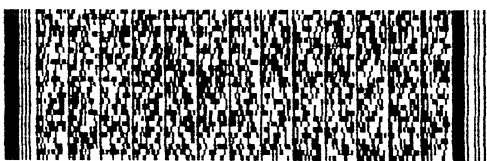
(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：28

GGAAAACCAA TATGTCGGAG ACCAAGGCAC A

31

(2) 序列識別編號：29 之資料：



五、發明說明 (82)

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 31 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(ix) 特徵 :

(A) 名字 / 關鍵字 : -

(B) 位置 : 補碼 (1..31)

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 29

CCTTTTGGTT ATACAGCCTC TGGTTCCGTG T

31

(2) 序列識別編號 : 30 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 32 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 30

TGGGAGAATG GAACACCACG ATGGAGGAGA CC

32

(2) 序列識別編號 : 31 之資料 :

(i) 序列特徵



五、發明說明 (83)

(A) 長度 : 32 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(ix) 特徵 :

(A) 名字 / 關鍵字 : -

(B) 位置 : 補碼 (1..32)

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 31

ACCCTCTTAC CTTGTGGTGC TACCTCCTCT GG

32

(2) 序列識別編號 : 32 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 32 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 32

AAAACCCAGA TGAACGAGAC GACCAAGGCA CA

32

(2) 序列識別編號 : 33 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 32 個鹼基對



五、發明說明 (84)

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼(1..32)

(xi) 序列說明：序列識別編號：33

TTTTGGGTCT ACTTGCTCTG CTGGTTCCGT GT

32

(2) 序列識別編號：34 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：31 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：34

CCCAGATGGA GAACACCTCG GCACAGGACA T

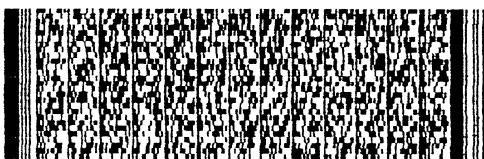
31

(2) 序列識別編號：35 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：31 個鹼基對

(B) 類型：核酸



五、發明說明 (85)

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼(1..31)

(xi) 序列說明：序列識別編號：35

GGGTCTACCT CTTGTGGAGC CGTGTCCTGT A

31

(2) 序列識別編號：36 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：32 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：36

CACGGGGACA AAACGGAACC ACTTGCCTCT CA

32

(2) 序列識別編號：37 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：32 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股



五、發明說明 (86)

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼(1..32)

(xi) 序列說明：序列識別編號：37

GTGCCCCTGT TTTGCCTTGG TGAACGGAGA GT

32

(2) 序列識別編號：38 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：31 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：38

CAGGGCAGGA ACACATCTCA CAAGGATCCC A

31

(2) 序列識別編號：39 之資料：

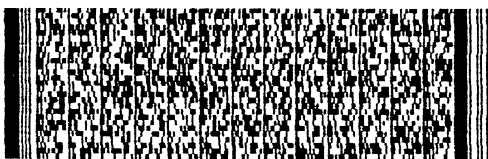
(i) 序列特徵

(A) 長度：31 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形



五、發明說明 (87)

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼 (1..31)

(xi) 序列說明：序列識別編號：39

GTCCCGTCCT TGTGTAGAGT GTTCCTAGGG T

31

(2) 序列識別編號：40 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：31 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：40

GGGCAGGACC AACGCTAGCA AGGATCCCAA T

31

(2) 序列識別編號：41 之資料：

(i) 序列特徵

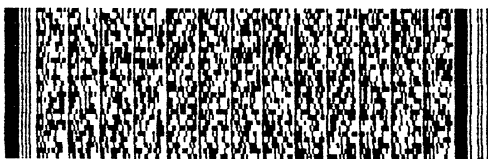
(A) 長度：31 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸



五、發明說明 (88)

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(ix) 特徵 :

(A) 名字 / 關鍵字 : -

(B) 位置 : 補碼(1..31)

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 41

CCCGTCCTGG TTGCGATCGT TCCTAGGGTT A 31

(2) 序列識別編號 : 42 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 24 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 42

CAGTGCAACG AGTCCCACCC TTGG 24

(2) 序列識別編號 : 43 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 24 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "



五、發明說明 (89)

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼 (1..24)

(xi) 序列說明：序列識別編號：43

GTCACGTTGC TCAGGGTGGG AAAC

24

(2) 序列識別編號：44 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：24 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = "核酸"

(xi) 序列說明：序列識別編號：44

GACCACAAAT CACTCCGATC CCAA

24

(2) 序列識別編號：45 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：24 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = "核酸"

(ix) 特徵：



五、發明說明 (90)

(A) 名字 / 關鍵字 : -

(B) 位置 : 補碼(1..24)

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 45

CTGGTGTTTA GTGAGGCTAG GGTT

24

(2) 序列識別編號 : 46 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 27 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 46

GTCCCCACCA ACACCTCTCT AGTCCTC

27

(2) 序列識別編號 : 47 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 27 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(ix) 特徵 :



五、發明說明 (91)

(A) 名字 / 關鍵字 : -

(B) 位置 : 補碼(1..27)

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 47

CAGGGGTGGT TGTGGAGAGA TCAGGAG

27

(2) 序列識別編號 : 48 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 33 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(ix) 特徵 :

(A) 名字 / 關鍵字 : -

(B) 位置 : 補碼(1..33)

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 48

TGACCGAGAC CCGAAGACTT CACTCAGCTG CCC

33

(2) 序列識別編號 : 49 之資料 :

(i) 序列特徵

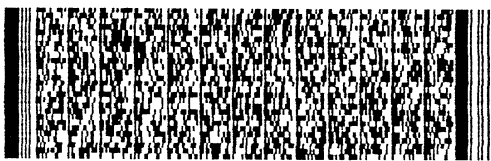
(A) 長度 : 31 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸



五、發明說明 (92)

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 49

GAAAACCCAG AACGAGACCA CCAAGGCACA G

31

(2) 序列識別編號 : 50 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 31 個鹼基對

(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "

(ix) 特徵 :

(A) 名字 / 關鍵字 : -

(B) 位置 : 補碼(1..31)

(xi) 序列說明 : 序列識別編號 : 50

CTTTTGGGTC TTGCTCTGGT GGTTCGGTGT C

31

(2) 序列識別編號 : 51 之資料 :

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 26 個鹼基對

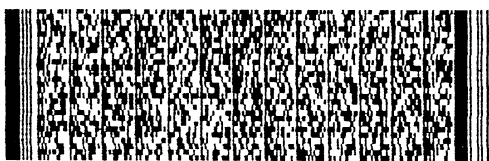
(B) 類型 : 核酸

(C) 股數 : 單股

(D) 構型 : 直鏈形

(ii) 分子類型 : 其他核酸

(A) 說明 : /desc = " 核酸 "



五、發明說明 (93)

(xi) 序列說明：序列識別編號：51

CACCAAGGCA CAGGACATTC TGGGAG

26

(2) 序列識別編號：52 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：26 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = "核酸"

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼(1..26)

(xi) 序列說明：序列識別編號：52

GTGGTTCCGT GTCCTGTAAG ACCCTC

26

(2) 序列識別編號：53 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：31 個鹼基對

(B) 類型：核酸

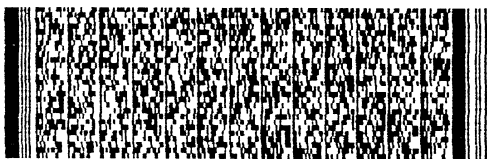
(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = "核酸"

(xi) 序列說明：序列識別編號：53



五、發明說明 (94)

GAAAACCCAG ATGAACGAGA CCAAGGCACA G

31

(2) 序列識別編號：54 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：31 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼(1..31)

(xi) 序列說明：序列識別編號：54

CTTTTGGGTC TACTTGCTCT GGTTC CGTGT C

31

(2) 序列識別編號：55 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：27 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：55

GTCCCCACCA ACACCACTCT AGTCCTC

27



五、發明說明 (95)

(2) 序列識別編號：56 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：27 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = "核酸"

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼(1..27)

(xi) 序列說明：序列識別編號：56

CAGGGGTGGT TGTGGTGAGA TCAGGAG

27

(2) 序列識別編號：57 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：33 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = "核酸"

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼(1..33)



五、發明說明 (96)

(xi) 序列說明：序列識別編號：57

TGACCGAGAC CCGAAGACTT CACTCAGCTG CCC

33

(2) 序列識別編號：58 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：23 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：58

TCCCCAGCAA CACCTCTCTA GTC

23

(2) 序列識別編號：59 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：23 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

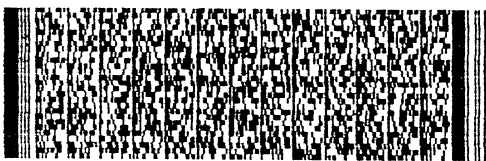
(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼(1..23)

(xi) 序列說明：序列識別編號：59



五、發明說明 (97)

GTGTCGACAG GGGTCGTTGT GGA

23

(2) 序列識別編號：60 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：23 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(xi) 序列說明：序列識別編號：60

TCCCCAACAG AACCTCTCTA GTC

23

(2) 序列識別編號：61 之資料：

(i) 序列特徵

(A) 長度：23 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股數：單股

(D) 構型：直鏈形

(ii) 分子類型：其他核酸

(A) 說明：/desc = " 核酸 "

(ix) 特徵：

(A) 名字/關鍵字：-

(B) 位置：補碼(1..23)

