公告本

申請日期	86. 4. 11.
案號	86104638
類別	C12N 15/12, 15/63, C07K 14/51, A61K 38/17

Int. Cl.[6]

（以上各欄由本局填註）

A4
C4

I221482

發明 ~~新型~~ 專利說明書

一、發明 ~~新型~~ 名稱	中文	促骨堆積肽
	英文	"OSTEOPROTEGERIN"
二、發明 ~~創作~~ 人	姓名	1.威廉 J. 伯利　2.大衛 L. 雷希 3.法蘭克 J. 卡羅　4.張明新
	國籍	1-4.均美國
	住、居所	1.美國加州摩爾公園市查斯納里其街11678號 2.美國加州千橡市伯沙維斯塔路614號 3.美國加州西湖村里克雷斯特中心841號 4.美國加州新伯利公園市卡拉斯柯林街736號
三、申請人	姓名（名稱）	美商安美基公司
	國籍	美國
	住、居所（事務所）	美國加州千橡市德哈威蘭路1840號
	代表人姓名	湯瑪士·E·渥克曼二世

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

裝 訂 線

五、發明說明（1 ）

發明領域

本發明係概括地有關參與骨新陳代謝的調節之多肽。更特定言之，本發明係有關一種新穎的多肽，稱爲促骨堆積肽，其爲腫瘤壞死因子受體超族的一成員。該多肽可用來治療具有增加骨耗損特徵的骨疾病例如骨稀鬆病。

發明背景

多肽生長因子和細胞激素皆爲分泌出來的因子，其經由特定地結合到個別，表面結合受體而發出有關廣多種細胞生長，分化，和新陳代謝的變化之信號。以其爲一蛋白質類別，因此受體就共構造和信號傳導方式而言互有不同。彼等的特徵在於其具有一細胞外域以參與配體結合，及細胞質域以傳遞恰當的細胞內信號。受體表現樣式最後決定那些細胞會對應所給配體，而所給受體的構造則指定經由配體結合所誘發的細胞回應。受體等經證明可透過其細胞質域經由活化蛋白質酪胺酸，或蛋白質絲胺酸/蘇胺酸磷酸化(如，血小板衍生生長因子受體(PDGFR)或轉形生長因子-β受體-I(TGFβR-I))，經由刺激G-蛋白質活化(例如，β-腎上腺素功能受體)，及經由調制與細胞質信號轉導蛋白質的締合(如，TNFR-1和Fas/APO)而傳遞細胞內信號(Heldin, Cell 80, 213-223(1995))。

腫瘤壞死因子受體(TNFR)超族爲一組第I類透膜蛋白質，彼等共有守恆的富含半胱胺酸圖式(motif)，其在細胞外域中重複三至六次(Smith, et al. Cell 76, 953-862(1994))。整體地，這些重複單位形成這些受體的配體結合域(Chen et al.,

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（2 ）

Chemistry 270, 2874-2878(1995))。這些受體的配體爲一組與TNFα同系，在構造上相關的蛋白質(Goeddel et al. Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol. 51, 597-609(1986)；Nagata et al. Science 267, 1449-1456(1995))。TNFα係結合到個別但彼此密切關聯的受體，TNFR-1和TNFR-2。TNFα會在載著受體的細胞內產生多種生物回應，包括，增生，分化及細胞毒性和apoptosis(Beutler et al. Ann. Rev. Biochem. 57, 505-518(1988))。

TNFα被認爲會媒介成急性和慢性炎性回應(Beutler et al. Ann. Rev. Biochem. 57, 505-508(1988))。TNFα的系統性輸送令誘發毒性休克和遍佈的組織壞死。因此之故，TNFα可能促成與多和感染性疾病，包括敗血病相關的嚴重罹病率和死亡率。FasL，TNFR-相關受體Fas/APO的配體(Suda et al. Cell 75, 1169-1178(1993))，其突變係與自體免疫相關者(Fisher et al. Cell 81, 935-946(1995))，而FasL的過度產生可能涉及藥物誘導的肝炎。因此，各種TNFR-相關性蛋白質的配體常媒介成許多疾病狀態的嚴重效應，據此可推測可中和這些配體的活性之藥劑皆具有治療價值。可溶性TNFR-1受體，及結合TNFα的抗體皆經檢驗過中和系統性TNFα之能力(Loetscher et al. Cancer Cells 3(6), 221-226(1991))。分泌TNFR-1 mRNA的自然發生形式已在最近被選殖，且其產生也經檢測過其在活體外(in vitro)和活體內(in vivo)中和TNFα活性之能力(Kohno et al. PNAS USA 87, 8331-8335(1990))。此蛋白質中和TNFα的能力可推測可溶性TNF受體具有結合

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

五、發明說明（3 ）

和清除TNF的功能藉而阻斷對載有TNFR的細胞所施加之細胞毒性效應。

本發明的一項目的爲鑑定出TNFR超族的新成員。經預期該新族員可爲透膜蛋白質或其可溶形式，其包括細胞外域而缺乏透膜和細胞質域。我像鑑定出一新的TNFR超族成員，其編碼一與TNFR-2密切相關的分泌蛋白質。類似於可溶性TNFR-1者，該TNFR-2相關性蛋白質可負面地調節其配體的活性，因而可用來治療某些人類疾病。

發明概述

一種新穎的腫瘤壞死因子受體(TNFR)超族成員已從胎鼠腸內cDNA庫鑑別出來。得到全長度的cDNA株並予以定序。該老鼠cDNA在導入外來基因的小鼠體內之表現揭露出骨密度有顯著的增加，特別是在長骨，骨盆骨和椎骨之中。該cDNA編碼的多肽稱爲促骨堆積肽(OPG)且其在促進骨蓄積中具有主要作用地位。

本發明提出核酸，其編碼具有至少一種OPG所具生物活性之多肽。此外也提出可雜合到編碼小鼠，老鼠或人類OPG的核酸之核酸，如圖2B-2C(SEQ ID NO：120)，9A-9B(SEQ ID NO：122)，和9C-9D(SEQ ID NO：124)中所示者。較佳者，該OPG爲哺乳動物OPG且更佳者爲人類OPG。此外也包括表現OPG的重組媒體和宿主細胞以及製備重組OPG之方法。另外也揭示可特定地結合該多肽的抗體或其片段。

本發明也提出治療骨疾病的方法。該多肽可用來預防骨吸除作用且可用來治療導致骨損失的任何病況，例如骨稀鬆

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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（4 ）

病，高鈣血症，柏哲德氏骨病(Paget's disease of bone)，及因風濕性關節炎或骨髓炎所致骨損失，及類似者。骨病也可以用本發明核酸經由反意或基因治療法予以治療。本發明更包括含有OPG核酸和多肽的醫學組合物。

圖式說明

圖1. A.新穎EST LORF的EASTA分析。圖中所示爲與人類TNFR-2序列排列在一起的推得之FRI-1胺基酸序列。B.新穎EST LORF的剖面分析，所示爲與人類TNFR-剖面對排在一起的推得RFI-1胺基酸序列。C. TNFR超族的構造圖，顯示出與新穎FRI-1同系的區域。

圖2. 全長度老鼠OPG基因-TNFR超族的一新成員-的構造和序列。A.pMOB-B1.1插入體的圖。框格表示LORF在cDNA序列(粗線)內的位置。黑色框格表信號肽，而灰色橢圓形表示富含半胱胺酸重複序列的位置。B，C.老鼠OPG cDNA的核酸和蛋白質序列。預測的信號序列係下面畫線部份，而N-聯結糖化潛在部位則以粗體底下劃線字母表出。D,E. OPG與其他TNFR超族成員fas(SEQ ID NO：128)；tnfrl(SEQ ID NO：129)；sfu-t2(SEQ ID NO：130)；tnfr2(SEQ ID NO：131)；cd40(SEQ ID NO：132)；osteo(SEQ ID NO：133)；ngfr(SEQ ID NO：134)；ox40(SEQ ID NO：135)；41bb(SEQ ID NO：136)的堆積序列比較(Wisconsin GCG Package, Version 8.1)。

圖3. 預測老鼠OPG蛋白質序列的PepPlot分析(Wisconsin GCG Package, Version 8.1)。A.老鼠OPG的略圖表示，顯示

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（5 ）

出疏水性(上)和親水性(下)胺基酸。也顯示出鹼性(上)和酸性(下)胺基酸。B.β-片層形成性(上)和β-片層破壞性(下)胺基酸殘基，如Chou and Fasman(Adv. Enz. 47, 45-147(1948))所定義者之顯示。C.α-螺旋和β-片層傾向測量之顯示(Chou and Fasman，上述)。1.00以上的曲線顯示出α-螺旋和β-片層結構之傾向。結構可能終止於曲線掉到1.00以下的蛋白質區域。D. α-形成性(上)或α-破壞性(下)的殘基之顯示。E.類似於典型地出現於α和β結構的胺基端之序列的蛋白質序列部份之顯示(Chou and Fasman，同上)。F.類似於典型地出現於α和β結構的羧基端之序列的蛋白質序列部份之顯示(Chou and Fasman，同上)。G.典型地出現於回轉處的蛋白質序列部份之顯示(Chou and Fasman，同上)。H.序列中各位置處的螺旋疏水性要素之顯示(Eisenberg et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 140-144(1984))。I.根據Kyte and Doolittle(J. Mol. Biol. 157, 105-132(1982))和Goldman et al.(評述於Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15, 321-353(1986))的平均hydrophathy之顯示。

圖4. OPG cDNA在人類組織中的mRNA表現樣式。北方氏吸漬係用32P-標示老鼠cDNA插入體(A.左邊兩盤)，或人類cDNA插入體(B.右邊盤)作爲探測核酸。

圖5. 在肝細胞內表現OPG cDNA的導入外來基因的小鼠之創造。HE-OPE外來基因在小鼠肝中的北方氏吸漬表示。

圖6. OPG外來基因導入小鼠的骨密度之增加。盤A-F。對照小鼠。G-J，OPG表現小鼠。在驗屍時，所有動物都經輻

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（6 ）

射照像並製備成相片。於A-F中，顯示出諸對照動物和一導入外來基因非表現者(#28)的輻射相片。可注意到該等骨具有清晰明確的表層和透明的中央骨髓腔。相對地，OPG動物(G-J)具有不明確的表層和增加的骨髓區內密度。

圖7. OPG外來基因導入小鼠的小梁骨增加情形。A-D.對照動物的骨所得代表性顯微照片。於A和B中，顯示出股骨的低(4X，10X)功率影像(Masson Trichrome染色)。抗酒石酸鹽酸性磷酸酶(TRAP)染色顯示出吸收性軟骨(C)和小梁骨(D)的蝕骨細胞(參看箭頭所示)。注意小梁骨上的蝕骨細胞之扁平外觀。E-H.取自OPG-表現動物的骨之代表性顯微照片。於E和F中，顯示出股骨的低(4X，10X)倍率影像(Masson Trichrome染色)。透明區的生長板軟骨，藍色染色區爲骨，而紅色部位爲骨髓。注意與對照樣相異者，未被吸除的小梁骨導致一般骨髓腔的不存在。此外，所得小梁骨具有藍色和透明部位斑雜的外觀。透明部位爲尚未改型的生長板軟骨之殘餘部份。根據TRAP染色，這些動物在生長板處確實具有蝕骨細胞(參看箭頭)(G)，其數目可能減少。不過，遠離生長板的小梁骨表面則幾乎沒有蝕骨細胞(H)，其爲與對照動物(參看D)有直接相異處之發現。

圖8. HE-OPE表現子在單核細胞-巨噬細胞發展中具有缺陷。小鼠骨質石化病的一個肇因爲M-CSF基因中點突變所致缺陷性M-CSF產生。此爲導致循環系和組織系巨噬細胞的顯著缺乏。由H1E分析評估得知OPG表現子的周圍血液含有單核細胞。爲了確定組織巨噬細胞的存在，使用可辨識鼠類

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（7 ）

巨噬細胞上的細胞表面抗原之F480抗體進行免疫組織化學分析。A和顯示出得自正常表現子和CR1迴度表現子的脾之低倍率(4X)顯微照片。注意兩種動物都具有許多F480陽性細胞。在正常表現子(B)和HE-OPE過度表現子(D)的骨髓中也都含有單核細胞-巨噬細胞(40X)。

圖9. 小鼠和人類OPG cDNA株的構造和序列。A，B。小鼠cDNA和蛋白質序列。C，D。人類cDNA和蛋白質序列。預測的信號肽係下面畫線者，N-聯結糖化潛在部位則以粗體字表出。E，F。老鼠，小鼠和人類OPG胺基酸序列的序列對正和比較。

圖10. TNFR-1和人類OPG細胞外域中的守恆序列之比較。TNFR1和OPG排列PrettyPlot(Wisconsin GCG Package, Version 8.1)係在實施例6中說明者。上面行，人類TNFR1序列編碼域1-4，底下行，人類OPG序列編碼域1-4。守恆殘基係以長方形框格突顯出。

圖11. 人類OPG的三次元模型。與人類TNFβ(細線)共結晶的人類OPG殘基25至163(寬線)預測三次元構造之Molescript顯示的側視圖。作爲方向的參考，沿OPG多肽主鏈的粗箭號係從N-端指向C-端。此外也沿著多肽主鏈插置個別半胱胺酸殘基側鏈的位置以幫助顯現出個別的富半胱胺酸域。TNFβ分子係依Banner et al.(1993)所述排列成線者。

圖12. OPG富含半胱胺酸域之構造。將人類(上行，SEQ ID NO：136)和小鼠(下行)OPG胺基酸序列的比對突顯出預測的OPG域結構。該多肽係分成兩半部；N-端(A)，和C-端

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（8 ）

(B)。N-端半部經預測含有四個富含半胱胺酸域(標爲1-4)。預測的鏈間雙硫鍵係以粗線表出，標爲"SS1"，"SS2"，或"SS3"。酪胺酸28和組胺酸75(底下畫線者)爲預期形成離子性交互作用者。而預期會與OPG配體交互作用的胺基酸係在各恰當殘基上方以粗點表示。位於OPG C-端本部內的半胱胺酸殘基係以長方形框格表出。

圖13. 全長度與截頭小鼠OPG-Fc融合蛋白質的表現和分泌。A.圖中以箭頭表出融合到人類IgG1 Fc域的點。B.得自F1.Fc(在白胺酸401融合到Fc的全長度OPG)和CT.Fc(在蘇胺酸180融合到Fc的羧基端截頭OPG)融合蛋白質表現媒體之經調理介質的銀染色結果和SDS-聚丙烯醯胺凝膠分離結果。道1，母pCEP4表現媒體細胞系；道2，Fl.Fc媒體細胞系；道3，CT.Fc媒體細胞系。C.用抗-人類IgG1 Fc域爲探測核酸丙從Fl.Fc和CT.Fc蛋白質表現媒體得到的調理介質之西氏方吸漬分析。道1，母pCEG4表現媒體細胞系；道2，Fl.Fc媒體細胞系；道3，CT.Fc媒體細胞系。

圖14. 人類OPG在大腸桿菌(E. coli)中的表現。A.細菌表現媒體的構成。人類OPG基因的LORF經PCR擴大後，接合到寡核苷酸聯結子片段(上面的股爲SEQ ID NO：137；下面的股的SEQ ID NO：127)，再連接到pAMG21媒體DNA內。所得媒體能夠表現出聯結到N-端甲硫胺酸殘基的OPG殘基32-401。B.載有pAMG21-人類OPG-32-401質體的未經誘導和經誘導細菌之SDS-PAGE分析。道1，MW標準樣；道2，未經誘導的細胞；道3，30℃誘導；道4，37℃誘導；道5，37℃

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（9 ）

誘導所得全細胞溶裂物；道6，全細胞溶裂物的可溶性部份；道7，全細胞溶裂物的不溶性部份；道8，得自全細胞溶裂物的經純化包涵體。

圖15. CHO細胞內產生的重組鼠類OPG經SDS-PAGE和西方氏吸漬分析之結果。於所示的每一道也加上等量的經CHO調理介質，且係經用還原性樣品緩衝液(左道)，或非還原性樣品緩衝液(右道)處理而製備者。於電泳後，將離析後的蛋白質轉移到耐綸膜，再用抗-OPG抗體予以探測。OPG的55 kd單體形式和100 kd二體物形式之相對位置皆以箭頭指示出。

圖16. 在CHO細胞內產生的重組鼠類OPG之脈衝-追踪分析。CHO細胞經^{35}S-甲硫胺酸/半胱胺酸脈衝標記後，追踪一段所示時間。將代謝標記培養物分離到經調理的介質和細胞內，分別製備出清潔劑萃取物，予以澄清，再用抗-OPG抗體予以免疫沈澱。以SDS-PAGE離析免疫沈澱物後，曝光到軟片上。上左和上右兩盤；在非還原條件下分析的樣品。下左和下右兩盤；在還原條件下分析的樣品。上左和下左盤；細胞萃取物。上右和下右盤；經調理培養基萃取物。OPG的55 kd單體形式和100 kd雙體形式之相對流動性係以箭頭示出。

圖17. 在CTLL-2細胞系中之OPG表現。製備CTLL-2細胞和經CHO-mu OPG[1-401]轉染細胞的無血清經調理培養基，予以濃縮後，以非還原性SDS-PAGE和西方氏吸漬予以分析。左道：CTLL-2經調理培養基。右道：CHO-muOPG經調理培

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（10）

養基。OPG的55 kd單體形式和100 kd雙體形式之相對流動性皆以箭頭示出。

圖18. 在得自對照小鼠和OPG導入外來基因小鼠的血清樣品和肝萃取物中的OPG表現之偵檢。導入外來基因的小鼠係依實施例4中所述構成的。OPG表現係在SDS-PAGE後用抗-OPG抗體進行西方氏吸漬分析而予以視測。

圖19. huOPG[22-401]-Fc融合蛋白質活體外(in vitro)蝕骨細胞形成之影響。該蝕骨細胞形成檢定係依實施例11A中所述在沒有(對照樣)或有所示量的huOPG[22-401]-Fc融合體之情況中進行的。蝕骨細胞形成係經由對酒石酸鹽酸性磷酸酶(TRAP)的組織化學染色而視測的。A. OPG添加至100毫微克/毫升。D.OPG添加至0.1毫微克/毫升。E.OPG添加到0.01毫微克/毫升。F.OPG添加到0.001毫微克/毫升。G.對照樣，未加OPG。

圖20. 蝕骨細胞培養物TRAP活性隨OPG量增加而減低。於蝕骨細胞形成檢定中加入所示濃度的huOPG[22-401]-Fc融合蛋白質並依實施例11A中所述定量測定TRAP活性。

圖21. OPG對蝕骨細胞分化終段的影響。huOPG[22-401]-Fc融合體係在蝕骨細胞成熟中間階段中(第5-6天；OPG-CTL)或在蝕骨細胞成熟終段中(第7-15天；CTL-OPG)的蝕骨細胞形成檢定中加入。定量分析TRAP活性並與沒有OPG(CTL-CTL)而有OPG通過之情況中觀測到的活性比較(OPG-OPG)。

圖22. IL-1β，IL-1α和OPG對於小鼠體內血液游離鈣的影響。在注射單獨的IL-1β，單獨的IL-1α，IL-1β+muOPG

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

五、發明說明（11）

[22-401]-Fc，IL-1α+muOPG[22-401]-Fc，及單獨的muOPG[22-401]-Fc之後監測血液游離鈣水平。對照小鼠係接受只有磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)的注射。A所示爲IL-1B實驗；B所示爲IL-1α實驗。

圖23. OPG對於對照小鼠和IL1-處理小鼠體中頭頂蝕骨細胞之影響。分析小鼠頭頂骨樣品的組織學方法係在實施例11B中說明。箭號所指爲在第2天處理過的小鼠體內所含的蝕骨細胞。(A)每天接受四次PBS注射，(B)每天一次IL-1注射和三次PBS注射，(C)每天注射一次PBS和三次OPG，(D)每天注射一次IL-1和三次OPG的小鼠頭頂樣。

圖24. 在正常小鼠骨髓腔內的骨質蓄積之放射攝影分析。小鼠經皮下注射食鹽水(A)或muOPG[22-401]-Fc融合體(5毫克/公斤/天)14天(B)並依實施例11C中所述測定骨密度。

圖25. 正常小鼠骨髓腔中骨質蓄積之組織形態測定分析。注射實驗和骨組織學皆依實施例11C中所述實施。

圖26. 正常小鼠骨髓腔中骨質蓄積之組織學分析。注射實驗和骨組織學皆依實施例11C中所述實施。A.食鹽水注射。B. muOPG[22-401]-Fc融合體注射。

圖27. 給到切除卵巢小鼠的蛋OPG活性。於此兩週實驗中，減低骨密度的傾向顯然會被OPG或其他抗吸除性治療所阻斷。於卵巢切除時和在治療的第一週和第二週皆給予DEXA測量。其結果表爲相對於初始骨密度的%變化率(平均值+/-SEM)。

圖28. 股幹骺端中的骨密度，以組織形態測定法測量者，

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（12）

其在切除卵巢老鼠(OVX)中的值傾向於低於在卵巢切除後17天的僞手術動物(SHAM)中的值。此效應會被OPG-Fc所阻斷，使得經OPG-Fc處理過的卵巢切除老鼠(OVX+OPG)比經媒液處理的卵巢切除老鼠(OVX)具有明顯較高的骨密度(平均值+/-SEM)。

發明之詳細說明

本發明鑑別出一種新穎的腫瘤壞死因子受體(TNFR)超族的成員，其係從胎老鼠腸cDNA庫中離析出來的表現序列標籤(expressed sequence tag)(EST)。全長度老鼠cDNA純系和對應的小鼠與人類cDNA純系所具構造係依實施例1和6所述而測定的。老鼠，小鼠和人類諸基因分別表於圖2B-2C (SEQ ID NO：120)，9A-9B((SEQ ID NO：122)，和9C-9D (SEQ ID NO：124)之中。所有這三種序列都顯示出對TNFR族員所具細胞外域的強烈相似性。該諸分離出的全長度cDNA純系沒有一者有編碼對膜結合受體所預期的透膜域和細胞質域，可推測這些cDNAs係編碼可溶性，分泌蛋白質而非細胞表面受體。圖9D中所示跨越核苷酸1200-1353的一部份人類基因已在1995年11月22日登記在the Genebank的數據庫，登記號碼17188769。

老鼠和人類mRNA的組織分佈係依實施例2中所述測定。在老鼠體內，於腎，肝，胎盤和心臟中偵檢mRNA表現而以腎中有最高的表現。此外也偵檢在骨骼肌和胰臟中的表現。於人體中，係在相同的組織以及淋巴節，胸腺，脾和闌尾內偵檢表現。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（13）

老鼠cDNA係使用肝-特定性ApoE啓動基因表現系統在導入外來基因的小鼠體內表現(實施例3)。表現子的分析顯示出骨密度有明顯地增加，特別是在長骨(股骨)。椎骨和扁平骨(骨盆骨)之間。骨經染色段的組織學分析顯示出嚴重的骨質石化病(參看實施例4)，顯示骨形成與吸除之間有顯著的不平衡，導致骨和軟骨的顯著蓄積。OPG表現子動物骨中小梁骨蝕骨細胞數目的減少顯示有明顯部份的TNFR-相關性蛋白質活性可能是在遏止骨吸除，一種由蝕骨細胞媒介的程序。從在導入外來基因的表現子中所具活性之觀點，將本文所述TNFR-相關性蛋白質稱爲OPGs。

使用老鼠cDNA序列，分離出小鼠和人類cDNA純系(實施例5)。小鼠OPG在293細胞中及人類OPG在大腸桿菌中的表現分別在實施例7和8中說明之。小鼠OPG係以Fc融合物形式產生，其係經蛋白質A親和性層析術純化的。此外也在實施例7中說全長度和截頭人類和小鼠OPG多肽在CHO和293細胞中的表現，成爲對人類IgG1的Fc區之融合多肽形式或爲未融合多肽。全長度和截頭人類和小鼠OPGs在大腸桿菌內表現成爲Fc融合多肽或爲未融合多肽，係在實施例8說明之。重組製成的哺乳動物和細菌OPG的純化係在實施例10中說明之。

OPG的生物活性係使用活體外(in vitro)蝕骨細胞成熟檢定，間白素-1(IL-1)誘導高鈣血症活體內(in vivo)模型，和正常小鼠骨密度的注射研究予以測定的(參看實施例11)。下面在CHO或293細胞中產生的OPG重組蛋白質於大腸桿菌

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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（14）

內蝕骨細胞成熟檢定中展現出活性：muOPG[22-185]-Fc，muOPG[22-194]-Fc，muOPG[22-401]-Fc，muOPG[22-401]，huOPG[22-201]-Fc，huOPG[22-401]-Fc。在CHO細胞中產生的muOPG[22-180]-Fc和在大腸桿菌中產生的huOPG met[32-401]於該活體外檢定中不展現出活性。

有幾種來源的OPG係產生成爲二體物且於某些程度上成爲更高的多體物。在導入外來基因小鼠中產生的老鼠OPG[22-401]，在CHO細胞中產生成爲重組多肽的muOPG[22-401]和huOPG[22-401]，以及從細胞毒性T細胞素表現成爲天然發生產物的OPG經在非還原性SDS凝膠上分析時大都爲二體物和三體物(參看實施例9)。在胺基酸186-401區中具有缺失的截頭OPG多肽(如OPG[1-185]和OPG[1-194])大都爲單體物，可推測該186-401區可能參與OPG多肽的自我締合。不過，在大腸桿菌中產生的huOPG met[32-401]則大部份爲單體。

OPG在調節骨吸除作用中可能具有重要性。該蛋白質顯然係作爲TNF族的可溶性受體且可遏止包含在溶骨途徑中的受體-配體交互作用。該調節作用的一部份似乎爲蝕骨細胞數目的減少。

核酸

本發明提出編碼具有至少一種OPG生物活性的多肽之離析核酸。如本文所述者，OPG生物活性包括，但不限於，包含骨新陳代謝的任何活性且特別者，包括增加骨密度。本發明的核酸係選自下列之中者：

a)如圖2B-2C(SEQ ID NO：120)，9A-9B((SEQ ID NO：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（15）

122)，和9C-9D((SEQ ID NO：124)中所示的核酸序列或其互補股；

b)在嚴峻條件下與圖2B-2C((SEQ ID NO：120)，9A-9B((SEQ ID NO：122)，和9C-9D((SEQ ID NO：124)中所示的多肽編碼區親合的核酸；及

c)在嚴峻條件下與圖1A中所示核苷酸148至337(包括核苷酸148和337)段雜合的核酸；及

d)變性成(a)和(b)中所述序列的核酸序列。

本發明提出編碼老鼠，小鼠和人類OPG的核酸以及雜合到彼等的核酸序列，彼等編碼具有至少一種OPG生物活性之多肽。此外也提出可雜合到涵蓋圖1A中所示核苷酸148-337的老鼠OPG EST之核酸。雜合條件通常是高嚴緊性者例如5xSSC，50%甲醯胺和42℃，爲本說明書實施例1中所述者。與這些條件同等嚴緊性者可以經由調整鹽和有機溶劑的濃度與溫度而易於得到。(b)中的核酸涵蓋著編碼著不會與其他已知的TNF受體超族成員發生可偵檢到的雜合之OPG-相關性多肽的核酸序列。於一較佳實施例中，該等核酸爲如圖2B-2C((SEQ ID NO：120)，9A-9B((SEQ ID NO：122)，和9C-9D((SEQ ID NO：124)中所示者。

本發明雜合核酸的長度係可變者，係因雜合可能發生於如圖2B-2C((SEQ ID NO：120)，9A-9B((SEQ ID NO：122)，和9C-9D((SEQ ID NO：124)中所示編碼多肽的區域之部份或全部，且也可能發生於鄰接的非編碼區。所以，雜合核酸可爲圖2B-2C((SEQ ID NO：120)，9A-9B((SEQ ID NO：122)，

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

五、發明說明（16）

和9C-9D((SEQ ID NO：124)中所示序列的截頭者或延伸者。截頭或延伸核酸只要保留著一或多種OPG生物性質即涵蓋在本發明之內。該雜合核酸也可包括鄰接的非編碼區，彼等可爲OPG編碼區的5'端/或3'端。該等非編碼區包括參與OPG表現的調節區，例如啓動基因，強化基因(enhance)，轉譯起始部位，轉錄終止部位和類似者。

核酸的雜合條件載於Sambrook et al. Molecular Cloning：A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)之中。

編碼老鼠OPG的DNA係摻加在質體pMO-B1.1之中而於1995年12月27日保存在the American Type Culture Collection, Rockville, MD其ATCC寄存號碼爲69970。編碼小鼠OPG的DNA係摻加在質體pRcCMV-鼠類OPG之中而於1995年12月27日保存在the American Type Culture Collection, Rockville, MD其寄存號碼爲69971。編碼人類OPG的DNA係摻加在質體pRcCMV-人類OPG之中而於1995年12月27日保存在the American Type Culture Collection, Rockville, MD其登錄號碼爲69969。本發明核酸會在嚴緊條件下雜合到ATCC登錄號碼69969，69970和69971的DNA插入體且具有至少一種OPG生物活性。

本發明也提出如圖2B，9A和9B中所示的核酸序列之衍生物。如本文所用者，衍生物包括具有一或多個殘基的添加，取代，插入或缺失之核酸序列使得所得序列所編碼的多肽具有一或多個經加入，缺失，插置或取代的胺基酸殘

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（17）

基且該所得多肽具有OPG活性。該核酸衍生物可爲自然發生者，例如經由接合變異或多形現象，或可用熟諳此技者可取得的部位-導向突變形成技術予以構成者。自然發生的OPG變體之一例子爲編碼前導序列中殘基3的lyl變成asn之核酸(參看實施例5)。預期該等核酸衍生物係編碼分子中至少可能瓦解生物活性的區域內之胺基酸變化。其他衍生物包括編碼具有如圖2B-2C((SEQ ID NO：120)，9A-9B((SEQ ID NO：122)，和9C-9D((SEQ ID NO：124)中所示細胞外域，及透膜域和細胞質域的膜結合形式OPG之核酸。

於一實施例中，OPG衍生物包括編碼著羧基端有一或多個胺基酸缺失掉的截頭形式OPG之核酸。編碼OPG的核酸可從羧基端缺失掉1至216個胺基酸。視情況，可從新的羧基端延伸抗體Fc區而得到具生物活性的OPG-Fc融合多肽(參看實施例11)。於較佳實施例中，核酸係編碼著具有殘基22-185，22-189，22-194或22-201(使用圖9E-F中的編號)胺基酸序列之OPG且視情況也編碼一人類IgG的Fc區。

此外也包括編碼著胺基端有一或多個胺基酸缺失掉的截頭形式OPG之核酸。截頭形式包括將構成前導序列的21個胺基酸之部份或全部都缺失掉者。另外，本發明提出編碼著從成熟胺基酸(在殘基22處)缺失掉1至10個胺基酸及，視情況，從羧基端(於殘基401處)缺失掉1至216個胺基的OPG之核酸。視情況，該核酸可編碼在胺基端的甲硫胺酸殘基。彼等OPG截頭多肽的例子載於實施例8中。

本發明核酸的例子包括cDNA，基因組DNA，合成DNA和

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

五、發明說明（18）

RNA。cDNA係得自從可表現OPG的各種組織分離出來的mRNA製備成之庫。對於人類，OPG的組織來源包括胃，肝，胎盤和心。編碼OPG的基因組DNA係得自市售來自各種物種的基因組庫。合成DNA係經由將重疊寡核苷酸片段化學合成後組合各片段以重構成部份或全部的編碼區和側翼序列而得者(參看美國專利第4,695,623號所述干擾素基因的化學合成)。RNA可經由導引高水平mRNA合成的原核生物表現媒體，例如使用T7啓動基因和RNA聚合酶的媒體而最容易地得到。

本發明核酸序列可用來偵檢生物樣品中的OPG序列以測定何種細胞和組織可表現OPG mRNA。該等序列也可以用來針對OPG相對性序列篩選cDNA庫和基因組庫。彼等篩選係諳於此技者能力所及者，可以利用恰當的雜合條件來偵檢同系序列。該等核酸也可以用來經由反意治療或基因治療而調制OPG表現水平。該等核酸也可用來發育導入外來基因的動物以用來生產該多肽及用於生物活性的研究(參看實施例3)。

媒體和宿主細胞

本發明也提出含有編碼OPG的核酸之表現媒體，用該媒體轉形過的宿主細胞及生產OPG的方法。重組蛋白質表現的評述載於Methods of Enzymology v 185, Goeddel, D. V. ed. Academic Press (1990)。

生產OPG的宿主細胞包括原核生物宿主細胞，例如大腸桿菌，酵母菌，植物，昆蟲和哺乳動物宿主細胞。大腸桿菌

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

五、發明說明（19）

菌株例如HB101或JM101即適合於表現之用。較佳的哺乳動物宿主細胞包括COS，CHOd-，293，CV-1，3T3，倉鼠嬰腎(BHK)細胞和其他。在宿主一轉譯修飾，例如糖基化作用和多肽處理修飾，對於OPG活性具重要性之時，以哺乳動物宿主細胞較適當。哺乳動物表現可促成可以從生長培養基回收得到分泌多肽之產生。

用於OPG表現的媒體含有媒體繁殖和選殖插入體表現所需的最少序列。這些序列包括複製源，選擇標記，啓動基因，核糖體結合部位，強化子序列，RNA接合部位和轉錄終止部位。適合於在前述宿主細胞內表現的媒體皆爲易於取得者且本發明的核酸係用標準重組DNA技術插到媒體內的。此外也包括組織特定性OPG表現用之媒體。彼等媒體包括可在肝，腎或其他器官中特定地作用供在小鼠內生產用之啓動基因，及供標的人類細胞內進行OPG表現所用之病毒媒體。

使用恰當的宿主-媒體系統，經由將經含有編碼OPG的核酸之表現媒體轉形過宿主細胞在產生OPG的條件下培養，及分離出表現產物即可重組地產生OPG。OPG係產生在經轉染哺乳動物細胞的上澄液內或在轉形細菌宿主細胞的包涵體內。如此產生的OPG可由諳於此技者依下文所述程序予以純化。在哺乳動物與細菌宿主系統內的OPG表現係在實施例7和8中說明之。哺乳動物宿主的表現媒體可用質體例如在PCT申請第90/14363中所述的pDSRα爲例說明之。細菌宿主細胞的表現媒體之例子有實施例8中所述的質體pAMG21和

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（20）

pAMG22-His。質體pAMG21已在1996年7月24日寄存在the American Type Culture Collection, Rockville, MD，其登錄號碼爲98113。質體pAMG22-His則在1996年7月24日寄存在the American Type Culture Collection, Rockville, MD，其登錄號碼爲98112。要預先說明者，所述及的特殊質體和宿主細胞皆爲供闡述目的者，其他可取得的質體和宿主細胞也可以用來表現出該多肽。

本發明也提出以內源性核酸經由活體內或活體外重組事件表現出OPG以促成來自宿主染色體的OPG調制。此外本發明也涵蓋經由導入能夠導引從內源性OPG密碼區生產OPG的外源性調節序列(如啓動基因或強化因子)而進行之OPG表現。另外本發明也提出對能夠導引OPG生產的內源性調節序列之刺激方法(例如經由暴露於轉錄強化因子)。

多肽

本發明提出OPG，一種新穎的TNF受體超族成員，其具有與骨新陳代謝相關聯的活性且特別者具有抑制骨質吸除藉以增加骨密度之活性。OPG指的是具有至少一種OPG生物活性的小鼠，老鼠或人類OPG或其衍生物的胺基酸序列之多肽。老鼠，小鼠和人類OPG的胺基酸序列分別示於圖2B-2C((SEQ ID NO：121)，9A-9B((SEQ ID NO：123)，和9C-9D((SEQ ID NO：125)之中。OPG衍生物指的是有添加，缺失，插入或取代一或多個胺基酸使得所產生的多肽具有至少一種OPG生物活性之多肽。OPG生物活性包括，但不限於，涉及骨新陳代謝之活性。較佳者，該多肽係將21個胺

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（21）

基酸的胺基末端前導序列脫除掉者。

本發明所涵蓋的OPG多肽包括老鼠[1-40]，老鼠[22-180]，老鼠[22-401]，老鼠[22-401]-Fc融合物，老鼠[1-180]-Fc融合物，小鼠[1-401]，小鼠[1-180]，小鼠[22-401]，人類[1-401]，小鼠[22-180]，人類[22-401]，人類[22-180]，人類[1-180]，人類[22-180]-Fc融合物和人類met-32-401。胺基酸編號係 SEQ ID NO：121(老鼠)，SEQ ID NO：123(小鼠)和SEQ ID NO：125(人類)中所示者。另外也涵蓋多肽衍生物。其將OPG的胺基酸殘基180-401部份或全部地缺失或羧基端截頭；於殘基180-401中有一或多個胺基酸改變；OPG的富含半胱胺酸或部份或全部地缺失掉，特別是遠端(羧基端)富含半胱胺酸域之缺失；及富含半胱胺酸域，特別是遠端(羧基端)富含半胱胺酸域中有一或多個胺基酸改變。於一實施例中，OPG係將其羧基端的1至約216胺基酸缺失掉。於另一實施例中，OPG係從其成熟胺基端缺失掉1至約10胺基酸(其中該成熟胺基端係位於殘基22)且視情況，從其羧基端缺失掉1至約216胺基酸。

本發明所涵蓋的其他OPG多肽包括下列：人類[22-180]-Fc融合體，人類[22-201]-Fc融合體，人類[22-401]-Fc融合體，小鼠[22-185]-Fc融合體，小鼠[22-194]-Fc融合體。這些多肽係在哺乳動物宿主的細胞，例如CHO或293細胞中產生的。本發明所涵蓋的在原核生物宿主細胞內表現之其他OPG多肽包括下列：人類met[22-401]，Fc-人類met[22-401]融合體(Fc區係融合在全強度OPG密碼序列的胺基端，如實施例8中所