(xi) 序列說明：序列識別編號：61

GTGTCGACAG GGGTTGTCTT GGA

23



附頁

實例 4

N2	-	CCCATGTCAATCACAGCAGACT	序列識別編號 : 5
N3	-	CTTCACAGCAACCTGAGCCAGT	序列識別編號 : 6
N4	-	CAGTGCAACGAGACCCACCCTTTG	序列識別編號 : 7
N5	-	GCCTACAAATGTCACGCTGCCTGCT	序列識別編號 : 8
N6	-	CCCACCTTGTAATCATCCCTC	序列識別編號 : 9
N7	-	CAACTGAACGCCACTTGTCTCTCA	序列識別編號 : 10
N8	-	ACTTGTCTCAACTCCACCCTGGGGGA	序列識別編號 : 11
N9	-	CTCCTGGGGAACCTTTCTGGA	序列識別編號 : 12
N10	-	GACCACAAATCACACCGATCCCAAT	序列識別編號 : 13
N11	-	ACCCTTTGTCTACAAATGTCACGCTGCCTGCT	序列識別編號 : 14
N12	-	TCTCTCAAACCTCACGGGGGAGCTT	序列識別編號 : 15
N13	-	TGGAAAAATCAGACGGAGGAGAC	序列識別編號 : 16
N14	-	TGGAGGAGAACAAGACACAGGACAT	序列識別編號 : 17

表 1

類似物/物種編號	胺基酸置換	序列改變
N1	(1-174); Pro ¹⁷⁵ →Gly ³³² 刪除	CCA→TGA (終結密碼子)
N2	Leu ²² →Asn ²²	CCT→AAT
N3	Arg ²⁵ →Asn ²⁵	AGA→AAC
N4	Pro ³⁰ , Val ³² →Asn ³⁰ , Thr ³²	CCA, GTT →AAC, ACC
N5	Pro ³⁸ , Leu ⁴⁰ →Asn ³⁸ , Thr ⁴⁰	CCT, CTG →AAT, ACG
N6	Leu ⁸⁶ →Asn ⁸⁶	CTC→AAC

附頁

N7	Gly ⁸² , Pro ⁸³ →Asn ⁸² , Ala ⁸³	GGA, CCC→AAC, GCC
N8	Ser ⁸⁷ , Leu ⁸⁹ →Asn ⁸⁷ , Thr ⁸⁹	TCA, CTC→AAC, ACC
N9	Gln ⁹² →Asn ⁹²	CAG→AAC
N10	Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² →Asn ¹²⁰ , Thr ¹²²	GCT, AAG→AAT, ACC
N11	Pro ³⁶ , Pro ³⁸ , Leu ⁴⁰ → Ser ³⁶ , Asn ³⁸ , Thr ⁴⁰	CCT, CCT, CTG→ TCT, AAT, ACG
N12	Ser ⁸⁸ Leu ⁹⁰ →Asn ⁸⁸ , Thr ⁹⁰	TCC, CTG→AAC, ACG
N13	Thr ⁵³ , Met ⁵⁵ →Asn ⁵³ , Thr ⁵⁵	ACC, ATG→AAT, ACG
N14	Thr ⁵⁸ , Ala ⁶⁰ →Asn ⁵⁸ , Thr ⁶⁰	ACC, GCA→AAC, ACA
N15	Pro ³⁰ , Val ³² , Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² → Asn ³⁰ , Thr ³² , Asn ¹²⁰ , Thr ¹²²	CCA, GTT, GCT, AAG→ AAC, ACC, AAT, ACC

表 2

N-鍵結碳水化合物之估計值

Mpl 配體 類似物(1-174)	分子量 (Da)	分子量變動(Da) (超過天然者) ¹	潛在之 N-鍵結 鍵之數目 (@4 KDa/部位)
N1 (天然)	23500	0	0
N4	28700	5200	1
N7	27200	3700	1
N10	27200	3700	1
N13	26700	3200	1
N14	28700	5200	1
N15	33500	10000	2

附頁

表 3

O-鍵結碳水化合物之計算值

Mpl 配體形式	O-聚糖酶 處理(+/-)	分子量 (Da)	分子量變動	潛在 O-鍵結 鏈之數目 (@950 Da/鏈)
1-332	-	54200	13600	14
"	(大腸桿菌版本)	40600		
1-174	-	24600	8600	9
"	+	16000		
1-163	-	18400	3900	4
"	+	14500		
1-153	-	15200	2300	2
"	+	12900		

表 4

Mpl 配體形式 (胺基酸長度)	序列	N-鍵結鏈之數目	Elisa (毫微克/毫升)	試管內活性 (單位/毫升)	比活性 (單位/ 毫微克)(d)
		(a)	(b)	(c)	
仿製組	無	0	<0.08	<10	<125
N1 (174)	天然	NA	25	5375	215
N1 (174)	天然	0	31.4	3800	280
N1 (174)	天然	0	31.75	NA	NA
N2 (174)	N22	0	NA	NA	NA
N3 (174)	N25	NA	1.85	636	344
N4 (174)	N30T32	1	38	3830	232
N4 (174)	N30T32	1	24	NA	NA
N5 (174)	N38T40	0	1.2	<10	<8
N6 (174)	N86	0	0.44	<10	<22
N7 (174)	N82A83	0 to 1	6	2660	443
N7 (174)	N82A83	0 to 1	4.7	3080	655
N9 (174)	N92	0	10.5	1970	188
N10 (174)	N120T122	1	20.4	5943	291
N10 (174)	N120T122	1	33.7	9690	288
N11 (174)	S36N38T40	NA	<0.625	<10	<16
N11 (174)	S36N38T40	0	1.3	<10	<8
N13 (174)	N53T55	0 to 1	67	18000	269
N14 (174)	N58T60	0 to 1	17.9	4850	271
N15 (174)	N30T32N120T122	0 to 2	26	6420	247

附頁

表 5

MPL 配體之試管內活性

MPL 配體形式)	N-鍵結鏈之數目	試管內活性 U/毫克 X 10E6
MK174(大腸桿菌)	0	13
1-163 (CHO)	0	86
1-174 (CHO)	0	85
N4 (CHO)	1	60
N15 (CHO)	2	92
1-332(CHO)	6	41

實例 14

5' F CCCTCTAGACCACCATGGAAGTGAATTGCTCCTC	序列識別編號: 18
3' R (1-174) CCCGTCGACTCAGAGCTCGTTCAGTGTG 19	序列識別編號: 19
N16 - 3' R CCCGTCGACTCACTCCAACAATCCAGAAG	序列識別編號: 20
N17 - 3' R CCCGTCGACTTATCTGGCTGAGGCAGTGA	序列識別編號: 21
N18 - F CACGTCCTTAACAGCAGCCTGAGCCAGTG	序列識別編號: 22
N18 - R CACTGGCTCAGGCTGCTGTTAAGGACGTG	序列識別編號: 23
N19 - F CCCTTTGCCTAACGGTTCCTGCTGCCTGCTGT	序列識別編號: 24
N19 - R ACAGCAGGCAGCAGGGAACCGTTAGGCAAAGGG	序列識別編號: 25
N20 - F TGCCTACACCTAACCTGTCGCCTGCTGTGGA	序列識別編號: 26
N20 - R TCCACAGCAGGCGACAGGTTAGGTGTAGGCA	序列識別編號: 27
N21 - F GGAAAACCAATATGTCTGGAGACCAAGGCACA	序列識別編號: 28
N21 - R TGTGCCTTGGTCTCCGACATATTGGTTTCC	序列識別編號: 29

附頁

N22 - F	TGGGAGAATGGAACACCACGATGGAGGAGACC	序列識別編號 : 30
N22 - R	GGTCTCCTCCATCGTGGTGTTCATTCTCCCA	序列識別編號 : 31
N23 - F	AAAACCCAGATGAACGAGACGACCAAGGCACA	序列識別編號 : 32
N23 - R	TGTGCCTTGGTCTCGTTCATCTGGGTTTT	序列識別編號 : 33
N24 - F	CCCAGATGGAGAACACCTCGGCACAGGACAT	序列識別編號 : 34
N24 - R	ATGTCCTGTGCCGAGGTGTTCTCCATCTGGG	序列識別編號 : 35
N25 - F	CACGGGGACAAAACGGAACCACTTGCCCTCTCA	序列識別編號 : 36
N25 - R	TGAGAGGCAAGTGGTTCGGTTTTGTCCCCGTG	序列識別編號 : 37
N26 - F	CAGGGCAGGAACACATCTCACAAGGATCCCA	序列識別編號 : 38
N26 - R	TGGGATCCTTGTGAGATGTGTTCTGCCCTG	序列識別編號 : 39
N27 - F	GGGCAGGACCAACGCTAGCAAGGATCCCAAT	序列識別編號 : 40
N27 - R	ATTGGGATCCTTGCTAGCGTTGGTCCTGCCC	序列識別編號 : 41
N29 - F pair1	CAGTGCAACGAGTCCCACCCCTTGG	序列識別編號 : 42
N29 - R pair1	CAAAGGGTGGGACTCGTTGCACTG	序列識別編號 : 43
N29 - F pair2	GACCACAAATCACTCCGATCCCAA	序列識別編號 : 44
N29 - R pair2	TTGGGATCGGAGTGATTGTGGTC	序列識別編號 : 45
N30 - F	GTCCCCACCAACACCTCTCTAGTCCTC	序列識別編號 : 46
N30 - R	GAGGACTAGAGAGGTGTTGGTGGGGAC	序列識別編號 : 47
N31 - 3' R	CCCGTCGACTCACTTCAGAAGCCCAGAGCCAGT	序列識別編號 : 48
N36 (1) - F	GAAAACCCAGAACGAGACCACCAAGGCACAG	序列識別編號 : 49
N36 (1) - R	CTGTGCCTTGGTGGTCTCGTTCTGGGTTTTTC	序列識別編號 : 50
N36 (2) - F	CACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAG	序列識別編號 : 51
N36 (2) - R	CTCCCAGAATGTCCTGTGCCTTGGTG	序列識別編號 : 52
N37 - F	GAAAACCCAGATGAACGAGACCAAGGCACAG	序列識別編號 : 53
N37 - R	CTGTGCCTTGGTCTCGTTCATCTGGGTTTTTC	序列識別編號 : 54
N38 - F	GTCCCCACCAACACCACTCTAGTCCTC	序列識別編號 : 55
N38 - R	GAGGACTAGAGTGGTGTGGTGGGGAC	序列識別編號 : 56

表 6

具有 N-鍵結碳水化合物鍵用之部位之 MPL 配體類似物

類似物/物種編號	胺基配置換	序列改變
N16	(1-183); Thr ¹⁸⁴ →Gly ³³² 刪除	ACA→TGA (終止密碼子)
N17	(1-191); Thr ¹⁹² →Gly ³³² 刪除	ACT→TAA (終止密碼子)
N18	His ²³ , Arg ²⁵ →Asn ²³ , Ser ²⁵	CAC, AGA→AAC, AGC
N19	Thr ³⁷ , Pro ³⁸ , Val ³⁹ → Asn ³⁷ , Gly ³⁸ , Ser ³⁹	ACA, CCT, GTC →AAC, GGT, TCC
N20	Val ³⁹ , Leu ⁴¹ →Asn ³⁹ , Ser ⁴¹	GTC, CTG→AAC, TCG
N21	Gln ⁵⁴ , Glu ⁵⁶ →Asn ⁵⁴ , Ser ⁵⁶	CAG, GAG→AAT, TCG
N22	Lys ⁵² , Gln ⁵⁴ →Asn ⁵² , Thr ⁵⁴	AAA, CAG→AAC, ACG
N23	Glu ⁵⁷ →Asn ^{55'(i)} , Thr ⁵⁷	GAG→AAC(i), ACG
N24	Glu ⁵⁷ , Lys ⁵⁹ →Asn ⁵⁷ , Ser ⁵⁹	GAG, AAG→AAC, TCG
N25	Leu ⁸¹ , Pro ⁸³ →Asn ⁸¹ , Thr ⁸³	CTG, CCC→AAC, ACC
N26	Thr ¹¹⁸ , Ala ¹²⁰ →Asn ¹¹⁸ , Ser ¹²⁰	ACC, GCT→AAC, TCT
N27	Thr ¹¹⁹ , His ¹²¹ →Asn ¹¹⁹ , Ser ¹²¹	ACA, CAC→AAC, AGC

附頁

N29	Pro ³⁰ , Val ³² , Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² → Asn ³⁰ , Ser ³² , Asn ¹²⁰ , Ser ¹²²	CCA, GTT, GCT, AAG→ AAC, TCC, AAT, TCC
N30	Ser ¹⁶³ , Arg ¹⁶⁴ →Thr ¹⁶³ , Asn ¹⁶⁴	AGC, AGA→ACC, AAC
N31	(1-199); Trp ²⁰⁰ →Gly ³³² 刪除	TGG→TGA (終止密碼子)
N33	Pro ³⁰ , Val ³² , Glu ⁵⁷ , Ala ¹²⁰ , Lys ¹²² → Asn ³⁰ , Thr ³² , Asn ^{55'} (i), Thr ⁵⁷ Asn ¹²⁰ , Thr ¹²²	CCA, GTT, GAG, GCT, AA G→ AAC, TCC, AAC(i), ACG , AAT, TCC
N34	Pro ³⁰ , Val ³² , Glu ⁵⁷ , Ser ¹⁶³ , Arg ¹⁶⁴ → Asn ³⁰ , Thr ³² , Asn ^{55'} (i), Thr ⁵⁷ , Thr ¹⁶³ , Asn ¹⁶⁴	CCA, GTT, GAG, AGC, AG A→ AAC, TCC, AAC(i), ACG , ACC, AAC
N35	N4+N23+N30+N31 (1-199)	- -
N36	Met ⁵⁵ , Glu ⁵⁷ →Asn ⁵⁵ , Thr ⁵⁷	ATG, GAG→AAC, ACC
N37	Glu ⁵⁶ →Asn ⁵⁶	GAG→AAC
N38	Ser ¹⁶³ , Arg ¹⁶⁴ , Ser ¹⁶⁶ →Thr ¹⁶³ , Asn ¹⁶⁴ , Thr ¹⁶⁶	AGC, AGA, TCT →ACC, AAC, ACT
N39	N4+N10+N36+N38 (1-174)	- -
N40	N4+N10+N36+N38+N31 (1-199)	- -

表 7

Mpl 配體形式 (胺基酸長度)	序列	N-鍵結鏈 之數目	Elisa (毫微克/ 毫升)	試管內 活性(單位/ 毫升)	比活性 (單位/ 毫微克) (d)
		(a)	(b)	(c)	
N1 (174)	天然	0	28	3991	143
N15 (174)	N30T32N120T122	0-2	45	7003	156
N16 (183)	1-183	0	85	9276	NA
N17 (191)	1-191	NA	<0.3	11	NA
N18 (174)	N23S25	0	2	5	2.5
N19 (174)	N37G38S39	NA	<0.3	NA	NA
N20 (174)	N39S41	NA	<0.3	<10	NA
N21 (174)	N54S56	0-1	30	4380	146
N22 (174)	N52T54	0-1	2	856	428
N23 (174)	N55'(i)T57	1	11	1059	96
N24 (174)	N57S59	0	5.3	458	86
N25 (174)	N81T83	NA	0.22	123	559
N26 (174)	N118S120	NA	0.9	96	106
N27 (174)	N119S121	0	4.5	338	75
N29 (174)	N30S32N120S122	0-2	15	1627	108
N30 (174)	T163N164	0-1	128	15592	122
N31 (199)	1-199	至少 1	156	19000	122
N33 (174)	4+10+23	3	78	10057	129
N34 (174)	4+23+30	至少 2	112	13536	120
N35 (199)	34+31	4 或以上	172	13112	76
N36 (174)	N55T57	0-1	48	5808	121
N37 (174)	N56	1	32	4504	141
N38 (174)	T163N164T166	0-1	25	3904	156
N39 (174)	N4+N10+N36+N38	3 to 4	127	17661	139
N40 (199)	N4+N10+N36+N38+N31	至少 5	134	19735	147

附頁

實例 17

5' F CCCTCTAGACCACCATGGAACTGACTGAATTGCTCCTC 序列識別編號：18

3' R (1-174) CCCGTCGACTCAGAGCTCGTTCAGTGTG 序列識別編號：19

3' R (1-199) CCCGTCGACTCACTTCAGAAGCCCAGAGCCAGT 序列識別編號：57

N41 - F TCCCCAGCAACACCTCTCTAGTC 序列識別編號：58

N41 - R AGGTGTTGCTGGGGACAGCTGTG 序列識別編號：59

N42 - F TCCCCAACAGAACCTCTCTAGTC 序列識別編號：60

N42 - R AGGTTCTGTTGGGGACAGCTGTG 序列識別編號：61

N37 - F GAAAACCCAGATGAACGAGACCAAGGCACAG 序列識別編號：53

N37 - R CTGTGCCTTGGTCTCGTTCATCTGGGTTTTC 序列識別編號：54

附頁

表 8

具有供 N-鍵結碳水化合物鏈用之部位之 MPL 配體類似物

類似物/物種編號	胺基酸置換	序列改變
N41	Arg ¹⁶⁴ → Asn ¹⁶⁴	AGA → AAC
N42	Ser ¹⁶³ → Asn ¹⁶³	AGC → AAC
N43	N4 + N10 + N37 + N41 + N31 (1-199)	- -

表 9

Mpl 配體形式 (胺基酸長度)	序列	N-鍵結鏈 之數目	Elisa (毫微克/ 毫升)	試管內活性 (單位/ 毫升)	比活性 (單位/ 毫微克)
		(a)	(b)	(c)	(d)
N1 (174)	天然	0	28	5400	193
N31 (199)	天然	至少 1	156	15000	96
N38 (174)	T163N164T166	0-1	55	6080	110
N40 (199)	N4+N10+N36+N38+N31	至少 5	134	18100	135
N41 (174)	N163	0-1	109	17500	161
N42 (174)	N164	0-1	51	9300	182
N43 (199)	N4+N10+N37+N41+N31	至少 5	153	30500	199

附頁

序列識別編號:1:

CAGGGAGCCA CGCCAGCCAA GACACCCCGG CCAGA ATG GAG CTG ACT GAA TTG	53
Met Glu Leu Thr Glu Leu	
-21 -20	
CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC CTA ACT GCA AGG CTA ACG CTG TCC AGC	101
Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser	
-15 -10 -5 1	
CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT	149
Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg	
5 10 15	
GAC TCC CAT GTC CTT CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC	197
Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His	
20 25 30	
CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA	245
Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly	
35 40 45	
GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA	293
Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly	
50 55 60 65	
GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG	341
Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu	
70 75 80	
GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC	389
Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val	
85 90 95	
CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT	437
Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro	
100 105 110	
CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG	485
Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu	
115 120 125	
AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ARG CTT GTA	533
Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val	
130 135 140 145	
GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA GCT GTC	581
Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val	
150 155 160	
CCC AGC AGA ACC TCT CTA GTC CTC ACA CTG AAC GAG CTC CCA AAC AGG	629
Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu Pro Asn Arg	
165 170 175	
ACT TCT GGA TTG TTG GAG ACA AAC TTC ACT GCC TCA GCC AGA ACT ACT	677
Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr Ala Ser Ala Arg Thr Thr	
180 185 190	