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

五、發明說明（22）

述者），人類met[22-401]-Fc融合體(Fc區係融合到全長度OPG序列），Fc-小鼠met[22-401]融合體，小鼠met[22-401]-融合體，人類met[27-401]，人類met[22-185]，人類met[22-189]，人類met[22-194]，人類met[22-194](P25A)，人類met[22-194](P26A)，人類met[27-185]，人類met[27-189]，人類met[27-194]，人類met-arg-gly-ser-(his)6[22-401]，人類met-lys[22-401]，人類met-$(lys)_3$-[22-401]，人類met[22-401]-Fc(P25A)，人類met[22-401](P25A)，人類met[22-401](P26A)，人類met[22-401](P26D)，小鼠met[22-401]，小鼠met[27-401]，小鼠met[32-401]，小鼠met[22-180]，小鼠met[22-189]，小鼠met[22-194]，小鼠met[27-189]，小鼠met[27-194]，小鼠met-lys[22-401]，小鼠HEK[22-401](A45T)，小鼠met-lys-$(his)_7$[22-401]，小鼠met-lys[22-401]-$(his)_7$和小鼠met[22-401](P33E，G36S，A45P)。要了解上述在原核生物宿主細胞內產生的OPG多肽都具有一個胺基端甲硫胺酸殘基，即使此種殘基未示出亦然。於特殊實施例子中係使用具有Ellison et al.(Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079(1982))中所示序列的人類IgG1-γ1所含227胺基酸區來產生OPG-Fc融合體。不過，也可以使用人類IgG所含Fc區的變體。

融合到人類IgGl Fc區的羧基端OPG截頭物所具生物活性之分析顯示出一活性所需的約164胺基酸之OPG部份。此區涵蓋著胺基酸22-185，較佳者爲9C-9D((SEQ ID NO：125)中者，且包括四個具有TNFR細胞外域所含富含半胱胺酸域特

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（23）

性的富含半胱胺酸域。

使用OPG與TNF受體族員所含細胞外配體結合域之間的同系性，根據TNFR-I所含細胞外域的已知結晶構造產生OPG的三次元模型(參看實施例6)。使用此模型來鑑別OPG內對生物活性具重要性之殘基。鑑別出參與維持該四個富含半胱胺酸域的構造之半胱胺酸殘基。在模型中鑑別出下列雙硫鍵：域1：cys41對cys54，cys44對cys62，tyr23和his66可用來安定此域的構造；域2：cys65對cys80，cys83對cys98，cys87對cys105；域3：cys107對cys118，cys124對cys142；域4：cys145對cy1060，cys166對cys185。此外也鑑別出密切靠近TNFβ的殘基如圖11和12A-12B中所示者。於此模型中，假設OPG係結合到對應的配體；使用TNFβ爲模型配體以刺激OPG與其配體之交互作用。根據此模型化，OPG中的下列殘基可能對配體結合具有重要性：glu34，lys43，pro66至gln91(特別者，pro66，his68，tyr69，tyr70，thr71，asp72，ser73，his76，ser77，asp78，glu79，leu81，tyr82，pro85，val86，lys88，glu90和gln91)，glu153及ser155。

這些胺基酸殘基的變更，單獨地或組合地，都可能變更OPG的生物活性。例如，特定光胱胺酸殘基的改變可能變更個別富含半胱胺酸域的構造，而對配體結合具重要性的殘基之變化可能影響OPG與配體的物理交互作用。構造模型可能幫助鑑定出具有更良好性質的類似物，例如具有增強的生物活性，更大的安定性，或更大的調配容易性者。

本發明也提出，由OPG單體構成的OPG多體物。OPG似乎

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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（24）

是以多體物來作用者(例如，二體物，三體物或更高數目的單體物者)。較佳者，該OPG多體物爲二體物或三體物。OPG多體物可包括具有足以促進多體物形成的OPG胺基酸序列之單體或可包括具有異系序列例如抗體Fc區之單體。OPG羧基端缺失之分析可推得在區186-401中至少有一部份參與OPG多肽的締合。將OPG胺基酸186-401區的部份或全部以能夠自締合的胺基酸序列予以取代也是涵蓋在本發明之內者。另外，OPG多肽或其衍生物可經修飾以形成二體物或多體物，如經由部位導引突變形成以造成未配對半胱胺酸殘基供鏈間雙硫鍵形成所用，經由光化學交聯，例如曝光到紫外光，或經由用雙官能性聯結子分子如雙官能聚乙二醇和類似者進行化學交聯。

本發明也涵蓋OPG多肽的修飾且其包括後-轉譯修飾(如，N-鍵聯或O-鍵聯的醣鏈，N-端或C-端的修飾處理)，將化學部份體連接到胺基酸主鏈，N-鍵聯或O-鍵聯醣鏈的化學修飾，及因原核生物宿主細胞表現的結果所致N-端甲硫胺酸殘基之添加。該多肽也可以用可偵檢標記予以修飾，例如用酵素性，螢光性，同位素或親和性標記修飾以供蛋白質偵檢和分離之用。

其他的OPG修飾包括OPG融合到異系胺基酸序列所形成的嵌合型蛋白質。該異系序列可爲能促使所得融合蛋白質保留住OPG活性之任何序列。該等異系序列包括例如，免疫球蛋白融合體，例如Fc融合體，有助於蛋白質的純化。較佳者爲能促進OPG單體締合形成二體物，三體物和其他更高的

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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（25）

多體物形式之異系序列。

本發明多肽係從表現出OPG的組織，細胞系和轉形宿主細胞中所含的其他多肽中分離純化出，或從含有分泌蛋白質的細胞培養物中所含成份純化出。於一實施例中，該多肽未與其他人類蛋白質，例如細菌宿主細胞的表現產物締合。

本發明也提出經化學修飾的OPG衍生物，彼等可提供附加的優點例如增加多肽的安定性和循環時間，或減低免疫遺傳性(參看美國專利第4,179,337號)。衍化所用化學部份體可選自水溶性聚合物例如聚乙二醇，乙二醇/丙二醇共聚物，羧甲基纖維素，葡聚糖，聚乙烯醇和類似者。該多肽可在分子內的隨機位置，或在分子內的預定位置修飾且可包括一，二，三或更多個接著的化學部份體。

該聚合物可爲具有任何分子量者，且可爲分支或未分枝者。對於聚乙二醇而言，較佳的分子量爲介於約1kDa和約100kDa之間("約"一詞表示在聚乙二醇的製備中，某些分子可能比所述分子量較重或較輕)以使處理和製造較爲容易。依所欲治療剖型而定，可以使用其他的大小(如根據所欲持續放的持續期，若有時，對生物活性的影響，處理的容易性，抗原性的程度或缺乏及聚乙二醇對治療性蛋白質或類似物的其他已知影響)。

聚乙二醇分子(或其他化學部份體)必須在考慮到對蛋白質官能域或抗原域的影響之下接著到蛋白質上。有許多接著方法可供諳於此技者所用，如EP 0 401 384中所述者，其併於本文作爲參考(將PEG偶合到G-CSF)，也參看Malik et al.,

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（26）

Exp. Hematol. 20：1028-1035(1992)(其中報導使用tresyl chloride進行CM-CSF的聚乙二醇化)。例如，可經由反應性基，如自由胺基或羧基透過胺基酸殘基共價地結合的聚乙二醇。反應性基的可讓活化聚乙二醇分子結合者。具有自由胺基的安基酸殘基可包括離胺酸殘基和N-端胺基酸殘基；而具有自由羧基者可包括天冬胺酸殘基，穀胺酸殘基和C-端胺基酸殘基。氫硫基也可以作爲接著聚乙二醇分子所用的反應性基。對於治療目的較佳者爲在胺基上的接著，例如在N-端或離胺酸胺基上的接著。

此外，可能有特別需要經N-端化學修飾的蛋白質。使用聚乙二醇作爲本發明組合物的闡示例子時，可以選用各種聚乙二醇分子(以分子量，分枝，等來分)，反應混合物中聚乙二醇分子對蛋白質(或肽)分子的比例，要進行的聚乙二醇化反應之類別，及得到所選N-端聚乙二醇化蛋白質之方法。取得N-端聚乙二醇化製備物的方法(亦即，必要時將此部份體從其他單聚乙二醇化部份體分離出)可爲從一族聚乙二醇化蛋白質分子純化出N-端聚乙二醇化物質。選擇性N-端化學修飾可經由還原性烷基化來完成，其係利用在特別蛋白質中可用來衍化的不同類別第一胺基(離胺酸相對於N-端)所具之差別反應性。在恰當反應條件下，可以達到用含羰基聚合物在N-端進行之實質選擇性蛋白質衍化。

合成OPG二體物可以經由各種化學交聯程序來製備成。OPG單體可以經由可保留或增強OPG生物活性之任何方式予以化學聯結。有各種化學交聯劑可以依所欲蛋白質二體物的

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（27）

性質而選用。例如，交聯劑可爲短且相當剛性者或爲較長而更柔韌性者，可爲生物可逆者，及可提供減低的免疫遺傳性或較長的藥物動力學半生期者。

於一實施例中，OPG分子係經由胺基端以兩步驟合成而鍵結在一起(參看實施例12)。於第一步驟中，OPG係經在胺基端化學改質以導入經保護的硫醇，其在純化後予以去保護並用爲一接著點供透過各種交聯劑與一第二OPG分子進行部位-特定性拼合所用。胺基端交聯包括，但不限於，雙硫鍵，使用短鏈，雙官能性脂族交聯劑的硫醚鍵聯，及對各種長度，雙官能聚乙二醇交聯劑的硫醚鍵聯(蛋白質"啞鈴")。此外，OPG二體物的PEG啞鈴合成也涵蓋彼等合成的副產物，稱爲"單鈴"(monobell)者。OPG單鈴包括偶合到一線型雙官能PEG的單體而具有一自由聚合物端者。另外，OPG也可以直接透過各種胺特定性同雙官能性交聯技術而交聯，其包括使用藥劑例如：二伸乙基三胺五乙酸二酐(DTPA)，對-苯幷輥(pBQ)或辛二酸二(磺酸基丁二醯亞胺)鹽(BS^3)以及技藝中熟知的其他藥劑。也可以直接用藥劑例如亞胺基硫烷(iminothiolane)在各種雙官能，硫醇特定性交聯劑，例如PEG雙順丁烯二醯亞胺存在中將OPG硫醇化並在一步驟方法中達到二體化及/或啞鈴。

另外也包括從天然來源及從經轉染宿主細胞純化OPG之方法。該純化方法可採用一或多種標準蛋白質純化步驟以恰當順序進行而得到經純化的蛋白質。其層析術步驟可包括離子交換，膠濾，疏水性作用，逆相，層析焦聚

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（28）

(chromatofocusing)，採用抗-OPG抗體或生物素-鏈抗生物素蛋白親和性複合物的親和性層析術等。

抗體

本發明也涵蓋可特定地結合到OPG的抗體。抗體產生所用的抗原可爲全長度多肽或跨越一部份OPG序列的肽。產生對OPG具反應性的多株或單株抗體所用之免疫學程序係諳於此技者所知悉的(參看，例如，Harlow and Lane, Antibodies：A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y. (1988))。如此所產生的抗體經使用標準的酵素聯結免疫吸著檢定鑑定其結合特定性和抗原決定部位辨識作用。抗體也包括嵌合型抗體其具有衍生自不同物種的可變和固定域區。於一實施例中，該嵌合型抗體爲具有鼠類的可變域和人類固定域之人化抗體。此外也涵蓋接枝到人類架構的互補決定區(所謂的CDR-接枝抗體)。嵌合型和CDR-接枝抗體係經由諳於此技者所知悉的重組方法製成的。另外也涵蓋在小鼠體內製成的人類抗體。

本發明抗-OPG抗體可用爲親和劑以從生物樣品中純化OPG(參看實施例10)。於一方法中，係將抗體固定化在CnBr活化Sepharose上並用抗體-Sepharose拼合物管柱從液體樣品中取出OPG。抗體也可作爲診斷劑而於下述方法中用來偵檢和分量分析生物樣品中的OPG。

醫藥組合物

本發明也提出醫藥組合物其包括治療有效量的本發明多肽及醫藥可接受的稀釋劑，載劑，溶解化劑，乳化劑，防腐

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（29）

劑及/或佐劑。"治療有效量"一詞意指針對指定的病況和給藥途徑可提供治療效用的量。該組合物可爲液體或冷凍乾燥形式且包括稀釋劑(Tris，乙酸鹽或磷酸鹽緩衝劑)其可具各種pH值和離子強度；溶解化劑例如Tween或Polysorbate；載劑例如人類血清白蛋白或明膠；防腐劑例如硫柳汞或苄醇；及抗氧化劑例如抗壞血酸或偏亞硫酸氫鈉。此外也涵蓋包括用水溶性聚合物改質過以增加溶解性或安定性的OPG之組合物。組合物也可包括將OPG摻加到脂質體，微乳液，微膠粒或囊泡中以控制時間內的輸送者。特別者，OPG組合物可包括摻加到聚合物基質例如水凝膠，矽酮，聚乙烯，乙烯-乙酸乙烯酯共聚物，或生物可分解的聚合物之內者。水凝膠的例子包括聚甲基丙烯酸羥烷基酯(p-HEMA)，聚丙烯醯胺，聚甲基丙烯醯胺，聚乙烯基吡咯啶酮，聚乙烯醇和各種聚電解質複合物。生物可分解性聚合物的例子包括聚乳酸(PLA)，聚乙醇酸(PGA)，PLA和PGA共聚物，聚醯胺和聚醯胺/聚酯共聚物。其他控制釋放方劑包括微膠囊劑，微球粒，巨分子複合物和可經由注射給藥的聚合物珠粒。

特定組合物的選擇決定於許多因素，包括正治療的病況，給藥途徑和所欲藥物動力學參數。適合於醫藥組合物的成份之更詳盡縱覽載於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, A. R. Gennaro, ed. Mack, Easton, PA (1980)。

本發明組合物可經由注射給藥，如皮下，靜脈內或肌肉內，或經由口服，鼻，肺或直腸給藥。最後給藥途徑係依許多因素而選定且可由諳於此技者予以確定。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 30）

本發明也提出醫藥組合物，其包括治療有效量的本發明核酸加上醫藥可接受的佐劑。核酸組合物適合用來將部份或全部的OPG編碼區輸送給細胞和組織作爲反意或基因治療法的一部份。

治療方法

骨組織係提供對身體的支持且其包括礦物質(大部份爲鈣和磷)，膠蛋白性和非膠蛋白性蛋白質基質，及細胞。骨中有三類細胞，亦即骨母細胞，成骨細胞和蝕骨細胞，參與骨連續形成和吸除的動態程序中。成骨細胞可促進骨組織的形成而蝕骨細胞則與吸除作用有關。吸除，或骨基質和礦物質的溶解，相對於骨形成爲一快速且有效率的程序且可從骨釋出大量的礦物質。蝕骨細胞係參與骨骼組織正常再塑的調節及參與激素所誘導的吸除作用。例如，對應於細胞外液鈣離子濃度減低而分泌的副甲狀腺激素即可能刺激吸除作用。相反地，吸除作用的抑制爲降血鈣素的主要功能。此外，維生素D的代謝物會變更骨對副甲狀腺激素和降血鈣素的回應性。

於骨骼成熟後，骨骼中的骨含量即反映出骨形成和骨吸除的平衡(或不平衡)。尖峯骨質量係發生於骨骼成熟後四十歲之前。於四十歲與五十歲之間，平衡會偏移而由骨吸除作用主導。骨質量隨年齡增加的不可避免減少在女性會比男性起始得較早且在某些女性停經後更明顯加速(主要爲高加索系和亞洲系者)。

貧骨症爲概括地有關任何種骨質減少到低於正常水平之病

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（31）

況。彼等病況可能起源於骨合成速率的減低或骨破壞速率的增加或兩者。最普遍的貧骨症形式爲原發性骨稀鬆症，也稱爲斷經後和老年骨稀鬆症。此種形式的骨稀鬆症爲全面性骨質隨年齡損失之結果且通常爲在正常骨形成速率之下骨吸除作用增加之結果。在美國全部白人女性中約有25至30%發展出系統性骨稀鬆症。在45歲和更老的女人中，骨稀鬆症與髖，股，頸和粗隆間骨折之間存在著直接相關性。老男人係在50至70歲之間發展出系統性骨稀鬆症，不過此症主要影響到女性。

斷經後和老年骨稀鬆症的肇因尚未得知。有幾項因素係經鑑定可能促成該病況者。其中包括激素水平隨年齡的變更及因小腸對鈣和其他礦物質的吸少減少所致鈣消耗不足。其治療通常包括激素治療或食物補充以期延緩該程序。不過，到目前爲止，尚未存在對骨損失的有效治療法。

本發明提出一種使用治療有效量的OPG治療骨病的方法。骨病可爲具有淨骨質損失特徵之任何病(貧骨症或骨質溶解)。一般而言，在有需要壓抑骨吸除速率時即預期用OPG治療。依此，該治療可用來在吸除速率高於正常值時減低骨吸除速率或將骨吸除減少到低於正常水平以彌補低於正常水平的骨形成。

OPG可治療的病況包括下列：

骨稀鬆症，例如原發性骨稀鬆症，內分泌骨稀鬆症(甲狀腺官能過旺症，副甲狀腺官能過旺症，克興氏徵候群，和肢端肥大病)，遺傳性和先性形式的骨稀鬆症(成骨不全，

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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（32）

同胱胺酸尿症，Menkes'徵候群，和Riley-Day徵候群）及因肢固定所致骨稀鬆症。

相哲德氏骨病（變形性骨炎），成人和年青人。

骨髓炎，或骨中感染性傷害導致骨損失。

固體腫瘤（胸，肺和腎）和血液學惡症（多發性骨髓瘤，淋巴瘤和白血病）所致高鈣血症，自發性高鈣血症，及與甲狀腺官能過旺症和腎官功相關聯的高鈣血症。

貧骨症，於手術後者，類固醇服用所誘導者，及與小腸和大腸疾病與慢性肝病和腎病相關聯者。

骨壞死，或骨細胞死亡，與創傷性傷害相關聯者或與高歇氏病，鐮狀細胞性貧血，系統性紅斑狼瘡和其他病況相關聯的非創傷性壞死。

因風濕性關節炎所致骨質流失。

齒骨膜骨質流失。

溶骨性轉移。

要了解者，OPG可以單獨使用或與其他因子配合使用來治療骨病。於一實施例中，係用促骨堆積素配合治療有效量的可刺激骨形成之因子。彼等因子包括但不限於從BMP-1命名到BMP-12的骨形態發育因子，轉形生長因子-β（TGF-β）和TGF-β族成員，間白素-1抑制劑，TNFα抑制劑，副甲狀腺激素和其類似物，副甲狀腺相關性蛋白質和其類似物，E系前列腺素，雙膦酸鹽（例如alendronate和其他），及骨強化性礦物質例如氟化物和鈣。

下列的實施例係提供來更完整地闡述本發明，但不可視爲

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（33）

係要限制其範圍者。

實施例1

老鼠OPG cDNA的鑑定和分離

cDNA選殖和分析所用物質和方法皆載於Maniatis et al.,上述之中。聚合酶連鎖反應(PCR)係以Perkin-Elmer 9600熱循環器用製造商規定的PCR反應混合物(Boehringer-Mannheim)和引子濃度實施的。通常，25-50微升的反應係在94℃變性，接著20-40次的循環：94℃ 5秒鐘，50-60℃ 5秒鐘，和72℃ 3-5分鐘。接著在72℃處理反應物3-5分鐘。然後以Maniatis et al.,同上中所述凝膠電泳法分析反應物。

使用得自胎d20腸的mRNA構成cDNA庫供EST分析用(Adams et al. Science 252, 1651-1656(1991))。切出老鼠的胚胎，取出整個多育中的小腸和大腸並在PBS中洗清。經由酸性硫氰酸胍-酚-氯仿萃取純化整個細胞RNA(Chomczynski and Sacchi Anal. Biochem. 162, 156-159, (1987))。用該整個RNA製備物經由使用製造商的建議程序吸附到Dynabeads Oligo (dT)25 (Dynal Corp)及從其洗提出而得聚(A+) mRNA部份。使用Superscript Plasmid System (Gibco BRL, Gaithersburg, Md)製備經無規引導的cDNA庫。使用含有內Not I限制部位的無規cDNA引子來起始第一股的合成且其具有下示序列：

5'-AAAGGAAGGAAAAAAGCGGCCGCTACANNNNNNNNT-3'　　(SEQ ID NO：1)
　　Not I

對於第一股合成要組合三個分開的反應，其中含有2.5微

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（34）

克的poly(A) RNA和120毫微克，360毫微克或1,080毫微克的無規引子。於第二股合成之後，用酚：氯仿：異戊醇(25：24：1比例)混合物分別萃取該等反應產物且接著予以乙醇沈澱。將三個反應的雙股(ds) cDNA產物合併並連接到下列ds寡核苷酸轉接子(adapter)：

5'-TCGACCCACGCGTCCG-3'　　(SEQ ID NO：2)

3'-GGGTGCGCAGGCp-5'　　(SEQ ID NO：3)

連接後，用Not I將cDNA消化到完全，再用酚：氯仿：異戊醇(25：24：1)萃取及乙醇沈澱。然後將再懸浮的cDNA用裝設著Superscript Plasmid System (Gibco BRL, Gaithersburg, Md)的預製管柱依製造商所建議者進行凝膠過濾予以尺寸分級。將含有最大cDNA產物的兩洗提份合併，乙醇沈澱再導引地連接到經Not I和Sal I消化過的pMOB媒體DNA(Strathmann et al, 1991)。連接好的cDNA即經由electroporation導到勝任的ElectroMAX DH10B大腸桿菌中(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)。對於自動序列分析，係將約10,000轉形體置於裝著氨苄黴素補充LB營養培養基的20公分×20分分瓊脂板上平板培養。將產生的菌落挑起並列佈在裝著200毫升L-肉湯，7.5%甘油，和50微克/毫升氨苄黴素的96洞微滴板上。將培養物置於37℃下生長整個晚上，使用無菌96栓複製工具製成重複的微滴板組，然後將兩組都貯存在-80℃供後續分析所用。對於全長度cDNA選殖，係將約一百萬轉形體置於各含約10,000菌落的96細菌氨苄黴素板上進行平板培養。將各池的質體DNA用Qiagen

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝　訂　線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（35）

Plasmid Maxi Kit (Qiagen Corp., Germany)分別地離析出來並佈列在96洞微滴板中供PCR分析所用。

要定序無規胎老鼠腸cDNA株時，係將甘油儲料解凍，並取小液份以1：25稀釋到蒸餾水中。於含有下列寡核苷酸的PCR反應混合物(Boehringer-Mannheim)中加入約3.0微升的稀細菌培養液：

5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'　　(SEQ ID NO：4)

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'　　(SEQ ID NO：5)

將反應物置於熱循環器(Perkin-Elmer 9600)中用下列循環條件下培育：94℃ 2分鐘；30個循環的：94℃ 5秒鐘，50℃ 5秒鐘，和72℃ 3分鐘；接著72℃ 4分鐘。在熱循環器中培育之後，用2.0毫升水稀釋反應物。擴增後的DNA片段再用Centricon管柱(Princeton Separations)以製造商建議的程序進一步純化。將PCR反應產物置於Applied Biosystems 373A自動DNA定序儀上用T3引子(寡核苷酸353-23；5'-CAATTAACCCTCACTAAAGG-3')(SEQ ID NO：6) Taq染料-終止區反應(Applied Biosystems)遵照製造商的建議程序進行序列分析。

從無規挑取cDNA株得到之5'核苷酸序列經轉譯後，與既有的已知蛋白質序列數據庫以修改過的FASTA程式版本進行比對(Pearson et al. Meth. Enzymol. 183, (1990))。此外也對轉譯序列分析其是否含有在所有已知的腫瘤壞死因子受體(TNFR)超族成員中都發現過的特定富含半胱胺酸蛋白質樣式(Smith et al. Cell 76, 959-962 (1994))，其中使用經

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝　訂　線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（36）

Luethy et al.修改過(Protein Science 3, 139-146 (1994))的Gribskov et al.之序列部面法(sequence profile method)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4355-4359 (1987))。

使用FASTA和剖面搜尋數據時，鑑別出一EST，FRI-1(胎老鼠腸-1)爲可能的新TNFR超族成員。FRI-1含有約600 bp插入體及約150胺基酸的LORF。數據庫中的最接近匹配爲人類第II型TNFR(TNFR-2)。比對過的區段顯示在TNFR-2和FRI-1之間於此150胺基酸LORF有~43%同系性。使用TNFR超族的第一和第二兩富含半胱胺酸重複域進行剖面分析得到~8的Z分，顯示該FRI-1基因可能編碼一新的族員。爲了推導出FRI-1產物的構造，乃篩選胎老鼠腸cDNA庫以期得到全長度株。下面的寡核苷酸係衍生自原始的FRI-1序列：

5'-GCATTATGACCCAGAAACCGGAC-3' (SEQ ID NO：7)

5'-AGGTAGCGCCCTTCCTCACATTC-3 (SEQ ID NO：8)

用這些引子於PCR反應中以篩選96池的質體DNA，各池含有來自10,000獨立cDNA株的質體DNA。將約1微克的質體池DNA置於PCR反應混合物(Boehringer-Mannheim)中用Perkin-Elmer 96洞熱循環器以下面的循環條件予以擴增：94℃ 2分鐘，1循環；94℃ 15秒，然後65℃ 45秒，30個循環；65℃ 7分鐘，1循環。之後以凝膠電泳分析PCR反應產物。96質體DNA池中有13池產生具有預期相對分子量的擴增DNA產物。

使用來自一陽性池的DNA依上述來轉形勝任的ElectroMAX DH10B大腸桿菌(Gibco BRL, Gaithersburg,

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（37）

MD)。將約40,000轉形體接種在無菌硝基纖維素濾紙(BA-85, Schleicher and Schuell)上，然後用上面所得PCR產物的^{32}p-dCTP標記物進行菌落雜合篩選。濾紙在5X SSC，50%去離子甲醯安，5X Denhardt's溶液。0.5% SDS，和100微克/毫升變性鮭魚精子DNA之中在42℃預雜合2-4小時。然後將濾紙置於5X SSC，50%去離子甲醯安，2X Denhardt's溶液，0.1% SDS，100微克/毫升變性鮭魚精子DNA，和~5毫微克/毫升標記探測核酸之中在42℃下雜合~18小時。之後將濾紙在2X SSC中室溫下洗10分鐘，1X SSC中55℃下洗10分鐘，及最後在0.5X SSC中55℃下洗10-15分鐘。於放射攝影後偵檢雜合菌落，然後再接種在硝基纖維素濾紙上進行二次篩選。在二次篩選下，分離出質體株(pB1.1)，再於含有100微克/毫升氨苄黴素的L-肉湯培養基中擴增而得到質體DNA。將該2.4 kb pB1.1插入體的兩股予以定序。

用該pB1.1插入體序列進行公開數據庫的FASTA插尋以偵測任何既有的序列匹配及/或類似性。未發現到對任何已知基因或EST's的匹配，雖則對人類和小鼠TNFR-2基因有45%的相似性。在核苷酸序列的bp 124處發現一甲硫胺酸起始密碼，接著爲編碼401胺基酸殘基的LORF，其在bp 1327處終止。該401胺基酸殘基產物經預測在其N-端具有一由約31殘基構成的疏水性信號肽，和4個潛在的N-鍵聯糖基化部位。使用PepPlot程式(Wisconsin GCG套裝軟體，8.1版)未鑑定出疏水性透膜跨越序列。然後用該推得之401胺基酸序列來插尋蛋白質數據庫。再度地，沒有既存的匹配，不過對

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（38）

TNFR超族的許多成員，最顯著的是人類和小鼠TNFR-2似乎有強相似性。用Pileup程式製備此新穎蛋白質與已知TNFR-超族成員的序列比對排列後，用PrettyPlot (Wisconsin GCG套裝軟體，8.1版)修改。此排列顯示全長度FRI-1基因產物與所有其他TNFR族員之間有清楚的同系性。該等同系區的圖位係在TNFR族員的細胞外域，且對應於這些蛋白質所具配體結合域中所發現的四個富含半胱胺酸重複體中之三個。此結果可推測該FRI-1基因編碼-新穎的TNFR族員。由於沒有偵檢到透膜展區，因此我們預測其可能爲一分泌受體，類似於TNFR-1衍生的可溶性受體(Kohno et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8331-8335 (1990))。由於該FRI-1基因所具的明顯生物活性(見下文)，將該產物稱爲促骨堆積素(OPG)。

實施例2

組織中的OPG mRNA表現圖式

用^{32}P-dCTP標記的FRI-1 PCR產物作爲探測核酸進行複式人類組織北方氏吸漬(Clonetech)以偵檢人類轉錄體的尺寸及測定表現圖式。北方氏吸漬係在5X SSPE，50%甲醯胺，5X Denhardt's溶液，0.5% SDS，和100微克/毫升變性鮭魚精子DNA之中於42℃預雜合2-4小時。然後在5X SSPE，50%甲醯胺，2X Denhardt's溶液,0.1% SDS，100微克/毫升變性鮭魚精子DNA，和5毫微克/毫升經標記探測核酸中於42℃下進行吸漬雜合18-24小時。之後將該吸漬體在2X SSC中於室溫下洗10分鐘，在1X SSC中於50℃下洗10分鐘，然後在0.5X

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（39）

SSC中洗10-15分鐘。

使用衍生自老鼠基因的探測核酸，於幾種組織，包括腎，肝，胎盤和心，之中偵檢到具有約2.4 kb的相對分子量之主要mRNA物種。在腎中偵檢到最高水平。在骨骼肌和脾中偵檢到約4.5和7.5 kb的大mRNA物種。於人胎組織中，腎經發現可表現相當高水平的2.4 kb mRNA。使用人類探測核酸時(參看下文)。於相同的這些組織中只偵檢到2.4 kb轉錄本。此外也在淋巴節，胸腺，脾和闌尾中偵檢到相當高水平的2.4 kb轉錄體。用老鼠和人類兩種促骨堆積素基因偵檢到的轉錄體尺寸都幾乎與老鼠pB1.1 FRI-1插入體的長度相同，因此可推測其爲一全長度cDNA株。

實施例3

OPG在導入外來基因的小鼠體內之系統性輸送

使用老鼠OPG株pB1.1作爲PCR的模版以擴增密碼區再分殖到ApoE-肝特定性表現媒體之中(Simonet et al. J. Clin. Invest. 94, 1310-1319(1994)，和PCT申請第US94/11675和共同擁有的美國申請序號08/221,767)。下面的5'和3'寡核苷酸引子分別用於PCR擴增之中：

5'-GACTAGTCCCACAATGAACAAGTGGCTGTG-3' (SEQ ID NO：9)

5'-ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATGAAACAGCCCAGTGACCATTC-3' (SEQ ID NO：10)

將PCR反應混合物(Boehringer-Mannheim)依下述處理之：94℃ 1分鐘，1循環；94℃ 20秒，62℃ 30秒,和74℃ 1分鐘，25個循環。擴增之後，以Qiagen PCR管柱純化樣品並

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（40）

用Spe I和Not I限制酶消化整個晚上。將消化過的產物萃取，沈澱再分殖到ApoE啓動基因表現媒體中。於微注射所得株，HE-OPG，之前，先將其定序以確定其不含突變。

將HE-OPG質體係經兩次CsCl密度梯度離心予以純化。將純化過的質體DNA用XhoI和Ase I消化並將3.6 kb導入外來基因插入體以凝膠電泳予以純化。將純化過的片段稀釋在5 mM Tris，pH 7.4，0.2 mM EDTA中成爲1微克/毫升的儲存注射液。基本上依(Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4338 (1985))。中所述注射取自BDF1×BDF1-育種小鼠的單細胞胚胎，不過，注射針在使用前係經切成斜角且經矽酮處理過。將胚胎置於CO_2保溫箱中培養過夜後，將15至20個2-細胞胚胎轉移到假孕的CD1雌小鼠之輸卵管內。

在足孕之後，從微注射胚胎移植得到49子小鼠。對該子鼠以PCR擴增整合到基因DNA樣品中的外來基因進行篩選。擴增反應的標的區爲包含在表現媒體中的人類Apo E介入子(intron)所含369 pb區。該PCR 擴增所用的寡核苷酸爲：

5'- GCC TCT AGA AAG AGC TGG GAC-3' (SEQ ID NO：11)

5'- CGC CGT GTT CCA TTT ATG AGC-3' (SEQ ID NO：12)

PCR的條件爲：94℃ 2分鐘，一循環；94℃ 1分鐘，63℃ 20秒，和72℃ 30秒，30個循環。於49個原子代中，有9個經鑑定爲PCR陽性導入外來基因建立者(founders)。

在8-10週年齡時，取5隻導入外來基因建立者(2，11，16，17和28)和5隻對照者(1，12，15，18和30)予以犧牲供驗屍和病理學分析所用。從剩餘的4隻建立者以部份肝切除術

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（41）

分離出肝。在進行部份肝切除術時，將小鼠麻醉並用手術取出一葉肝。從所述全部外來基因建立者；和5雙陰性對照組同窩出生者的肝分離出總細胞RNA(McDonald et al. Meth. Enzymol. 152, 219 (1987))。對這些樣品進行北方氏吸漬分析以評估外來基因表現水平。約10微克來自各動物肝的總RNA經電泳變性凝膠(Ogden et al. Meth. Enzymol 152, 61 (1987))離析後，轉移到HYBOND-N耐綸膜(Amersham)並以^{32}P dCTP-標記pB1.1插入體DNA作爲探測核酸。在50%甲醯胺，5× SSPE，0.5% SDS，5× Denhardt's溶液，100微克/毫升變性鮭魚精子NDA和2-4×10^6 cmp的標誌探測核酸/毫升雜合緩衝液中於42℃下進行雜合整個晚上。於雜合後，將吸清點置於2×SSC，0.1% SDS中於室溫下各洗5分鐘兩次，接著在0.1×SSC，0.1% SDS中於55℃下各洗5-10分鐘兩次。建立者和對照組同窩出生小鼠體內導入基因的表現係在放射自顯術後測定的。

北方氏吸漬數據顯示出導入外來基因的建立者之中有七隻表現出可偵檢水平的導入基因mRNA(動物編號2，11，16，17，22，33，和45)。陰性對照小鼠和一隻建立者(#28)未表現出與導入基因相關的mRNA。由於OPG係經預期爲分泌蛋白質，因此導入基因mRNA的過度表現應該可作爲系統性輸送基因產物水平的代表。於PCR和北方氏吸漬陽性小鼠中，動物2，17和22表現出最高水平的外來基因mRNA，且可能顯示出對宿主細胞和組織的更廣遠生物學影響。

實施例4

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（42）

OPG的生物活性

將5隻導入外來基因小鼠(動物#2，11，16，17和28)和5隻對照組同窩出生小鼠(動物#1，12，15，18和30)犧牲以供使用下述程序進行驗屍和病理學分析。在安逸死之前，先將所有動物的鑑別號碼核對過，再予稱重，麻醉和抽血。血液係以血清和全血液形式保存起來供完全血清化學和血液學檢查所用。剛好在用致死CO_2予以最終麻醉之後及大解剖之前進行放射攝影。其後，取出組織並固定在10%緩衝Zn－福馬林中供組織學檢驗所用。所收集的組織包括肝，脾，胰，胃，十二指腸，迴腸，結腸，腎，生殖器官，皮膚和乳腺，骨，腦，心，肺，胸腺，氣管，食道，甲狀腺，空腸，盲腸，直腸，腎上腺，膀胱，和骨骼肌。在固定之前，測定肝，胃，腎，腎上腺，髀，和胸腺的全器官重量。於固定之後，將組織處理成石蠟塊，且取得3微米切片。用甲酸溶液將骨組織脫鈣並用蘇木素和曙紅染色所有切片。此外，對某些組織也用Gomoris氏網硬蛋白和Masson's氏trichrome進行染色。另外實施酵素組織化學來測定酒石酸鹽抗拒性酸性磷酸酶(TRAP)的表現，該酵素係被蝕骨細胞所高度表現者，該細胞爲單核細胞-巨噬細胞系的多核骨吸除性細胞。此外也進行BrdU和F480單核細胞-巨噬細胞表面抗原的免疫組織化學來分別偵檢複製細胞和單核細胞-巨噬細胞系。要偵檢F480表現抗原表現時，先將經福馬林固定，石蠟包埋的4微米切片予以脫石蠟並用去離子水予以水合。將該切片用3%過氧化氫驟凝，以Protein Block

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（43）

((Lipshaw, Pittsburgh, PA)予以封阻，並在老鼠單株抗-小鼠F480 (Harlan, Indianapolis, IN)中培育。將此抗體以經生物素化兔子抗-老鼠免疫球蛋白，過氧化酶拼合鏈抗生物素蛋白(BioGenex San Ramon, CA)在DAB作爲chromagen (BioTek, Santa Barbara, CA)之下予以偵檢。

在內臟組織的大解剖和觀察之下，在導入外來基因的表現子或對照組同窩小鼠中都未發現有異常。器官重量分析顯示導入外來基因的小鼠之脾尺寸相對於對照組增加約38%。於導入外來基因的表現子體內有稍微擴大的血小板尺寸和增加的循環未染色細胞。在導入外來基因的表現子體內之血小板水平有邊際減少。此外，在導入外來基因表現子中，其血清尿酸，脲蛋，和鹼性磷酸酶水平都傾向於較爲低。該等表現子經發現具有增高的骨骼放射密度，包括長股(股骨)，椎骨，和扁平骨(骨盆骨)。表現子內的股骨之相對尺寸與對照小鼠沒有不同。

來自OPG表現子的骨染色切片所得組織學分析顯示出嚴重的骨質石化病，在股骨骨幹中的小梁骨內可看到含有來自初骨鬆質的軟骨殘留物。於股骨切片中沒有清晰明確的皮質可鑑別出來。於正常動物中，中央骨幹都填充著骨髓。椎骨切片也顯示出骨質石化性變化，暗示著OPG-誘導的骨骼變化係系統性者。殘留骨髓顯示出主要爲骨髓要素。其中含有巨核細胞。網硬蛋白染色未顯示出網硬蛋白沈積跡象。對F480-由小鼠體內單核細胞-巨噬細胞衍化的細胞所表現出的一種細胞表面抗原-進行免疫組織化學顯示出在骨髓

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（44）

空間內含有F480陽性細胞。焦點地，扁平化的F480陽性細胞可以看到係直接鄰接於小梁骨表面上。

襯著小梁骨的間葉細胞係扁平化且顯得不具活性者。根據H&E和TRAP染色，在OPG表現子的小梁骨表面上罕於發現蝕骨細胞。相反地，在生長板吸除軟骨區中可看到蝕骨細胞及/或破軟骨細胞，但其數目相對於對照組係較低者。此外，在通常具有強烈模塑活性的幹骺端之皮質表面上含有蝕骨細胞。表現子與對照組之間的主要差異在於在椎骨和股骨兩者中的小梁骨蝕骨細胞都有明顯的減少。骨蓄積程度與總肝RNA北方氏吸漬所偵檢到的OPG導入外來基因的mRNA水平有直接的相互關聯。