附頁

GGC TCT GGG CTT CTG AAG TGG CAG CAG GGA TTC AGA GCC AAG ATT CCT Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly Phe Arg Ala Lys Ile Pro 195 200 205	725
GGT CTG CTG AAC CAA ACC TCC AGG TCC CTG GAC CAA ATC CCC GGA TAC Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu Asp Gln Ile Pro Gly Tyr 210 215 220 225	773
CTG AAC AGG ATA CAC GAA CTC TTG AAT GGA ACT CGT GGA CTC TTT CCT Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe Pro 230 235 240	821
GGA CCC TCA CGC AGG ACC CTA GGA GCC CCG GAC ATT TCC TCA GGA ACA Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly Thr 245 250 255	869
TCA GAC ACA GGC TCC CTG CCA CCC AAC CTC CAG CCT GGA TAT TCT CCT Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser Pro 260 265 270	917
TCC CCA ACC CAT CCT CCT ACT GGA CAG TAT ACG CTC TTC CCT CTT CCA Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu Pro 275 280 285	965
CCC ACC TTG CCC ACC CCT GTG GTC CAG CTC CAC CCC CTG CTT CCT GAC Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro Asp 290 295 300 305	1013
CCT TCT GCT CCA ACG CCC ACC CCT ACC AGC CCT CTT CTA AAC ACA TCC Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr Ser 310 315 320	1061
TAC ACC CAC TCC CAG AAT CTG TCT CAG GAA GGG TAAGGTTCTC AGACACTGCC Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly 325 330	1114
GACATCAGCA TTGTCTCGTG TACAGCTCCC TTCCCTGCAG GGC GCCCCTG GGAGACAACT	1174
GGACAAGATT TCCTACTTTC TCCTGAAACC CAAAGCCCTG GTAAAAGGGA TACACAGGAC	1234
TGAAAAGGGA ATCATTTTTC ACTGTACATT ATAAACCTTC AGAAGCTATT TTTTAAAGCT	1294
ATCAGCAATA CTCATCAGAG CAGCTAGCTC TTTGGTCTAT TTTCTGCA	1342

附頁

序列識別編號 :2:

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala
 -21 -20 -15 -10

Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val
 -5 1 5 10

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser
 15 20 25

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala
 30 35 40

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys
 45 50 55

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
 60 65 70 75

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly
 80 85 90

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu
 95 100 105

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp
 110 115 120

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val
 125 130 135

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala
 140 145 150 155

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu
 160 165 170

Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr
 175 180 185

Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly
 190 195 200

Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu
 205 210 215

Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly
 220 225 230 235

Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro
 240 245 250

Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu
 255 260 265

Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr
 270 275 280

附頁

Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu
285 290 295

His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser
300 305 310 315

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu
320 325 330

Gly

序列識別編號 :3:

TCTAGACCAC C ATG GAG CTG ACT GAA TTG CTC CTC GTG GTC ATG CTT CTC Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu -21 -20 -15 -10	50
CTA ACT GCA AGG CTA ACG CTG TCC AGC CCG GCT CCT CCT GCT TGT GAC Leu Thr Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp -5 1 5	98
CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAC GTC CTT CAC AGC Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser 10 15 20	146
AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA CCT GTC CTG Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu 25 30 35 40	194
CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC CAG ATG GAG Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu 45 50 55	242
GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT CTG CTG GAG Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu 60 65 70	290
GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC CTC TCA TCC Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser 75 80 85	338
CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT GGG GCC CTG Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu 90 95 100	386
CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG ACC ACA GCT Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala 105 110 115 120	434

附頁

CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC CTG CTC CGA	482
His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg	
125 130 135	
GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC CTC TGC GTC	530
Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val	
140 145 150	
AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA GCT GTC CCC AGC AGA ACC TCT CAA GTC	578
Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val	
155 160 165	
CTC ACA CTG AAC GAG CTC TAGGTCGAC	605
Leu Thr Leu Asn Glu Leu	
170	

序列識別編號 :4:

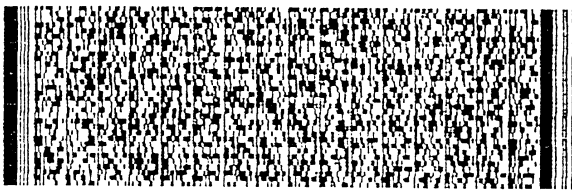
Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala	
-21 -20 -15 -10	
Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val	
-5 1 5 10	
Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser	
15 20 25	
Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala	
30 35 40	
Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys	
45 50 55	
Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met	
60 65 70 75	
Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly	
80 85 90	
Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu	
95 100 105	
Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp	
110 115 120	
Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val	
125 130 135	
Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala	
140 145 150 155	
Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu	
160 165 170	
Asn Glu Leu	

四、中文發明摘要 (發明之名稱:MPL配體類似物)

本發明揭示一種mpl配體類似物，其與具有對應數目之天然mpl配體相較，具有一個或以上被改變之糖基化部位。本發明亦關於編碼該mpl配體類似物之DNA序列，供該類似物表現之重組質體及宿主細胞，以及包括該類似物之治療組合物。

英文發明摘要 (發明之名稱:MPL LIGAND ANALOGS)

Mpl ligand analogs having one or more changed glycosylation sites as compared to a naturally occurring mpl ligand sequence of a corresponding number of amino acids are disclosed. The invention also relates to DNA sequences encoding said mpl ligand analogs, recombinant plasmids and host cells for analog expression, and therapeutic compositions including such analogs.



1	CAGGAGCCACGCCAGCCAGACACCCCGGCCAGAATGGAGCTGACTGAATTCCTCCTC	59
-21	MetGluLeuThrGluLeuLeuLeu	-14
60	GTGTCATGCTTCTCCTAAGCTCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTGT	119
-13	ValValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCys	7
120	GACCTCCGAGTCCCTCAGTAACCTGCTGCTGACTCCCATGTCTCCTTCACAGCAGACTGAGC	179
8	AspLeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSer	27
180	CAGTCCCCAGAGGTTCAACCCCTTGGCCTACACCTGTCTGCTGCTGCTGACTTTAGC	239
28	GlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSer	47
240	TTGGGAGAAATGGAAAACCCAGATGGAGGAGACCAAGGCACAGACATTCTGGGAGCAGTG	299
48	LeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaVal	67
300	ACCCTTCTGCTGGAGGAGTGATGGCAGCACGGGACCAACTGGGACCCACTTGCCCTCTCA	359
68	ThrLeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSer	87
360	TCCCTCCTGGGGCAGCTTCTTGACACAGGTCCGCTCTCCTTGCGGCCCTGCAGAGCCCTC	419
88	SerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeu	107

圖 1A

圖式

840	CTAGGAGCCCCGACATTTCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCAACCCTC	899
248	LeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeu	267
900	CAGCCTGGATATCTCTCCTTCCCAACCCATCCTCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCT	959
268	GlnProGlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPhePro	287
960	CTTCCACCCACCTTGCCCAACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCTGCTTCCCTGACCCTTCT	1019
288	LeuProProThrLeuProThrProValGlnLeuHisProLeuLeuProAspProSer	307
1020	GCTCCAACGCCCAACCCCTAACCAAGCCCTCTCTAAACACATCCTACACCCACTCCCAAGAAAT	1079
308	AlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsn	327
1080	CTGTCTCAGGAAGGTTAAGTTCTCAGACACTGCCGACATCAGCATGTCTCGTGTACAG	1139
328	LeuSerGlnGlyGlyEnd	332
1140	CTCCCTTCCCTGCAGGGGCGCCCTGGGAGACAACCTGGACAAGATTTCCTACTTTCCTCTG	1199
1200	AAACCCAAAGCCCTGCTAAAGGATACACAGGACTGAAAAAGGAATCATTTTCACTGT	1259
1260	ACATTATAAACCTTCAGAAAGCTATTTTAAAGCTATCAGCAATACTCATCAGAGCAGCT	1319
1320	AGCTCTTTGGTCTATTTCTGCA	1342

圖 1C

圖式

圖式

10 30 50
TCTAGACCACCATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTCGTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAA
M E L T E L L L V V M L L L T A R

70 90 110
GGCTAACGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGTGACCTCCGAGTCCTCAGTAAACTGC
L T L S S P A P P A C D L R V L S K L L

130 150 170
TTCGTGACTCCCACGTCCTTCACAGCAGACTGAGCCAGTGCCAGAGGTTACCCCTTTGC
R D S H V L H S R L S Q C P E V H P L P

190 210 230
CTACACCTGTCCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGCTTGGGAGAATGGAAAACCCAGATGG
T P V L L P A V D F S L G E W K T Q M E

250 270 290
AGGAGACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAGCAGTGACCCTTCTGCTGGAGGGAGTGATGG
E T K A Q D I L G A V T L L L E G V M A

圖 2A

圖式

310 330 350
CAGCACGGGGACAACCTGGGACCCACTTGCCTCTCATCCCTCCTGGGGCAGCTTTCTGGAC
A R G Q L G P T C L S S L L G Q L S G Q

370 390 410
AGGTCCGTCTCCTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTCCTTGGAACCCAGCTTCCTCCACAGG
V R L L L G A L Q S L L G T Q L P P Q G