OPG表現子的脾具有增加量的紅髓，其擴張係因增加的造血所致。所有造血系都作用出。在對照組與OPG表現子兩者中的紅髓內都含有F480陽性細胞。兩個表現子(2號和17號)在肝中具有髓外造血竈且其可能是由骨質硬化性骨髓所致。

在胸腺，淋巴節，胃腸道，胰肝膽道，生殖系統，生殖泌尿系統，皮膚，神經系統，心和主動脈，乳房，骨骼肌與脂肪都沒有可觀察到的異常情形。

實施例5

小鼠和人類OPG cDNA的分離

利用PCR擴增從小鼠腎cDNA庫(Clontech)分離出對應於小鼠OPG mRNA 5'端的cDNA株。寡核苷酸係衍生自老鼠OPG cDNA序列且其係下面所示者：

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

五、發明說明（45）

5'-ATCAAAGGCAGGGCATACTTCCTG-3' (SEQ ID NO：13)

5'-GTTGCACTCCTGTTTCACGGTCTG-3' (SEQ ID NO：14)

5'-CAAGACACCTTGAAGGGCCTGATG-3' (SEQ ID NO：15)

5'-TAACTTTTACAGAAGAGCATCAGC-3' (SEQ ID NO：16)

5'-AGCGCGGCCGCATGAACAAGTGGCTGTGCTGCG-3' (SEQ ID NO：17)

5'-AGCTCTAGAGAAACAGCCCAGTGACCATTCC-3' (SEQ ID NO：18)

將此程序所得部份和全長度cDNA產物予以定序。將全長產物手Not I和Xba I消化後直接選殖在質體媒體pRcCMV (Invitrogen)內。所得質體稱爲pRcCMV-Mu-OPG。將選殖產物的核苷酸序列與老鼠OPG cDNA序列比對。於跨越OPG LORF的1300 bp內，老鼠和小鼠DNA序列有約88%相同率。小鼠cDNA序列含有一段401胺基酸LORF，其在與老鼠OPG蛋白質序列比對之下發現有~94%相同率且無間隙。此點顯示所分離出的小鼠cDNA序列編碼小鼠OPG蛋白質，且其序列和構造在整個進化中都高度地保存著。小鼠OPG蛋白質序列在其N-端含有一相同的推定性信號肽，且所有4個潛在的N-鍵聯糖基化部位都保存著。

使用下列老鼠-特定性寡核苷酸從人類腎cDNA庫選殖出一種部份人類OPG cDNA：

5'-GTG AAG CTG TGC AAG AAC CTG ATG-3' (SEQ ID NO：19)

5'-ATC AAA GGC AGG GCA TAC TTC CTG-3' (SEQ ID NO：20)

將該PCR產物定序並用來設計引子以用於以入中的人類

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（46）

OPG基因組株作爲模版所進行的人類cDNA 3'端之擴增中：

5'-TCCGTAAGAAACAGCCCAGTGACC-3' (SEQ ID NO：29)

5'-CAGATCCTGAAGCTGCTCAGTTTG-3' (SEQ ID NO：21)

將擴增PCR產物定序，並與5'-端序列一起用來設計可用來擴增整個人類OPG cDNA密碼序列之5'和3'人類一特定性引子：

5'-AGCGCGGCCGCGGGGACCACAATGAACAAGTTG-3' (SEQ ID NO：22)

5'-AGCTCTAGAATTGTGAGGAAACAGCTCAATGGC-3' (SEQ ID NO：23)

將該全長度人類PCR產物定序後，用Not I和Xba I直接選殖到質體媒體pRcCMV(Invitrogen)內。所得質體稱爲pRcCMV-人類-OPG。將選殖產物的核苷酸序列與老鼠和小鼠的OPG cDNA序列比對。於跨越OPG LORF的1300 bp區內，老鼠和小鼠DNA序列與人類OPG cDNA約有78-88%的相同率。該人類OPG cDNA序列也含有一401胺基酸LORF，將其與老鼠與小鼠蛋白質序列比對。預測的人類OPG蛋白質相對於老鼠和小鼠蛋白質分別有約85%相同率，和~90%相同率。老鼠，小鼠和人類蛋白質的序列排列比對顯示出彼等在進化中有高度的保守。人類蛋白質經預測具有一N-端信號肽，和5個潛在的N-鍵聯糖基化部位，其中4個係在老鼠和小鼠OPG蛋白質之間保存住者。

小鼠OPG的DNA與預測的胺基酸序列示於圖9A和9B中((SEQ ID NO：122)。人類OPG的DNA與經預測的胺基酸序列示於圖9C和9D中(SEQ ID NO：124)。老鼠，小鼠和人類OPG胺基酸序列的比較示於圖9E和9F中。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（47）

其他人類OPG cDNA株的分離揭露出在圖9C中所示的DNA序列之位置103處有一G至C的改變。此核苷酸改變導致圖9C所示胺基酸序列的位置3處發生天冬胺醯胺取代離胺酸之結果。具有這種改變的各株中所含其餘序列都與圖9C和9D中所示者相同。

實施例6

OPG三次元構造的塑造

OPG的胺基端部份與TNFR超族的所有已知成員所具細胞外部份具有同系性(圖1C)。在TNFR-相關基因的此區內之最顯著圖式爲一段折疊成突出構造的~40胺基酸，富含半胱胺酸重複序列(Banner et al. Cell 73, 431-445(1993))。此圖式通常顯示成四個(3-6範圍)縱排重複(參看圖1C)，且係已知涉及配體結合之中者(Beutler and van Huffel Science 264, 667-663(1994))。每一重複體通常含有6個間隔的半胱胺酸殘基，彼等涉及三個域間雙硫鍵之形成，該等雙硫鍵稱爲SS1，SS2，和SS3(Banner et al., 同上)。於某些受體中，例如TNFR2，CD30和CD40，有某些重複域只含有兩個鏈間雙硫鍵(SS1和SS3)。

將人類OPG蛋白質序列經由使用Luethy, et al., 同上所述方法與TNFR1細胞外域外型比對，並用Wisconsin Package, version 8.1(Genetics Computer Group, Madison, WI)的Pretty Polt程式以圖形顯示出結果(圖10)。該排列比對顯示出明確保存著參與域1-4的形成中之半胱胺酸殘基。然後用此排列，使用已知的p55 TNFR1細胞外域3-D構造(Banner et al.,

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（48）

同上）作爲模版來構成人類OPG N-端域的三次元(3-D)模型。要做到此點時，要從TNFR1晶體構造座標複製出肽主鏈和相同殘基側鏈的原子座標。其後，使用LOOK程式(Molecular Applications Group, Palo Alto, CA)產生插入體和不同側鏈的其餘座標。之後用LOOK減低其構形能量到最少而予以精製。

以類似其他TNFR族員的方式，也假設OPG係結合到一配體。爲了塑造OPG與其配體的交互作用，使用TNF-β的晶體構造來模擬"OPG配體"的3-D模型。用Molscript(Kraulis, J. Appl. Cryst. 24, 946-950, 1991)將此數據以圖形顯示(圖11)。構成具有3 TNFβ和3 OPG分子的OPG/配體複合物模型，其中OPG的相對位置與TNFR1在晶體構造中的位置相同。然後使用下述作法來找出可能與其配體交互作用的OPG殘基：計算出複合物中所含全部殘基的溶劑可接近部位及一個單一的OPG模型。在複合物中具有不同於在單體中的可親性之殘基可能與配體交互作用。

使用此構形將人類和小鼠OPG胺基酸序列再排列比對以突顯出包括每一富含半胱胺酸域1-4的序列(圖12A和12B)。每一域具有可以預測的個別構造特性：

域1

含有參與在SS2(C41對C54)和SS3(C44對C62)雙鍵中的4個半胱胺酸。雖然根據雙硫橋聯明顯沒有SS1鍵，但其在位置28的守恆酪胺酸相對於TNFR1中的Y20係同系者，其係已知參與與H66的交互作用而有助於域形成者。OPG具有在位置

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（49）

75的同系組胺酸，可推測OPG Y28與H75在原蛋白質中係堆積在一起的，如同系殘基在TNFR1中一般者。所以，這兩殘基可能確實對生物活性具有重要性，且截頭到且超過Y28的N-端OPG可能具有變更的活性。此外，根據本發明的3次元模型，殘基E34和K43係經預測會與結合配體交互作用的。

域2

含有6個半胱胺酸且經預測含有SS1(65對C80)，SS2(C83對C98)和SS3(C87對C105)雙硫鍵。此OPG區也包含一從P66延展到Q91的區，其與可和TNFβ形成密切接觸的TNFR1域2部份相對正(參看上文)，且其可與OPG配體交互作用。特別者，殘基P66，H68，Y69，Y70，T71，D72，S73，H75，T76，S77，D78，E79，L81，Y82，P85，V86，K88，E89，L90，及Q91，皆根據我們的構造數據經預測會與結合配體發生作用。

域3

含有4個參與SS1(C107對C118)和SS3(C124對C142)雙硫鍵的半胱胺酸，但未參與SS2鍵。根據我們的構造數據，殘基E115，L118和K119皆經預測會與OPG配體交互作用。

域4

含有4個參與SS1(C145對C160)和SS3(C166對C185)雙硫鍵，但類似於域3者，不涉及SS2鍵之4個半胱胺酸。我們的構造數據預測E153和S155會與OPG配體交互作用。

因此，預測的OPG構造模型可鑑別出許多高度守恆且可能對其生物活性具重要性之殘基。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（50）

實施例7

在哺乳動物細胞中產生重組分必OPG蛋白質

爲測定OPG是否確定爲分泌蛋白質，乃將小鼠OPG cDNA作爲標記融合到人類IgGl Fc域(Capon et al. Nature 337, 525-531 (1989))，並在人類293纖維母細胞中表現。Fc融合係用媒體pFc-A3進行的。pFc-A3含有編碼人類免疫球蛋白IgG-γ1重鏈所含Fc部份(Ellison et al. 同上)從鉸鏈域或第一胺基酸(Glu-99)到羧基端的區域且側接著5'-Not I融合部位和3'-Sal I和Xba I部位。經由人類脾cDNA庫(Clontech)的PCR擴增構成質體。PCR反應係以100微升的最後體積進行且含有2單位的Vent DNA聚合酶(New England Biolabs)於20 mM Tris-HCl (pH 8.8)，10 mM KCl，10 μM$(NH_4)2SO_4$，2 mM $MgSO_4$，0.1% Triton X-100，各爲400 μM的dNTP和1毫微克要擴增的cDNA庫與各爲1 μM的引子。反應係經由在95℃ 2分鐘起始，接著30個循環的95℃ 30秒，55℃ 30秒和73℃ 2分鐘。其5'-引子

5' ATAGCGGCCGCTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC 3' (SEQ IN NO：24)

中含有緊接IgG-γ1鉸鏈域第一個殘基(Glu-99)5'端的Not I部位。其3'引子

5' TCTAGAGTCGACTTATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTT-3' (SEQ IN NO：25)

中含有Sal I和XbaI部位。用Not I和Sal I消化該717-bp PCR產物，用1%瓊脂糖(FMC Corp.)電泳分離，以Geneclean程

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（51）

序(BIO 101, Inc.)純化再選殖到經Not I，Sal I-消化過的pBluescript II KS媒體內(Stratagene)。將所得質體內pFc-A3，的插入體，定序而確定PCR反應的傳眞度。

用下列兩組引子配對擴增經選殖在質體pRcCMV-MuOPG內的小鼠cDNA：

配對1

5'-CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGACCACAATGAACAAG-3' (SEQ ID NO：26)

5'-CCTCTGCGGCCGCTAAGCAGCTTATTTTCACGGATTGAACCTG-3' (SEQ ID NO：27)

配對2

5'-CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGACCACAATGAACAAG-3' (SEQ ID NO：28)

5'-CCTCTGCGGCCGCTGTTGCATTTCCTTTCTG-3' (SEQ ID NO：30)

第一配對擴增整個OPG LORF，並造成一Not I限制部位，其與Fc融合媒體pFcA3中的架構內Not I部位相容。pFcA3係經由將Not I限制部份處理到人類IgG1 Fc cDNA所含天冬胺酸殘基216的5'端而製備成的。此構造導入一聯結子其編碼兩個跨越OPG蛋白質與IgG Fc區之間的接合之無關聯胺基酸。此產物在聯結到Fc部份時，即編碼在人類IgG1 Fc區所有227胺基酸殘基後面的全部401個OPG殘基(F1.Fc)。第二引子配對擴增編碼著OPG所含涵蓋其推定配體結合域的前面180個胺基酸殘基。如上所述者，該3'引子造成一人工Not I限制部位，其可將C-端截頭OPG LORF於蘇胺酸180位置處

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（52）

直接融合到IgGl Fc或(CT. fc)。

聯結OPG殘基401與人類Fc區所含無菌酸殘基221的胺基酸序列接合可經改質如下：編碼人類Fc區所含殘基216-220的DNA可依下述予以缺失，或可將對應於人類Fc區所含C220的半光胺酸殘基予以突變或絲胺酸或丙胺酸。這些經改質媒體所編碼的OPF-Fc融合蛋白質可轉染到人類293細胞，或CHO細胞內，並依下文所述純化出重組OPG-Fc融合蛋白質。

兩種產物皆經導向地選殖到質體媒體pCEP4(Invitrogen)內。pCEP46含有Epstein-Barr病毒複製源，且能夠在293-EBNA-1細胞內進行附加體複製。母pCEP4，和pCEP4-Fl.Fc與pGEP4-CT.Fc諸媒體都經由使用製造商建議的方法脂染(lipofected)到293-EBNA-1細胞內。然後將經轉染的細胞於100微克/毫升潮黴素中進行選擇培養以選擇出供媒體表現用者，並將所得抗藥性培養物生長到會合。然後在無血清培養基內培養該細胞72小時，取出經調理的培養基並以SDS-PAGE分析之。聚丙烯醯胺凝膠的銀染色偵檢出由抗藥性293培養物所產生的主要經調理培養基蛋白質。於pCEP4-Fl.Fc和pCEP4-CT.Fc經調理培養基中，豐盛地分泌出具預定尺寸的獨特分離帶(參看圖13B和13C)。該全長度Fc融合蛋白質會蓄積到高濃度，顯示其可能具安定性。兩種Fc融合蛋白質都在西方氏吸漬上以抗-人類IgGl Fc抗體(Pierce)予以偵檢，結果顯示出彼等爲重組OPG產物。

將全長度OPG-Fc融合蛋白質以蛋白質-A管柱層析術(Pierce)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（53）

用製造商建議的程序予以純化。然後基本上依Matsudaira et al.所述(J. Biol. Chem. 262, 10-35(1987))對該蛋白質施以自動Edman降解N-端序列分析。於19個循環後讀得下列胺基酸序列：

NH2-ETLPPKYLHYDPETGHQLL-CO2H

(SEQ ID NO：31)

此序列與預測的從胺基酸殘基22開始之小鼠OPG胺基酸序列相同，可推測自然的哺乳動物前導段切斷部位係在胺基酸殘基Q21-E22，而不是原來所預測的在Y31-D32之間。用pCEP4-F1.Fc和pCEP4-CT.Fc在293-EBNA細胞中進行的表現實驗發明OPG的一種分泌蛋白質，且可系統地作用以結合其配體。

採用類似於構成和表現muOPG[22-180]-Fc和muOPG[22-400]-Fc融合體所用的程序來產生另外的小鼠和人類OPG-Fc融合蛋白質。

融合到人類IgG1的Fc區之編碼胺基酸1-185的鼠類OPG cDNA[muOPG Ct(185).Fc]係依下述而構成的。用下列引子配對於上述聚合酶連鎖反應中擴增取自質體pRcCMV Mu促骨堆積肽的鼠類OPG cDNA(實施例5中所述者)：

1333-82：

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3' (SEQ ID NO：32)

1333-80：

5'-CCT CTG CGG CCG CAC ACA CGT TGT CAT GTG TTG C-3' (SEQ ID NO：33)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（54）

此引子配對擴增的是編碼如圖9A所示OPG讀碼中的胺基酸殘基63-185(對應於bp 278-645)之鼠類OPG cDNA。其3'引子含有一個Not I限制部位，其與Fc融合媒體pFcA3的架構內Not I部位相容。其產物也跨越位於bp 436的一獨特EcoRI限制部位。將經擴增的PCR產物純化，用Not I和EcoR I切，並純化所得EcoRI-Not I限制片段。將含有鼠類1-401 OPG-Fc融合插入體的媒體pCEP4用EcoRI和Not I切，純化並連接到上面產生的PCR產物。所得以pCEP4爲基的表現媒體編碼緊接在人類IgG1 Fc區所含全部227胺基酸殘基之後的OPG殘基1-185。將鼠類OPG 1-185，Fc融合媒體轉染到293細胞中，施以藥物選擇培養，並產生調理培養基，如上文所述者。所得分泌鼠類OPG 1-185.Fc融合產物再以蛋白質-A管柱層析術(Pierce)用製造商建議的程序予以純化。

依下述構成稠合到人類IgG1所含Fc區且編碼胺基酸殘基1-194的鼠類OPG DNA(muOPG Ct(193).Fc)。用下列引子配對擴增得自質體pRcCMV Mu-促骨堆積肽的小鼠OPG cDNA：

1333-82：

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3' (SEQ ID NO：34)

1333-81：

5'-CCT CTG CGG CCG CCT TTT GCG TGG CTT CTC TGT T-3' (SEQ ID NO：35)

此引子配對擴增的是編碼OPG讀碼所含胺基酸殘基70-194(對位於bp 298-672)的鼠類OPG cDNA區。其3'引子含有一Not I限制部位，其可與Fc融合媒體pFcA3的架構內Not I部

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（55）

位相容。該產物也跨越位於bp 436處的一獨特EcoRI限制部位。經擴增的PCR產物依上文所述經選殖到鼠類OPG[1-401]Fc融合媒體內。所得以pCEP4爲基的表現媒體編碼著緊接在人類IgGl Fc區所含全部227胺基酸殘基之後的OPG殘基1-194。將該鼠類OPG 1-194.Fc融合媒體轉染到293細胞中，予以藥物選擇培養，及產生調理培養基。所得分泌融合產物以蛋白質-A管柱層析術(Pierce)用製造商建議的程序予以純化。

編碼著融合到人類IgGl所含Fc區的胺基酸1-401之人類OPG DNA係依下述構成的。用下列寡核苷酸引子擴增在質體pRcCMV-hu促骨堆積肽中的人類OPG DNA(實施例5中所述者)：

1254-90：

5' CCT CTG AGC TCA AGC TTG GTT TCC GGG GAC CAC ATT G-3' (SEQ ID NO：36)

1254-95：

5-'CCT CTG CGG CCG CTA AGC AGC TTA TTT TTA CTG AAT GG-3' (SEQ ID NO：37)

所得PCR產物編碼全長度人類OPG蛋白質且造成一Not I限制部位其可與Fc融合媒體Fc A3中的架構內Not I部位相容。將該PCR產物依上述導引地選殖到質體媒體pCEP4中。所得表現媒體編碼緊接在人類IgGl Fc區所含227胺基酸殘基之後的人類OPG殘基1-401。從經轉染及藥物選擇培養過的細胞產生調理培養基並以蛋白質-A管柱層析術(Pierce)用製造商建議的程序純化huOPG Fl.Fc融合產物。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（56）

編碼著融合到人類IgG1 Fc區的胺基酸1-201之人類OPG DNA[huOPG Ct(201).Fc]係依下述構成的。用下列寡核苷酸引子配對經由PCR擴增選殖自質體pRrCMV-hu促骨堆積肽的人類OPG cDNA：

1254-90：

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTG GTT TCC GGG GAC CAC AAT G-3' (SEQ ID NO：38)

1254-92：

5'-CCT CTG CGG CCG CCA GGG TAA CAT CTA TTC CAC-3' (SEQ ID NO：39)

此引子配對係擴增編碼OPG讀碼所含胺基酸殘基1-201的人類OPG cDNA區，且在3'端造成一Not I限制部位其可與Fc融合媒FcA3架構內Not I部位相容。此產物於聯結到Fc部份時係編碼緊接在人類IgG1 Fc區所含全部221胺基酸殘基之後的OPG殘基1-201。依上述將該PCR導引地選殖在質體媒體pCEP4內。從經轉染和藥物選擇培養過的細胞產生經調理培養基，並以蛋白質-A管柱層析術(Pierce)用製造商建議的程序純化hu OPG Ct(201).Fc融合產物。

使用下述程序構成且表現未經融合的小老鼠和人類OPG。

供全長度鼠類OPG(殘基1-401)的哺乳動物表現所用之質體係用取自pRcCMV Mu-促骨堆積肽的鼠OPG cDNA插入體經RCR擴增產生且選殖到表現媒體pDSRα中(DeClerck et . atl. J. Biol. Chem. 266, 3893 (1991))。使用下列寡核苷酸引子：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（57）

1295-26：

5'-CCG AAG CTT CCA CCA TGA ACA AGT GGC TGT GCT GC-3' (SEQ ID NO：40)

1295-27：

5'-CCT CTG TCG ACT ATT ATA AGC AGC TTA TTT TCA CGG ATT G-3' (SEQ ID NO：41)

依上述以PCR擴增鼠類OPG全長度讀碼。將PCR產物純化並用內核酸限制酶Hind III和Xba I(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)在製造商建議的條件下進行消化，然後連接到經Hind III和Xba I消化過的pDSRα。以內核酸限制酶消化偵檢出重組株後，予以定序以確定在PCR擴增步驟中沒有產生突變。

將所得質體，pDSRα-muOPG以鈣媒介轉染導到田鼠卵巢(CHO)細胞內(Wigler et al. Cell 11, 233 (1977))。根據質體媒體中的二氫葉酸還原酶(DHFR)基因的表現選擇個別的株系並分離出幾種株系。經由CHO細胞調理培養基的西方氏吸漬分析監測鼠OPG重組蛋白質的表現。選擇出高表現性細胞並依所述(DeClerck et al.,同上)用胺甲碟呤處理以進一步擴增OPG表現。接著從CHO細胞系產生調理培養基以進一步純化重組分泌鼠OPG蛋白質。

經由將pRcCMV-hu促骨堆積肽中的cDNA插入體直接分殖到媒體pDSRα中以產生供全長度人類OPG(胺基酸1-401)哺乳動物表現所用的質體(DeClerck et al., 同上)。將該pRcCMV-OPG質體用Not I消化到完全，用Klenow予以鈍端

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（58）

化，再用Xba I消化到完全。將媒體DNA用Hind III消化，用Klenow鈍端化，再用Xba I消化，之後，連接到OPG插入體。然後將重組質體定序以確定人類OPG cDNA的恰當定向。

依上述將所得質體pDSRα-muOPG導到田鼠卵巢(CHO)細胞內。根據質體媒體所含二氫葉酸還原酶(DHFR)基因的表現選擇出個別株系並分離出幾種株系。經由CHO細胞調理培養基的西方氏吸漬分析監測人類OPG重組蛋白質之表現。選擇出高表現性株系，並用胺甲碟呤處理進一步擴增OPG表現。之後用表現人類OPG的CHO細胞系產生調理培養基供蛋白質純化之用。

依下述構成編碼殘基1-185的鼠類OPG之表現媒體。用下列寡核苷酸引子從pRcCMV-Mu OPG擴增鼠類OPG cDNA：

1333-82：

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3' (SEQ ID NO：42)

1356-12：

5'-CCT CTG TCG ACT TAA CAC ACG TTG TCA TGT GTT GC-3' (SEQ ID NO：43)

此引子配對係擴增編碼著OPG讀碼中的胺基酸63-185(bp 278-645)之鼠OPG cDNA區且含有緊接在半胱胺酸密碼子(C185)後的人造停止密碼，其後接著一人造Sal I核酸內切限制酶部位。預期的產物含有可用來分殖到預存在媒體中的內Eco RI限制部位。於PCR擴增後，用Eco RI和Sal I核酸內切限制酶切所得純化產物，並以凝膠純化大片段。之後將純化產物分殖到上述pBluescript-muOPG Fl.Fc的Eco RI和Sal

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

五、發明說明（59）

I消化物之大限制片段。用Hind III和Xho I消化所得質體並以凝膠純化出小片段。接著將含有編碼1-185開放讀碼的該片段分殖到表現媒體pCEP4的Hind III和Xho I消化體內。所得媒體，pmuOPG[1-185]編碼著在位於185位置的半胱胺酸殘基終止之截頭OPG多肽。依上述從經轉染和經藥物選擇培養過的細胞產生經調理培養基。

1333-82：

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT -3' (SEQ ID NO：44)

1356-13：

5'-CCT CTG TCG ACT TAC TTT TGC GTG GCT TCT CTG TT-3' (SEQ ID NO：45)

此引子配對係擴增編碼OPG讀碼中的胺基酸70-194(bp 298-672)的鼠類OPG cDNA區且含有緊接著離胺酸密碼子(K194)後會的人造停止密碼，其後接著人造Sal I核酸內切限制部位。預期的產物含有可用來分殖到預先存在的媒體中之內Eco RI限制部位。於PCR擴增後，用Eco RI和Sal I核酸內切限制酶切所得純化產物，並以凝膠純化出大片段。之後將純化產物分殖到上述pBluescript-muOPG Fl.Fc的Eco RI和Sal I消化體之大限制片段。所得質體經Hind III和Xho I消化以凝膠純化出小片段。接著將含有編碼著殘基1-185的開放讀碼之該片段分殖到表現媒體pCEP4的Hind III和Xho I消化體中。所得媒體，pmuOPG[1-185]編碼在位置194的離胺酸終止之截頭OPG多肽。依上述用該經轉染和藥物選擇培養過的細胞產生經調理培養基。

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

五、發明說明（60 ）

在huOPG[22-401]-Fc基因的5'端產生幾種突變，其可在殘基22至32間導入OPG的胺基酸取代，或缺失。所有突變都是因"QuickChange™部位導向突變形成套劑"(Stratagene, San Diego, CA)以製造商建議的程序產生的。簡而言之，對含有huOPG[22-401]-Fc質體DNA模版和突變形成性引子的反應混合物用Pfu聚合酶在去氧核苷酸存在中處理之，然後依上述在熱循環器內擴增。其後取一液份的反應物經由熱震盪轉染到勝任的大腸桿菌XL1-Blue中，再予以平板培養。然後將轉形體的質體DNA定序以查證突變。

下列引子配對係用來將人類OPG基因的殘基22-26缺失掉，促成huOPG[22-401]-Fc融合蛋白質的產生：

1436-11：

5'-TGG ACC ACC CAG AAG TAC CTT CAT TAT GAC-3'
(SEQ ID NO：140)

1436-12：

5'-GTC ATA ATG AAG GTA CTT CTG GGT GGT CCA-3'
(SEQ ID NO：141)

下列引子配對係用來將人類OPG基因的殘基22-28缺失掉，促成huOPG[22-401]-Fc融合蛋白質之產生：

1436-17：

5'-GGA CCA CCC AGC TTC ATT ATG ACG AAG AAA C-3'
(SEQ ID NO：142)

1436-18：

5'-GTT TCT TCG TCA TAA TGA AGC TGG GTG GTC C-3'

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（61）

(SEQ ID NO：143)

下列引子配對係用來將人類OPG基因的殘基22-31缺失掉，導致huOPG[22-401]-Fc融合蛋白質之產生：

1436-27：

5'-GTG GAC CAC CCA GGA CGA AGA AAC CTC TC-3'

(SEQ ID NO：144)

1436-28：

5'-GAG AGG TTT CTT CGT CCT GGG TGG TCC AC-3'

(SEQ ID NO：145)

下列引子配對係用來將人類OPG基因的酪胺酸28密碼子改變成苯丙胺酸的，導致huOPG[22-401]-Fc Y28F融合蛋白質之產生：

1436-29：

5'-CGT TTC CTC CAA AGT TCC TTC ATT ATG AC-3'

(SEQ ID NO：146)

1436-30：

5'-GTC ATA ATG AAG GAA CTT TGG AGG AAA CG-3'

(SEQ ID NO：147)

下列引子配對係用來將人類OPG基因的脯胺酸殘基26之密碼子改變成丙胺酸的，導致huOPG[22-401]-Fc P26A融合蛋白質之產生：

1429-83：

5'-GGA AAC GTT TCC TGC AAA GTA CCT TCA TTA TG-3 (SEQ ID NO：148)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（62）

1429-84：

5'-CAT AAT GAA GGT ACT TTG CAG GAA ACG TTT CC-3' (SEQ ID NO：149)

然後將每一種所得含有恰當突變的muOPG[22-401]-Fc質體轉染到人類293細胞中，依上述從調理培養基中純化出突變株OPG-Fc融合蛋白質。用實施例11中所述活體外蝕骨細胞形成檢定評估每一蛋白質的生物學活性。

實施例8

大腸桿菌內的OPG表現

A.細胞表現媒體

pAMG21

從美國專利第4,710,473號中所述Amgen表現媒體系統衍生出Amgen表現媒體pCFM1656 (ATCC #69576)，其可再轉而衍生出表現質體pAMG21。pCFM1656質體可經由下述從所述pCFM836質體(專利第4,710,473號)衍生得：(a)用T4聚合酶進行末端填充接著鈍端連接而破壞兩個內源性Nde I限制部位；(b)將含有合成P_L啓動基因而在獨特Aat II與Cla I限制部位之間的DNA序列用從含有P_L啓動基因的pCFM636(專利第4,710,473號)所得類似片段予以取代

```
  AatII
5'    CTAATTCCGCTCTCACCTACCAAACAATGCCCCCCTGCAAAAAATAAATTCATAT-
3'TGCAGATTAAGGCGAGAGTGGATGGTTTGTTACGGGGGGACGTTTTTTATTTAAGTATA-

-AAAAAACATACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAA-
-TTTTTTGTATGTCTATTGGTAGACGCCACTATTTAATAGAGACCGCCACAACTGTATTT-

-TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT  3'   (SEQ ID NO:53)
-ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGC5'   (SEQ ID NO:54)
                        ClaI
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（63 ）

及接著(C)用下列寡核苷酸取代在獨特Cla I與Kpn I限制部位之間的小DNA序列：

```
5′ CGATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC3′ (SEQ ID NO:48)
3′   TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC    5′ (SEQ ID NO:49)
  ClaI                                                KpnI
```

其後可經由PCR重疊寡核苷酸突變形成和DNA序列取代進行一系列部位導引性鹼改變而從pCFM1656衍出出表現質體pAMG21。從緊接著質體複製啓動基因PcopB的5'端之BglII部位(質體bp # 180)起始並朝向質體複製基因進行，其中的鹼對改變如下所列：

pAMG21 bp #	pCFM1656中的bb	在pAMG21中改變成的bp
# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/C
# 509	G/C	A/T
# 617	--	插入兩G/C bp
# 679	G/C	T/A
# 980	T/A	C/G
# 994	G/C	A/T
# 1004	A/T	C/G
# 1007	C/G	T/A
# 1028	A/T	T/A
# 1047	C/G	T/A
# 1178	G/C	T/A
# 1466	G/C	T/A
# 2028	G/C	bp 缺失
# 2187	C/G	T/A
# 2480	A/T	T/A
# 2499-2502	AGTG TCAC	GTCA CAGT

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（64 ）

# 2642	TCCGAGC AGGCTCG	7 bp 缺失
# 3435	G/C	A/T
# 3446	G/C	A/T
# 3643	A/T	T/A

在獨特Aat II(pCFM1656中的位置#4364)與Sac II(在pCFM1656中的位置#4585)限制部位之間的DNA序列係用下列DNA序列予以取代：

```
[AatII sticky end]                5'     GCGTAACGTATGCATGGTCTCC-
(position #4358 in pAMG21)        3' TGCACGCATTGCATACGTACCAGAGG-

-CCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACT-
-GGTACGCTCTCATCCCTTGACGGTCCGTAGTTTATTTTGCTTTCCGAGTCAGCTTTCTGA-

-GGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGC-
-CCCGGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCACTTGCGAGAGGACTCATCCTGTTTAGGCG-

-CGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGC-
-GCCCTCGCCTAAACTTGCAACGCTTCGTTGCCGGGCCTCCCACCGCCCGTCCTGCGGGCG-

-CATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGT-
-GTATTTGACGGTCCGTAGTTTAATTCGTCTTCCGGTAGGACTGCCTACCGGAAAAACGCA-

                                                      AatII
-TTCTACAAACTCTTTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGGACGTCGTACTTAAC-
-AAGATGTTTGAGAAAACAAATAAAAAGATTTATGTAAGTTTATACCTGCAGCATGAATTG-

-TTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCCTGTTAAAATTGCTTTAGAAATACTTTGGCAGC-
-AAAATTTCATACCCGTTAGTTAACGAGGACAATTTTAACGAAATCTTTATGAAACCGTCG-

-GGTTTGTTGTATTGAGTTTCATTTGCGCATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTGCGCTTAC-
-CCAAACAACATAACTCAAAGTAAACGCGTAACCAATTTACCTTTCACTGGCACGCGAATG-

-TACAGCCTAATATTTTTGAAATATCCCAAGAGCTTTTTCCTTCGCATGCCCACGCTAAAC-
-ATGTCGGATTATAAAAACTTTATAGGGTTCTCGAAAAAGGAAGCGTACGGGTGCGATTTG-

-ATTCTTTTTCTCTTTTGGTTAAATCGTTGTTTGATTTATTATTTGCTATATTTATTTTTC-
-TAAGAAAAAGAGAAAACCAATTTAGCAACAAACTAAATAATAAACGATATAAATAAAAAG-
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

A7
B7

五、發明說明（65）

```
-GATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAATTAATGGTATGTTCATACACGCATGTAAAAATA-
-CTATTAATAGTTGATCTCTTCCTTGTTAATTACCATACAAGTATGTGCGTACATTTTTAT-

-AACTATCTATATAGTTGTCTTTCTCTGAATGTGCAAAACTAAGCATTCCGAAGCCATTAT-
-TTGATAGATATATCAACAGAAAGAGACTTACACGTTTTGATTCGTAAGGCTTCGGTAATA-

-TAGCAGTATGAATAGGGAAACTAAACCCAGTGATAAGACCTGATGATTTCGCTTCTTTAA-
-ATCGTCATACTTATCCCTTTGATTTGGGTCACTATTCTGGACTACTAAAGCGAAGAAATT-

-TTACATTTGGAGATTTTTTATTTACAGCATTGTTTTCAAATATATTCCAATTAATCGGTG-
-AATGTAAACCTCTAAAAAATAAATGTCGTAACAAAAGTTTATATAAGGTTAATTAGCCAC-

-AATGATTGGAGTTAGAATAATCTACTATAGGATCATATTTTATTAAATTAGCGTCATCAT-
-TTACTAACCTCAATCTTATTAGATGATATCCTAGTATAAAATAATTTAATCGCAGTAGTA-

-AATATTGCCTCCATTTTTTAGGGTAATTATCCAGAATTGAAATATCAGATTTAACCATAG-
-TTATAACGGAGGTAAAAAATCCCATTAATAGGTCTTAACTTTATAGTCTAAATTGGTATC-

-AATGAGGATAAATGATCGCGAGTAAATAATATTCACAATGTACCATTTTAGTCATATCAG-
-TTACTCCTATTTACTAGCGCTCATTTATTATAAGTGTTACATGGTAAAATCAGTATAGTC-

-ATAAGCATTGATTAATATCATTATTGCTTCTACAGGCTTTAATTTTATTAATTATTCTGT-
-TATTCGTAACTAATTATAGTAATAACGAAGATGTCCGAAATTAAAATAATTAATAAGACA-

-AAGTGTCGTCGGCATTTATGTCTTTCATACCCATCTCTTTATCCTTACCTATTGTTTGTC-
-TTCACAGCAGCCGTAAATACAGAAAGTATGGGTAGAGAAATAGGAATGGATAACAAACAG-

-GCAAGTTTTGCGTGTTATATATCATTAAAACGGTAATAGATTGACATTTGATTCTAATAA-
-CGTTCAAAACGCACAATATATAGTAATTTTGCCATTATCTAACTGTAAACTAAGATTATT-

-ATTGGATTTTTGTCACACTATTATATCGCTTGAAATACAATTGTTTAACATAAGTACCTG-
-TAACCTAAAAACAGTGTGATAATATAGCGAACTTTATGTTAACAAATTGTATTCATGGAC-

-TAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTTATAGTCGATTAATCGATTTGATT-
-ATCCTAGCATGTCCAAATGCGTTCTTTTACCAAACAATATCAGCTAATTAGCTAAACTAA-

-CTAGATTTGTTTTAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGA-
-GATCTAAACAAAATTGATTAATTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCT-

                                                    SacII
-GCTCACTAGTGTCGACCTGCAGGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGAAAGAA-
-CGAGTGATCACAGCTGGACGTCCCATGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTTTCTT-

-GAAGAAGAAGAAGAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA-
-CTTCTTCTTCTTCTTTCGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTAT-

-ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGG-
-TGATCGTATTGGGGAACCCCGGAGATTTGCCCAGAACTCCCCAAAAAACGACTTTCCTCC-

-AACCGCTCTTCACGCTCTTCACGC 3'     [SacII sticky end] (SEQ ID NO:50)
-TTGGCGAGAAGTGCGAGAAGTG   5'  (position #5904 in pAMG21) (SEQ ID NO:46)
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 66 ）

於此取代DNA序列黏狀末端的連接中，外部的Aat II和Sac II部位即被破壞。在經取代DNA中有獨特的Aat II和Sac II部位。

pAMG22-His

表現質體pAMG22-His可以經由將pAMG22中在獨特Nde I (#4795)與EcoRI(#4818)限制部位之間的小DNA序列用下列寡核苷酸複體取代而從Amgen表現媒體pAMG22衍生出：