430 450 470
GCAGGACCACAGCTCACAAGGATCCCAATGCCATCTTCCTGAGCTTCCAACACCTGCTCC
R T T A H K D P N A I F L S F Q H L L R

490 510 530
GAGGAAAGGTGCGTTTCCTGATGCTTGTAAGGAGGGTCCACCCTCTGCGTCAGGCGGGCCC
G K V R F L M L V G G S T L C V R R A P

550 570 590
CACCCACCACAGCTGTCCCCAGCAGAACCTCTCTAGTCCTCACACTGAACGAGCTCTAGG
P T T A V P S R T S L V L T L N E L *

TCGAC

圖 2B

圖式

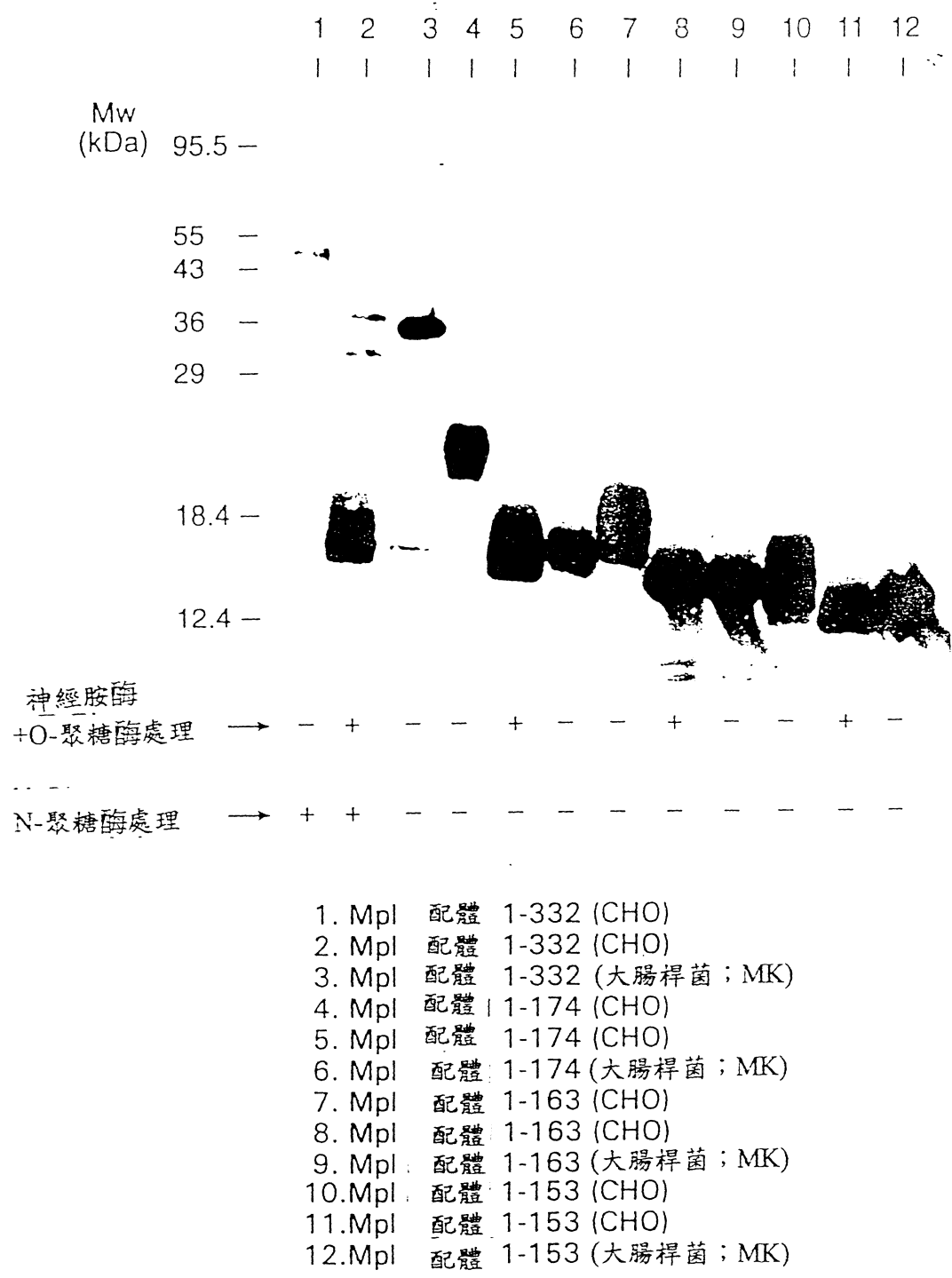
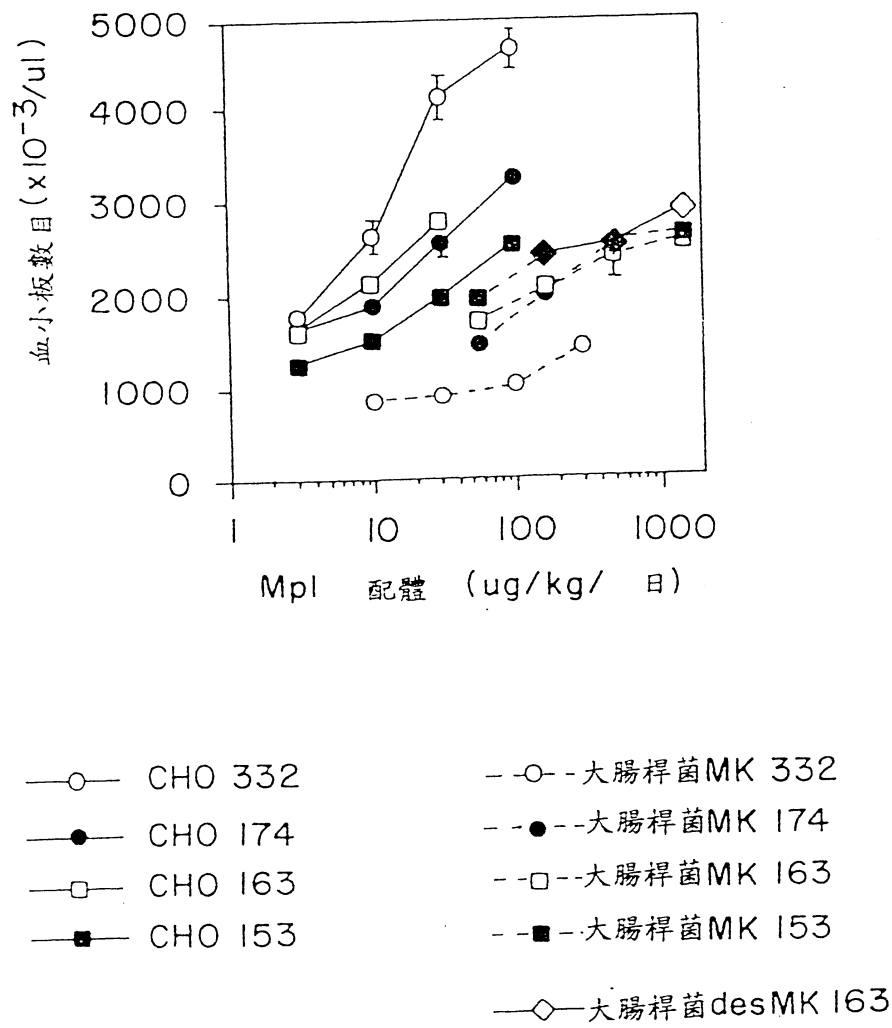