```
  NdeI                          NheI                EcoRI
5'  TATGAAACATCATCACCATCACCATCATGCTAGCGTTAACGCGTTGG      3' (SEQ ID NO:51)
3'    ACTTTGTAGTAGTGGTAGTGGTAGTACGATCGCAATTGCGCAACCTTAA  5' (SEQ ID NO:52)
     MetLysHisHisHisHisHisHisAlaSerValAsnAlaLeuGlu       (SEQ ID NO:168)
```

pAMG22

從美國專利第4,710,473號(1987年12月1日授與)所述Amgen表現媒體系統可衍生出Amgen表現媒體pCFM1656(ATCC #69576)，其轉而可衍生表現質體pAMG22。質體pCFM1656可經由下述而從所述質體pCFM836(專利第4,710,473號)衍生出：

(a) 經由用T4聚合酶末端填充接著鈍端連接而破壞兩個內源性Nde I限制部位；(b)將在獨特Aat II與Cla I限制部位之間含有合成PL啓動基因的DNA序列用得自pCFM636(專利第4,710,473號)含有PL啓動基因的類似片段予以取代

```
  AatII
5'    CTAATTCCGCTCTCACCTACCAAACAATGCCCCCCTGCAAAAAATAAATTCATAT-
3'TGCAGATTAAGGCGAGAGTGGATGGTTTGTTACGGGGGGACGTTTTTTATTTAAGTATA-

-AAAAAACATACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAA-
-TTTTTTGTATGTCTATTGGTAGACGCCACTATTTAATAGAGACCGCCACAACTGTATTT-

-TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT  3'    (SEQ ID NO:53)
-ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGC5'    (SEQ ID NO:54)
                          ClaI
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（67）

及接著(C)用下列寡核苷酸取代在獨特Cla I與Kpn I限制部位之間的小DNA序列：

```
5′ CGATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC 3′(SEQ ID NO:55)
3′   TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC     5′(SEQ ID NO:56)
  ClaI                                                KpnI
```

然後可從pCFM1656經由PCR重疊寡核苷酸突變形成和DNA序列取代進行一系列部位導引性鹼變換而衍生出表現質體pAMG22。從緊接在質體複製啓動基因PcopB 5'端的Bgl II部位起始並朝向質體複製基因進行時，其鹼對變換爲如下所列者：

pAMG22 bp #	在pCFM1656中的bb	在pAMG22中改變成的bp
# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/C
# 509	G/C	A/T
# 617	--	插入兩G/C bp
# 679	G/C	T/A
# 980	T/A	C/G
# 994	G/C	A/T
# 1004	A/T	C/G
# 1007	C/G	T/A
# 1028	A/T	T/A
# 1047	C/G	T/A
# 1178	G/C	T/A
# 1466	G/C	T/A
# 2028	G/C	bp 缺失
# 2187	C/G	T/A
# 2480	A/T	T/A
# 2499-2502	AGTG TCAC	GTCA CAGT
# 2642	TCCGAGC	7 bp 缺失

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

五、發明說明（68 ）

AGGCTCG

# 3435	G/C	A/T
# 3446	G/C	A/T
# 3643	A/T	T/A

用下列DNA序列取代在獨特Aat II(pCFM1656中的位置#4364)與Sac II(pCFM1656中的位置#4585)限制部位之間的DNA序列：

[AatII sticky end] (position #4358 in pAMG22)

```
5'      GCGTAACGTATGCATGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAA-
3' TGCACGCATTGCATACGTACCAGAGGGGTACGCTCTCATCCCTTGACGGTCCGTAGTT-

-ATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTG-
-TATTTTGCTTTCCGAGTCAGCTTTCTGACCCGGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCAC-

-AACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGG-
-TTGCGAGAGGACTCATCCTGTTTAGGCGGCCCTCGCCTAAACTTGCAACGCTTCGTTGCC-

-CCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAG-
-GGGCCTCCCACCGCCCGTCCTGCGGGCGGTATTTGACGGTCCGTAGTTTAATTCGTCTTC-

-GCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTTTTGTTTATTTTTCTAAAT-
-CGGTAGGACTGCCTACCGGAAAAACGCAAAGATGTTTGAGAAAACAAATAAAAAGATTTA-

              AatII
-ACATTCAAATATGGACGTCTCATAATTTTTAAAAAATTCATTTGACAAATGCTAAAATTC-
-TGTAAGTTTATACCTGCAGAGTATTAAAAATTTTTTAAGTAAACTGTTTACGATTTTAAG-

-TTGATTAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAATTTATCGATTTGATTCTAGATTTGTTT-
-AACTAATTATAAGAGTTAACACTCGCGAGTGTTAAATAGCTAAACTAAGATCTAAACTCA-

-TAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGAGCTCACTAGTGT-
-ATTGATTAATTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCTCGAGTGATCACA-

                                        SacII
-CGACCTGCAGGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGAAAGAAGAAGAAGAAGAA-
-GCTGGACGTCCCATGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTTTCTTCTTCTTCTTCTT-

-GAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACC-
-CTTTCGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTATTGATCGTATTGG-

-CCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACCGCTCTTCA-
-GGAACCCCGGAGATTTGCCCAGAACTCCCCAAAAAACGACTTTCCTCCTTGGCGAGAAGT-

-CGCTCTTCACGC 3'    (SEQ ID NO:58)
-GCGAGAAGTG   5'    (SEQ ID NO:57)
```

[SacII sticky end] (position #5024 in pAMG22)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（69 ）

於此取代DNA序列所含黏狀末端的連接中，外側Aat II和Sac II部位都被破壞。而在取代DNA中含有獨特Aat II和Sac II部位。

B.人類OPG Met[32-401]

於此實施例中，所用表現媒體的pAMG21，其爲pCFM1656(ATCC登錄號碼69576)的衍生物，其含有恰當的限制部位供lux PR啓動基因下游的基因插入所用。(參看美國專利第5,169,318號有關lux表現系統的說明)。所用的宿主細胞爲GM120(ATCC登錄號碼55764)。此宿主具有整合到原養型大腸桿菌K12宿主的宿主染色體中所含第二部位內的lacIQ啓動基因和lacI基因。其他常用的大腸桿菌表現媒體和宿主細胞也適用來表現。

依下述將編碼人類OPG多肽的N-端甲硫胺酸和胺基酸32-401之DNA序列置於質體表現媒體pAMG21中的luxPR啓動基因之控制下。要完成此舉，使用含有人類OPG cDNA的質體pRcCMV-Hu OPG DNA作爲模版且用寡核苷酸#1257-20和#1257-19作爲引子進行PCR，其中包括30個循環的熱循環，每一循環爲：94℃ 20秒，接著37℃ 30秒，接著72℃ 30秒。將所得PCR樣品在瓊脂糖凝膠上解析，將PCR產物剪開，純化，並用Kpn I和BamHI核酸內切限制酶予以限制消化再純化。將合成寡核苷酸#1257-21和#1257-22分別用T4聚核苷酸激酶和ATP予以磷酸化後，將其混合在一起，於94℃下加熱並使其慢慢冷卻到室溫以形成含有Nde I和Kpn I黏狀末端的寡核苷酸聯結子複體。將在寡核苷酸#1257-21與#1257-22之間形成且含有Nde I和Kpn I粘性末端的磷酸化聯結子複體及

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

五、發明說明（70）

用寡核苷酸引子#1257-20和#1257-19所產生且經KpnI和BamHI消化並純化過的PCR產物(參看上述)經由使用標準重組DNA方法導引地插置在質體媒體pAMG21的兩個部位，亦即Nde I部位與BamHI部位之間(參看圖14A及下面的序列)。合成聯結子係利用大腸桿菌密碼子且提供一個N-端甲硫胺酸。

選擇培養出兩株系並分離出質體DNA，且於隨後經由DNA序列確定人類OPG插入體。所得含有在架構內緊接在甲硫胺酸之後的人類OPG多肽所含胺基酸32-401之質體pAMG21稱爲 pAMG21-huOPG met[32-401] 或 pAMG21-huOPG met[32-401]。

Oligo#1257-19

5'-TACGCACTGGATCCTTATAAGCAGCTTATTTTTACTGATTGGAC-3'(SEQ ID NO：59)

Oligo#1257-20

5'-GTCCTCCTGGTACCTACCTAAAACAAC-3'　　(SEQ ID NO：60)

Oligo#1257-21

5'-TATGGATGAAGAAACTTCTCATCAGCTGCTGTGTGATAAATGTCC GCCGGGTAC-3' (SEQ ID NO：61)

Oligo#1257-22

5'-CCGGCGGACATTTATCACACAGCAGCTGATGAGAAGTTTCTTCATC CA-3'(SEQ ID NO：47)

pAMG21-huOPG met[32-401]在大腸桿菌GM-120內於含有20微克/毫升卡那黴素的2XYT培養基中的培養物係在誘導之前置於30℃下溫置。在添加合成自動誘導劑N-(3-氧基已醯基)-DL-同絲胺酸內酯到培養基中達30毫微克/毫升的最

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（71）

後濃度且將培養物置於30℃或37℃下培育6小時後即達到huOPG met[32-401]基因產物表現之誘導。於6小時後，以顯微術檢查細菌培養物中的包涵體之存在，接著予以離心成丸。在經誘導的培養物中觀察到折射光的包涵體，顯示在大腸桿菌中產生某些不溶性重組huOPG met[32-401]基因產物。將一些細菌沈著丸再懸浮於10 mM Tris-HCl/ pH 8，1 mM EDTA之中並添加2X Laemlli樣品緩衝液到1X最後濃度和β-氫硫基乙醇到5%最後濃度而予以直接溶裂，再以SDS-PAGE分析。在含有30℃和37℃誘導培養物的總細胞溶裂物之SDS-PAGE凝膠上觀察到在約42 kDa處比在第2道上30℃未經誘導培養物所得總細胞溶裂物實質地更強的考馬斯(coomassie)染色帶(圖14B)。預期的基因產物爲具有370胺基酸長度及約42.2 kDa預期分子量者。在37℃下誘導6小時後，將另一培養物沈著成丸，再施以包涵體分離(參看下文)或以微流體化處理。將要用微流體化處理的丸再懸浮於25 mM Tris-HCl/pH 8，0.5 M NaCl緩衝液中並通過Microfluidizer Model 1108(Microfluidics Corp.)20次後收集起來。於收集所得樣品(微流體化總溶裂物)中取出一液份，並將剩餘物以20,000 x g離心20分鐘沈著成丸。取出離心後的上澄液(微流體化可溶部份)並將沈丸重新懸浮在25 mM Tris-HCl/pH 8，0.5 M NaCl，6M脲溶液中(微流體化不溶部份)。於一液份總可溶部份或不溶部份中加入等體積的2X Laemalli樣品緩衝液和β-氫硫基乙醇到5%最後濃度。然後以SDS-PAGE分析該等樣品。於不溶部份中發現明顯量的重

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（72）

組huOPG met[32-401]基因產物。要純化出該重組蛋白質時，係依下文所述先純化過包涵體：用在Beckman J-6B離心機中所裝的JS-4.2轉子以4,900 x g在4℃進行密度梯度離子15分鐘而從培養基分離出細菌細胞。將細菌沈丸再懸浮於5毫升水中後，用水稀釋到10毫升最後體積。將此懸浮液轉移到已在冰中冷卻過的不銹鋼杯中並用裝備著標準尖頭的Branson Sonifier施以聲波碎裂（動力設定=5，負載循環=95%，80次破裂）。將聲波處理過的細胞懸浮液置於Beckman Optima TLX超離心機中的TLA 100.3轉子內以195,000 x g在23℃下離心5到10分鐘。丟棄上澄液並用注射瓶以水流沖洗沈丸。用微調刀刮取收集沈丸並轉移到玻璃勻化器（15毫升容量）。於勻化器中加入5毫升的Percoll溶液（75%液體Percoll，0.15M氯化鈉）並將內容物勻化到均勻地懸浮爲止。經由添加Percoll溶液使體積增加到19.5毫升，混合，並分配到3個Beckman Quick-Seal管（13×32毫米）之中。根據製造商的說明將諸管密封。將該等管置於Beckman TLA 100.3轉子內於23℃下，以20,000 rpm(21,600 x g)離子30分鐘。檢驗各管的恰當分帶圖案。要回收折光體時，係經回收梯度部份並集中起來後，用水稀釋。離心沈著包涵體，並於SDS-PAGE後估測蛋白質濃度。

取一份依下述分離出的包涵體溶解在含有5% β-氫硫基乙醇的1X Laemlli樣品中並在SDS-PAGE凝膠上解析，該分離出的包涵體可提供高度純化的重組huOPG[32-401]基因產物。將在SDS-聚丙烯醯胺凝膠上解析出包涵體之後可觀察

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（73 ）

到的主要~42 kDa帶從個別凝膠上剪下並基本上依Matsudaira et al. J. Biol. Chem. 262, 10-35(1987)中所述測定N-端胺基酸序列。於19循環後定出下列序列：

NH_2-MDEETASHQLLCDKCPPGTY-COOH (SEQ ID NO：62)

此序列經發現與經由細菌表現媒體提供甲硫胺酸所產生的pAMG21 Hu-OPG met[32-401]表現媒體所編碼之前面19個胺基酸相同。

C.人類OPG met[22-401]

將編碼人類OPG的N-端甲硫胺酸和胺基酸22至401之DNA序列依下文所述置於原核生物質體表現媒體pAMG21中的luxPR啓動基因的控制之下。將分離出的pAMG21-huOPG met[32-401]質體DNA(參看B段)用Kpn I和BamH I核酸內切限制酶切劈並將所得片段置於瓊脂糖凝膠上分離。用標準方法從凝膠上分離出B片段(~1064 bp片段)。用B段中所述方法將合成寡核苷酸(Oligos) #1267-06和1267-07分別磷酸化並使其形成寡核苷酸聯結子複體，其含有Nde I和Kpn I黏性末端。該合成聯結子複體係利用大腸桿菌密碼子並提供N-端甲硫胺酸。將含有Nde I和Kpn I黏狀末端的磷酸化寡核苷酸聯結子與分離出的經Kpn I和BamHI核酸內切限制酶消化過的pAMG21-huOPG met[32-401]所含~1064 bp片段經由使用標準重組DNA方法導引地插置在pAMG21的Nade I與BamHI部位之間。將連接混合物以electroporation利用製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393內。選擇出菌株，分離出質體DNA，並實施DNA定序以查證huOPG met[22-401]基因的

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（74）

DNA序列。

Oligo #1267-06

5'-TAT GGA AAC TTT TCC TCC AAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AAC TTC TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TCC GCC GGG TAC-3' (SEQ ID NO：63)

Oligo #1267-07

5-CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAG AAG TTT CTT CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG GAA AAG TTT CCA-3' (SEQ ID NO：64)

將pAMG21-huOPG met[22-401]在大腸桿菌宿主393中的培養物置於含有20微克/毫升卡那黴素的2XYT培養基中並在誘導前於30℃下溫置。在添加合成自動誘導劑N-(3-氧基己醯基)-DL-同絲胺酸內酯到培養基中達30毫微克/毫升的最後濃度且將培養物置於30℃或37℃下培育6小時後即達到從媒體pAMG21所含luxPR啓動基因誘導出重組基因產物表現之舉。於6小時後，將細菌培養物離心成丸(=30℃ I+6或37℃ I+6)。細菌培養物也在誘導之前刻離心成丸(=30℃ PreI)或於另一份培養物中不加自動誘導劑而在30℃再培育6小時而得未經誘導(UI)培養物(=30℃ UI)。將30℃ PreI，30℃ UI，30℃ I+6，或37℃ I+6諸培養物的細菌丸依B段中所述重新懸浮，溶裂，及以SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)予以分析。將聚丙烯醯胺凝膠用考馬斯藍染色及/或以西方化轉移到硝基纖維素並用兔子抗-mu OPG-Fc多株抗體依實施例10中所述

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（75 ）

進行免疫探測。誘導後的基因產物水平可比擬於未經誘導(30℃ UI)或預誘導(30℃ PreI)樣品。

D. 鼠OPG met-[22-401]

將編碼鼠(mu)OPG多肽的N-端甲硫胺酸和胺基酸22至401之DNA序列依下述置於原核生物質體表現媒體pAMG21所含luxPR啓動基因的控制之下。使用寡核苷酸#1257-16和#1257-15作爲引子，用質體pRcCMV-Mu OPG DNA作爲模版及以B節中所述熱循環條件實施PCR。將PCR產物依B段中所述予以純化並用Kpn I和BamHI核酸內切限制酶予以劈切。將合成寡核苷酸#1260-61和#1260-82分別以B段中所述方法磷酸化並使其形成具有Nde I和Kpn I黏狀末端的寡核苷酸聯結子複體。該合成聯結子複體係利用大腸桿菌密碼並提供N-端甲硫胺酸。將在寡核苷酸#1260-61與#1260-82之間形成且含有Nde I和Kpn I黏狀末端的經磷酸化聯結子複體及用寡核苷酸引子#1257-16和#1257-15產生且經Kpn I和BamHI消化和純化過的PCR產物用標準方法導引地插置於pAMG21的Nde I與BamHI部位之間。將連接混合物以electroporation用製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393之內。選擇培養出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證MuOPG met[22-401]基因的DNA序列。

使用C段中所述方法測定載有質體pAMG21-MuOPG met[22-401]的393細胞培養物在誘導後的重組muOPG met[22-401]多肽之表現。

Oligo #1257-15

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（76 ）

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTC ACG GAT TGA AC-3' (SEQ ID NO：65)

Oligo #1257-16

5'-GTG CTC CTG GTA CCT ACC TAA AAC AGC ACT GCA CAG TG-3' (SEQ ID NO：66)

Oligo #1260-61

5'-TAT GGA AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA CGA TCC GGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC GGG TAC-3' (SEQ ID NO：67)

Oligo #1260-82

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CCA-3' (SEQ ID NO：68)

E. 鼠OPG met[32-401]

將編碼鼠OPG所含N-端甲硫胺酸和胺基酸32至401的DNA序列依下述置於原核生物質體表現媒體pAMG21中的luxPR啓動基因之控制下。要完成此舉時，係將合成寡核甘酸#1267-08和#1267-09以B段中所述方法分別磷酸化並使其形成寡核苷酸聯結子複體。該聯結子複體係利用大腸桿菌密碼且提供N-端甲硫胺酸。將在寡核苷酸#1267-08與#1267-09之間形成且含有Nde I和Kpn I黏狀末端的經磷酸化聯結子複體及稍早所述經Kpn I和BamHI消化且純化過的PCR產物(參看D段)用標準方法導引地插置於pAMG21的Nde I和BamHI部

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（77 ）

位之間。將連接混合物用electroporation以製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393之內。選擇出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證muOPG-met[32-401]基因的DNA序列。

使用C段中所述方法測定載有pAMG21重組質體的393細胞培養物在誘導後的重組muOPG-met[32-401]多肽之表現。

Oligo # 1267-08

5'-TAT GGA CCC AGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC GGG TAC-3' (SEQ ID NO：69)

Oligo # 1267-09

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT GTG GGT CCA-3' (SEQ ID NO：70)

F. 鼠OPG met-lys[22-401]

將編碼鼠OPG所含N-端甲硫胺酸接著離胺酸殘基和胺基酸22至401的DNA序列依下述置於原核生物表現媒體pAMG21中的luxPR啓動基因之控制下。將合成寡核甘酸#1282-95和#1282-96以B段中所述方法分別磷酸化並使其形成寡核苷酸聯結子複體。該聯結子複體係利用大腸桿菌密碼且提供N-端甲硫胺酸。將在寡核苷酸#1282-95與#1282-96之間形成且含有Nde I和Kpn I黏狀末端的經磷酸化聯結子複體及D段中所述經Kpn I和BamHI消化且純化過的PCR產物用標準方法導引地插置於pAMG21的Nde I和BamHI部位之間。將連接混合物用electroporation以製造商的程序轉形到大腸

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 78 ）

桿菌宿主393之內。選擇出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證MuOPG-Met-Lys[22-401]基因的DNA序列。

使用C段中所述方法測定載有pAMG21重組質體的393細胞培養物在誘導後的重組MuOPG Met-Lys[32-401]多肽之表現。

Oligo # 1282-95

5'-TAT GAA AGA AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA CGA TCC GGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC GGG TAC-3' (SEQ ID NO：71)

Oligo # 1282-96

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT TCA-3' (SEQ ID NO：72)

G. 鼠OPG met-lys-$(his)_7$[22-401]

將編碼鼠OPG的N-端殘基Met-Lys-His-His-His-His-His-His(=MKH)接著胺基酸22到401之DNA序列依下述置於原核生物表現媒體pAMG21所含luxPR啓動基的控制之下。使用寡核苷酸#1300-50和#1257-15作爲引子及質體pAMG21-muOPG-met[22-401] DNA作爲模版進行PCR。熱循環條件爲B段中所述者。將所得PCR產物剪開，純化，用Nde I和BamHI核酸內切限制酶切劈並純化。將用寡核苷酸引子#1300-50和#1257-15產生且經Nde I和BamHI消化和純化過的PCR產物用標準DNA方法導引地插置於pAMG21的Nde I和BamHI部位之間。將連接混合物以electroporation用製造商

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

五、發明說明（ 79 ）

的程序轉形到大腸桿菌宿主393之內。選擇培養出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證muOPG-MKH[22-401]基因的DNA序列。

使用C段中所述方法測定載有重組pAMG21質體的經轉形393培養物在誘導後的重組MuOPG-MKH[22-401]多肽之表現。

Oligo # 1300-50

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAC ATC ATC ACC ATC ACC ATC ATG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC ATT ACG AT-3' (SEQ ID NO：73)

Oligo # 1257-15

(參看D段)

H. 鼠OPG met-lys[22-401] $(his)_7$

將編碼鼠OPG所含N-端met-lys，胺基酸22至401，及胺基酸401後面所接七個組胺酸殘基的DNA序列(=muOPG MK[22-401]-H_7)依下文所述置於原核生物表現媒體pAMG21所含lux PR啓動基因之控制下。使用寡核苷酸#1300-49和#1300-51作爲引子及用pAMG21-muOPG met[22-401] DNA作爲模版進行PCR。其熱循環條件爲B段中所述者。將所得PCR樣品置於瓊脂凝膠上分離，將PCR產物剪開，純化，用Nde I和BamHI核酸內切限制酶切劈並純化。經Nde I和BamHI消化和純化過的PCR產物使用標準DNA方法導引地插置於pAMG21的Nde I和BamHI部位之間。將連接混合物以electroporation

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

五、發明說明（ 80 ）

用製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393之內。選擇培養出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證muOPG-MKH[22-401]-H_7基因的DNA序列。

使用C段中所述方法測定載有重組pAMG21質體的經轉形393培養物在誘導後的重組muOPG-MKH[22-401]-H_7多肽之表現。

Oligo # 1300-49

5'-CTT CTC CTC ATA TGA AAG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC A-3' (SEQ ID NO：74)

Oligo # 1300-51

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAA TGA TGG TGA TGG TGA TGA TGT AAG CAG CTT ATT TTC ACG GAT TGA ACC TGA TTC CCT A-3' (SEQ ID NO：75)

I. 鼠OPG met[27-401]

將編碼鼠OPG所含N-端甲硫胺酸和胺基酸27至401的DNA序列依下述置於原核生物表現媒體pAMG21中的lux PR啓動基因之控制下。用寡核酸苷酸#1309-74和#1257-15作爲引子及用質體pAMG21-muOPG met[22-401] DNA作爲模版。熱循環條件爲B段中所述者。將所得PCR樣品置於瓊脂凝膠上分離，將PCR產物剪開，純化，用Nde I和BamHI核酸內切限制酶切劈並純化。將經Nde I和BamHI消化和純化過的PCR產物用標準方法導引地插置於pAMG21的Nde I與BamHI部位之間。將連接混合物以electroporation用製造商的程序轉形到

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

五、發明說明（ 81 ）

大腸桿菌宿主393之內。選擇培養出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證muOPG-met[27-401]基因的DNA序列。

使用C段中所述方法測定載有重組pAMG21質體的經轉染393培養物於誘導後的重組muOPG-met[22-401]多肽之表現。

Oligo # 1309-74

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAT ACC TGC ATT ACG ATC CGG AAA CTG GTC AT-3' (SEQ ID NO：76)

Oligo # 1257-15

(參看D段)

J.人類OPG met[27-401]

將編碼人類OPG所含N-端甲硫胺酸和胺基酸27至401的DNA序列依下述置於原核生物表現媒體pAMG21中的lux PR啓動基因之控制下。使用寡核酸苷酸#1309-75和#1309-76作爲引子及用質體pAMG21-muOPG-met[22-401] DNA作爲模版進行PCR。熱循環條件爲B段中所說明者。將所得PCR樣品置於瓊脂糖凝膠上分離，將PCR產物剪下，純化，用AseI和BamHI核酸內切限制酶予以限制消化，並純化。將上述經AseI和BamHI消化且純化過的PCR產物用標準方法導引地插置於pAMG21的Nde I和BamHI部位之間。將連接混合物以electroporation用製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393之內。選擇培養出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證huOPG-met[27-401]基因的DNA序列。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 82 ）

使用C段中所述方法測定載有重組pAMG21質體的經轉染393細胞在誘導後的重組huOPG-met[27-401]多肽之表現。

Oligo # 1309-75

5'-GTT CTC CTA TTA ATG AAA TAT CTT CAT TAT GAT GAA GAA ACT T-3' (SEQ ID NO：77)

Oligo #1309-76

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTT ACT GAT T-3' (SEQ ID NO：78)

K. 鼠OPG met[22-180]

將編碼鼠OPG所含N-端甲硫胺酸和胺基酸22至180的DNA序列依下述置於原核生物質體表現媒體pAMG21中的lux PR啓動基因之控制下。使用寡核酸苷酸#1309-72和#1309-73作爲引子及用質體pAMG21-muOPG met[22-401] DNA作爲模版進行PCR。熱循環條件爲B段中所述者。將所得PCR樣品置於瓊脂糖凝膠上分離，將PCR產物剪下，純化，用Nde I和BamHI核酸內切限制酶予以限制消化。將上述經Nde I和BamHI消化且純化過的PCR產物用標準方法導引地插置於pAMG21的Nde I與BamHI部位之間。將連接混合物用electroporation以製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393之內。選擇出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證muOPG-met[22-180]基因的DNA序列。

使用C段中所述方法測定載有重組pAMG21質體的經轉形393培養物於誘導後的重組muOPG-met[22-180]多肽之表

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 83 ）

現。

Oligo # 1309-72

5'-GTT CTC CTC ATA TGG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC A-3' (SEQ ID NO：79)

Oligo #1309-73

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT GTT GCA TTT CCT TTC TGA ATT AGC A-3' (SEQ ID NO：80)

L. 鼠OPG met[27-180]

將編碼鼠OPG的N-端甲硫胺酸和胺基酸27至180之DNA序列依下文所述置於原核生物表現媒體pAMG21中的lux PR啓動基因的控制之下。使用寡核酸苷酸#1309-74(參看I節)和#1309-73(參看K節)作爲引子及用質體pAMG21-muOPG met[22-401] DNA作爲模版進行PCR。熱循環條件爲B節中所述者。將所得PCR樣品置於瓊脂糖凝膠上分離，將PCR產物剪下，純化，用Nde I和BamHI核酸內切限制酶予以限制消化，並純化。將上述經Nde I和BamHI消化且純化過的PCR產物用標準方法導引地插置在pAMG21的Nde I和BamHI部位之間。將連接混合物用electroporation以製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393之內。選擇出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證muOPG-met[27-180]基因的DNA序列。

使用C段中所述方法測定載有重組pAMG21質體的經轉形393細胞培養物在誘導後的重組muOPG met[27-180]多肽之表現。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 84）

M. 鼠OPG met [22-189]和met [22-194]

將編碼鼠OPG所含N-端甲硫胺酸和胺基酸22至189，或22到194的DNA序列依下述置於原核生物表現媒體pAMG21所含lux PR啓動基因之控制下，使用B節中所述方法將合成寡核苷酸配對#1337-92和#1337-93(=muOPG-189聯結子)或#1333-57和#1333-58(=muOPG-194聯結子)分別磷酸化並使其形成寡核苷酸聯結子複體配對。將經純化的質體pAMG21-muOPG met[22-401] DNA用KpnI和BspEI核酸內切限制酶予以切劈並將所得DNA片段置於瓊脂糖凝膠上分離。用標準重組DNA方法分離出~413 bp B片段。將在寡核核苷酸#1337-92與#1337-93(muOPG-189聯結子)或寡核苷酸#1333-57和#1333-58(muOPG-194聯結子)之間形成且含有BspEI和BamHI黏性末端之經磷酸化寡核苷酸聯結子複體，及上述分離出且經KpnI和BspEI核酸內切限制酶消化過的質體pAMG21-muOPG-met [22-401]所含~413 bp B片段使用標準方法導引地插置在pAMG21-muOPG-met [22-401]的KpnI與BamHI部位之間。將各連接混合物以electroporation用製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393之內。選擇培養出株系，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證muOPG-met [22-189]或muOPG-met [22-194]基因的DNA序列。

用C節中所述方法測定轉形到393細胞內的重組pAMG21質體之重組muOPG-met[22-189]和muOPG-met[22-194]多肽之表現。

Oligo # 1337-92

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 85 ）

5'-CCG GAA ACA GAT ATT GAG-3' (SEQ ID NO：81)

Oligo # 1337-93

5'-GAT CCT CAT TAT CTG TTT-3' (SEQ ID NO：82)

Oligo # 1333-57

5'-CCG GAA ACA GAG AAG CCA CGC AAA AGT AAG-3' (SEQ ID NO：83)

Oligo # 1333-58

5'-GAT CCT TAC TTT TGC GTG GCT TCT CTG TTT-3' (SEQ ID NO：84)

N. 鼠OPG met [27-189]和met [27-194]

將編碼鼠OPG所含N-端甲硫胺酸和胺基酸22至189，或27至194的DNA序列依下文所述置於原核生物表現媒體pAMG21所含lux PR啓動基因的控制之下。將含有BspEI和BamHI黏性末端經磷酸化的寡核苷酸聯結子，"muOPG-189聯結子"或"muOPG-194聯結子"（參看M節），及分離出的經KpnI和BspHI核酸內切限制酶消化過的質體pAMG21-muOPG-met [22-401]所含~413 bp B片段用標準方法導引地插置於質體pAMG21-muOPG-met [27-401]的KpnI和BamHI部位之間。將每一連接混合物以electroporation用製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393之內。選擇出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證muOPG met [27-189]或muOPG met [27-194]基因之DNA序列。

用C節中所述方法測定載著重組pAMG21質體的393細胞經

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 86）

誘導後的重組muOPG met[27-189]或muOPG met[27-194]之表現。

O.人類OPG met [22-185]，met [22-189]，met[22-194]

將編碼人類OPG多肽的N-端甲硫胺酸及胺基酸22至185，22至189，或22到194之DNA序列依下述置於原核生物表現媒體pAMG21所含lux PR啓動基因的控制之下，將合成寡核苷酸配對#1331-87和#1331-88(=huOPG-185聯結子)，#1331-89和#1331-90(=huOPG-189聯結子)，或#1331-91 & #1331-92(=huOPG-194聯結子)分別磷酸化且使用B節所述方法予以分別形寡核苷酸聯結子複體。將經純化的pAMG21-huOPG-met[27-401] 質體DNA用KpnI和NaeI核酸內切限制酶予以限制消化並將所得DNA片段置於瓊脂糖凝膠上分離。用標準重組DNA方法分離出~407 bp B片段。將在寡核核苷酸#1337-87與#1331-88(huOPG-185聯結子)，寡核苷酸#1331-89與#1331-90(huOPG-189聯結子)，或寡核苷酸#1331-91與#1331-92(huOPG-194聯結子)[每一聯結子含有NdeI和BamHI黏性末端]之間形成的經磷酸化寡核苷酸聯結子複體，及上述分離出的經KpnI和NdeI核酸內切限制酶消化過之質體pAMG21-huOPG-met [27-401]所含~407 bp B片段經由使用標準方法導引地插置在質體pAMG21-huOPG-met[22-401]的KpnI和BamHI部位之間。將每一連接物以electroporation用製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393內。選擇出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證huOPG-met [22-185]，huOPG-met [22-189]，或huOPG-met [22-194]基因的

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 87 ）

DNA序列。

用C節所述方法測定載有重組pAMG21質體的經轉形393細胞在誘導後的重組huOPG-met[22-185]，huOPG-met[22-189]或huOPG-met[22-194]之表現。

Oligo # 1331-87

5'-TAT GTT AAT GAG -3' (SEQ ID NO：85)

Oligo # 1331-88

5'-GAT CCT CAT TAA CA-3' (SEQ ID NO：86)

Oligo # 1331-89

5'-TAT GTT CCG GAA ACA GTT AAG-3' (SEQ ID NO：87)

Oligo # 1331-90

5'-GAT CCT TAA CTG TTT CCG GAA CA-3' (SEQ ID NO：88)

Oligo # 1331-91

5'-TAT GTT CCG GAA ACA GTG AAT CAA CTC AAA AAT AAG-3' (SEQ ID NO：89)

Oligo # 1331-92

5'-GAT CCT TAT TTT TGA GTT GAT TCA CTG TTT CCG GAA GA-3' (SEQ ID NO：90)

P.人類OPG met [27-185]，met [27-189]，met[27-194]

將編碼人類OPG多肽所含的N-端甲硫胺酸和胺基酸27至185，27至189，或27到194的DNA序列依下文所述置於原核生

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 88 ）

物表現媒體pAMG21所含lux PR啓動基因的控制之下。將各含Nde I和BamHI黏狀末端的經磷酸化寡核苷酸聯結子"huOPG-185聯結子"，"huOPG-189聯結子"或"huOPG-194聯結子"(參看O節)，及分解出的經KpnI和Nde I核酸內切酶消化過之質體pAMG21-huOPG-met [27-401]所含~407 bp B片段(參看O節)，使用標準方法導引地插置於質體pAMG21-huOPG-met [27-401]的KpnI和BamHI部位之間(參看J節)。將各連接物用electroporation以製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393之內。選擇出菌株，分離出質體DNA，並進行DNA定序以查證huOPG-met [27-185]，huOPG-met [27-189]，或huOPG-met [27-194]基因的DNA序列。

使用C節中所述方法測定轉形到393細胞內的重組pAMG21質體之重組huOPG-met[27-185]，huOPG-met[27-189]，和huOPG-met[27-194]的表現。

Q.鼠OPG met[27-401](P33E，G36S，A45P)

將編碼人類OPG所含N-端甲硫胺酸和胺基酸27至48及鼠OPG所含胺基酸殘基49至401的DNA序列依下述置於原核生物表現媒體pAMG21所含lux PR啓動基因的控制之下。將純化出的質體pAMG21-huOPG-met[27-401] DNA(參看J節)用AatII和KpnI核酸內切限制酶切劈並用標準重組DNA方法從瓊脂糖凝膠分離出~1075 bp B片段。此外，將質體pAMG21-muOPG-met[22-401] DNA(參看D節)用KpnI和BamHI核酸內切限制酶消化並依上述分離出~1064 bp B片段。用標準重組DNA方法將分離出且含有AatII & KpnI黏性末端的~1075 bp

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 89）

pAMG21-huOPG-met[27-401]限制片段（參看上文），含有KpnI和BamHI黏性末端的~1064 bp pAMG21-muOPG-met[22-401]限制片段及含有AatII和BamHI黏性末端且對應於pAMG21在AatII和BamHI之間的核酸序列之~5043 bp限制片段予以連接起來。將連接體經由electroporatino用製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主393內。選擇出菌株，並用標準DNA方法查證質體中的重組插入體之存在。muOPG-27-401 (P33E，G36S，A45P)基因。在muOPG中脯胺酸-33變成穀胺酸-33，甘胺酸-36變成絲胺酸-36，及丙胺酸-45變成脯胺酸-45諸胺基酸改變係由muOPG殘基27至48被huOPG殘基27至48取代所促成的。

用C節中所述方法測定載有重組pAMG21質體的經轉形393]細胞之重組muOPG-met[27-401] (P33E，G36S，A45P)之表現。

R. 鼠OPG met-lys-$(his)_7$-ala-ser-$(asp)_4$-lys[22-401](A45T)

將編碼鼠OPG多肽所含N-端His標記和腸激酶辨識序列（自NH_2端至COOH端）：Met-Lys-His-His-His-His-His-His-His-Ala-Ser-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys(=HEK)，接著胺基酸22至401的DNA序列依下述置於被lac限遏物調節的Ps4啓動基因之控制下。將pAMG22-His（參看A節）用Nhe I和BamHI核酸內切限制酶予以消化並用標準重組DNA方法從瓊脂糖凝膠分離出大片段（A片段）。將寡核苷酸#1282-91和#1282-92用前面所述方法予以分別磷酸化並使其形成寡核苷酸聯結子複體（參看B節）。使用標準重組DNA方法將在寡核苷酸#1282-91與#1282-92之間形成且含有Nhe I和KpnI黏狀末端的經磷酸化

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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 90 ）

聯結子複體，上述經Kpn I和BamHI消化且純化的PCR產物（參看D節），及經Nhe I和BamHI消化過的媒體pAMG22-His之A片段吸連接在一起。將連接物用electroporation以製造商的程序轉形到大腸桿菌宿主GM120內。選擇出菌株，分離出質體DNA並進行DNA定序以查證muOPG-HEK[22-401]基因的DNA序列。DNA定序顯露出自然muOPG序列中的假基因突變，其導致muOPG多肽的丙胺酸-45變成蘇胺酸之單一胺基酸變化。

用類似C節中所述方法測定載有重組pAMG21質體的GM120細胞之重組muOPG-HEK[22-401]之表現，不過，其中不添加合成自動誘導劑，而是添加IPTG到0.4 mM最後濃度以達到誘導作用。

Oligo # 1282-91

5'-CTA GCG ACG ACG ACG ACA AAG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC ATT ACG ATC CGG AAA CTG GTC ATC AGC TGC TGT GTG ATA AAT GTG CTC CGG GTA C-3' (SEQ ID NO：91)

Oligo # 1282-92

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT TGT CGT CGT CGT CG-3' (SEQ ID NO：92)

S.人類OPG met-arg-gly-ser-$(his)_6$[22-401]

設計八種寡核苷酸(1338-09至1338-16，如下方者)來產生爲重疊，雙股DNA形式的175鹼片段。將該等寡核苷酸配對，連接，並使用5'和3'寡核苷酸作爲PCR引子以產生大量

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 91 ）

的175鹼片段。將最後PCR基因產物用核酸內切限制酶ClaI和KpnI消化而得到取代人類OPG所含N-端28密碼子之片段。將經ClaI和KpnI消化過的PCR產物插置到也用ClaI和KpnI切過的pAMG21-huOPG[27-401]之內。將連接DNA轉形到勝任的大腸桿菌菌株393宿主細胞內。針對產生重組蛋白質產物及擁有具有正確核苷酸序列的基因融合物之能力篩選菌株。用50毫升搖動機燒瓶研究來測定蛋白質表現水平。對全細胞溶裂物和聲波丸粒用鼠抗-OPG抗體以考馬斯染色PAGE凝膠和西方氏分析進行構成物表現。導致大包涵體和蛋白質的形成之huOPG Met-Arg-Gly-Ser(His)$_6$ [22-401]表現係集中在不溶性(丸)部份。

1338-09

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GA (SEQ ID NO:93)

1338-10

TTT GTT TTA ACT AAT TAA AGG AGG AAT AAA ATA TGA GAG GAT CGC ATC AC (SEQ ID NO:94)

1338-11

CAT CAC CAT CAC GAA ACC TTC CCG CCG AAA TAC CTG CAC TAC GAC GAA GA (SEQ ID NO:95)

1338-12

AAC CTC CCA CCA GCT GCT GTG CGA CAA ATG CCC GCC GGG TAC CCA AAC A (SEQ ID NO:96)

1338-13

TGT TTG GGT ACC CGG CGG GCA TTT GT (SEQ ID NO:97)

1338-14

CGC ACA GCA GCT GGT GGG AGG TTT CTT CGT CGT AGT GCA GGT ATT TCG GC (SEQ ID NO:98)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 92 ）

1338-15

GGG AAG GTT TCG TGA TGG TGA TGG TGA TGC GAT CCT CTC ATA TTT TAT T
(SEQ ID NO:99)

1338-16

CCT CCT TTA ATT AGT TAA AAC AAA TCT AGT ATC AAA TCG ATT GTG TTT GT
(SEQ ID NO:100)

T. 人類OPG met-lys[22-401]和met(lys)$_3$[22-401]

爲構成人類OPG[22-401]的met-lys和met-(lys)$_3$形式，乃設計重疊寡核苷酸以添加恰當數目的離胺酸殘基。每一構成物的兩個寡核苷酸係經設計成重疊者，以使兩次PCR即可產生最後產物。第一次PCR反應的模版爲含有人類OPG 22-401基因的質體DNA製備物。第一次PCR係添加離胺酸殘基。第二次PCR使用第一次的產物並將序列加回到第一限制部位，ClaI。

將最後PCR基因產物用核酸內切限制酶ClaI和KpnI消化，取代人類OPG的N-端28密碼子，然後將其連接到也已用該兩核酸內切限制酶消化過的質體pAMG21-hu OPG-[27-401]之內。將連接後的DNA轉形到勝任的大腸桿菌菌株393宿主細胞內。針對產生重組蛋白質產物及擁有具有正確核苷酸序列的基因融合體之能力篩選菌株。用50毫升搖動器燒瓶研究來測定蛋白質表現水平。對全細胞溶裂物和聲波沈丸用鼠抗-OPG抗體考馬斯染色PAGE凝膠和西方氏分析進行構成物表現分析。任一構成物皆未有可偵檢的蛋白質表現水平且未能看到包涵體。以DNA定序確定DNA序列。

製備Met-Lys huOPG[22-401]的寡核苷酸引子：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 93 ）

1338-17
ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TG (SEQ ID NO:101)

1338-18
CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TGA AAG AAA CTT TTC CTC CAA AAT ATC (SEQ ID NO:102)

1338-20
TGT TTG GGT ACC CGG CGG ACA TTT ATC ACA C (SEQ ID NO:103)

Oligonucleotide primers to prepare Met-$(Lys)_3$-huOPG[22-401]:
1338-17
ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TG (SEQ ID NO:104)

1338-19
CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TGA AAA AAA AAG AAA CTT TTC CTC CAA AAT ATC (SEQ ID NO:105)

1338-20
TGT TTG GGT ACC CGG CGG ACA TTT ATC ACA C (SEQ ID NO:106)

U.人類和鼠OPG[22-401]/Fc融合體

構成四種OPG-Fc融合體，其中係將人類IgG1的Fc區融合到人類或鼠促骨堆積肽胺基酸22到401的N-端(稱爲Fc/OPG[22-401])或融合到C-端(稱爲OPG[22-401]/Fc)。Fc融合體係用實施例7中所述融合媒體pFc-A3構成者。

所有的融合基因都是用標準PCR技術構成的。PCR反應的模版爲含有標的基因的質體製備物。設計重疊寡核苷酸以

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（ 94 ）

將一基因的C-端部份與另一基因的N端部份組合起來。此方法可將兩基因在實施恰當的PCR反應後以正確的讀碼融合在一起。初始時係將每一基因的"融合"寡核苷酸與載著標的基因的媒體所用之通用引體一起放入PCR反應中。互補"融合"寡核苷酸則與一通用引子一起用來PCR另一基因。於此第一PCR反應結束時，得到兩個別的產物，每一基因各含其融合部位，造成足夠的重疊以驅使第二回PCR及造成所欲融合體。於第二回PCR中，第一回的兩種產物係與通用引子組合且透過重疊區而產生全長度融合DNA序列。

將最後PCR基因產物用核酸內切限制酶XbaI與BamHI消化後，連接到也已用該兩種相同核酸內切限制酶消化過的媒體pAMG21內。將連接後的DNA轉形到勝任的大腸桿菌菌株393宿主細胞內。針對產生重組蛋白質產物及擁有具正確核苷酸序列的基因融合體之能力篩選菌株。用50毫升搖動機燒瓶研究測定蛋白質表現水平。全細胞溶裂物，聲波丸，和上澄液都經考馬斯染色PAGE凝膠和用鼠抗-OPG抗體進行的西方氏分析予以分析融合體的表現。

Fc/huOPG[22-401]

在考馬斯染色PAGE凝膠上和西方氏吸漬上偵檢Fc/huOPG[22-401]融合肽的表現。該細胞具有非常大的包涵體，且其大部份的產物係在不溶(丸)部份內。用下列引子來構成此OPG-Fc融合體：

1318-48

CAG CCC GGG TAA AAT GGA AAC GTT TCC TCC AAA

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（95）

ATA TCT TCA TT (SEQ ID NO：107)

1318-49

CGT TTC CAT TTT ACC CGG GCT GAG CGA GAG GCT CTT CTG CGT CT (SEQ ID NO：108)

Fc/muOPG[22-401]

在考馬斯染色凝膠和西方氏吸漬上偵檢融合肽的表現。細胞具有非常大的包涵體，且大部份的產物都在不溶(丸)部份內。使用下列引子來構成此OPG-Fc融合物：

1318-50

CGC TCA GCC CGG GTA AAA TGG AAA CGT TGC CTC CAA AAT ACC TGC (SEQ ID NO：109)

1318-51

CCA TTT TAC CCG GGC TGA GCG AGA GGC TCT TCT GCG TGT (SEQ ID NO：110)

muOPG[22-401]/Fc

在考馬斯染色凝膠和西方氏吸漬上偵檢融合肽的表現。重組產物的量少於在N端具有Fc區的OPG融合蛋白質。未偵檢到明顯的包涵體。大部份的產物顯示在不溶(丸)部份內。使用下列引子來構成OPG-Fc融合體：

1318-54

CAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGC TGA ACC AAA ATC (SEQ ID NO：111)

1318-55

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（96）

CAG CTG CAG CTA AGC AGC TTA TTT TCA CGG ATT G (SEQ ID NO：112)

huOPG[22-401]/Fc

在考馬斯染色凝膠上未偵檢到融合肽的表現，雖則含有微弱的西方氏陽性信號。使用下列引子來製備此OPG-Fc融合體：

1318-52

AAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGC TGA ACC AAA ATC (SEQ ID NO：113)

1318-53

CAG CTG CAG CTA AGC AGC TTA TTT TTA CTG ATT GG (SEQ ID NO：114)

V.人類OPG met[22-401]-Fc融合體(P25A)

此構成物將在位置25的脯胺酸變成丙胺酸的胺基酸變化(P25A)與huOPG met[22-401]-Fc融合體組合在一起。將質體用核酸限制酶ClaI和KpnI消化以脫除基因的N-端28個密碼子，並將所得小(少於200鹼對)片段以凝膠純化。然後將含有脯胺酸成爲丙胺酸變化的此片段連接到已用該兩種核酸內切酶消化過的質體pAMG21-huOPG[22-401]-Fc融合體之內。將連接好的DNA轉形到勝任的大腸桿菌菌株393宿主細胞內。針對產生重組蛋白質產物及擁有具有正確核苷酸序列的基因融合體之能力篩選菌株。用50毫升搖動器燒瓶研究來測定蛋白質表現水平。經由考馬斯染色PAGE凝膠及用

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（97）

鼠抗-OPG抗體進行西方氏分析以分析全細胞溶裂物和聲波丸的構成物表現。在考馬斯染色PAGE凝膠和西方氏吸漬上偵檢融合肽的表現水平。蛋白質係在不溶(丸)部份內。細胞具有大包涵體。

W.人類OPG met[22-401] (P25A)

編碼其位碼25處的脯胺酸被丙胺酸取代的人類OPG所含N-端甲硫胺酸和胺基酸22至401且係在原核生物表現媒體pAMG21所含lux PR啓動基因控制之下的DNA序列係以下述構成的：將合成寡核苷酸#1289-84和1289-85配對形成具有XbaI和KpnI黏狀末端的寡核苷酸聯結子複體。該合成聯結子複體係利用最適的大腸桿菌密碼子並編碼N-端甲硫胺酸。該聯結子也包含一個在原序列中不存在的SpeI限制部位。將該聯結子複體用標準方法導引地插置在pAMG21-huOPG-22-401中的XbaI與KpnI部位之間。將連接混合物轉形導到大腸桿菌宿主GM221內。先篩選生產重組蛋白質的菌株。從陽性菌株分離出質體DNA並進行DNA定序以查證HuOPG-Met[22-401] (P25A)基因的DNA序列。使用下列寡核苷酸來產生XbaI-KpnI聯結子：

Oligo #1289-84

5'-CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TGC TCC AAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AAC TAG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TCC GCC GGG TAC-3' (SEQ ID NO：115)

Oligo #1289-85

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（98）

5'-CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC TAG TTT CTT CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG CAA AAG TTT CCA TAT GTT ATT CCT CCT T-3' (SEQ ID NO：116)

X.人類OPG met[22-401] (P26A)和(P26D)

將編碼其26位置的脯胺酸被丙胺酸取代的人類OPG所含N-端甲硫胺酸和胺基酸22至401且係在原核生物表現媒體pAMG21所含lux PR啓動基因控制之下的DNA序列係以下文所述製備的：將合成寡核苷酸#1289-86和1289-87配對形成具有黏狀末端的寡核苷酸聯結子複體。該合成聯結子複體係利用最適的大腸桿菌密碼且編碼著一N-端甲硫胺酸。用標準方法將該聯結子複體導引地插置於pAMG21-huOPG[22-401](P25A)所含XbaI與SpeI兩部位之間。將連接混合物轉形導到大腸桿菌宿主GM221內。先篩選生生產重組蛋白質的菌株。從陽性菌株分離出質體DNA並進行DNA定序以查證huOPG-met[22-401] (P26A)基因的DNA序列。被定序過的菌株之一經發現在26位置處的脯胺酸被天冬胺酸而非丙胺酸所取代，而將此株命名爲huOPG-met[22-401](P26D)。使用下列寡核苷酸來產生XbaI-SpeI聯結子：

Oligo #1289-86

5'-CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TCC TGC TAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AA-3' (SEQ ID NO：117)

Oligo #1289-87

5'-CTA GTT TCT TCA TCA TAA TGA AGA TAT TTA GCA GGA AAA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（99）

GTT TCC ATA TGT TAT TCC TCC TT-3' (SEQ ID NO：118)

Y.人類OPG met[22-194] (P25A)

將編碼其25位置處的脯胺酸被丙胺酸取代的人類OPG所含N-端甲硫胺酸和胺基酸22至194且係在原核生物表現媒體pAMG21所含lux PR啓動基因控制之下的DNA序列依下述構成：將質體pAMG21-huOPG[27-194]和pAMG21-huOPG[22-401](P25A)分別用KpnI和BamHI核酸內切酶予以消化。從pAMG21-huOPG[27-194]分離出450 bp片段且從pAMG21-huOPG[22-401](P25A)分離出6.1 kbp片段。將這些片段連接在一起並轉形導到大腸桿菌宿主GM221內。先篩選出生產重組蛋白質的菌株。從陽性菌株分離出質體DNA且定序DNA以查證huOPG-Met[22-194](P25A)基因的DNA序列。

實施例9

OPG單體的締合

使用經處理成過度表現muOPG[22-401]的CHO細胞產生調理培養基以供使用兔子多株抗-OPG抗體進行分泌重組OPG分析所用。將一液份的調理培養基濃縮20-倍，然後以還原性和非還原性SDS-PAGE予以分析(圖15)。在還原性條件下，蛋白質像一Mr 50-55 kd多肽一般移動，如同在將成熟產物在其一或多個一致的N-鍵聯糖基化部位予以糖基化後所預測者。令人訝異者，在用非還原性SDS-PAGE分析相同的樣品時，大部份的蛋白質係依約100 kd多肽而移動，爲被還原蛋白質的兩倍尺寸。此外，還有較少量的Nr 50-55 kd多肽。這種在SDS-PAGE上的移動樣式與OPG產物經由自由

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（100）

氫硫基氧化形成二體物之說法一致。

預期的成熟OPG多肽含有23半胱胺酸殘基，其中18個預測有參與鏈間雙硫橋聯的形成，其中包括四個富含半胱胺酸的域(圖12A)。五個剩餘的C-端半胱胺殘基不涉及在二級結構中，此點可根據與其他TNFR族員的同系性而預測。整體而言，其中有淨非偶數的光胱胺酸殘基，且就形式上而言可能有至少一個殘基係自由者可以形成兩個OPG單體之間的分子間雙硫鍵。

爲了有助於解開OPG動力學和單體締合樣式，乃進行脈衝-追踪標記研究。將表現muOPG[22-401]的CHO細胞依上文所述在含有^{35}S甲硫胺酸和半胱胺酸的無血清培養基中代謝地標記30分鐘。在此期後，取出培養基，並換上完全培養基，其中含有約爲原來放射性胺基酸濃度約2,000-倍超量的水平之未標記甲硫胺酸和半胱胺酸。於添加後30分鐘，1小時，2小時，4小時，6小時和12小時，經由脫除調理培養基而收取培養物，並製備調理培養基及吸附單層的溶裂物。依上述將培養物的培養基和細胞溶裂物予以澄清，然後依上述用抗-OPG抗體予以免疫沈澱。於洗滌過免疫沈澱物後，經由在非還原性SDS-PAGE緩衝液中煮沸使彼等釋出，再平分成兩半。於其中一半，將還原劑β-氫硫基乙醇加到5%(v/v)最後濃度，同時將另一半保持在非還原性狀況下。依上文所述以SDS-PAGE分析兩組免疫沈澱物後，進行放射自顯術處理並曝光到底片。其結果示圖16中。經由還原性SDS-PAGE分析過的樣品示於下面兩格組中。於合成

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（101）

後，將OPG多肽迅速處理成稍微較大的多肽，其可能展現出N-鍵聯糖基化改質形式。於約1-2小時後，細胞中的OPG水平急劇下降，且同時出現於培養物上澄液中。此種現象似乎爲OPG隨時間從細胞經由媒體輸送到培養基中之結果，與OPG爲天然分泌蛋白質的說法一致。分析在非還原性條件下的相同免疫沈澱物時揭露出在OPG二體物形成與分泌到調理培養基中之間的關係(圖16，上面格)。於前面30-60分鐘內，OPG單體在細胞內經由明顯的糖基化反應處理，接著即二體物形成。隨著時間，大部份的OPG單體都被形成爲二體物，其隨後即從細胞中消失。於合成後約60分開始，OPG二體物即出現在調理培養基中，並隨實驗的持續而蓄積。在此期間之後，形成OPG二體物，其隨後即分泌到培養物培養基內。OPG單體則內則在細胞內隨時間以低水平保持著，且也有少量出現在培養基中。此似乎不足共價鍵結OPG二體物分解的結果，而是次化學計算量的單體在細胞內產生及隨後分泌出所致。

從轉染CHO細胞重組產生的OPG主要爲二體物。爲了決定二體化是否爲OPG合成中的自然程序，我們分析可自然表現OPG的細胞系之調理培養基。CTLL-2細胞系一種鼠類細胞毒性T淋巴細胞系(ATCC登錄號碼TIB-214)經發現可在一組組織和細胞系RNA中表現OPG mRNA。其中OPG轉錄本經發與從腎鑑別出，經選殖和定序過的2.5-3.0 kb RNA相同且經發現其編碼著分泌分子。從CTLL-2細胞得到的調理培養基經西方氏吸漬分析顯示，若非全部也有大部份的分泌出之

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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 102）

OPG蛋白質爲二體物(圖17)。此點可推測OPG二體化和分泌不是人工在細胞系內過度表現所致，而可能是產物被表現性細胞產生時的主要產物形式。

將正常和導入外來基因的小鼠組織物與血清進行分析以測定在OPG導入外來是基因小鼠內表現出的OPG分子之本質。由於老鼠OPG cDNA係在肝細胞控制要素之下表現者，因此使用對照小鼠和導入外來基因的小鼠之實質在非還原條件下所得萃取物進行分析(圖18)。於來自導入外來基因的小鼠而非對照小鼠的萃取物中，可順利地偵檢到OPG二體物，以及化學計算量的單體。該OPG二體物和單體物顯得與在經遺傳工程處理過的CHO細胞中表現的重組鼠蛋白質相同。此點強烈地推測OPG二體物確實是基因產物的自然形式，且可能爲關鍵性活性成份，將得自對照小鼠和導入外來基因小鼠的血清樣品也用西方氏吸漬分析進行類似的分析。於對照小鼠中，大部份的OPG蛋白質係以二體物形式移動，同時也偵檢出少量的單體物。此外，也偵檢出明顯量的較大型OPG相關蛋白質，其以與預測的共價鍵聯三體物一致的相對分子量移動。因此，重組OPG在OPG導入外來基因小鼠內主要係表現成二體物蛋白質，且該二體物形式可能爲OPG小鼠內的骨質石化表現型之基礎。OPG重組蛋白質也可以存在於更高分子量的"參體物"形式之中。

於了測定OPG所含的5個C-端半胱胺酸殘基是否在同元二體化中具有作用，乃依上文所述使用the QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene, San Diego, CA)將

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

五、發明說明（ 103）

半胱胺酸殘基195(C195)，C202，C277，C319，和C400的鼠OPG密碼子改變成絲胺酸。然後將該muOPG基因分殖在pcDNA 3.1(+)媒體(Invitrogen, San Diego, CA)的Not I和XbaI兩部位之間。將所得質體，pcDNA 3.1-muOPG，及突變產生引子用Pfu聚合酶在去氧核苷酸存在中處理後，依上述在熱循環器中擴增。取一液份的反應物經由熱震盪轉染到勝任的大腸桿菌XL1-Blue中，然後予以平板培養。從轉形體所得質體DNA再經定序以查證突變。

使用下列引子配對將鼠OPG基因所含半胱胺酸殘基195的密碼子改變成絲胺酸的密碼子，導到muOPG[22-401] C195S蛋白質的產生：

1389-19：

5'-CAC GCA AAA GTC GGG AAT AGA TGT CAC-3' (SEQ ID NO：150)

1406-38：

5'-GTG ACA TCT ATT CCC GAC TTT TGC GTG-3' (SEQ ID NO：151)

使用下列引子配對將鼠OPG基因所含半胱胺酸202的密碼子改變成絲胺酸的密碼子，導致muOPG[22-401] C202S蛋白質之產生：

1389-21：

5'-CAC CCT GTC GGA AGA GGC CTT CTT C-3' (SEQ ID NO：152)

1389-22：

5'-GAA GAA GGC CTC TTC CGA CAG GGT G-3' (1389-22) (SEQ ID NO：153)

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

五、發明說明（ 104)

使用下列引子配對將鼠OPG基因所含半胱胺酸殘基277的密碼子改變成絲胺酸的密碼子，導致muOPG[22-401] C277S蛋白質之產生：

1389-23：

5'-TGA CCT CTC GGA AAG CAG CGT GCA-3' (SEQ ID NO：154)

1389-24：

5'-TGC ACG CTG CTT TCC GAG AGG TCA-3' (SEQ ID NO：155)

使用下列引子配對將鼠OPG基因所含半胱胺酸殘基319的密碼子改成絲胺酸的密碼子，導致muOPG[22-401] C319S蛋白質之產生：

1389-17：

5'-CCT CGA AAT CGA GCG AGC AGC TCC-3' (SEQ ID NO：156)

1389-18：

5'-CGA TTT CGA GGT CTT TCT CGT TCT C-3' (SEQ ID NO：157)

使用下列引子配對將鼠OPG基因所含半胱胺酸殘基400的密碼子改成絲胺酸的密碼子，導致muOPG[22-401] C400S蛋白質的產生：

1406-72：

5'-CCG TGA AAA TAA GCT CGT TAT AAC TAG GAA TGG-3' (SEQ ID NO：158)

1406-75：

5'-CCA TTC CTA GTT ATA ACG AGC TTA TTT TCA CGG-3' (SEQ ID NO：159)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 105)

然後將含有恰當突變的每一所得muOPG[22-401]質體轉染到人類293細胞內，並依上述從調理培養基純化出突變OPG-Fc融合蛋白質。使用實施例11中所述的活體外蝕骨細胞形成檢定來評估每一蛋白質的生物活性。從每一轉形體所得調理培養基經由用於-OPG抗體以非還原性SDS-PAGE和西方吸漬予以分析。

五個C-端半光胺酸殘基中的任何一者之突變導致主要(>90%)爲單體55 kd OPG分子之產生。此強烈地推測該等C-端半胱胺酸殘基一起在OPG同元二體化中產生作用。

構成C-端OPG缺失突變株以製作對OPG同元二體化具重要性的OPG C-端域之染色體圖區。使用可將預成熟停止轉譯信號導到鼠OPG所含C-端區內之引子經由PCR擴增構成OPG突變株。將5'寡核苷酸設計到MuOPG起始密碼子(含有HindIII限制部位)並將3'寡核苷酸(含有停止密碼子和XhoI部位)設計成可將於蘇胺酸殘基200(CT 200)，脯胺酸212(CT 212)，穀胺酸293(CT-293)，或絲胺酸355(CT-355)中任一者終結的muOPG所含C-端區截頭者。

使用下列引子來構成muOPG[22-200]：

1091-39：

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA AG-3'
(SEQ ID NO：160)

1391-91：

5'-CCT CTC TCG AGT CAG GTG ACA TCT ATT CCA CAC TTT TGC

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 106）

GTG GC-3' (1391-91) (SEQ ID NO：161)

使用下列引子來構成muOPG[22-212]：

1091-39：

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA AG-3' (SEQ ID NO：162)

1391-90：

5'-CCT CTC TCG AGT CAA GGA ACA GCA AAC CTG AAG AAG GC-3' (SEQ ID NO：163)

使用下列引子來構成muOPG[22-293]：

1091-39：

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA AG-3' (SEQ ID NO：164)

1391-89：

5'-CCT CTC TCG AGT CAC TCT GTG GTG AGG TTC GAG TGG CC-3' (SEQ ID NO：165)

使用下列引子來構成muOPG[22-355]：

1091-39：

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA AG-3' (SEQ ID NO：166)

1391-88：

5'-CCT CTC TCG AGT CAG GAT GTT TTC AAG TGC TTG AGG GC-3' (SEQ ID NO：167)

然後將含有恰當截頭的每一所得muOPG-ct質體轉染到人

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 107）

類293細胞內，及依上述從調理培養基純化出突變OPG-Fc融合蛋白質。依實施例11中所述活體外蝕骨細胞形成檢定評估每一蛋白質的生物活性。此外也用抗-OPG抗體經由非還原性SDS-PAGE和西方吸漬來分析調理培養基。

OPG C-端區的截頭會影響OPG形成同元二體物的能力。CT 355主要爲單體物，不過有某些二體物會形成。CT 293形成顯得是等莫耳量的單體和二體，以及高分子量的凝集體。不過，CT 212和CT 200皆爲單體物。

實施例10

OPG的純化

A. 哺乳動物OPG-Fc融合蛋白質之純化

依下述從表現OPG-Fc融合蛋白質的293細胞製備5升的調理培養基。將冷凍細胞樣品解凍到10毫升293S培養基中(DMEM-高葡萄糖，1x L-葡萄糖胺，10%熱活化胎牛血清(FBS)和100微克/毫升潮黴素)並於一天後飼與新鮮培養基。三天後，將細胞以1：10和1：20稀釋度分到兩個T175燒瓶內。另外做兩個1：10分流以擴大到200 T175燒瓶。細胞於此點爲後解凍5天。將細胞生長到接近會合(約三天)，於此時將含血清的培養基予以攪動，用25毫升PBS每燒瓶洗細胞一次後，於每一燒瓶中加入25毫升的SF培養基(DMEM-高葡萄糖，1x L-葡萄糖胺)。將細胞保持在5% CO_2三天，於此點，收取培養基，予以離心，並濾過0.45m纖維素硝酸酯濾器(Corning)。

使用在PBS中平衡過的蛋白質G Sepharose管柱(Pharmacia)

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

五、發明說明（ 108）

純化OPG-Fc融合蛋白質。管柱尺寸係依起始培養基的體積而變異。依上述製備成的調理培養基裝載在管柱上，用PBS洗該管柱。並手100 mM甘胺酸pH 2.7洗提純蛋白質。將洗提液份收集到裝著1M Tris pH 9.2的管子內以期儘可能快速地中和。將含蛋白質的部份集中，於Amicon Centricon 10或Centriprep 10中濃縮後，透濾(diafiltered)到PBS中。將純蛋白質貯存在-80℃。

以這種程序純化鼠[22-401]-Fc，鼠[22-180]-Fc，鼠[22-194]-Fc，人類[22-401]-Fc和人類[22-201] Fc。鼠[22-185]-Fc係以這種程序純化的。

B. 抗-OPG抗體之製備

用muOPG[22-401]-Fc融合蛋白質皮下注射三隻紐西蘭白兔子(5-8磅初始重量)。在第一天用乳化在等體積Freunds完全佐劑中的50微克抗體將每一隻兔子免疫化。改用Freunds不完全佐劑以相同的程序進行後續加強(第14和28天)。以EIA監測抗體效價。於第二次加強後，抗血清顯露出高抗體效價，從每一隻動物取得25毫升的生產血液。將血清先通過已固定化鼠OPG-Fc的親和性管柱。用含有1%以冰醋酸的Pierce Gentle Elution Buffer洗提抗-OPG抗體。然後將洗提出的蛋白質透析到PBS中並通過Fc管柱以脫除對OPG融合蛋白質的Fc部份具特定性之任何抗體。將含有抗-OPG特定性抗體的洗提分液透析到PBS中。

C. 鼠OPG[22-401]的純化

抗體親和層析術

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

五、發明說明（ 109）

將經親和純化過的抗-OPG抗體透濾到偶合緩衝液(0.1 M碳酸鈉，pH 8.3，0.5M NaCl)中，並與CNBr-活化sepharose珠粒(Pharmacia)在室溫下混合兩小時。然後用偶合緩衝液充分地洗該樹脂後，用1M乙醇胺(pH 8.0)在室溫下將未經佔住的部位封阻住。接著用低pH洗樹脂(0.1M乙酸鈉pH 4.0，0.5M NaCl)接著以高pH洗(0.1M Tris-HCl pH 8.0，0.5M NaCl)。將最後的洗滌重複三次。將樹脂於最後用PBS平衡後，再填充到管柱內。一填充後，用PBS洗樹脂。用0.1M甘胺酸-HCl，pH 2.5進行對照洗提，接著用PBS再平衡。

將表現muOPG[22-410]的CHO細胞所得濃縮調理培養基以低流速施加到管柱上。用PBS洗該管柱直到在280 nm測得的UV吸光度回歸到基線爲止。先用0.1M甘胺酸-HCl(pH 2.5)從該管柱洗提蛋白質，用PBS再平衡，再用第二種緩衝液(0.1M CAPS，pH 10.5，1M NaCl)洗提。將兩份洗提份分別透濾到PBA內並無菌過濾後，於-20℃下冷凍。

傳統層析術

將CHO細胞調理培養基置於Amicon螺旋盤繞筒(S10Y10)中濃縮23x後，透濾到20mM tris pH 8.0。然後將透濾過的培養基施加到已用20mM tris pH 8.0平衡過的Q-sepharose HP (Pharmacia)管柱。接著洗該管柱直到280 nm的吸光度達到基線爲止。用20管柱體積梯度的0-300mM NaCl/tris pH 8.0)洗提蛋白質。對管柱洗提份以西方氏吸漬偵檢OPG蛋白質。

將含有OPG的洗提份合併並使其達到300mM NaCl，0.2mM DTT的最後濃度。用20mM tris pH 8.0，300mM NaCl，

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 110）

0.2mM DTT平衡NiNTA superose(Qiagen)管柱後，將合併洗提份施加上去。用平衡緩衝液洗該管柱到已達基線吸光度爲止。用0-30mM咪唑梯度/平衡緩衝液從管柱洗提蛋白質。用1M咪唑從管柱洗出殘餘的蛋白質。再度地，用西方氏吸漬來偵檢含OPG的洗提份。

將得自NiNTA管柱的合併洗提份液透析到10mM磷酸鉀pH 7.0，0.2mM DTT之中。然後將透析過的合併液施加到已平衡在10mM磷酸鹽緩衝液中的陶瓷羥磷灰石管柱(Bio-Rad)。在管柱洗滌後，用20管柱體積的10-100mM磷酸鉀梯度洗提蛋白質。其後接著用20管柱體積的100-400mM磷酸鹽梯度洗提。

以考馬斯藍染色SDS-聚丙烯醯胺凝膠及西方氏吸漬偵檢OPG。將洗提份合併並透濾到PBS中，再於-80℃冷凍。純化的蛋白質係以單體形式流跑且在透濾到PBS中之後仍保持如此。於冷凍貯存或貯存在pH 5 4℃下時，該單體具安定性。不過若貯存在4℃ PBS 中時，於一星期後即形成二體物及似乎爲三體物和四體物者。

D. 自大腸桿菌純化人類OPG met[22-401]

將細菌細胞糊用低切變勻化器在5℃下懸浮在10mM EDTA中到15%(w/v)之濃度。然後將細胞以兩次各在5℃下，15,000 psi的勻化予以破裂。將所得勻化物以5,000 x g在5℃離心1小時。將離心丸以低切變勻化洗到水中至原有的勻化體積，接著依前述予以離心。之後，用(最後濃度)6M胍HCl，10mM二硫蘇糖醇，10mM Tris HCl，pH 8.5，溶液將

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

五、發明說明（ 111）

洗過的丸在室溫下溶解化30分鐘。將此溶液稀釋30-倍到含有50 mM CAPS，pH 10.5，1mM還原穀胱甘肽的2M脲中後，置於5℃下攪拌72小時。於25℃下，先用乙酸將此溶液調整到pH 4.5，再於已用25 mM乙酸鈉，pH 4.5平衡過的SP-HP Sepharose樹脂管柱上進行層析術純化出OPG。使用20管柱體積的50 mM至550 mM在相同緩衝液中的線型氯化鈉梯度以0.1管柱體積/分的流速進行管柱洗提。將只含有所欲OPG形式的尖峯洗提份合併，貯存在5℃或經緩衝液交換到磷酸鹽緩衝食鹽水中，予以超濾濃縮，再貯存於5℃下。以逆相HPLC，SDS-PAGE，偵檢內毒素存在性的limulus amebocyte溶裂物檢定，及N-端定序分析該物質。此外，也使用質譜測定法，pH/溫度安定性，螢光，圓偏光二色性，差式掃描熱量測定法，及蛋白酶剖面檢定諸技術來檢驗該蛋白質的折疊本質。

實施例11

重組OPG的生物活性

根據組織學和組織形態學，顯示出在導入外來基因小鼠內的OPG之肝中過度表現明顯地減少蝕骨細胞的數目導致骨組織的明顯增加(參看實施例4)。爲了進一步洞察在這種活體內效應底下的潛在機制，乃在蝕骨細胞形成的活體外培養模型(蝕骨細胞形成檢定)中試驗各種形式的重組OPG。這種培養系統原先係由Udagawa所構想出的(Udagawa et al. Endocrinology 125, 1805-1813(1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7260-7264(1990))且採用骨髓細胞與來自骨髓基質

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

五、發明說明（ 112）

細胞系的細胞之組合。有關這些研究所用此培養系統的修改之說明已在以前發表過(Lacey et al. Endocrinology 136, 2367-2376(1995))。於此方法中，將從小鼠股和脛沖洗出的骨髓細胞置於增補500 U/毫升CSF-1(菌落刺激因子1，也稱爲M-CSF)-一種對單核細胞/巨噬細胞族系的細胞具特定性之造血生長因子-的培養基(含有10%熱活化胎牛血清的α MEM)中培養整個晚上。在此培育之後，收集非吸附性細胞，施以梯度純化，然後與來自骨髓細胞系ST2的細胞共培養(1×10^6非吸附性細胞：1×10^5 ST2細胞/毫升培養基)。用地塞米松(dexamethasone)(100 nM)和稱爲1,25-二羥維生素D3的維生素D3之生物活性代謝物($1,25(OH)_2$ D3，10 nM)補充該培養基。爲了增強蝕骨細胞的出現，於某些培養物中加入前列腺素E2(250 nM)。培養期通常爲8-10天而培養基係每3-4天換新一次，每次將所有補充物新鮮地加入。以不同的間隔，用組織化學染色(Sigma Kit # 387A, Sigma, St. Louis, MO)或TRAP溶液檢定測定培養物的酒石酸鹽酸性磷酸酶(TRAP)之存在。該TRAP組織化學法可用來表現型地鑑定也爲TRAP+的多核(≥3核)細胞之蝕骨細胞。溶液檢定包括將食蝕骨細胞的培養物置於含0.1% Triton X-100的檸檬酸鹽緩衝液(100 mM，pH 5.0)中予以溶裂。然後根據在室溫下3-5分鐘培育中於80 mM酒石酒鈉存在中所發生的對-硝基苯基磷酸酯(20 nM)變成對-硝基酚之轉化測量抗酒石酸性酸性磷酸酶活性。經由添加NaOH到0.5 M之最後濃度終止該反應。測量在405 nm的光學密度並將結果標繪出。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 113）

使用蝕骨細胞形成檢定的先前研究(Udagaws et al. 同上)證明這些細胞可表現出^{125}I-降血鈣素的受體(放射顯跡術)且可在骨表面上造成坑，其在與TRAP陽性結果組合時可確定該多核化細胞具有蝕骨細胞表現型。支持在活體外蝕骨細胞形式檢定中所得多核化細胞的蝕骨細胞表現型之其他證據爲該細胞可在免疫細胞化學中表現αv和β3整合素(integrins)及在原位(in situ)雜合(ISH)中表現降血鈣素受體和TRAP mRNA。

從CHO細胞調理培養基純化出huOPG[22-401]-Fc融合體並於隨後用於蝕骨細胞形成檢定中。在100毫微克/毫升huOPG[22-401]-Fc下，蝕骨細胞形成幾乎100%被抑制(圖19A)。在微滴板洞中所裝溶裂培養物內測得之TRAP水平也會在OPG存在中被抑制，其ID_{50}爲約3毫微克/毫升(圖20)。溶裂物中的TRAP活性水平似乎與TRAP細胞化學所看到的相對蝕骨細胞數目有相互關聯(比較圖19A-19G與20)。經純化的人類IgG1和TNFbp也在此模型中檢驗且經發現沒有抑制或刺激效應，可推測huOPG[22-401]-Fc的抑制效應係來自於融合蛋白質的OPG部份。另外也檢試人類和鼠分子的其他形式且其累積結果都摘錄於表1中。

表1

各種OPG形式對活體外蝕骨細胞形成之影響

OPG構成物	活體外相對生物活性
muOPG[22-401]-Fc	+++
muOPG[22-194]-Fc	+++
muOPG[22-185]-Fc	++
muOPG[22-180]-Fc	-

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 114）

muOPG[22-401]	+++
muOPG[22-401] C195	+++
muOPG[22-401] C202	+
muOPG[22-401] C277	-
muOPG[22-401] C319	+
muOPG[22-401] C400	+
muOPG[22-185]	-
muOPG[22-194]	++
muOPG[22-200]	++
muOPG[22-212]	-
muOPG[22-293]	+++
muOPG[22-355]	+++
huOPG[22-401]-Fc	+++
huOPG[22-201]-Fc	+++
huOPG[22-401]-Fc P26A	+++
huOPG[22-401]-Fc Y28F	+++
huOPG[22-401]	+++
huOPG[27-401]-Fc	++
huOPG[29-401]-Fc	++
huOPG[32-401]-Fc	+/-

+++, ED_{50} = 0.4-2毫微克/毫升

++, ED_{50} = 2-10毫微克/毫升

+, ED_{50} = 10-100毫微克/毫升

-, ED_{50} > 100毫微克/毫升

該累積數據可推測鼠和人類OPG胺基酸序列22-401在融合到Fc域，或未融合時係具有完整活體外活性者。彼等係以劑量依賴性方式抑制且具有在2-10毫微克/毫升範圍內之半-最大活性。鼠C-端在蘇酸殘基180處截頭會使分子抑活化，而在半胱胺酸185及以後者之處截頭時具有完全活性。在位置185處的半胱胺酸殘基經預測係在OPG域4的區域內形成-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 115）

SS3鍵。於先前已證明將其他TNFR-相關蛋白質中的該殘基去除掉時會廢止其生物活性(Yan et al. J. Biol. Chem. 266, 12099-12104 (1994))。我們所發現所muOPG[22-180]-Fc爲不具活性而muOPG[22-185]-Fc爲活性者之事實與這些發現相一致。此點可推斷胺基酸殘基22-185界定一有OPG活性之區。