圖 3

圖式

圖 4



圖式

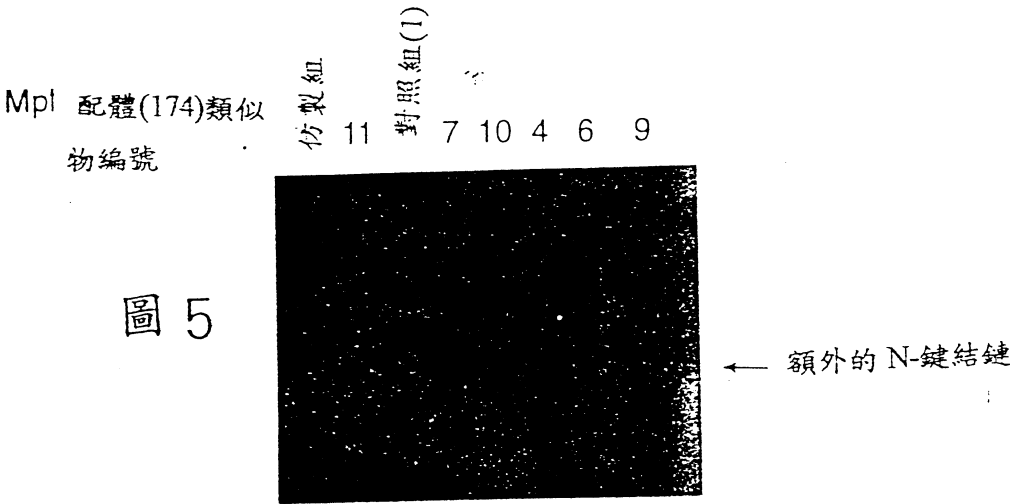


圖 5

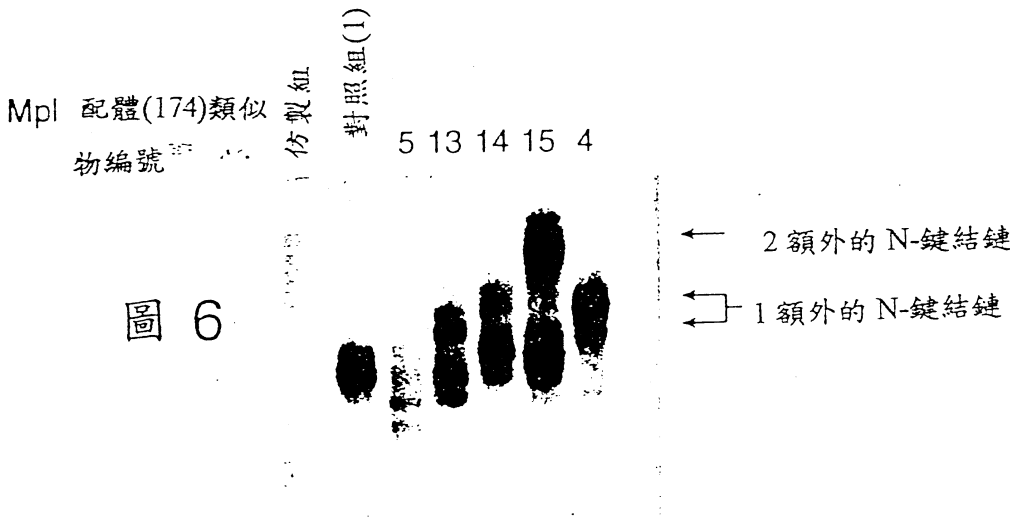


圖 6

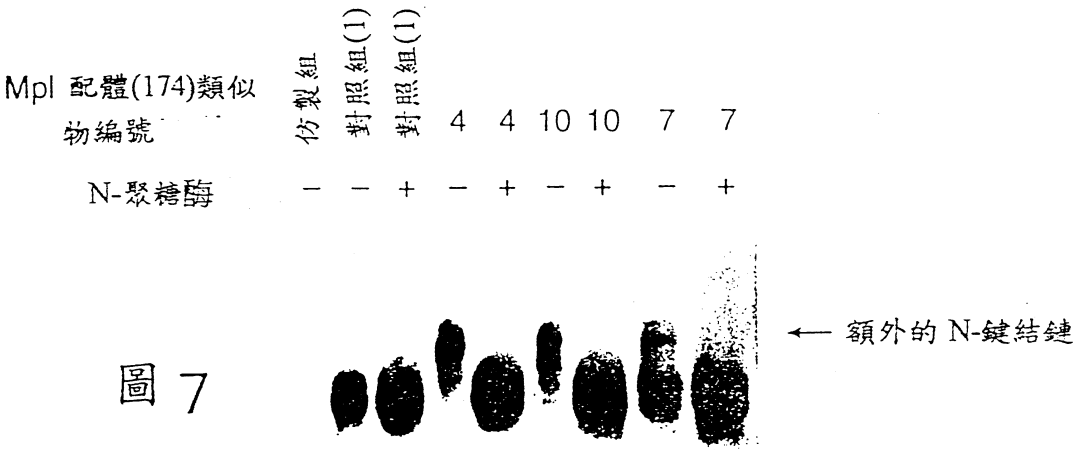


圖 7

圖式

圖 8A

圖 8B

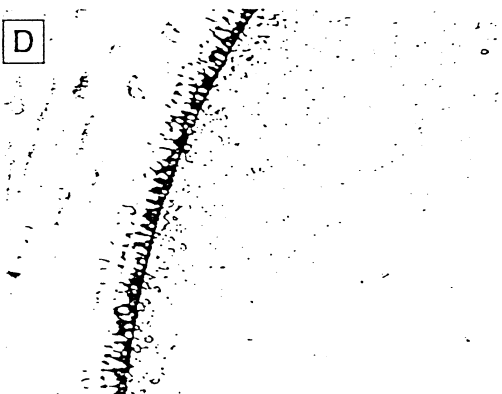
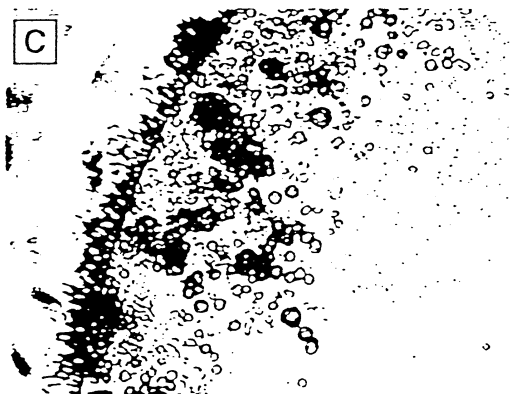
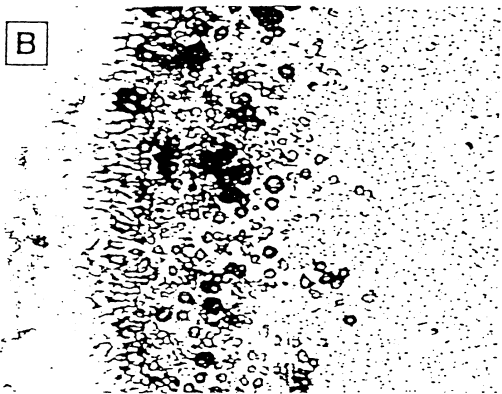
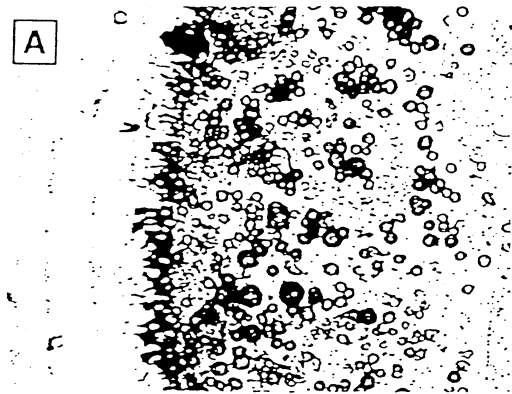


圖 8C

圖 8D

圖式

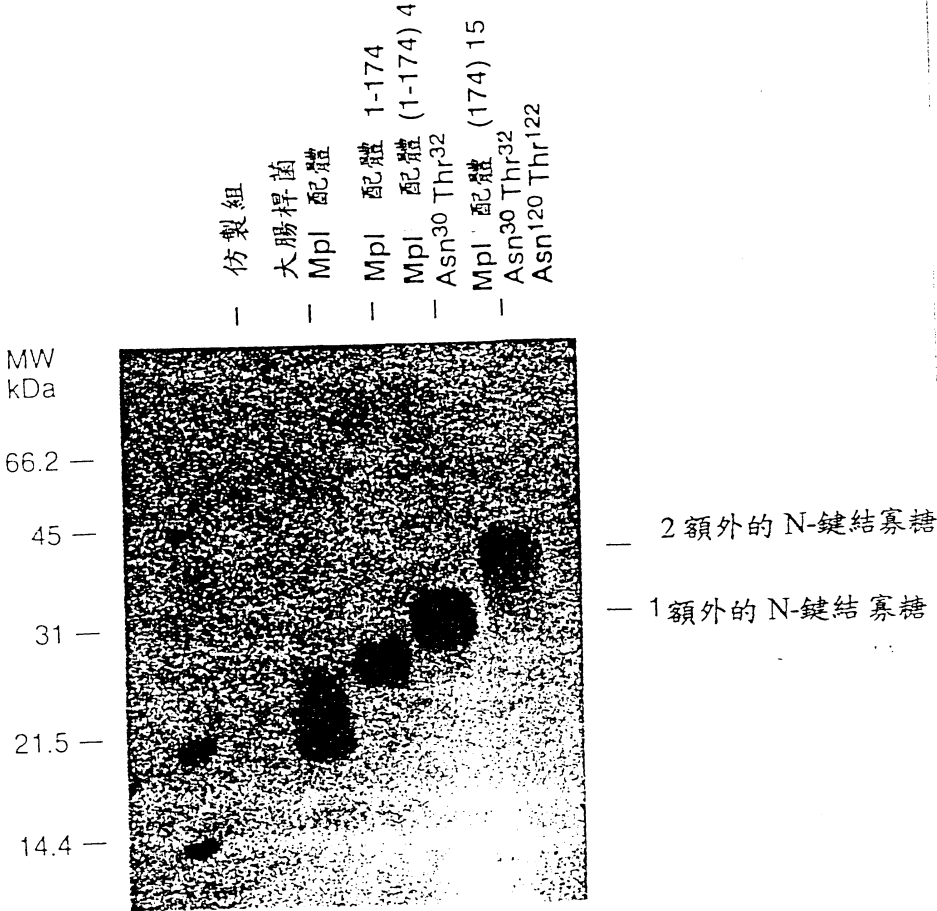


圖 9

圖式

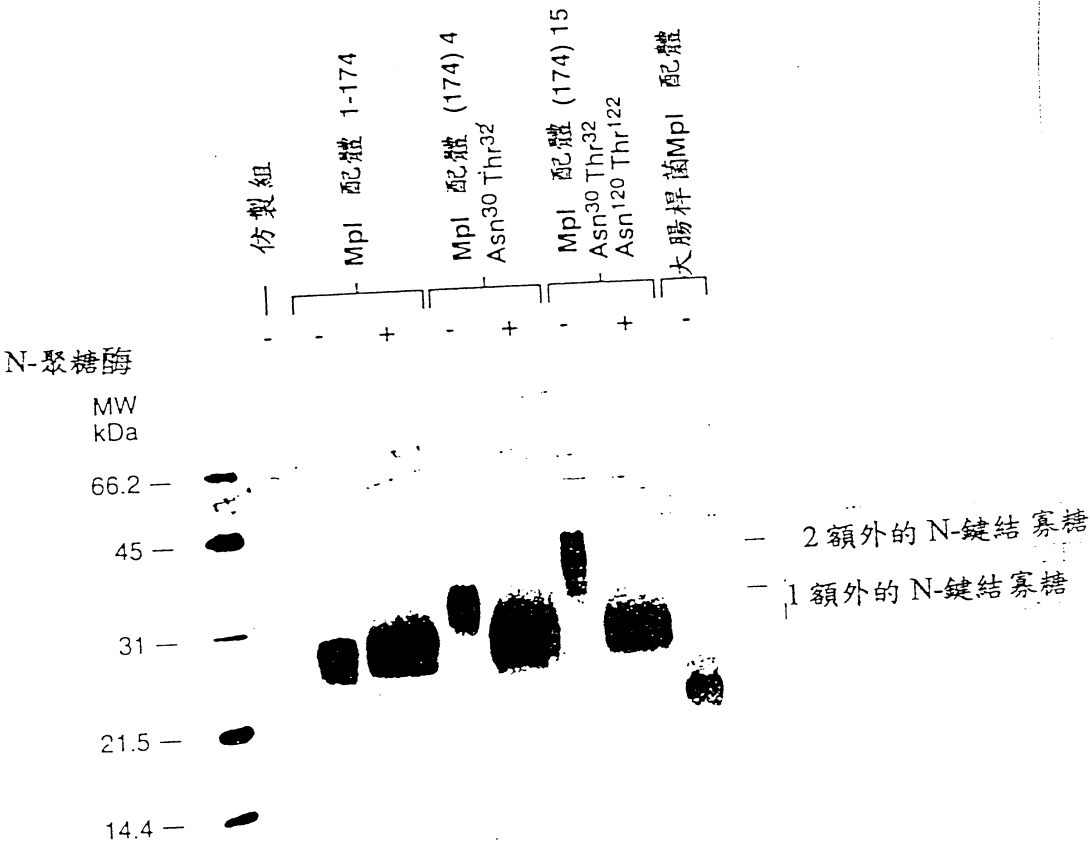
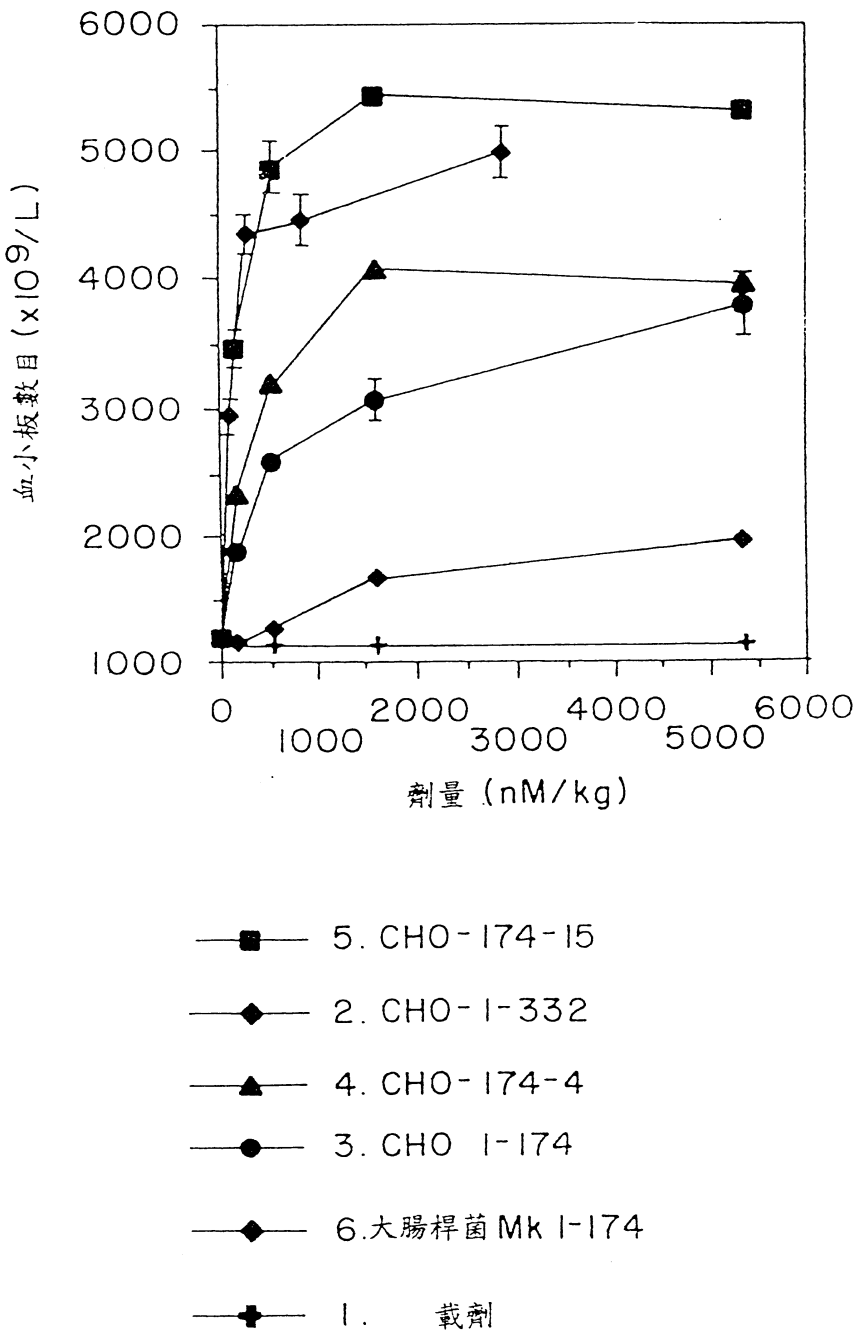