這些發現顯示如在蝕骨細胞形成檢定中所試驗者，如同導入外來基因而表現的OPG一般，重組OPG蛋白質也會壓抑蝕骨細胞的形成。在連續暴露於OPG的培養物中進行探討TRAP+細胞β3+細胞，F480+細胞的出現之時間過程實驗證明OPG會封阻TRAP+和β3+細胞的出現，但不會封阻F480+細胞。相反地，在對照培養物中於早在建立培養後的第4天即開始出現TRAP+和β3+細胞。而在OPG-處理過的培養物中只能發現F480+細胞且彼等似乎以與對照培養物在質地上相同的數目存在。如此，活體外OPG效應的機制似乎包括在單核細胞-巨噬細胞出現之後但在可表現TRAP或β3整合素的細胞出現之前的蝕骨細胞分化的封阻步驟。這些發現整體地顯示OPG不干擾單核細胞-巨噬細胞前體從骨髓的一般生長和分化，反而顯示OPG會特定地封阻蝕骨細胞從單核細胞-巨噬細胞前體的選擇性分化。

爲了更特定地測定出OPG在蝕骨細胞分化途徑中的何時具有抑制作用，乃採用一種活體外培養方法的變異法。此變異法載於(Lacey et al., 同上)，其採用骨髓巨噬細胞作爲蝕骨細胞前體。該蝕骨細胞前體係經由採取在CSF-1/M-CSF中培育整個晚上後的非吸附性骨髓細胞並將該細胞用1,000-2,000 U/毫升CSF-1再培養4天而衍生得者。於稱爲生長期的

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 116）

4天培養後，取出非吸附性細胞。然後將屬於骨髓巨噬細胞的吸附性細胞在1,000-2,000 U/毫升CSF-1存在中接受各種處理長達2天之久。此二天期稱爲中間分化期。之後，將細胞層再沖洗，接著加入ST-2細胞(1×10^5細胞/毫升)，地塞米松(100 nM)和1,25(OH)2 D3(10 nM)經過至少8天，其稱爲末端分化期。於此末端期中也可以加入試驗藥劑。於此末端期中獲得有關蝕骨細胞分化的表現型標記之資訊(Lacey et al. 同上)。

將huOPG[22-401]-Fc(100毫微克/毫升)於中間分化期，末端分化期，或另外在兩分化期中加入以試驗其在此模型中對蝕骨細胞形成的影響。TRAP細胞化學和溶液兩種檢定都實施。溶液檢定的結果示於圖21中。當huOPG[22-401]-Fc係加在中間期和末端期兩者或只加在末端分化期之時，其會抑制TRAP活性之出現。當其係加到中間期，然後從培養液沖洗掉，則huOPG[22-401]-Fc不會阻斷TRAP活性在培養物溶裂物中出現。細胞化學結果與溶液檢定數據相似。整體而言，這些觀察結果表示huOPG[22-401]-Fc只需要在末端分化期中存在使其施出對蝕骨細胞形成的所有壓抑效應。

B. 活體內IL1-α和IL1-β刺激實驗

IL1於皮下注射到小鼠的頭頂時會系統地及局部地增加骨吸除作用(Boyce et al., Endocrinology 125, 1142-1150 (1989))。其系統性效應可經由高鈣血症程序予以評估而其局部效應可經由評估蝕骨細胞-媒介回應的相對大小予以組織學地評估。這些實驗的目的係爲了測定重組muOPG[22-

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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 117）

401]-Fc在與IL1一般皮下注射到相同的頭頂區時是否會改變IL1的局部性及/或系統性作用。

IL-1β試驗

將4星期大的雄小鼠(ICR瑞士白小鼠)分成下列諸處理組(每組五隻小鼠)：對照組；IL1處理動物組(接受每天一次2.5微克IL-1β注射的小鼠)；低劑量muOPG[22-401]-Fc處理動物組(每天接受三次1微克muOPG[22-401]-Fc注射的小鼠)；低劑量muOPG[22-401]-Fc和IL1-β；高劑量muOPG[22-401]-Fc處理動物組(每天接受三次10微克muOPG[22-401]-Fc注射的小鼠)；高劑量muOPG[22-401]-Fc和IL1-β。所有小鼠都接受相同總數的活性因子注射或媒液注射(0.1%牛血清白蛋白/磷酸鹽緩衝食鹽水)。所有的動物組都在最後一次注射後的該天殺死。於第一次注射之前，第二次注射後4小時及第三次IL1注射後24小時，剛好在動物被殺之前，測量體重和血中游離鈣水平。於殺死後，取出頭頂並處理以製備石蠟切片。

IL1-α實驗

將4星期大的雄小鼠(ICR瑞士白小鼠)分成下列諸處理組(每組5隻)：對照組；IL1-α處理動物(每天接受一次5微克IL1-α注射的小鼠)；低劑量muOPG[22-401]-Fc處理動物(每天接受一次10微克muOPG[22-401]-Fc注射的小鼠)；低劑量muOPG[22-401]-Fc和IL1-α，(劑量如上)；高劑量muOPG[22-401]-Fc處理動物(每天接受三次10微克muOPG[22-401]-Fc注射的小鼠)；高劑量muOPG[22-401]-Fc和IL1-α。所有

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

五、發明說明（ 118）

小鼠都接受每天相同數目的活性因子注射或媒液注射。所有動物組都在最後一次注射後當天殺死。在第一次注射前，第二次注射後四小時和第三次IL1注射後24小時，剛好在動物被殺死之前，測量血液游離鈣水平。在第一次注射之前，第二次注射後四小時及第三次IL1注射後24小時，剛好在殺死動物之前，測量動物的體重。在殺死後，取出頭頂並進行石蠟切片處理。

組織學方法

將頭頂骨固定在鋅福馬林中，於甲酸中去鈣，以乙醇脫水並安置在石蠟中。切片(5微米厚)係從鄰接人字縫的頭頂切出並用蘇木素和曙紅予以染色或針對抗酒石酸鹽性酸性磷酸酶活性進行反應(Sigma Kit # 387A)及用蘇木素予以逆染色。經由用Osteomeasure(Osteometrics, Atlanta, GA)以安裝在顯微鏡上的攝影機明亮接著將組織學特徵示跡在數字化器的滾筒上之組織學方法評估在IL1-α處理小鼠中的骨吸除作用。測定頭頂骨的骨髓空間內的蝕骨細胞數，蝕骨細胞襯底表面，和蝕化表面。頭頂的注射側和無注射側係分開測量者。

結果

IL1-α和IL1-β會在所用劑量下，特別是第二天產生高鈣血症，可能是經由誘導出系統性增加的骨吸除所致。於IL1-β處理小鼠中高鈣血症回應會被muOPG[22-401]-Fc所阻斷且在IL1-α處理小鼠中明顯地減低，一種在第2天最明顯的效應(圖22A-22B)。

圖IL1-α和IL1-β處理過的小鼠之頭頂組織學分析顯示單

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

五、發明說明（ 119）

用IL1處理會使諸種骨吸除指數明顯增加：蝕骨細胞數，蝕骨細胞襯底表面；和蝕穿表面(表面因蝕骨作用而顯示出深扇形)(圖23B，表2)。對於IL1-α和IL1-β的回應而言，骨吸除作用的增加在頭頂的注射側和無注射側面上都類似。MuOPG[22-401] Fc注射會減少IL1-α和-β處理過的小鼠及只接受媒液注射的小鼠之骨吸除作用，但此減少效用只出現於頭頂經muOPG[22-401]-Fc注射過的側邊。

這些觀察結果的最可能解釋爲muOPG[22-401]-Fc會抑制骨吸除作用，爲可由總蝕骨細胞數和正進行骨吸除的可得骨表面之百分比兩者在鄰接muOPG[22-401]-Fc注射部位的區域內同時減低之事實所支持的結論。從組織學來看，muOPG[22-401]-Fc的作用係局部地最顯著，但muOPG[22-401]-Fc也使IL1-誘發高鈣血鈣受挫之事實也可推斷出muOPG[22-401]-Fc對骨吸除作用具有系統地更微妙之影響。

表2. OPG對IL-1注射小鼠體內的骨吸除變數之影響

	蝕骨細胞表面佔骨表面的%(平均值±S.D)		蝕穿表面佔骨表面的%(平均值±S.D)		蝕骨細胞數/平方毫米組織面積(平均值±S.D)	
實驗1	無注射側	注射側	無注射側	注射側	無注射側	注射側
對照組	12.36±3.44	9.54±2.46	8.07±3.90	9.75±3.16	32.51±11.09	23.50±10.83
IL1-β(2.5μg/d)	17.18±1.30	16.0±21.6	40.66±4.28	37.53±10.28	71.80±18.76	60.89±5.16
OPG(40μg/d)	10.12±3.71	5.04±1.66	9.73±4.33	4.19±3.61	32.73±11.09	15.24±7.54
OPG+IL1-β	18.61±2.46	#13.26±2.50	44.87±8.63	#25.94±6.82	69.42±36.29	#47.13±24.26
實驗2						
對照組	11.56±4.22	11.95±2.97	12.67±5.04	10.03±5.13	51.72±23.93	56.03±30.70
IL1-α(5μg/d)	28.81±4.84	23.46±5.76	37.51±5.16	41.10±12.53	113.60±18.04	102.70±32.09
OPG(40μg/d)	14.40±1.00	#4.26±2.54	11.55±4.14	#4.29±3.16	72.28±14.11	#22.65±16.68
OPG+IL1-α	29.58±8.80	#17.83±3.34	33.66±9.21	#24.38±8.88	146.10±42.37	#66.56±15.62

#相對於無注射的差異$p<0.05$(經由配對t試驗)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（120）

C. muOPG[22-401]-Fc在生長中的小鼠體內之系統性影響

將3-4星期大，重量9.2-15.7克的雄BDF1小鼠分成每組十隻的數組。用食鹽水或muOPG[22-401]-Fc 2.5毫克/公斤每日兩次地皮下注射這些小鼠14天(5毫克/公斤/天)。在處理前，第7天和第14天將這些小鼠射線攝影。在最後注射24小時後將小鼠殺死。取出右股，固定在鋅馬福林中，於甲酸內除鈣並包埋在石蠟中。從遠股幹骺端的中區和股軸切出切片。於從生長板的幹骺端限延展經過原發和續發骨鬆質到股幹(軸)的六個相鄰區以組織形態學測定法測定骨密度。每一區皆爲0.5×0.5平方毫米。

射線攝影變化

於處理七天後，在OPG處理小鼠體內相對於對照組已可看到與生長板締合的骨鬆質內出現骨密度增加的區之跡象。該效果在遠股和近脛中期中特別突出(圖24A-24B)。不過，在椎骨體，髂嵴和遠脛中也出現密度增加的帶。於第14天時，不透光區已更延展到股幹和脛幹中，雖則放射不透性的強度已減弱。此外，在實驗完成時股的長度沒有不同或在實驗進行中的長度變化也沒有不同，意謂著OPG不會變更骨生長。

組織學變化

遠股幹骺端顯示出在距生長板1.1至2.65毫米區內有增加的骨密度(圖25和26A-26B)。此爲骨被小鼠內蝕骨細胞媒介骨吸除所迅速脫除掉之區。於這些快速生長中的幼鼠體內，所觀察到的在此區內用OPG處理所致骨增加現象係與骨

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 121）

吸除作用的抑制相一致的。

D.促骨堆積肽對於老鼠卵巢切除所誘發的骨質流失之影響

將十二週大的雌費施爾鼠(Fisher rats)施以卵巢切除術(OVX)或假手術並對遠股幹骺端的骨密度進行雙X射線吸收測定法(DEXA)測量。於三天恢復期後，於14天期間，該等動物接受下述的每天注射：十隻假手術動物接受媒液注射(磷酸鹽緩衝食鹽水)；六隻OVX動物接受OPG-Fc 5毫克/公斤皮下注射；六隻OVX動物接受雌激素(ESTR)40微克/公斤皮下注射。在處理七天和14天後，以DEXA測量動物的骨密度。在最後注射後兩天，殺死動物並切除右脛和合股供組織學評估用。

骨密度DEXA測量顯示出卵巢切除後被OPG-Fc阻斷的骨質密度減少傾向。其效應類似於已知的抗吸除劑雌激素和pamidronate(圖27)。組織形態測定法分析確定用OPG-Fc處理所得這些觀察結果，產生在OVX老鼠中比在未處理的OVX老鼠中明顯較高的骨密度(圖28)。這些結果確立OPG在與卵巢切除後的內源雌激素退去相關的骨質流失中之活性。

活體內概述

重組OPG的活體內作用類似於OPG導入外來基因小鼠體內所看到的變化。OPG導入外來基因小鼠體內所看到的蝕骨細胞數目之減少可經由在正常小鼠和用IL1-α或IL1-β處理過的小鼠之頭頂局部注射重組OPG而複現。OPG導入外來基因小鼠會發展出骨質石化性表現型，其骨髓腔內會漸進地填充入骨質且在出生後第1天起從生長板會延展出未再塑過的

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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 122）

軟骨。對於正常三週大(生長中)的小鼠，OPG處理也會導致軟骨內骨形成區內的骨和未再塑軟骨之保留，一種經由射線攝影術所觀察到且由組織學確定過之效應。因此，重組OPG會在正常動物產生類似於在導入外來基因動物體內看到的表現型之變化且該變化與OPG-誘導出的骨吸除作用之抑制一致。根據活體外蝕骨細胞形成檢定，此抑制作用的一明顯部份係受損的蝕骨細胞形成作用所致。與此假設一致者，OPG會阻斷卵巢切除術誘導的老鼠骨疏鬆病。此模型中的骨質流失係已知爲經活化的蝕骨細胞所促成者，由此暗示OPG在原發性骨疏鬆病治療中的作用。

實施例12

OPG之聚乙二醇化衍生物

經由還原性烷基化製備N-端PEG-OPG拼合物

將 HuOPG met[22-194] P25A 緩衝交換到 25-50 mM NaOAc，pH 4.5-4.8內並濃縮到2-5毫克/毫升。此溶液即用來於5-7℃下以單官能性PEG醛進行OPG還原性烷基化。將線型或分枝的MW=1至57 kDa之PEG單官能醛(可得自Shearwater Polymers)以固體形式可構成2-4莫耳PEG醛/莫耳OPG之量加到該OPG溶液內。在聚合物溶解到蛋白質溶液中之後，用1-1.6 M新製備的在冷去離子水中的儲液將氰硼氫化鈉加到反應混合物內至15至20 mM之最後濃度。經由在G3000SW$_{XL}$管柱(Toso Haas)上用100 mM $NaPO_4$，0.5 M NaCl，10%乙醇，pH 6.9洗提進行尺寸排斥HPLC(size exclusion HPLC)以監測反應的進展和OPG聚乙二醇化的程

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 123）

度。典型地該反應要進行16-18小時，其後，將反應混合物稀釋6-8倍並將pH降低到3.5-4。將反應混合物以離子交換層析術(HP SP HiLoad 16/10, Pharmacia)用20 mM NaOAc pH 4以25管柱體積，30立方米/小時的流速洗提到線型梯度0.75M NaCl予以分段分離。將含有單一，二-或多-聚乙二醇化OPG的洗提份合併並以SEC HPLC和SDS-PAGE鑑定之。經由N-端定序測定出於大部情況中爲主要反應產物的單PEG-OPG拼合物爲98% N-端PEG-改質OPG。

此程序通常是用來製備下列N-端PEG-OPG拼合物(此處的OPG爲HuOPG met [22-194] P25A：5kD monoPEG，10kD mono分支PEG，12 kD monoPEG，20 kD monoPEG，20 kD mono分支PEG，25 kD monoPEG，31 kD monoPEG，57 kD monoPEG，12 kD diPEG，25 kD diPEG，31 kD diPEG，57 kD diPEG，25 kD triPEG。

經由醯基化製備PEG-OPG拼合物

將HuOPG met [22-194] P25A緩衝交換到50 mM BICINE緩衝液，pH 8中並濃縮到2-3毫克/毫升。因此溶液以單官能PEG N-羥基丁二醯亞胺基酯在室溫下進行OPG醯化。將線型或分枝，MW=1至57 kDa的PEG N-羥基丁二醯亞胺基酯(可得自Shearwater Polymers)以固體形式可達到4-8莫耳PEG N-羥基丁二醯亞胺基酯/莫耳OPG之量加到OPG溶液內。用尺寸排斥HPLC在G3000SW$_{XL}$管柱(Toso Haas)上用100 mM $MaPO_4$，0.5 M NaCl，10%乙醇，pH 6.9洗提以監測反應的進展和OPG PEG化之程度。典型地，該反應要進行1小時，

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（ 124）

其後將反應混合物稀釋6-8倍並將pH降到3.5-4。將反應混合物以離子交換層析術(HP SP HiLoad 16/10, Pharmacia)用20 mM NaOAc pH4，於25管柱體積以30立方米/小時流速到0.75 M NaCl之線型梯度洗提分段分離。將單-，雙-或多-PEG化OPG的洗提液份合併並用SEC HPLC和SDS-PAGE予以鑑定。

此程序通用地用來製備下列PEG-OPG拼合物：5 kD多PEG，20 kD多PEG，40 kD多分枝PEG，50 kD多PEG。

三體物PEG-OPG之製備

將HuOPG met[22-194] P25A置於近乎中性pH的磷酸鹽緩衝液中以1-3毫克/毫升濃度準備硫醇化之用。於保持pH在7.0之下，將S-乙醯基氫硫基丁二酸酐(AMSA)以3-7倍莫耳超量加入並在4℃下將反應攪拌2小時。以離子交換層析術從未改質和多硫醇化OPG中分離出單硫醇化-OPG並用羥胺處理以脫除經保護硫醇的保護基。於去保護之後，以凝膠過濾去除羥胺並對所得單硫醇化-OPG施以各種硫醇特定性交聯化學。爲了產生雙硫鍵結二體物，與以>1毫克/毫升的硫醇化OPG經由透析到微鹼性磷酸鹽緩衝液中進行空氣氧化。經由用雙-順丁烯二醯亞胺交聯劑，N,N-雙(3-順丁烯二醯亞胺基丙醯基)-2-羥基1,3丙烷與該硫醇化OPG(>1毫克/毫升)於0.6x交聯劑：OPG莫耳比例下在pH 6.5磷酸鹽緩衝液中反應而製備共價硫醚OPG二體物。類似地，經由用次化學計算量的雙-順丁烯二醯亞安PEG交聯劑與>1毫克/毫升硫醇化OPG在磷酸鹽緩衝液pH 6.5內反應而製成PEG亞鈴。任何種

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 127）

序列表

(1) 一般資訊：

(i) 申請者：Amgen Inc.

(ii) 發明名稱：促骨堆積肽

(iii) 序列數目：168

(iv) 通信地址：

(A) 收件人：Amgen Inc.

(B) 街名：1840 Dehavilland Drive

(C) 市名：Thousand Oaks

(D) 州名：加州

(E) 國名：美國

(F) 郵遞區號：91320

(v) 計算機可讀形式：

(A) 媒體類別：軟磁片

(B) 計算機：IBM PC相容

(C) 操作系統：PC-DOS/MS-DOS

(D) 軟體：PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) 現行申請數據：

(A) 申請編號：

(B) 提申日期：

(C) 分類：

(viii) 代理律師/代理人：

(A) 名稱：Winter, Robert B.

(B) 參考文件檔號：A-378-CIP2

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 128）

(2) SEQ ID NO：1的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：36鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：1：

AAAGGAAGGA AAAAAGCGGC CGCTACANNN NNNNNT 36

(2) SEQ ID NO：2的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：16鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：2：

TCGACCCACG CGTCCG 16

(2) SEQ ID NO：3的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：12鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：3：

GGTGCGCAG GC 12

(2) SEQ ID NO：4的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：18鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 129）

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：4：

TGTAAAACGA CGGCCAGT 18

(2) SEQ ID NO：5的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：18鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：5：

CAGGAAACAG CTATGACC 18

(2) SEQ ID NO：6的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：20鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：6：

CAATTAACCC TCACTAAAGG 20

(2) SEQ ID NO：7的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：23鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：7：

GCATTATGAC CCAGAAACCG GAC 23

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 130）

(2) SEQ ID NO：8的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：23鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：8：

AGGTAGCGCC CTTCCTCACA TTC 23

(2) SEQ ID NO：9的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：30鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：9：

GACTAGTCCC ACAATGAACA AGTGGCTGTG 30

(2) SEQ ID NO：10的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：45鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：10：

ATAAGAATGC GGCCGCTAAA CTATGAAACA GCCCAGTGAC CATTC 45

(2) SEQ ID NO：11的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：21鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 131）

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：11：

GCCTCTAGAA AGAGCTGGGA C 21

(2) SEQ ID NO：12的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：21鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：12：

CGCCGTGTTC CATTTATGAG C 21

(2) SEQ ID NO：13的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：24鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：13：

ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTG 24

(2) SEQ ID NO：14的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：24鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：14：

GTTGCACTCC TGTTTCACGG TCTG 24

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 132）

(2) SEQ ID NO：15的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：24鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：15：

CAAGACACCT TGAAGGGCCT GATG 24

(2) SEQ ID NO：16的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：24鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：16：

TAACTTTTAC AGAAGAGCAT CAGC 24

(2) SEQ ID NO：17的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：33鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：17：

AGCGCGGCCG CATGAACAAG TGGCTGTGCT GCG 33

(2) SEQ ID NO：18的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：31鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 133）

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：18：

AGCTCTAGAG AAACAGCCCA GTGACCATTC C 31

(2) SEQ ID NO：19的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：24鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：19：

GTGAAGCTGT GCAAGAACCT GATG 24

(2) SEQ ID NO：20的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：24鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：20：

ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTG 24

(2) SEQ ID NO：21的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：24鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：21：

CAGATCCTGA AGCTGCTCAG TTTG 24

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 134）

(2) SEQ ID NO：22的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：33鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：22：

AGCGCGGCCG CGGGGACCAC AATGAACAAG TG 33

(2) SEQ ID NO：23的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：33鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：23：

AGCTCTAGAA TTGTGAGGAA ACAGCTCAAT GGC 33

(2) SEQ ID NO：24的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：39鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：24：

ATAGCGGCCG CTGAGCCCAA ATCTTGTGAC AAAACTCAC 39

(2) SEQ ID NO：25的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：45鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 135）

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：25：

TCTAGAGTCG ACTTATCATT TACCCGGAGA GAGGGAGAGG CTCTT 45

(2) SEQ ID NO：26的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：38鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：26：

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG 38

(2) SEQ ID NO：27的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：43鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：27：

CCTCTGCGGC CGCTAAGCAG CTTATTTTCA CGGATTGAAC CTG 43

(2) SEQ ID NO：28的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：38鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：28：

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG 38

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 136）

(2) SEQ ID NO：29的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：24鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：29：

TCCGTAAGAA ACAGCCCAGT GACC 24

(2) SEQ ID NO：30的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：31鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：30：

CCTCTGCGGC CGCTGTTGCA TTTCCTTTCT G 31

(2) SEQ ID NO：31的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：19胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：31：

Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His
1 5 10 15

Gln Leu Leu

(2) SEQ ID NO：32的資訊：

(i) 序列特性：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 137）

(A) 長度：21鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：32：

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T 21

(2) SEQ ID NO：33的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：34鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：33：

CCTCTGCGGC CGCACACACG TTGTCATGTG TTGC 34

(2) SEQ ID NO：34的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：21鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：34：

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T 21

(2) SEQ ID NO：35的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：34鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA

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

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 138）

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：35：

CCTCTGCGGC CGCCTTTTGC GTGGCTTCTC TGTT 34

(2) SEQ ID NO：36的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：37鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：36：

CCTCTGAGCT CAAGCTTGGT TTCCGGGGAC CACAATG 37

(2) SEQ ID NO：37的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：38鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：37：

CCTCTGCGGC CGCTAAGCAG CTTATTTTA CTGAATGG 38

(2) SEQ ID NO：38的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：37鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：38：

CCTCTGAGCT CAAGCTTGGT TTCCGGGGAC CACAATG 37

(2) SEQ ID NO：39的資訊：

(i) 序列特性：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 139）

(A) 長度：33鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：39：

CCTCTGCGGC CGCCAGGGTA ACATCTATTC CAC 33

(2) SEQ ID NO：40的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：35鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：40：

CCGAAGCTTC CACCATGAAC AAGTGGCTGT GCTGC 35

(2) SEQ ID NO：41的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：40鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：41：

CCTCTGTCGA CTATTATAAG CAGCTTATTT TCACGGATTG 40

(2) SEQ ID NO：42的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：21鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 140）

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：42：

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T 21

(2) SEQ ID NO：43的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：35鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：43：

CCTCTGTCGA CTTAACACAC GTTGTCATGT GTTGC 35

(2) SEQ ID NO：44的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：21鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：44：

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T 21

(2) SEQ ID NO：45的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：35鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：45：

CCTCTGTCGA CTTACTTTTG CGTGGCTTCT CTGTT 35

(2) SEQ ID NO：46的資訊：

(i) 序列特性：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 141）

(A) 長度：1537鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：46：

```
GTGAAGAGCG TGAAGAGCGG TTCCTCCTTT CAGCAAAAAA CCCCTCAAGA CCCGTTTAGA      60
GGCCCCAAGG GGTTATGCTA GTTATTGCTC AGCGGTGGCA GCAGCCAACT CAGCTTCCTT     120
TCGGGCTTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTTCC GCGGATCCTC GAGTAAGCTT CCATGGTACC     180
CTGCAGGTCG ACACTAGTGA GCTCGAATTC CAACGCGTTA ACCATATGTT ATTCCTCCTT     240
TAATTAGTTA AAACAAATCT AGAATCAAAT CGATTAATCG ACTATAACAA ACCATTTTCT     300
TGCGTAAACC TGTACGATCC TACAGGTACT TATGTTAAAC AATTGTATTT CAAGCGATAT     360
AATAGTGTGA CAAAAATCCA ATTTATTAGA ATCAAATGTC AATCTATTAC CGTTTTAATG     420
ATATATAACA CGCAAAACTT GCGACAAACA ATAGGTAAGG ATAAAGAGAT GGGTATGAAA     480
GACATAAATG CCGACGACAC TTACAGAATA ATTAATAAAA TTAAAGCCTG TAGAAGCAAT     540
AATGATATTA ATCAATGCTT ATCTGATATG ACTAAAATGG TACATTGTGA ATATTATTTA     600
CTCGCGATCA TTTATCCTCA TTCTATGGTT AAATCTGATA TTTCAATTCT GGATAATTAC     660
CCTAAAAAAT GGAGGCAATA TTATGATGAC GCTAATTTAA TAAAATATGA TCCTATAGTA     720
GATTATTCTA ACTCCAATCA TTCACCGATT AATTGGAATA TATTTGAAAA CAATGCTGTA     780
AATAAAAAAT CTCCAAATGT AATTAAAGAA GCGAAATCAT CAGGTCTTAT CACTGGGTTT     840
AGTTTCCCTA TTCATACTGC TAATAATGGC TTCGGAATGC TTAGTTTTGC ACATTCAGAG     900
AAAGACAACT ATATAGATAG TTTATTTTTA CATGCGTGTA TGAACATACC ATTAATTGTT     960
CCTTCTCTAG TTGATAATTA TCGAAAAATA AATATAGCAA ATAATAAATC AAACAACGAT    1020
TTAACCAAAA GAGAAAAAGA ATGTTTAGCG TGGGCATGCG AAGGAAAAAG CTCTTGGGAT    1080
ATTTCAAAAA TATTAGGCTG TAGTAAGCGC ACGGTCACTT TCCATTTAAC CAATGCGCAA    1140
ATGAAACTCA ATACAACAAA CCGCTGCCAA AGTATTTCTA AAGCAATTTT AACAGGAGCA    1200
ATTGATTGCC CATACTTTAA AAGTTAAGTA CGACGTCCAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA    1260
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 142）

ATAAACAAAA GAGTTTGTAG AAACGCAAAA AGGCCATCCG TCAGGATGGC CTTCTGCTTA 1320

ATTTGATGCC TGGCAGTTTA TGGCGGGCGT CCTGCCCGCC ACCCTCCGGG CCGTTGCTTC 1380

GCAACGTTCA AATCCGCTCC CGGCGGATTT GTCCTACTCA GGAGAGCGTT CACCGACAAA 1440

CAACAGATAA AACGAAAGGC CCAGTCTTTC GACTGAGCCT TTCGTTTTAT TTGATGCCTG 1500

GCAGTTCCCT ACTCTCGCAT GGGGAGACCA TGCATAC 1537

(2) SEQ ID NO：47的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：48鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：47：

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCATCCA 48

(2) SEQ ID NO：48的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：55鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：48：

CGATTTGATT CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGTTAACGC GTTGGAATTC GGTAC 55

(2) SEQ ID NO：49的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：49鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 143）

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：49：

CGAATTCCAA CGCGTTAACC ATATGTTATT CCTCCTTCTA GAATCAAAT 49

(2) SEQ ID NO：50的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：1546鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：50：

GCGTAACGTA TGCATGGTCT CCCCATGCGA GAGTAGGGAA CTGCCAGGCA TCAAATAAAA 60

CGAAAGGCTC AGTCGAAAGA CTGGGCCTTT CGTTTTATCT GTTGTTTGTC GGTGAACGCT 120

CTCCTGAGTA GGACAAATCC GCCGGGAGCG GATTTGAACG TTGCGAAGCA ACGGCCCGGA 180

GGGTGGCGGG CAGGACGCCC GCCATAAACT GCCAGGCATC AAATTAAGCA GAAGGCCATC 240

CTGACGGATG GCCTTTTTGC GTTTCTACAA ACTCTTTTGT TTATTTTTCT AAATACATTC 300

AAATATGGAC GTCGTACTTA ACTTTTAAAG TATGGGCAAT CAATTGCTCC TGTTAAAATT 360

GCTTTAGAAA TACTTTGGCA GCGGTTTGTT GTATTGAGTT TCATTTGCGC ATTGGTTAAA 420

TGGAAAGTGA CCGTGCGCTT ACTACAGCCT AATATTTTTG AAATATCCCA AGAGCTTTTT 480

CCTTCGCATG CCCACGCTAA ACATTCTTTT TCTCTTTTGG TTAAATCGTT GTTTGATTTA 540

TTATTTGCTA TATTTATTTT TCGATAATTA TCAACTAGAG AAGGAACAAT TAATGGTATG 600

TTCATACACG CATGTAAAAA TAAACTATCT ATATAGTTGT CTTTCTCTGA ATGTGCAAAA 660

CTAAGCATTC CGAAGCCATT ATTAGCAGTA TGAATAGGGA AACTAAACCC AGTGATAAGA 720

CCTGATGATT TCGCTTCTTT AATTACATTT GGAGATTTTT TATTTACAGC ATTGTTTTCA 780

AATATATTCC AATTAATCGG TGAATGATTG GAGTTAGAAT AATCTACTAT AGGATCATAT 840

TTTATTAAAT TAGCGTCATC ATAATATTGC CTCCATTTTT TAGGGTAATT ATCCAGAATT 900

GAAATATCAG ATTTAACCAT AGAATGAGGA TAAATGATCG CGAGTAAATA ATATTCACAA 960

TGTACCATTT TAGTCATATC AGATAAGCAT TGATTAATAT CATTATTGCT TCTACAGGCT 1020

TTAATTTTAT TAATTATTCT GTAAGTGTCG TCGGCATTTA TGTCTTTCAT ACCCATCTCT 1080

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 144）

TTATCCTTAC CTATTGTTTG TCGCAAGTTT TGCGTGTTAT ATATCATTAA AACGGTAATA 1140

GATTGACATT TGATTCTAAT AAATTGGATT TTTGTCACAC TATTATATCG CTTGAAATAC 1200

AATTGTTTAA CATAAGTACC TGTAGGATCG TACAGGTTTA CGCAAGAAAA TGGTTTGTTA 1260

TAGTCGATTA ATCGATTTGA TTCTAGATTT GTTTTAACTA ATTAAAGGAG GAATAACATA 1320

TGGTTAACGC GTTGGAATTC GAGCTCACTA GTGTCGACCT GCAGGGTACC ATGGAAGCTT 1380

ACTCGAGGAT CCGCGGAAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAAGC CCGAAAGGAA GCTGAGTTGG 1440

CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA TAACTAGCAT AACCCCTTGG GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA 1500

GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA GGAACCGCTC TTCACGCTCT TCACGC 1546

(2) SEQ ID NO：51的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：47鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：51：

TATGAAACAT CATCACCATC ACCATCATGC TAGCGTTAAC GCGTTGG 47

(2) SEQ ID NO：52的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：49鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：52：

AATTCCAACG CGTTAACGCT AGCATGATGG TGATGGTGAT GATGTTTCA 49

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 145）

(2) SEQ ID NO：53的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：141鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：53：

```
CTAATTCCGC TCTCACCTAC CAAACAATGC CCCCCTGCAA AAAATAAATT CATATAAAAA      60

ACATACAGAT AACCATCTGC GGTGATAAAT TATCTCTGGC GGTGTTGACA TAAATACCAC     120

TGGCGGTGAT ACTGAGCACA T                                               141
```

(2) SEQ ID NO：54的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：147鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：54：

```
CGATGTGCTC AGTATCACCG CCAGTGGTAT TTATGTCAAC ACCGCCAGAG ATAATTTATC      60

ACCGCAGATG GTTATCTGTA TGTTTTTTAT ATGAATTTAT TTTTTGCAGG GGGGCATTGT     120

TTGGTAGGTG AGAGCGGAAT TAGACGT                                         147
```

(2) SEQ ID NO：55的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：55鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：55：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 146）

CGATTTGATT CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGTTAACGC GTTGGAATTC GGTAC 55

(2) SEQ ID NO：56的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：49鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：56：

CGAATTCCAA CGCGTTAACC ATATGTTATT CCTCCTTCTA GAATCAAAT 49

(2) SEQ ID NO：57的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：668鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：57：

GTGAAGAGCG TGAAGAGCGG TTCCTCCTTT CAGCAAAAAA CCCCTCAAGA CCCGTTTAGA 60

GGCCCCAAGG GGTTATGCTA GTTATTGCTC AGCGGTGGCA GCAGCCAACT CAGCTTCCTT 120

TCGGGCTTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTTCC GCGGATCCTC GAGTAAGCTT CCATGGTACC 180

CTGCAGGTCG ACACTAGTGA GCTCGAATTC CAACGCGTTA ACCATATGTT ATTCCTCCTT 240

TAATTAGTTA ACTCAAATCT AGAATCAAAT CGATAAATTG TGAGCGCTCA CAATTGAGAA 300

TATTAATCAA GAATTTTAGC ATTTGTCAAA TGAATTTTTT AAAAATTATG AGACGTCCAT 360

ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAA GAGTTTGTAG AAACGCAAAA AGGCCATCCG 420

TCAGGATGGC CTTCTGCTTA ATTTGATGCC TGGCAGTTTA TGGCGGGCGT CCTGCCCGCC 480

ACCCTCCGGG CCGTTGCTTC GCAACGTTCA AATCCGCTCC CGGCGGATTT GTCCTACTCA 540

GGAGAGCGTT CACCGACAAA CAACAGATAA AACGAAAGGC CCAGTCTTTC GACTGAGCCT 600

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 147）

TTCGTTTTAT TTGATGCCTG GCAGTTCCCT ACTCTCGCAT GGGGAGACCA TGCATACGTT 660

ACGCACGT 668

(2) SEQ ID NO：58的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：726鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：58：

GCGTAACGTA TGCATGGTCT CCCCATGCGA GAGTAGGGAA CTGCCAGGCA TCAAATAAAA 60

CGAAAGGCTC AGTCGAAAGA CTGGGCCTTT CGTTTTATCT GTTGTTTGTC GGTGAACGCT 120

CTCCTGAGTA GGACAAATCC GCCGGGAGCG GATTTGAACG TTGCGAAGCA ACGGCCCGGA 180

GGGTGGCGGG CAGGACGCCC GCCATAAACT GCCAGGCATC AAATTAAGCA GAAGGGGCCT 240

CCCACCGCCC GTCCTGCGGG CGGTATTTGA CGGTCCGTAG TTTAATTCGT CTTCGCCATC 300

CTGACGGATG GCCTTTTTGC GTTTCTACAA ACTCTTTTGT TTATTTTTCT AAATACATTC 360

AAATATGGAC GTCTCATAAT TTTTAAAAAA TTCATTTGAC AAATGCTAAA ATTCTTGATT 420

AATATTCTCA ATTGTGAGCG CTCACAATTT ATCGATTTGA TTCTAGATTT GTTTTAACTA 480

ATTAAAGGAG GAATAACATA TGGTTAACGC GTTGGAATTC GAGCTCACTA GTGTCGACCT 540

GCAGGGTACC ATGGAAGCTT ACTCGAGGAT CCGCGGAAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAAGC 600

CCGAAAGGAA GCTGAGTTGG CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA TAACTAGCAT AACCCCTTGG 660

GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA GGAACCGCTC TTCACGCTCT 720

TCACGC 726

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 148）

(2) SEQ ID NO：59的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：44鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：59：

TACGACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTTACTGATT GGAC 44

(2) SEQ ID NO：60的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：27鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：60：

GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAAC 27

(2) SEQ ID NO：61的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：102鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：61：

TATGGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTCCGCCGG GTACCCGGCG 60

GACATTTATC ACACAGCAGC TGATGAGAAG TTTCTTCATC CA 102

(2) SEQ ID NO：62的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：19胺基酸

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 149）

(B) 類別：胺基酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：蛋白質
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：62：

```
Met Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro
1               5                  10                  15

Gly Thr Tyr
```

(2) SEQ ID NO：63的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：84鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：63：

```
TATGGAAACT TTTCCTCCAA AATATCTTCA TTATGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT      60

GTGTGATAAA TGTCCGCCGG GTAC                                            84
```

(2) SEQ ID NO：64的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：78鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：64：

```
CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCATCATAA TGAAGATATT      60