圖 10

圖式

圖 11



圖式

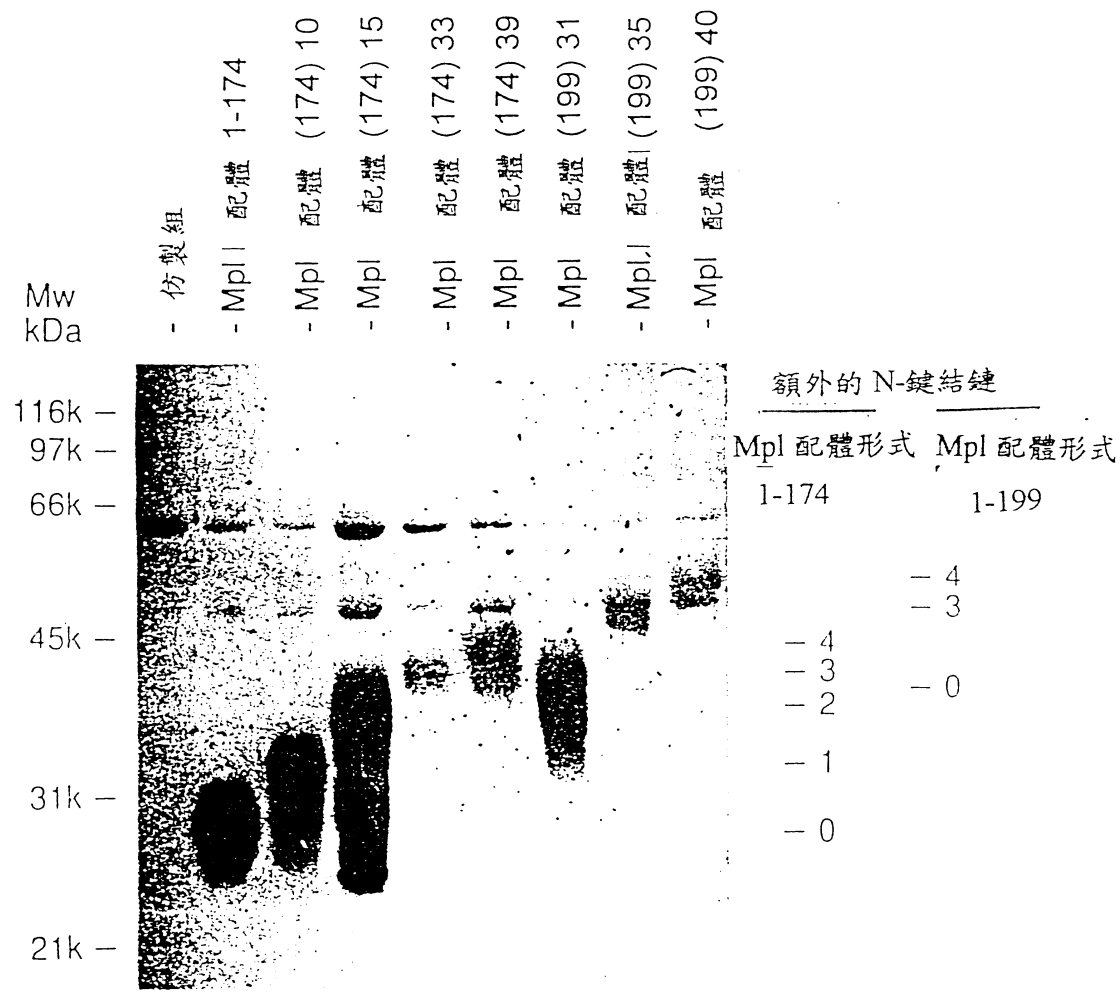


圖 12

圖式

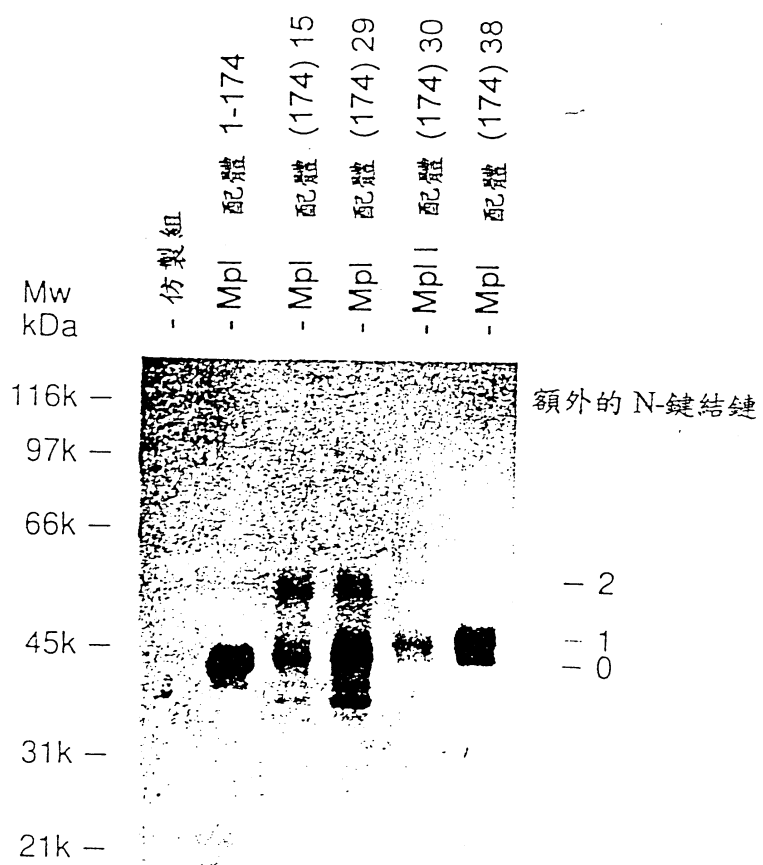


圖 13

圖式

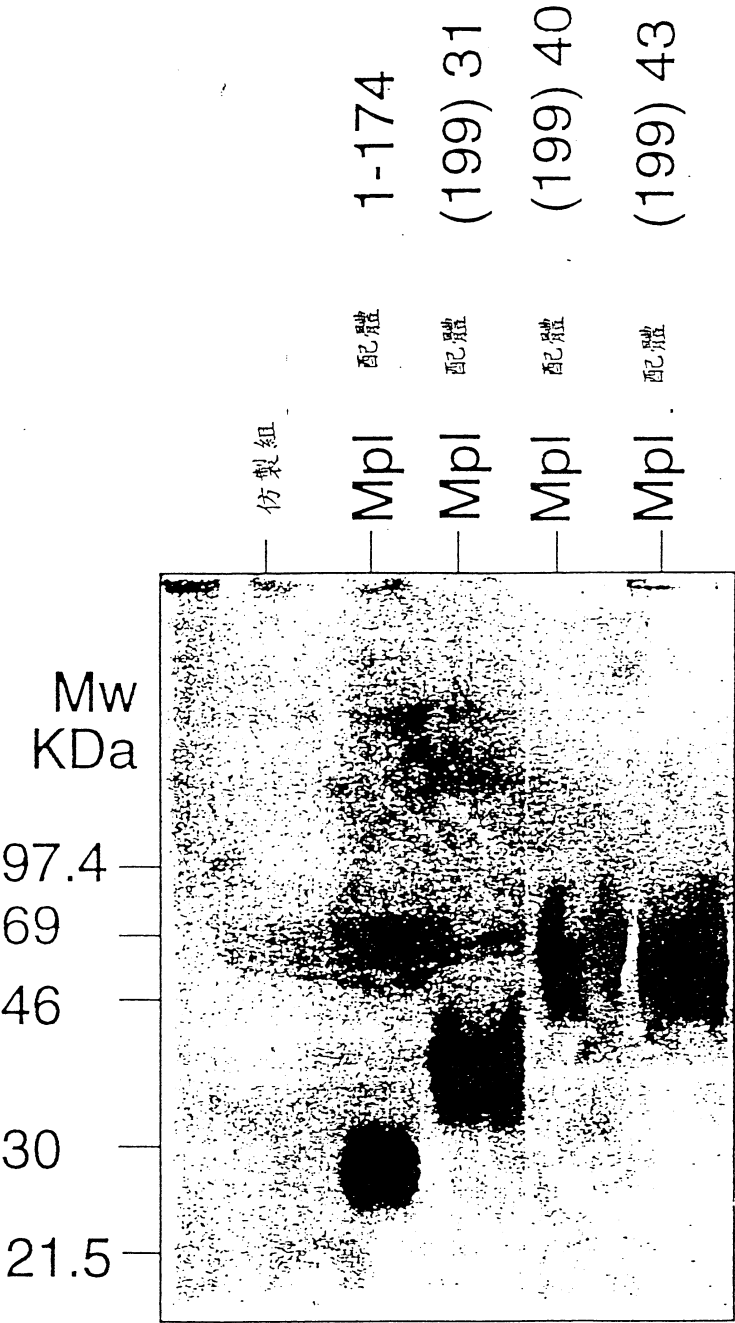


圖 14

圖式

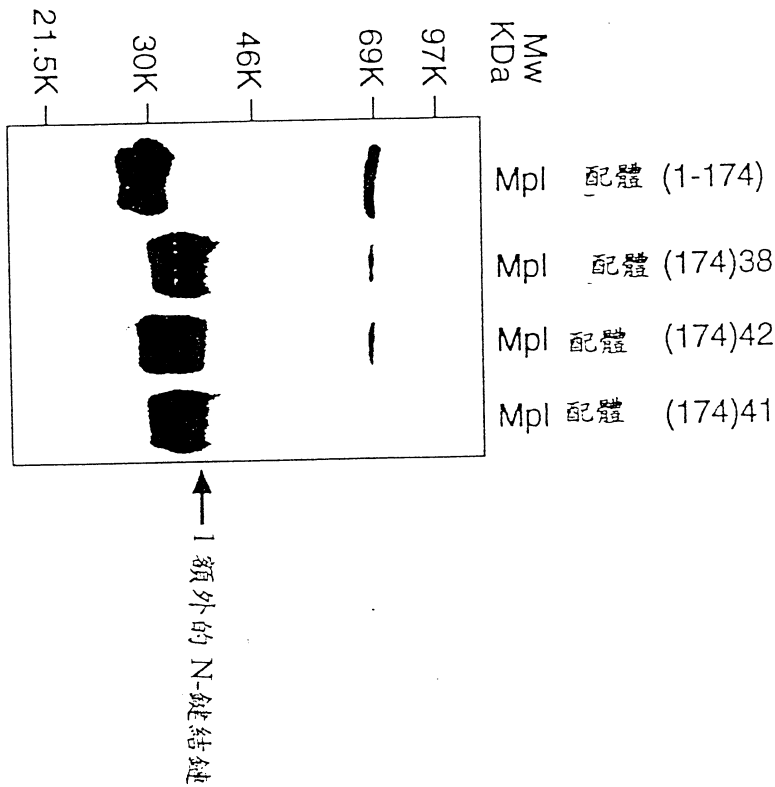


圖 15

六、申請專利範圍

1. 一種mpl配體之類似物，其中：

(a) 該mpl配體包含一選自開始於序列識別編號：1之1-7任一個及終止於151-332任一個之胺基酸序列所組成群組；

(b) 該mpl配體之類似物在該胺基酸序列中具有至少一被加入之N-鍵結糖基化部位；

(c) 該mpl配體之類似物具有特異性刺激或增加巨核細胞或血小板之生物活性；以及

(d) 該至少一被加入之N-鍵結糖基化部位選自下列所組成之族群：

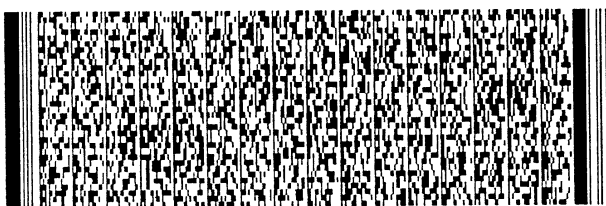
[Asn164]；

[Asn163]；及

[Asn30，Thr32，Asn56，Asn120，Thr122，Asn164]。

2. 根據申請專利範圍第1項之類似物，其中該mpl配體具有下列者所組成族群中之胺基酸序列：

mpl配體1-332	序列識別編號：1之胺基酸1-332
mpl配體1-199	序列識別編號：1之胺基酸1-199
mpl配體1-191	序列識別編號：1之胺基酸1-191
mpl配體1-183	序列識別編號：1之胺基酸1-183
mpl配體1-174	序列識別編號：1之胺基酸1-174
mpl配體7-332	序列識別編號：1之胺基酸7-332
mpl配體7-191	序列識別編號：1之胺基酸7-191
mpl配體7-199	序列識別編號：1之胺基酸7-199
mpl配體7-183	序列識別編號：1之胺基酸7-183



六、申請專利範圍

及

mpl 配體7-174 序列識別編號：1之胺基酸7-174。

3. 根據申請專利範圍第2項之類似物，其中該mpl配體具有序列識別編號：1之胺基酸1-174所組成之胺基酸序列。

4. 根據申請專利範圍第2項之類似物，其中該mpl配體具有序列識別編號：1之胺基酸1-199所組成之胺基酸序列。

5. 根據申請專利範圍第2項之類似物，其為：

序列識別編號：1之[Asn30，Thr32，Asn56，Asn120，Thr122，Asn164]mpl配體1-199。

6. 根據申請專利範圍第1至5項中任一項之類似物，其為真核細胞中外源DNA序列之表現產物。

7. 根據申請專利範圍第6項之類似物，其中該真核細胞為哺乳動物細胞。

8. 根據申請專利範圍第7項之類似物，其中該哺乳動物細胞為CHO。

9. 一種用於刺激或增加巨核細胞或血小板之組合物，其中該組合物包含治療有效量之申請專利範圍第1至5項中任一項之mpl配體類似物，以及醫藥上允許之稀釋劑、佐劑或載劑。



圖式

420	CTTGAACCCAGCTTCTCCACAGGGCAGGACCACAGCTCACAAGGATCCCAATGCCATC	479
108	LeuGlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIle	127
480	TTCCGTAGCTTCCAACACCTGCTCCGAGGAAGTGCGTTTCCCTGATGCTTGTAGGAGGG	539
128	PheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysValArgPheLeuMetLeuValGlyGly	147
540	TCCACCCCTCTGCGTCAGGGGGCCCCACCCACACAGCTGTCCCCAGCAGAACCTCTCTA	599
148	SerThrLeuCysValArgArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeu	167
600	GTCCCTCACACTGAACGAGCTCCCAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAACCTTCACT	659
168	ValLeuThrLeuAsnGlnLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThr	187
660	GCCTCAGCCAGAACTACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGGAATTCAGAGCCAAG	719
188	AlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLys	207
720	ATTCCTGGTCTGCTGAACCAACCTCCAGGTCCCTGGACCAAAATCCCGGATACCTGAAC	779
208	IleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsn	227
780	AGGATACACGAACCTCTTGAATGGAACCTCGTGACTCTTTCCTGGACCTCAGCGAGGACC	839
228	ArgIleHisGlnLeuLeuAsnGlyThrArgGlyLeuPheProGlyProSerArgArgThr	247

修正
本
8月3日
540
148
600
168
660
188

圖 1B

願請委員明示，本案修正後是否仍屬實質內容