TTGGAGGAAA AGTTTCCA                                                   78
```

(2) SEQ ID NO：65的資訊：
(i) 序列特性：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 150）

(A) 長度：44鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：65：

TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTCACGGATT GAAC 44

(2) SEQ ID NO：66的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：38鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：66：

GTGCTCCTGG TACCTACCTA AAACAGCACT GCACAGTG 38

(2) SEQ ID NO：67的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：84鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：67：

TATGGAAACT CTGCCTCCAA AATACCTGCA TTACGATCCG GAAACTGGTC ATCAGCTGCT 60

GTGTGATAAA TGTGCTCCGG GTAC 84

(2) SEQ ID NO：68的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：78鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 151）

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：68：

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT 60

TTGGAGGCAG AGTTTCCA 78

(2) SEQ ID NO：69的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：54鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：69：

TATGGACCCA GAAACTGGTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTGCTCCGG GTAC 54

(2) SEQ ID NO：70的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：48鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：70：

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC TGGGTCCA 48

(2) SEQ ID NO：71的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：87鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：71：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 152）

TATGAAAGAA ACTCTGCCTC CAAAATACCT GCATTACGAT CCGGAAACTG GTCATCAGCT 60

GCTGTGTGAT AAATGTGCTC CGGGTAC 87

(2) SEQ ID NO：72的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：81鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：72：

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT 60

TTGGAGGCAG AGTTTCTTTC A 81

(2) SEQ ID NO：73的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：71鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：73：

GTTCTCCTCA TATGAAACAT CATCACCATC ACCATCATGA AACTCTGCCT CCAAAATACC 60

TGCATTACGA T 71

(2) SEQ ID NO：74的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：43鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：74：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 153）

CTTCTCCTCA TATGAAAGAA ACTCTGCCTC CAAAATACCT GCA 43

(2) SEQ ID NO：75的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：76鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：75：

TACGCACTGG ATCCTTAATG ATGGTGATGG TGATGATGTA AGCAGCTTAT TTTCACGGAT 60

TGAACCTGAT TCCCTA 76

(2) SEQ ID NO：76的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：47鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：76：

GTTCTCCTCA TATGAAATAC CTGCATTACG ATCCGGAAAC TGGTCAT 47

(2) SEQ ID NO：77的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：43鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：77：

GTTCTCCTAT TAATGAAATA TCTTCATTAT GATGAAGAAA CTT 43

(2) SEQ ID NO：78的資訊：

(i) 序列特性：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 154）

(A) 長度：40鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：78：

TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTTACTGATT 40

(2) SEQ ID NO：79的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：40鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：79：

GTTCTCCTCA TATGGAAACT CTGCCTCCAA AATACCTGCA 40

(2) SEQ ID NO：80的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：43鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：80：

TACGCACTGG ATCCTTATGT TGCATTTCCT TTCTGAATTA GCA 43

(2) SEQ ID NO：81的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：18鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 155）

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：81：

CCGGAAACAG ATAATGAG 18

(2) SEQ ID NO：82的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：18鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：82：

GATCCTCATT ATCTGTTT 18

(2) SEQ ID NO：83的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：30鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：83：

CCGGAAACAG AGAAGCCACG CAAAAGTAAG 30

(2) SEQ ID NO：84的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：30鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：84：

GATCCTTACT TTTGCGTGGC TTCTCTGTTT 30

(2) SEQ ID NO：85的資訊：

(i) 序列特性：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 156）

(A) 長度：12鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：85：

TATGTTAATG AG 12

(2) SEQ ID NO：86的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：14鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：86：

GATCCTCATT AACA 14

(2) SEQ ID NO：87的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：21鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：87：

TATGTTCCGG AAACAGTTAA G 21

(2) SEQ ID NO：88的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：23鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 157）

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：88：

GATCCTTAAC TGTTTCCGGA ACA 23

(2) SEQ ID NO：89的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：36鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：89：

TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATAAG 36

(2) SEQ ID NO：90的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：38鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：90：

GATCCTTATT TTTGAGTTGA TTCACTGTTT CCGGAACA 38

(2) SEQ ID NO：91的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：100鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：91：

CTAGCGACGA CGACGACAAA GAAACTCTGC CTCCAAAATA CCTGCATTAC GATCCGGAAA 60

CTGGTCATCA GCTGCTGTGT GATAAATGTG CTCCGGGTAC 100

(2) SEQ ID NO：92的資訊：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 158）

(i) 序列特性：
(A) 長度：92鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：92：

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT 60

TTGGAGGCAG AGTTTCTTTG TCGTCGTCGT CG 92

(2) SEQ ID NO：93的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：26鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：93：

ACAAACACAA TCGATTTGAT ACTAGA 26

(2) SEQ ID NO：94的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：50鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：94：

TTTGTTTTAA CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATATGAGAGG ATCGCATCAC 50

(2) SEQ ID NO：95的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：50鹼對
(B) 類別：核酸

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 159）

(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：95：

CATCACCATC ACGAAACCTT CCCGCCGAAA TACCTGCACT ACGACGAAGA 50

(2) SEQ ID NO：96的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：49鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：96：

AACCTCCCAC CAGCTGCTGT GCGACAAATG CCCGCCGGGT ACCCAAACA 49

(2) SEQ ID NO：97的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：26鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：97：

TGTTTGGGTA CCCGGCGGGC ATTTGT 26

(2) SEQ ID NO：98的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：50鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：98：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 160）

CGCACAGCAG CTGGTGGGAG GTTTCTTCGT CGTAGTGCAG GTATTTCGGC 50

(2) SEQ ID NO：99的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：49鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：99：

GGGAAGGTTT CGTGATGGTG ATGGTGATGC GATCCTCTCA TATTTTATT 49

(2) SEQ ID NO：100的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：50鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：100：

CCTCCTTTAA TTAGTTAAAA CAAATCTAGT ATCAAATCGA TTGTGTTTGT 50

(2) SEQ ID NO：101的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：59鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：101：

ACAAACACAA TCGATTTGAT ACTAGATTTG TTTTAACTAA TTAAAGGAGG AATAAAATG 59

(2) SEQ ID NO：102的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：48鹼對

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 161）

(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：102：

CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATGAAAGAAA CTTTTCCTCC AAAATATC 48

(2) SEQ ID NO：103的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：31鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：103：

TGTTTGGGTA CCCGGCGGAC ATTTATCACA C 31

(2) SEQ ID NO：104的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：59鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：104：

ACAAACACAA TCGATTTGAT ACTAGATTTG TTTTAACTAA TTAAAGGAGG AATAAAATG 59

(2) SEQ ID NO：105的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：54鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：105：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 162）

CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATGAAAAAAA AAGAAACTTT TCCTCCAAAA TATC 54

(2) SEQ ID NO：106的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：31鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：106：

TGTTTGGGTA CCCGGCGGAC ATTTATCACA C 31

(2) SEQ ID NO：107的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：44鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：107：

CAGCCCGGGT AAAATGGAAA CGTTTCCTCC AAAATATCTT CATT 44

(2) SEQ ID NO：108的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：44鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：108：

CGTTTCCATT TTACCCGGGC TGAGCGAGAG GCTCTTCTGC GTGT 44

(2) SEQ ID NO：109的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：45鹼對

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 163）

(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：109：

CGCTCAGCCC GGGTAAAATG GAAACGTTGC CTCCAAAATA CCTGC 45

(2) SEQ ID NO：110的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：39鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：110：

CCATTTTACC CGGGCTGAGC GAGAGGCTCT TCTGCGTGT 39

(2) SEQ ID NO：111的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：36鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：111：

GAAAATAAGC TGCTTAGCTG CAGCTGAACC AAAATC 36

(2) SEQ ID NO：112的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：34鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：112：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 164）

CAGCTGCAGC TAAGCAGCTT ATTTTCACGG ATTG 34

(2) SEQ ID NO：113的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：36鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：113：

AAAAATAAGC TGCTTAGCTG CAGCTGAACC AAAATC 36

(2) SEQ ID NO：114的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：35鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：114：

CAGCTGCAGC TAAGCAGCTT ATTTTTACTG ATTGG 35

(2) SEQ ID NO：115的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：102鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：115：

CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGAAACTTT TGCTCCAAAA TATCTTCATT ATGATGAAGA 60

AACTAGTCAT CAGCTGCTGT GTGATAAATG TCCGCCGGGT AC 102

(2) SEQ ID NO：116的資訊：

(i) 序列特性：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 165）

(A) 長度：94鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：116：

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACTAGTTTC TTCATCATAA TGAAGATATT 60

TTGGAGCAAA AGTTTCCATA TGTTATTCCT CCTT 94

(2) SEQ ID NO：117的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：62鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：117：

CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGAAACTTT TCCTGCTAAA TATCTTCATT ATGATGAAGA 60

AA 62

(2) SEQ ID NO：118的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：62鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：118：

CTAGTTTCTT CATCATAATG AAGATATTTA GCAGGAAAAG TTTCCATATG TTATTCCTCC 60

TT 62

(2) SEQ ID NO：119的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：51胺基酸

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 166）

(B) 類別：胺基酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：蛋白質
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：119：

```
Tyr His Tyr Tyr Asp Gln Asn Gly Arg Met Cys Glu Glu Cys His Met
1               5                  10                  15

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

Asp Thr Val Cys His Lys Pro Cys Glu Pro Gly Val Thr Tyr Thr Asp
        35                  40                  45

Asp Trp His
    50
```

(2) SEQ ID NO：120的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：2432鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(ix) 特徵：
(A) 名稱/關鍵詞：CDS
(B) 位置：124...1326
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：120：

```
ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTGTTGCCC AGACCTTATA TAAAACGTCA TGTTCGCCTG      60

GGCAGCAGAG AAGCACCTAG CACTGGCCCA GCGGCTGCCG CCTGAGGTTT CCAGAGGACC     120

ACA ATG AAC AAG TGG CTG TGC TGT GCA CTC CTG GTG TTC TTG GAC ATC        168
    Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile
      1               5                  10                  15

ATT GAA TGG ACA ACC CAG GAA ACC TTT CCT CCA AAA TAC TTG CAT TAT        216
Ile Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr
                20                  25                  30
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 167）

```
GAC CCA GAA ACC GGA CGT CAG CTC TTG TGT GAC AAA TGT GCT CCT GGC        264
Asp Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly
               35                  40                  45

ACC TAC CTA AAA CAG CAC TGC ACA GTC AGG AGG AAG ACA CTG TGT GTC        312
Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val
          50                  55                  60

CCT TGC CCT GAC TAC TCT TAT ACA GAC AGC TGG CAC ACG AGT GAT GAA        360
Pro Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu
      65                  70                  75

TGC GTG TAC TGC AGC CCC GTG TGC AAG GAA CTG CAG ACC GTG AAA CAG        408
Cys Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln
 80                  85                  90                  95

GAG TGC AAC CGC ACC CAC AAC CGA GTG TGC GAA TGT GAG GAA GGG CGC        456
Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg
                100                 105                 110

TAC CTG GAG CTC GAA TTC TGC TTG AAG CAC CGG AGC TGT CCC CCA GGC        504
Tyr Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly
            115                 120                 125

TTG GGT GTG CTG CAG GCT GGG ACC CCA GAG CGA AAC ACG GTT TGC AAA        552
Leu Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys
        130                 135                 140

AGA TGT CCG GAT GGG TTC TTC TCA GGT GAG ACG TCA TCG AAA GCA CCC        600
Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro
    145                 150                 155

TGT AGG AAA CAC ACC AAC TGC AGC TCA CTT GGC CTC CTG CTA ATT CAG        648
Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Gln
160                 165                 170                 175

AAA GGA AAT GCA ACA CAT GAC AAT GTA TGT TCC GGA AAC AGA GAA GCA        696
Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala
                180                 185                 190

ACT CAA AAT TGT GGA ATA GAT GTC ACC CTG TGC GAA GAG GCA TTC TTC        744
Thr Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe
            195                 200                 205

AGG TTT GCT GTG CCT ACC AAG ATT ATA CCG AAT TGG CTG AGT GTT CTG        792
Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu
        210                 215                 220

GTG GAC AGT TTG CCT GGG ACC AAA GTG AAT GCA GAG AGT GTA GAG AGG        840
Val Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg
    225                 230                 235
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 168）

```
ATA AAA CGG AGA CAC AGC TCG CAA GAG CAA ACT TTC CAG CTA CTT AAG        888
Ile Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys
240                 245                 250                 255

CTG TGG AAG CAT CAA AAC AGA GAC CAG GAA ATG GTG AAG AAG ATC ATC        936
Leu Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile
                260                 265                 270

CAA GAC ATT GAC CTC TGT GAA AGC AGT GTG CAA CGG CAT ATC GGC CAC        984
Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Ile Gly His
            275                 280                 285

GCG AAC CTC ACC ACA GAG CAG CTC CGC ATC TTG ATG GAG AGC TTG CCT       1032
Ala Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Arg Ile Leu Met Glu Ser Leu Pro
        290                 295                 300

GGG AAG AAG ATC AGC CCA GAC GAG ATT GAG AGA ACG AGA AAG ACC TGC       1080
Gly Lys Lys Ile Ser Pro Asp Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys
    305                 310                 315

AAA CCC AGC GAG CAG CTC CTG AAG CTA CTG AGC TTG TGG AGG ATC AAA       1128
Lys Pro Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys
320                 325                 330                 335

AAT GGA GAC CAA GAC ACC TTG AAG GGC CTG ATG TAC GCA CTC AAG CAC       1176
Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His
                340                 345                 350

TTG AAA GCA TAC CAC TTT CCC AAA ACC GTC ACC CAC AGT CTG AGG AAG       1224
Leu Lys Ala Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys
            355                 360                 365

ACC ATC AGG TTC TTG CAC AGC TTC ACC ATG TAC CGA TTG TAT CAG AAA       1272
Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys
        370                 375                 380

CTC TTT CTA GAA ATG ATA GGG AAT CAG GTT CAA TCA GTG AAG ATA AGC       1320
Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser
    385                 390                 395

TGC TTA TAGTTAGGAA TGGTCACTGG GCTGTTTCTT CAGGATGGGC CAACACTGAT        1376
Cys Leu
400

GGAGCAGATG GCTGCTTCTC CGGCTCTTGA AATGGCAGTT GATTCCTTTC TCATCAGTTG     1436

GTGGGAATGA AGATCCTCCA GCCCAACACA CACACTGGGG AGTCTGAGTC AGGAGAGTGA     1496

GGCAGGCTAT TTGATAATTG TGCAAAGCTG CCAGGTGTAC ACCTAGAAAG TCAAGCACCC     1556
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 169）

```
TGAGAAAGAG GATATTTTTA TAACCTCAAA CATAGGCCCT TTCCTTCCTC TCCTTATGGA    1616

TGAGTACTCA GAAGGCTTCT ACTATCTTCT GTGTCATCCC TAGATGAAGG CCTCTTTTAT    1676

TTATTTTTTT ATTCTTTTTT TCGGAGCTGG GGACCGAACC CAGGGCCTTG CGCTTGCGAG    1736

GCAAGTGCTC TACCACTGAG CTAAATCTCC AACCCCTGAA GGCCTCTTTC TTTCTGCCTC    1796

TGATAGTCTA TGACATTCTT TTTTCTACAA TTCGTATCAG GTGCACGAGC CTTATCCCAT    1856

TTGTAGGTTT CTAGGCAAGT TGACCGTTAG CTATTTTTCC CTCTGAAGAT TTGATTCGAG    1916

TTGCAGACTT GGCTAGACAA GCAGGGGTAG GTTATGGTAG TTTATTTAAC AGACTGCCAC    1976

CAGGAGTCCA GTGTTTCTTG TTCCTCTGTA GTTGTACCTA AGCTGACTCC AAGTACATTT    2036

AGTATGAAAA ATAATCAACA AATTTTATTC CTTCTATCAA CATTGGCTAG CTTTGTTTCA    2096

GGGCACTAAA AGAAACTACT ATATGGAGAA AGAATTGATA TTGCCCCCAA CGTTCAACAA    2156

CCCAATAGTT TATCCAGCTG TCATGCCTGG TTCAGTGTCT ACTGACTATG CGCCCTCTTA    2216

TTACTGCATG CAGTAATTCA ACTGGAAATA GTAATAATAA TAATAGAAAT AAAATCTAGA    2276

CTCCATTGGA TCTCTCTGAA TATGGGAATA TCTAACTTAA GAAGCTTTGA GATTTCAGTT    2336

GTGTTAAAGG CTTTTATTAA AAAGCTGATG CTCTTCTGTA AAAGTTACTA ATATATCTGT    2396

AAGACTATTA CAGTATTGCT ATTTATATCC ATCCAG                              2432
```

(2) SEQ ID NO：121的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：401胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：121：

```
Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile Ile
 1               5                  10                  15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
            20                  25                  30
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 170）

```
Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr
          35                  40                  45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro
      50                  55                  60

Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
 65                  70                  75                  80

Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln Glu
                 85                  90                  95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr
            100                 105                 110

Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Leu
        115                 120                 125

Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
    130                 135                 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
145                 150                 155                 160

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys
                165                 170                 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr
            180                 185                 190

Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
        195                 200                 205

Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
    210                 215                 220

Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
225                 230                 235                 240

Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
                245                 250                 255

Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln
            260                 265                 270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
        275                 280                 285

Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Arg Ile Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
    290                 295                 300
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 171）

```
Lys Lys Ile Ser Pro Asp Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys
305                 310                 315                 320

Pro Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
                325                 330                 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu
            340                 345                 350

Lys Ala Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr
        355                 360                 365

Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu
    370                 375                 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
385                 390                 395                 400

Leu
```

(2) SEQ ID NO：122的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：1324鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(ix) 特徵：

(A) 名稱/關鍵詞：CDS

(B) 位置：90...1292

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：122：

```
CCTTATATAA ACGTCATGAT TGCCTGGGCT GCAGAGACGC ACCTAGCACT GACCCAGCGG      60

CTGCCTCCTG AGGTTTCCCG AGGACCACA ATG AAC AAG TGG CTG TGC TGC GCA       113
                                Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala
                                  1               5

CTC CTG GTG CTC CTG GAC ATC ATT GAA TGG ACA ACC CAG GAA ACC CTT       161
Leu Leu Val Leu Leu Asp Ile Ile Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu
     10                  15                  20
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 172）

```
CCT CCA AAG TAC TTG CAT TAT GAC CCA GAA ACT GGT CAT CAG CTC CTG          209
Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu
 25                  30                  35                  40

TGT GAC AAA TGT GCT CCT GGC ACC TAC CTA AAA CAG CAC TGC ACA GTG          257
Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val
                 45                  50                  55

AGG AGG AAG ACA TTG TGT GTC CCT TGC CCT GAC CAC TCT TAT ACG GAC          305
Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp
             60                  65                  70

AGC TGG CAC ACC AGT GAT GAG TGT GTG TAT TGC AGC CCA GTG TGC AAG          353
Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys
         75                  80                  85

GAA CTG CAG TCC GTG AAG CAG GAG TGC AAC CGC ACC CAC AAC CGA GTG          401
Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val
     90                  95                 100

TGT GAG TGT GAG GAA GGG CGT TAC CTG GAG ATC GAA TTC TGC TTG AAG          449
Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys
105                 110                 115                 120

CAC CGG AGC TGT CCC CCG GGC TCC GGC GTG GTG CAA GCT GGA ACC CCA          497
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro
                125                 130                 135

GAG CGA AAC ACA GTT TGC AAA AAA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA GGT          545
Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly
            140                 145                 150

GAG ACT TCA TCG AAA GCA CCC TGT ATA AAA CAC ACG AAC TGC AGC ACA          593
Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Ile Lys His Thr Asn Cys Ser Thr
        155                 160                 165

TTT GGC CTC CTG CTA ATT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAT GAC AAC GTG          641
Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val
    170                 175                 180

TGT TCC GGA AAC AGA GAA GCC ACG CAA AAG TGT GGA ATA GAT GTC ACC          689
Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr
185                 190                 195                 200

CTG TGT GAA GAG GCC TTC TTC AGG TTT GCT GTT CCT ACC AAG ATT ATA          737
Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile
                205                 210                 215
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 173）

```
CCA AAT TGG CTG AGT GTT TTG GTG GAC AGT TTG CCT GGG ACC AAA GTG        785
Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val
            220                 225                 230

AAT GCC GAG AGT GTA GAG AGG ATA AAA CGG AGA CAC AGC TCA CAA GAG        833
Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu
        235                 240                 245

CAA ACC TTC CAG CTG CTG AAG CTG TGG AAA CAT CAA AAC AGA GAC CAG        881
Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln
    250                 255                 260

GAA ATG GTG AAG AAG ATC ATC CAA GAC ATT GAC CTC TGT GAA AGC AGC        929
Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser
265                 270                 275                 280

GTG CAG CGG CAT CTC GGC CAC TCG AAC CTC ACC ACA GAG CAG CTT CTT        977
Val Gln Arg His Leu Gly His Ser Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu
                285                 290                 295

GCC TTG ATG GAG AGC CTG CCT GGG AAG AAG ATC AGC CCA GAA GAG ATT       1025
Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile
            300                 305                 310

GAG AGA ACG AGA AAG ACC TGC AAA TCG AGC GAG CAG CTC CTG AAG CTA       1073
Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu
        315                 320                 325

CTC AGT TTA TGG AGG ATC AAA AAT GGT GAC CAA GAC ACC TTG AAG GGC       1121
Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly
    330                 335                 340

CTG ATG TAT GCC CTC AAG CAC TTG AAA ACA TCC CAC TTT CCC AAA ACT       1169
Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr
345                 350                 355                 360

GTC ACC CAC AGT CTG AGG AAG ACC ATG AGG TTC CTG CAC AGC TTC ACA       1217
Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr
                365                 370                 375

ATG TAC AGA CTG TAT CAG AAG CTC TTT TTA GAA ATG ATA GGG AAT CAG       1265
Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln
            380                 385                 390

GTT CAA TCC GTG AAA ATA AGC TGC TTA TAACTAGGAA TGGTCACTGG             1312
Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
        395                 400

GCTGTTTCTT CA                                                        1324
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 174）

(2) SEQ ID NO：123的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：401胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：123：

```
Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Leu Leu Asp Ile Ile
 1               5                  10                  15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
            20                  25                  30

Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr
        35                  40                  45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro
    50                  55                  60

Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
65                  70                  75                  80

Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu
                85                  90                  95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr
            100                 105                 110

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys
    130                 135                 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
145                 150                 155                 160

Ile Lys His Thr Asn Cys Ser Thr Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys
                165                 170                 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr
            180                 185                 190

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
        195                 200                 205
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 175）

```
Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
    210                 215                 220

Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
225                 230                 235                 240

Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
                245                 250                 255

Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln
            260                 265                 270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Leu Gly His Ser
        275                 280                 285

Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
    290                 295                 300

Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys
305                 310                 315                 320

Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
                325                 330                 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu
            340                 345                 350

Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr
        355                 360                 365

Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu
    370                 375                 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
385                 390                 395                 400

Leu
```

(2) SEQ ID NO：124的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：1355鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 176）

(ix) 特徵：

(A) 名稱/關鍵詞：CDS

(B) 位置：94...1296

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：124：

```
GTATATATAA CGTGATGAGC GTACGGGTGC GGAGACGCAC CGGAGCGCTC GCCCAGCCGC        60

CGCTCCAAGC CCCTGAGGTT TCCGGGGACC ACA ATG AAC AAG TTG CTG TGC TGC        114
                                     Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys
                                       1               5

GCG CTC GTG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG        162
Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr
         10                  15                  20

TTT CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG        210
Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu
     25                  30                  35

TTG TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA        258
Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr
 40                  45                  50                  55

GCA AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CCT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA        306
Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr
                 60                  65                  70

GAC AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TGC AGC CCC GTG TGC        354
Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys
             75                  80                  85

AAG GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC        402
Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg
         90                  95                  100

GTG TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTG        450
Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu
    105                 110                 115

AAA CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA GTG GTG CAA GCT GGA ACC        498
Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr
120                 125                 130                 135

CCA GAG CGA AAT ACA GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA        546
Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser
                140                 145                 150
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 177）

```
AAT GAG ACG TCA TCT AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT        594
Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser
            155                 160                 165

GTC TTT GGT CTC CTG CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC        642
Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn
        170                 175                 180


ATA TGT TCC GGA AAC AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA GAT GTT        690
Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val
    185                 190                 195

ACC CTG TGT GAG GAG GCA TTC TTC AGG TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT        738
Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe
200                 205                 210                 215

ACG CCT AAC TGG CTT AGT GTC TTG GTA GAC AAT TTG CCT GGC ACC AAA        786
Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys
                220                 225                 230

GTA AAC GCA GAG AGT GTA GAG AGG ATA AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA        834
Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln
            235                 240                 245

GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA TGG AAA CAT CAA AAC AAA GCC        882
Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Ala
        250                 255                 260

CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA GAT ATT GAC CTC TGT GAA AAC        930
Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn
    265                 270                 275

AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC TTC GAG CAG CTT        978
Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu
280                 285                 290                 295

CGT AGC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG GGA GCA GAA GAC       1026
Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp
                300                 305                 310

ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC CAG ATC CTG AAG       1074
Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys
            315                 320                 325

CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA GAC ACC TTG AAG       1122
Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys
        330                 335                 340
```


本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（ 178）

```
GGC CTA ATG CAC GCA CTA AAG CAC TCA AAG ACG TAC CAC TTT CCC AAA      1170
Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys
    345                 350                 355

ACT GTC ACT CAG AGT CTA AAG AAG ACC ATC AGG TTC CTT CAC AGC TTC      1218
Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe
360                 365                 370                 375

ACA ATG TAC AAA TTG TAT CAG AAG TTA TTT TTA GAA ATG ATA GGT AAC      1266
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn
                380                 385                 390

CAG GTC CAA TCA GTA AAA ATA AGC TGC TTA TAACTGGAAA TGGCCATTGA        1316
Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
            395                 400

GCTGTTTCCT CACAATTGGC GAGATCCCAT GGATGATAA                          1355
```

(2) SEQ ID NO：125的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：401胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：125：

```
Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile
 1               5                  10                  15

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
            20                  25                  30

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr
        35                  40                  45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro
    50                  55                  60

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
65                  70                  75                  80

Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu
                85                  90                  95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr
            100                 105                 110
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 179）

```
Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe
        115                 120                 125

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
    130                 135                 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
145                 150                 155                 160

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys
                165                 170                 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr
            180                 185                 190

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
        195                 200                 205

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
    210                 215                 220

Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
225                 230                 235                 240

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
                245                 250                 255

Trp Lys His Gln Asn Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln
            260                 265                 270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
        275                 280                 285

Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
    290                 295                 300

Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys
305                 310                 315                 320

Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
                325                 330                 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser
            340                 345                 350

Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr
        355                 360                 365

Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu
    370                 375                 380
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 180）

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
385 390 395 400

Leu

(2) SEQ ID NO：126的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：139胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：126：

Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys
1 5 10 15

Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro
20 25 30

Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala
35 40 45

Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys
50 55 60

Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr
65 70 75 80

Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn
85 90 95

Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His
100 105 110

Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly
115 120 125

Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys
130 135

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 181）

(2) SEQ ID NO：127的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：48鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：127：

```
CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCATCCA                48
```

(2) SEQ ID NO：128的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：219胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：128：

```
Met Leu Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala
1               5                  10                  15

Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser
            20                  25                  30

Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn
        35                  40                  45

Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro
    50                  55                  60

Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro
65                  70                  75                  80
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 182）

```
Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
                 85                  90                  95

Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
            100                 105                 110

Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg
        115                 120                 125

Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
    130                 135                 140

Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
145                 150                 155                 160

Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp
                165                 170                 175

Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg
            180                 185                 190

Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly
        195                 200                 205

Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr
    210                 215
```

(2) SEQ ID NO：129的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：280胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：129：

```
Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
1               5                  10                  15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
            20                  25                  30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
        35                  40                  45
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 183）

```
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50                  55                  60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65                  70                  75                  80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
                85                  90                  95

Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
            100                 105                 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
        115                 120                 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
    130                 135                 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145                 150                 155                 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
                165                 170                 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
            180                 185                 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
        195                 200                 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
    210                 215                 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
225                 230                 235                 240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
                245                 250                 255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
            260                 265                 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr
        275                 280
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 184）

(2) SEQ ID NO：130的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：207胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：130：

```
Met Leu Arg Leu Ile Ala Leu Leu Val Cys Val Val Tyr Val Tyr Gly
1               5                  10                  15

Asp Asp Val Pro Tyr Ser Ser Asn Gln Gly Lys Cys Gly Gly His Asp
            20                  25                  30

Tyr Glu Lys Asp Gly Leu Cys Cys Ala Ser Cys His Pro Gly Phe Tyr
        35                  40                  45

Ala Ser Arg Leu Cys Gly Pro Gly Ser Asn Thr Val Cys Ser Pro Cys
    50                  55                  60

Glu Asp Gly Thr Phe Thr Ala Ser Thr Asn His Ala Pro Ala Cys Val
65                  70                  75                  80

Ser Cys Arg Gly Pro Cys Thr Gly His Leu Ser Glu Ser Gln Pro Cys
                85                  90                  95

Asp Arg Thr His Asp Arg Val Cys Asn Cys Ser Thr Gly Asn Tyr Cys
            100                 105                 110

Leu Leu Lys Gly Gln Asn Gly Cys Arg Ile Cys Ala Pro Gln Thr Lys
        115                 120                 125

Cys Pro Ala Gly Tyr Gly Val Ser Gly His Thr Arg Ala Gly Asp Thr
    130                 135                 140

Leu Cys Glu Lys Cys Pro Pro His Thr Tyr Ser Asp Ser Leu Ser Pro
145                 150                 155                 160

Thr Glu Arg Cys Gly Thr Ser Phe Asn Tyr Ile Ser Val Gly Phe Asn
                165                 170                 175

Leu Tyr Pro Val Asn Glu Thr Ser Cys Thr Thr Thr Ala Gly His Asn
            180                 185                 190
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 185）

Glu Val Ile Lys Thr Lys Glu Phe Thr Val Thr Leu Asn Tyr Thr
195 200 205

(2) SEQ ID NO：131的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：227胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：131：

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 186）

```
Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
            180                 185                 190

Asn Ala Ser Arg Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
        195                 200                 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
    210                 215                 220

Gln His Thr
225
```

(2) SEQ ID NO：132的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：197胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：132：

```
Met Val Ser Leu Pro Arg Leu Cys Ala Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1               5                  10                  15

Ala Val His Leu Gly Gln Cys Val Thr Cys Ser Asp Lys Gln Tyr Leu
            20                  25                  30

His Asp Gly Gln Cys Cys Asp Leu Cys Gln Pro Gly Ser Arg Leu Thr
        35                  40                  45

Ser His Cys Thr Ala Leu Glu Lys Thr Gln Cys His Pro Cys Asp Ser
    50                  55                  60

Gly Glu Phe Ser Ala Gln Trp Asn Arg Glu Ile Arg Cys His Gln His
65                  70                  75                  80

Arg His Cys Glu Pro Asn Gln Gly Leu Arg Val Lys Lys Glu Gly Thr
                85                  90                  95

Ala Glu Ser Asp Thr Val Cys Thr Cys Lys Glu Gly Gln His Cys Thr
            100                 105                 110

Ser Lys Asp Cys Glu Ala Cys Ala Gln His Thr Pro Cys Ile Pro Gly
        115                 120                 125
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 187）

```
Phe Gly Val Met Glu Met Ala Thr Glu Thr Thr Asp Thr Val Cys His
    130                 135                 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Gln Ser Ser Leu Phe Glu Lys
145                 150                 155                 160

Cys Tyr Pro Trp Thr Ser Cys Glu Asp Lys Asn Leu Glu Val Leu Gln
                165                 170                 175

Lys Gly Thr Ser Gln Thr Asn Val Ile Cys Gly Leu Lys Ser Arg Met
            180                 185                 190

Arg Ala Leu Leu Val
        195
```

(2) SEQ ID NO：133的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：208胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：133：

```
Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile Ile
1               5                   10                  15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
            20                  25                  30

Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr
        35                  40                  45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro
    50                  55                  60

Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
65                  70                  75                  80

Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln Glu
                85                  90                  95
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 188）

```
Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr
            100                 105                 110

Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Leu
        115                 120                 125

Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
    130                 135                 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
145                 150                 155                 160

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys
                165                 170                 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr
            180                 185                 190

Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
        195                 200                 205
```

(2) SEQ ID NO：134的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：224胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：134：

```
Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu
1               5                   10                  15

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys
            20                  25                  30

Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn
        35                  40                  45

Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys
    50                  55                  60
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 189）

```
Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr
65                  70                  75                  80

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser
                85                  90                  95

Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly
            100                 105                 110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys
        115                 120                 125

Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr
    130                 135                 140

Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His
145                 150                 155                 160

Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln
                165                 170                 175

Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro
            180                 185                 190

Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
        195                 200                 205

Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile
    210                 215                 220
```

(2) SEQ ID NO：135的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：205胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：135：

```
Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Phe Leu Leu Leu Gly Leu
1               5                   10                  15

Ser Leu Gly Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro
            20                  25                  30
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 190）

```
Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val
        35                  40                  45

Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro
    50                  55                  60

Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr
65                  70                  75                  80

Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro
                85                  90                  95

Thr Glu Asp Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln
            100                 105                 110

Asp Ser Ser His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly
        115                 120                 125

His Phe Ser Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys
    130                 135                 140

Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp
145                 150                 155                 160

Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr
                165                 170                 175

Gln Arg Thr Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp
            180                 185                 190

Pro Arg Thr Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val
        195                 200                 205
```

(2) SEQ ID NO：136的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：191胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：136：

```
Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
1               5                   10                  15
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 191）

```
Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro
        35                  40                  45

Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys
    50                  55                  60

Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr
65                  70                  75                  80

His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
                85                  90                  95

Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
            100                 105                 110

Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
        115                 120                 125

Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
    130                 135                 140

Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro
145                 150                 155                 160

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
                165                 170                 175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu
            180                 185                 190
```

(2) SEQ ID NO：137的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：54鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：137：

```
TATGGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTCCGCCGG GTAC      54
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 192）

(2) SEQ ID NO：138的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：380胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：138：

```
Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His
1               5                  10                  15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His
            20                  25                  30

Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro Cys Pro Asp His Ser
        35                  40                  45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Val Tyr Cys Ser Pro
    50                  55                  60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His
65                  70                  75                  80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe
                85                  90                  95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser Gly Val Val Gln Ala
            100                 105                 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys Cys Pro Asp Gly Phe
        115                 120                 125

Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Ile Lys His Thr Asn
    130                 135                 140

Cys Ser Thr Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys Gly Asn Ala Thr His
145                 150                 155                 160

Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr Gln Lys Cys Gly Ile
                165                 170                 175

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr
            180                 185                 190
```


本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

五、發明說明（ 193）

```
Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Ser Leu Pro Gly
        195                 200                 205

Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Arg His Ser
    210                 215                 220

Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn
225                 230                 235                 240

Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys
                245                 250                 255

Glu Ser Ser Val Gln Arg His Leu Gly His Ser Asn Leu Thr Thr Glu
            260                 265                 270

Gln Leu Leu Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Ile Ser Pro
        275                 280                 285

Glu Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys Ser Ser Glu Gln Leu
    290                 295                 300

Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr
305                 310                 315                 320

Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu Lys Thr Ser His Phe
                325                 330                 335

Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr Met Arg Phe Leu His
            340                 345                 350

Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile
        355                 360                 365

Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
    370                 375                 380
```

(2) SEQ ID NO：139的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：380胺基酸

(B) 類別：胺基酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 194）

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：139：

```
Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His
1               5                  10                  15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His
            20                  25                  30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr
        35                  40                  45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro
    50                  55                  60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His
65                  70                  75                  80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe
                85                  90                  95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala
            100                 105                 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe
        115                 120                 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn
    130                 135                 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His
145                 150                 155                 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile
                165                 170                 175

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr
            180                 185                 190

Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly
        195                 200                 205

Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser
    210                 215                 220

Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn
225                 230                 235                 240

Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys
                245                 250                 255
```


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 195）

```
Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu
            260                 265                 270

Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala
        275                 280                 285

Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile
    290                 295                 300

Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr
305                 310                 315                 320

Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe
                325                 330                 335

Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His
            340                 345                 350

Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile
        355                 360                 365

Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
    370                 375                 380
```

(2) SEQ ID NO：140的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：30鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：140：

TGGACCACCC AGAAGTACCT TCATTATGAC 30

(2) SEQ ID NO：141的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：30鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 196）

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：141：

GTCATAATGA AGGTACTTCT GGGTGGTCCA 30

(2) SEQ ID NO：142的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：31鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：142：

GGACCACCCA GCTTCATTAT GACGAAGAAA C 31

(2) SEQ ID NO：143的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：31鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：143：

GTTTCTTCGT CATAATGAAG CTGGGTGGTC C 31

(2) SEQ ID NO：144的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：29鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：144：

GTGGACCACC CAGGACGAAG AAACCTCTC 29

(2) SEQ ID NO：145的資訊：

(i) 序列特性：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 197）

(A) 長度：29鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：145：

GAGAGGTTTC TTCGTCCTGG GTGGTCCAC 29

(2) SEQ ID NO：146的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：29鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：146：

CGTTTCCTCC AAAGTTCCTT CATTATGAC 29

(2) SEQ ID NO：147的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：29鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：147：

GTCATAATGA AGGAACTTTG GAGGAAACG 29

(2) SEQ ID NO：148的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：32鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 198）

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：148：

GGAAACGTTT CCTGCAAAGT ACCTTCATTA TG 32

(2) SEQ ID NO：149的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：32鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：149：

CATAATGAAG GTACTTTGCA GGAAACGTTT C 32

(2) SEQ ID NO：150的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：27鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：150：

CACGCAAAAG TCGGGAATAG ATGTCAC 27

(2) SEQ ID NO：151的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：27鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：151：

GTGACATCTA TTCCCGACTT TTGCGTG 27

(2) SEQ ID NO：152的資訊：

(i) 序列特性：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 199）

(A) 長度：25鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：152：

CACCCTGTCG GAAGAGGCCT TCTTC 25

(2) SEQ ID NO：153的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：25鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：153：

GAAGAAGGCC TCTTCCGACA GGGTG 25

(2) SEQ ID NO：154的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：24鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：154：

TGACCTCTCG GAAAGCAGCG TGCA 24

(2) SEQ ID NO：155的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：24鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 200）

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：155：

TGCACGCTGC TTTCCGAGAG GTCA 24

(2) SEQ ID NO：156的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：24鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：156：

CCTCGAAATC GAGCGAGCAG CTCC 24

(2) SEQ ID NO：157的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：25鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：157：

CGATTTCGAG GTCTTTCTCG TTCTC 25

(2) SEQ ID NO：158的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：33鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：158：

CCGTGAAAAT AAGCTCGTTA TAACTAGGAA TGG 33

(2) SEQ ID NO：159的資訊：

(i) 序列特性：

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 201）

(A) 長度：33鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：159：

CCATTCCTAG TTATAACGAG CTTATTTTCA CGG 33

(2) SEQ ID NO：160的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：38鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：160：

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG 38

(2) SEQ ID NO：161的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：44鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA
(xi) 序列說明：SEQ ID NO：161：

CCTCTCTCGA GTCAGGTGAC ATCTATTCCA CACTTTTGCG TGGC 44

(2) SEQ ID NO：162的資訊：
(i) 序列特性：
(A) 長度：38鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型
(ii) 分子類別：cDNA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 202）

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：162：

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG 38

(2) SEQ ID NO：163的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：38鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：163：

CCTCTCTCGA GTCAAGGAAC AGCAAACCTG AAGAAGGC 38

(2) SEQ ID NO：164的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：38鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：164：

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG 38

(2) SEQ ID NO：165的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：38鹼對

(B) 類別：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：165：

CCTCTCTCGA GTCACTCTGT GGTGAGGTTC GAGTGGCC 38

(2) SEQ ID NO：166的資訊：

(i) 序列特性：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 203）

(A) 長度：38鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：166：

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG 38

(2) SEQ ID NO：167的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：38鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：cDNA

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：167：

CCTCTCTCGA GTCAGGATGT TTTCAAGTGC TTGAGGGC 38

(2) SEQ ID NO：168的資訊：

(i) 序列特性：

(A) 長度：16鹼對
(B) 類別：核酸
(C) 股型：單股
(D) 拓樸學：線型

(ii) 分子類別：蛋白質

(xi) 序列說明：SEQ ID NO：168：

Met Lys His His His His His His His Ala Ser Val Asn Ala Leu Glu
1 5 10 15

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：促骨堆積肽）

本發明揭示一種新穎的分泌多肽，稱爲促骨堆積肽，其爲腫瘤壞死因子受體超族的一成員且其參與骨新陳代謝的調節。此外也揭示編碼促骨堆積肽的核酸，多肽，供表現用的重組媒體和宿主細胞，結合OPG的抗體，及醫藥組合物。該多肽可用來治療具有增加的吸除現象之特徵的骨病例如骨稀鬆病。

英文發明摘要（發明之名稱："OSTEOPROTEGERIN"）

The present invention discloses a novel secreted polypeptide, termed osteoprotegerin, which is a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and is involved in the regulation of bone metabolism. Also disclosed are nucleic acids encoding osteoprotegerin, polypeptides, recombinant vectors and host cells for expression, antibodies which bind OPG, and pharmaceutical compositions. The polypeptides are used to treat bone diseases characterized by increased resorption such as osteoporosis.

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

圖 1A

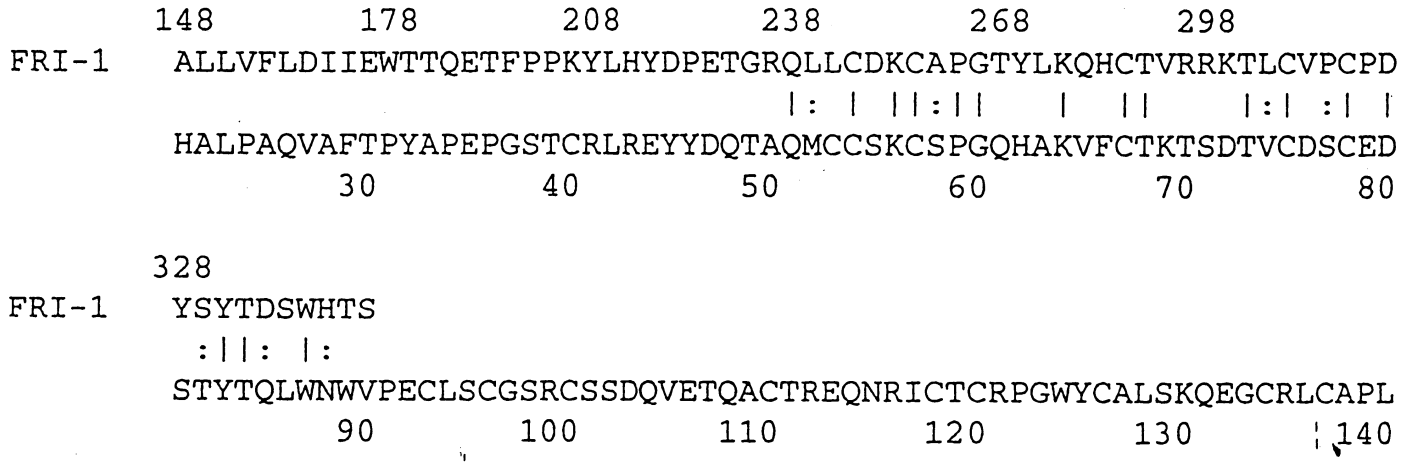
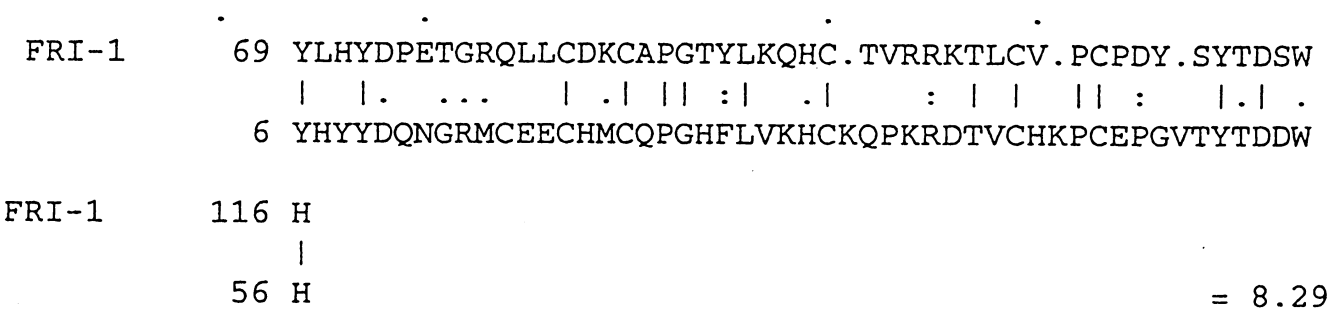


圖 1B



I221482

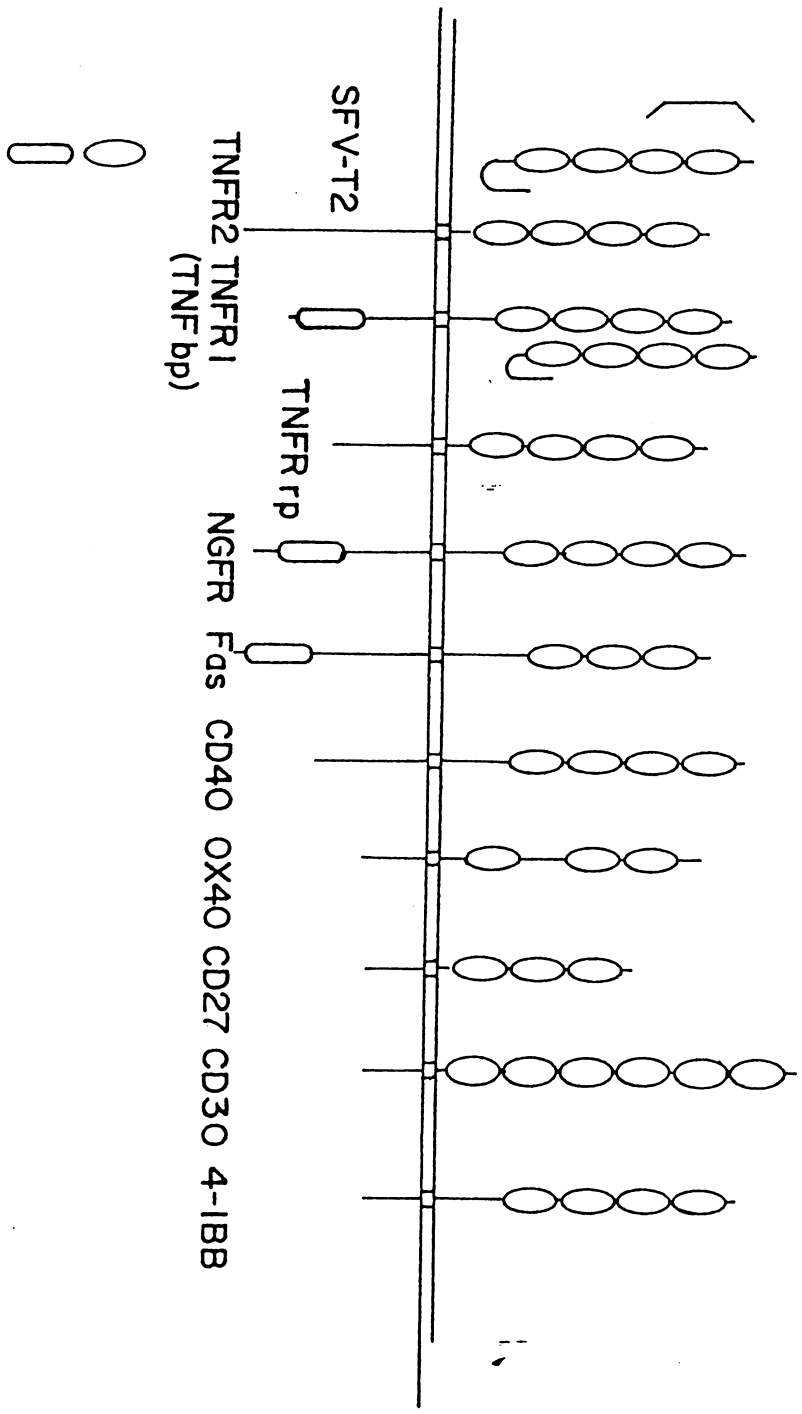

SFV-T2
TNFR2 TNFR1
(TNF bp)
TNFR rp
NGFR Fas CD40 OX40 CD27 CD30 4-1BB

圖 1C

圖 2A

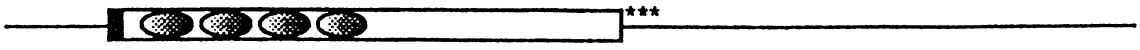


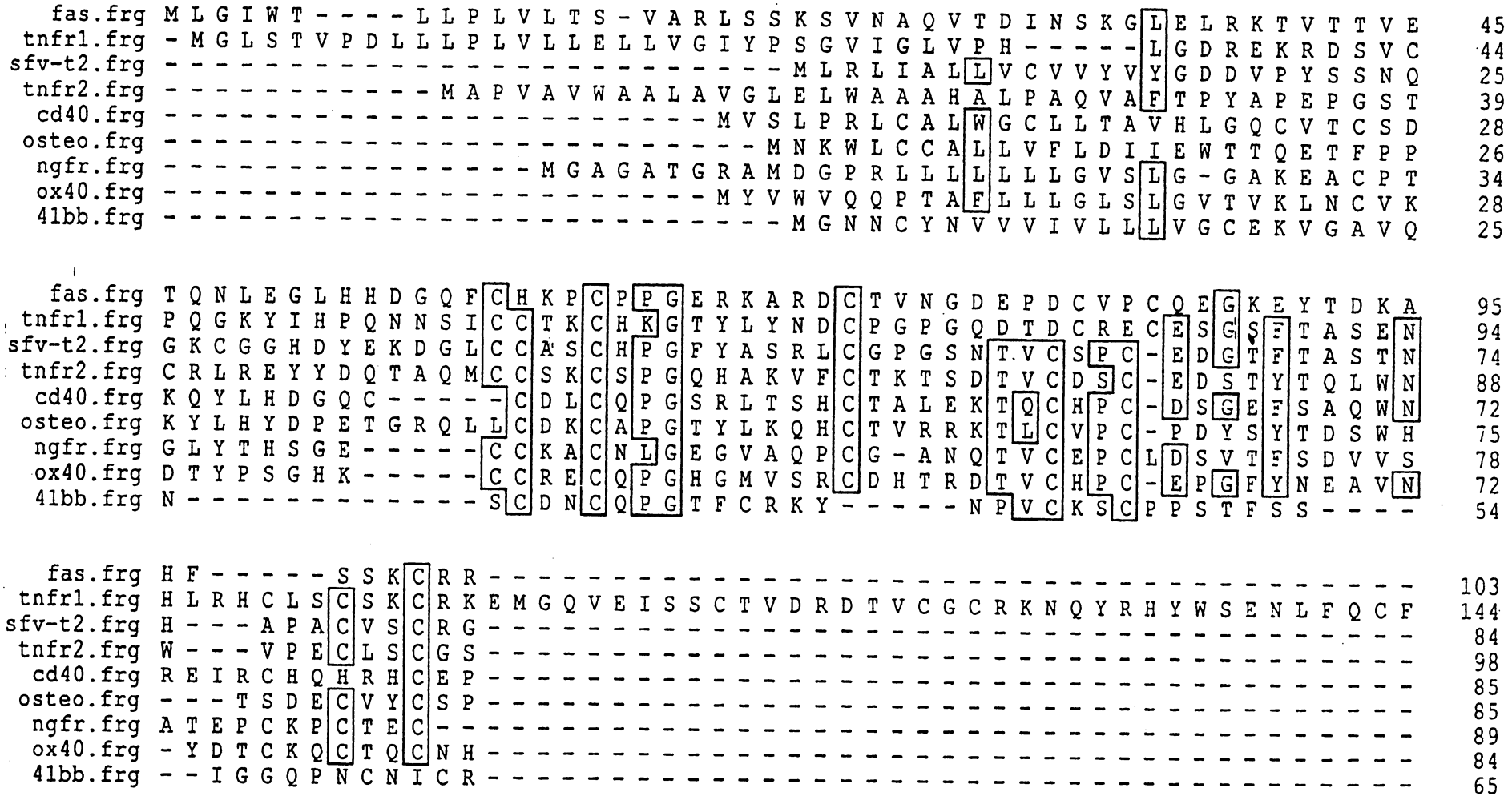
圖 2B

```
         10                  30                  50
ATCAAAGGCAGGGCATACTTCCTGTTGCCCAGACCTTATATAAAACGTCATGTTCGCCTG
         70                  90                 110
GGCAGCAGAGAAGCACCTAGCACTGGCCCAGCGGCTGCCGCCTGAGGTTTCCAGAGGACC
        130                 150                 170
ACAATGAACAAGTGGCTGTGCTGTGCACTCCTGGTGTTCTTGGACATCATTGAATGGACA
   M  N  K  W  L  C  C  A  L  L  V  F  L  D  I  I  E  W  T
        190                 210                 230
ACCCAGGAAACCTTTCCTCCAAAATACTTGCATTATGACCCAGAAACCGGACGTCAGCTC
T  Q  E  T  F  P  P  K  Y  L  H  Y  D  P  E  T  G  R  Q  L
        250                 270                 290
TTGTGTGACAAATGTGCTCCTGGCACCTACCTAAAACAGCACTGCACAGTCAGGAGGAAG
L  C  D  K  C  A  P  G  T  Y  L  K  Q  H  C  T  V  R  R  K
        310                 330                 350
ACACTGTGTGTCCCTTGCCCTGACTACTCTTATACAGACAGCTGGCACACGAGTGATGAA
T  L  C  V  P  C  P  D  Y  S  Y  T  D  S  W  H  T  S  D  E
        370                 390                 410
TGCGTGTACTGCAGCCCCGTGTGCAAGGAACTGCAGACCGTGAAACAGGAGTGCAACCGC
C  V  Y  C  S  P  V  C  K  E  L  Q  T  V  K  Q  E  C  N  R
        430                 450                 470
ACCCACAACCGAGTGTGCGAATGTGAGGAAGGGCGCTACCTGGAGCTCGAATTCTGCTTG
T  H  N  R  V  C  E  C  E  E  G  R  Y  L  E  L  E  F  C  L
        490                 510                 530
AAGCACCGGAGCTGTCCCCCAGGCTTGGGTGTGCTGCAGGCTGGGACCCCAGAGCGAAAC
K  H  R  S  C  P  P  G  L  G  V  L  Q  A  G  T  P  E  R  N
        550                 570                 590
ACGGTTTGCAAAAGATGTCCGGATGGGTTCTTCTCAGGTGAGACGTCATCGAAAGCACCC
T  V  C  K  R  C  P  D  G  F  F  S  G  E  T  S  S  K  A  P
        610                 630                 650
TGTAGGAAACACACCAACTGCAGCTCACTTGGCCTCCTGCTAATTCAGAAAGGAAATGCA
C  R  K  H  T  N  C  S  S  L  G  L  L  L  I  Q  K  G  N  A
        670                 690                 710
ACACATGACAATGTATGTTCCGGAAACAGAGAAGCAACTCAAAATTGTGGAATAGATGTC
T  H  D  N  V  C  S  G  N  R  E  A  T  Q  N  C  G  I  D  V
        730                 750                 770
ACCCTGTGCGAAGAGGCATTCTTCAGGTTTGCTGTGCCTACCAAGATTATACCGAATTGG
T  L  C  E  E  A  F  F  R  F  A  V  P  T  K  I  I  P  N  W
        790                 810                 830
CTGAGTGTTCTGGTGGACAGTTTGCCTGGGACCAAAGTGAATGCAGAGAGTGTAGAGAGG
L  S  V  L  V  D  S  L  P  G  T  K  V  N  A  E  S  V  E  R
        850                 870                 890
ATAAAACGGAGACACAGCTCGCAAGAGCAAACTTTCCAGCTACTTAAGCTGTGGAAGCAT
I  K  R  R  H  S  S  Q  E  Q  T  F  Q  L  L  K  L  W  K  H
        910                 930                 950
CAAAACAGAGACCAGGAAATGGTGAAGAAGATCATCCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGC
Q  N  R  D  Q  E  M  V  K  K  I  I  Q  D  I  D  L  C  E  S
        970                 990                1010
AGTGTGCAACGGCATATCGGCCACGCGAACCTCACCACAGAGCAGCTCCGCATCTTGATG
S  V  Q  R  H  I  G  H  A  N  L  T  T  E  Q  L  R  I  L  M
```

圖2C

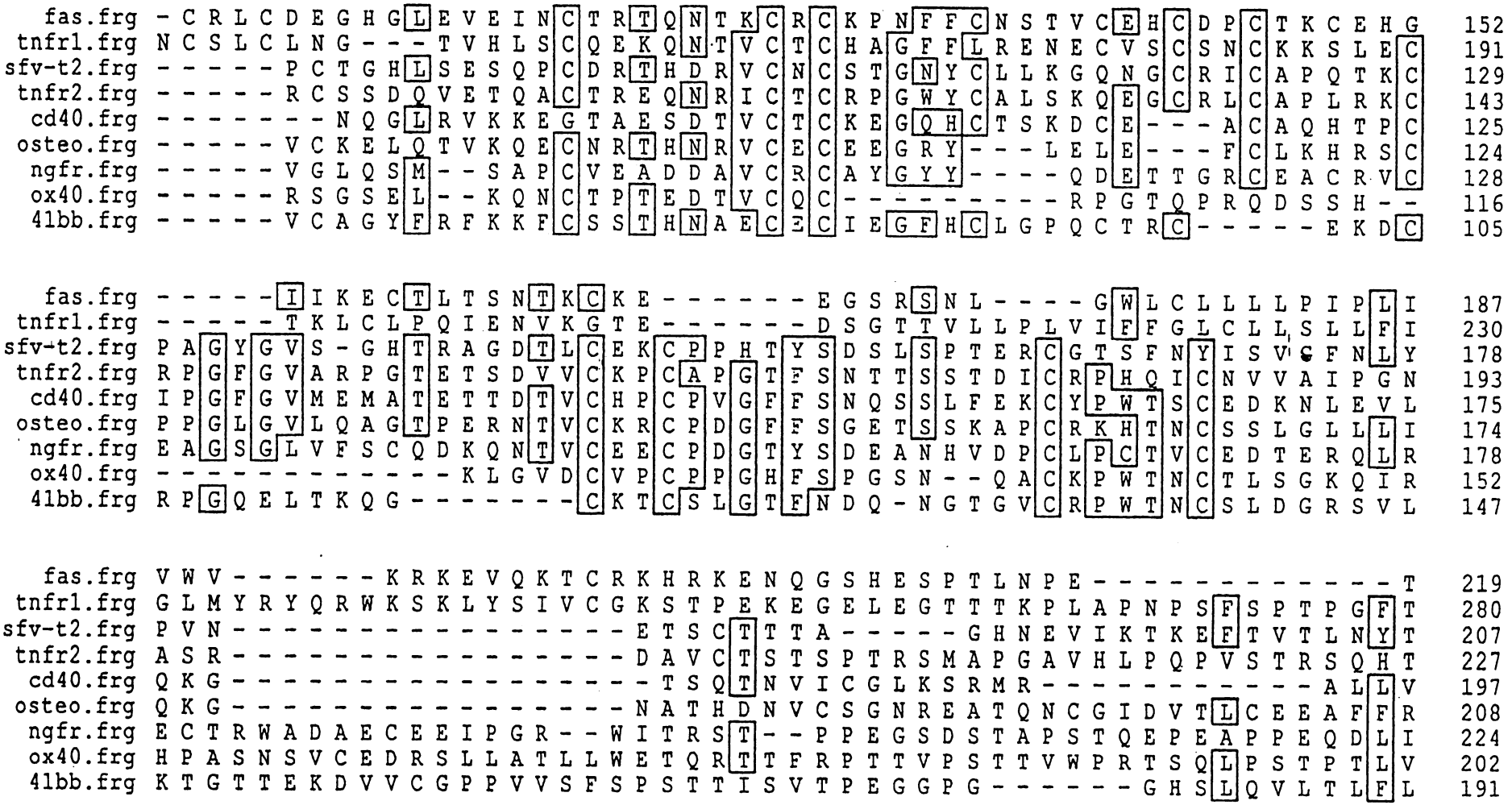
```
      1030                  1050                  1070
GAGAGCTTGCCTGGGAAGAAGATCAGCCCAGACGAGATTGAGAGAACGAGAAAGACCTGC
E  S  L  P  G  K  K  I  S  P  D  E  I  E  R  T  R  K  T  C
      1090                  1110                  1130
AAACCCAGCGAGCAGCTCCTGAAGCTACTGAGCTTGTGGAGGATCAAAAATGGAGACCAA
K  P  S  E  Q  L  L  K  L  L  S  L  W  R  I  K  N  G  D  Q
      1150                  1170                  1190
GACACCTTGAAGGGCCTGATGTACGCACTCAAGCACTTGAAAGCATACCACTTTCCCAAA
D  T  L  K  G  L  M  Y  A  L  K  H  L  K  A  Y  H  F  P  K
      1210                  1230                  1250
ACCGTCACCCACAGTCTGAGGAAGACCATCAGGTTCTTGCACAGCTTCACCATGTACCGA
T  V  T  H  S  L  R  K  T  I  R  F  L  H  S  F  T  M  Y  R
      1270                  1290                  1310
TTGTATCAGAAACTCTTTCTAGAAATGATAGGGAATCAGGTTCAATCAGTGAAGATAAGC
L  Y  Q  K  L  F  L  E  M  I  G  N  Q  V  Q  S  V  K  I  S
      1330                  1350                  1370
TGCTTATAGTTAGGAATGGTCACTGGGCTGTTTCTTCAGGATGGGCCAACACTGATGGAG
C  L
      1390                  1410                  1430
CAGATGGCTGCTTCTCCGGCTCTTGAAATGGCAGTTGATTCCTTTCTCATCAGTTGGTGG
      1450                  1470                  1490
GAATGAAGATCCTCCAGCCCAACACACACACTGGGGAGTCTGAGTCAGGAGAGTGAGGCA
      1510                  1530                  1550
GGCTATTTGATAATTGTGCAAAGCTGCCAGGTGTACACCTAGAAAGTCAAGCACCCTGAG
      1570                  1590                  1610
AAAGAGGATATTTTTATAACCTCAAACATAGGCCCTTTCCTTCCTCTCCTTATGGATGAG
      1630                  1650                  1670
TACTCAGAAGGCTTCTACTATCTTCTGTGTCATCCCTAGATGAAGGCCTCTTTTATTTAT
      1690                  1710                  1730
TTTTTTATTCTTTTTTTCGGAGCTGGGGACCGAACCCAGGGCCTTGCGCTTGCGAGGCAA
      1750                  1770                  1790
GTGCTCTACCACTGAGCTAAATCTCCAACCCCTGAAGGCCTCTTTCTTTCTGCCTCTGAT
      1810                  1830                  1850
AGTCTATGACATTCTTTTTTCTACAATTCGTATCAGGTGCACGAGCCTTATCCCATTTGT
      1870                  1890                  1910
AGGTTTCTAGGCAAGTTGACCGTTAGCTATTTTTCCCTCTGAAGATTTGATTCGAGTTGC
      1930                  1950                  1970
AGACTTGGCTAGACAAGCAGGGGTAGGTTATGGTAGTTTATTTAACAGACTGCCACCAGG
      1990                  2010                  2030
AGTCCAGTGTTTCTTGTTCCTCTGTAGTTGTACCTAAGCTGACTCCAAGTACATTTAGTA
      2050                  2070                  2090
TGAAAAATAATCAACAAATTTTATTCCTTCTATCAACATTGGCTAGCTTTGTTTCAGGGC
      2110                  2130                  2150
ACTAAAAGAAACTACTATATGGAGAAAGAATTGATATTGCCCCCAACGTTCAACAACCCA
      2170                  2190                  2210
ATAGTTTATCCAGCTGTCATGCCTGGTTCAGTGTCTACTGACTATGCGCCCTCTTATTAC
      2230                  2250                  2270
TGCATGCAGTAATTCAACTGGAAATAGTAATAATAATAATAGAAATAAAATCTAGACTCC
      2290                  2310                  2330
ATTGGATCTCTCTGAATATGGGAATATCTAACTTAAGAAGCTTTGAGATTTCAGTTGTGT
      2350                  2370                  2390
TAAAGGCTTTTATTAAAAAGCTGATGCTCTTCTGTAAAAGTTACTAATATATCTGTAAGA
      2410                  2430
CTATTACAGTATTGCTATTTATATCCATCCAG
```

圖 2D


fas.frg MLGIWT----LLPLVLTS-VARLSSKSVNAQVTDINSKGLELRKTVTTVE 45
tnfr1.frg -MGLSTVPDLLLPLVLLELLVGIYPSGVIGLVPH-----LGDREKRDSVC 44
sfv-t2.frg ----------------------MLRLIALLVCVVYVYGDDVPYSSNQ 25
tnfr2.frg ----------MAPVAVWAALAVGLELWAAAHALPAQVAFTPYAPEPGST 39
cd40.frg ----------MVSLPRLCALWGCLLTAVHLGQCVTCSD 28
osteo.frg ----------MNKWLCCALLVFLDIIEWTTQETFPP 26
ngfr.frg ----------MGAGATGRAMDGPRLLLLLLLGVSLG-GAKEACPT 34
ox40.frg ----------MYVWVQQPTAFLLLGLSLGVTVKLNCVK 28
41bb.frg ----------MGNNCYNVVVIVLLLVGCEKVGAVQ 25
fas.frg TQNLEGLHHDGQFCHKPCPPGERKARDCTVNGDEPDCVPCQEGKEYTDKA 95
tnfr1.frg PQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQDTDCREC-ESGSFTASEN 94
sfv-t2.frg GKCGGHDYEKDGLCCASCHPGFYASRLCGPGSNTVCSPC-EDGTFTASTN 74
tnfr2.frg CRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSC-EDSTYTQLWN 88
cd40.frg KQYLHDGQC-----CDLCQPGSRLTSHCTALEKTQCHPC-DSGEFSAQWN 72
osteo.frg KYLHYDPETGRQLLCDKCAPGTYLKQHCTVRRKTLCVPC-PDYSYTDSWH 75
ngfr.frg GLYTHSGE-----CCKACNLGEGVAQPCG-ANQTVCEPCLDSVTFSDVVS 78
ox40.frg DTYPSGHK-----CCRECQPGHGMVSRCDHTRDTVCHPC-EPGFYNEAVN 72
41bb.frg N----------SCDNCQPGTFCRKY-----NPVCKSC-PPSTFSS---- 54
fas.frg HF-----SSKCRR---------- 103
tnfr1.frg HLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCF 144
sfv-t2.frg H---APACVSCRG---------- 84
tnfr2.frg W---VPECLSCGS---------- 98
cd40.frg REIRCHQHRHCEP---------- 85
osteo.frg ---TSDECVYCSP---------- 85
ngfr.frg ATEPCKPCTECC---------- 89
ox40.frg -YDTCKQCTQCNH---------- 84
41bb.frg --IGGQPNCNICR---------- 65

I221482

圖 2E


fas.frg - C R L C D E G H G L E V E I N C T R T Q N T K C R C K P N F F C N S T V C E H C D P C T K C E H G 152
tnfr1.frg N C S L C L N G - - - T V H L S C Q E K Q N T V C T C H A G F F L R E N E C V S C S N C K K S L E C 191
sfv-t2.frg - - - - - P C T G H L S E S Q P C D R T H D R V C N C S T G N Y C L L K G Q N G C R I C A P Q T K C 129
tnfr2.frg - - - - - R C S S D Q V E T Q A C T R E Q N R I C T C R P G W Y C A L S K Q E G C R L C A P L R K C 143
cd40.frg - - - - - - - - N Q G L R V K K E G T A E S D T V C T C K E G Q H C T S K D C E - - - A C A Q H T P C 125
osteo.frg - - - - - V C K E L Q T V K Q E C N R T H N R V C E C E E G R Y - - - L E L E - - - F C L K H R S C 124
ngfr.frg - - - - - V G L Q S M - - S A P C V E A D D A V C R C A Y G Y Y - - - - Q D E T T G R C E A C R V C 128
ox40.frg - - - - - R S G S E L - - K Q N C T P T E D T V C Q C - - - - - - - - - R P G T Q P R Q D S S H - - 116
41bb.frg - - - - - V C A G Y F R F K K F C S S T H N A E C E C I E G F H C L G P Q C T R C - - - - - E K D C 105
fas.frg - - - - - I I K E C T L T S N T K C K E - - - - - - - E G S R S N L - - - - G W L C L L L L P I P L I 187
tnfr1.frg - - - - - T K L C L P Q I E N V K G T E - - - - - - - D S G T T V L L P L V I F F G L C L L S L L F I 230
sfv-t2.frg P A G Y G V S - G H T R A G D T L C E K C P P H T Y S D S L S P T E R C G T S F N Y I S V C F N L Y 178
tnfr2.frg R P G F G V A R P G T E T S D V V C K P C A P G T F S N T T S S T D I C R P H Q I C N V V A I P G N 193
cd40.frg I P G F G V M E M A T E T T D T V C H P C P V G F F S N Q S S L F E K C Y P W T S C E D K N L E V L 175
osteo.frg P P G L G V L Q A G T P E R N T V C K R C P D G F F S G E T S S K A P C R K H T N C S S L G L L L I 174
ngfr.frg E A G S G L V F S C Q D K Q N T V C E E C P D G T Y S D E A N H V D P C L P C T V C E D T E R Q L R 178
ox40.frg - - - - - - - - - - - - K L G V D C V P C P P G H F S P G S N - - Q A C K P W T N C T L S G K Q I R 152
41bb.frg R P G Q E L T K Q G - - - - - - - C K T C S L G T F N D Q - N G T G V C R P W T N C S L D G R S V L 147
fas.frg V W V - - - - - - K R K E V Q K T C R K H R K E N Q G S H E S P T L N P E - - - - - - - - - - - - T 219
tnfr1.frg G L M Y R Y Q R W K S K L Y S I V C G K S T P E K E G E L E G T T T K P L A P N P S F S P T P G F T 280
sfv-t2.frg P V N - - - - - - - - - - - - - - - - - E T S C T T T A - - - - - G H N E V I K T K E F T V T L N Y T 207
tnfr2.frg A S R - - - - - - - - - - - - - - - - - D A V C T S T S P T R S M A P G A V H L P Q P V S T R S Q H T 227
cd40.frg Q K G - - - - - - - - - - - - - - - - - T S Q T N V I C G L K S R M R - - - - - - - - - - A L L V 197
osteo.frg Q K G - - - - - - - - - - - - - - - - - N A T H D N V C S G N R E A T Q N C G I D V T L C E E A F F R 208
ngfr.frg E C T R W A D A E C E E I P G R - - W I T R S T - - P P E G S D S T A P S T Q E P E A P P E Q D L I 224
ox40.frg H P A S N S V C E D R S L L A T L L W E T Q R T T F R P T T V P S T T V W P R T S Q L P S T P T L V 202
41bb.frg K T G T T E K D V V C G P P V V S F S P S T T I S V T P E G G P G - - - - - - G H S L Q V L T L F L 191

I221482

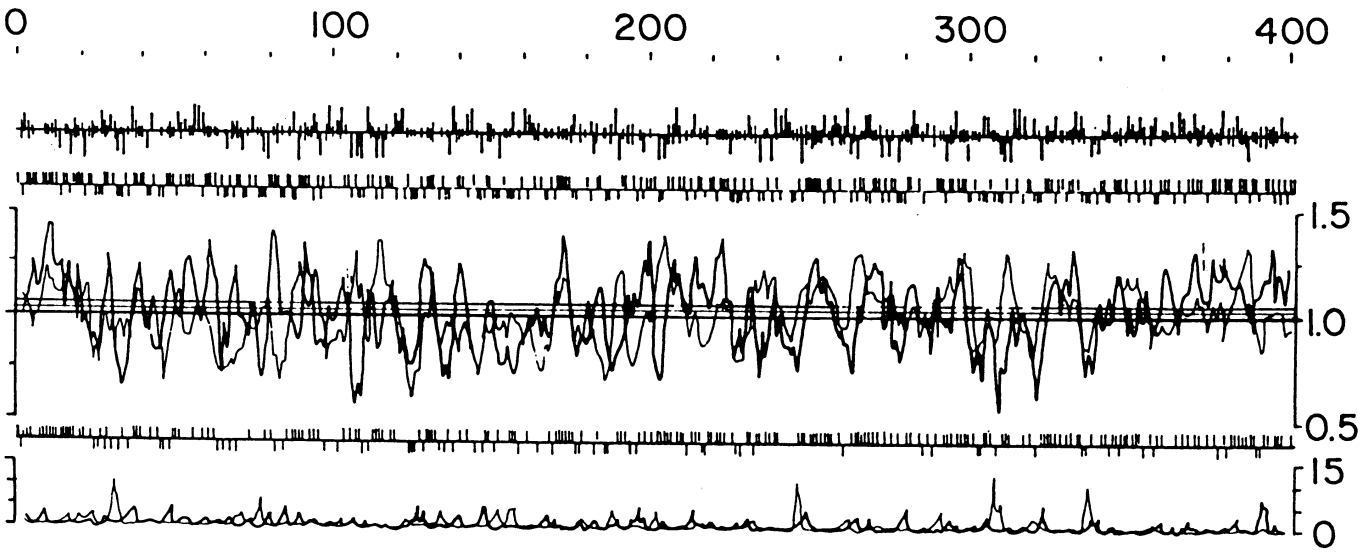


圖 3A

圖 3B

圖 3C

圖 3D

圖 3E

I221482

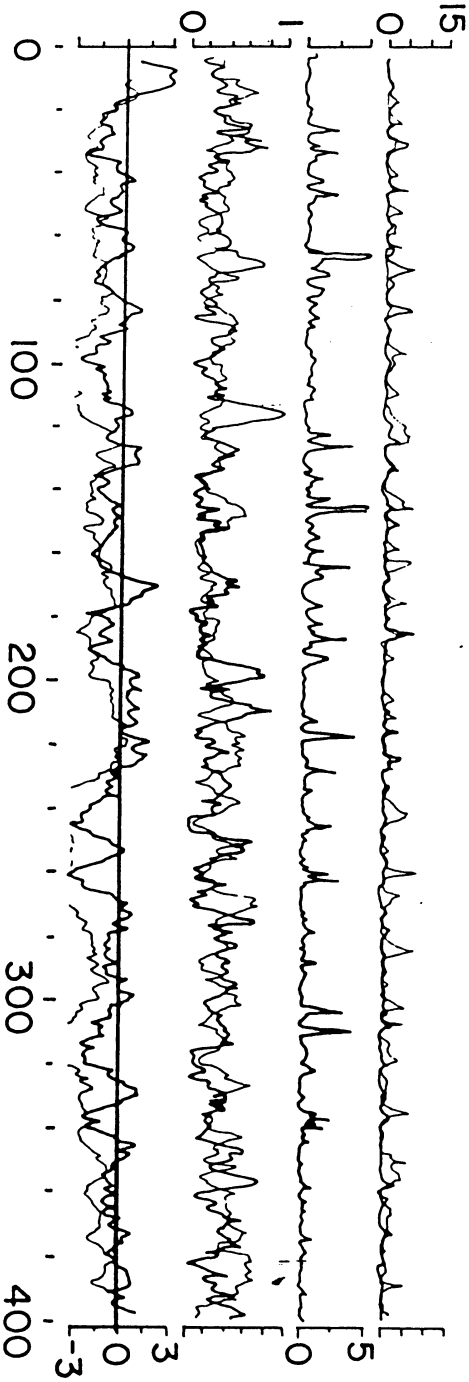


圖 3F

圖 3G

圖 3H

圖 3I

圖4A

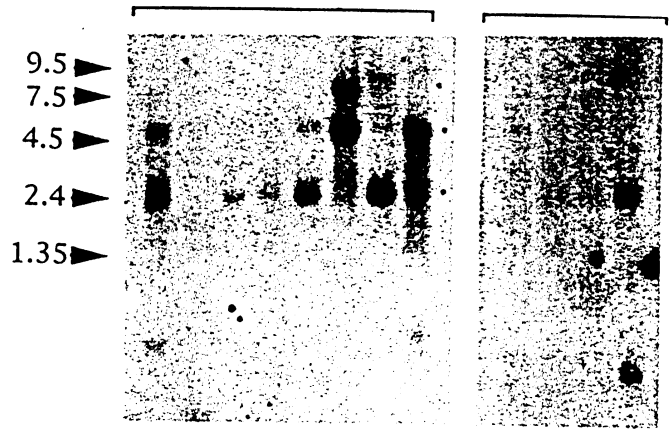


圖4B

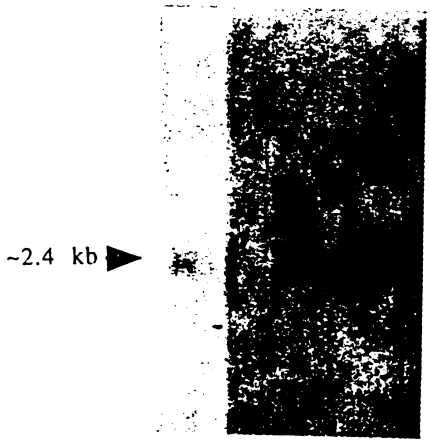


圖 5

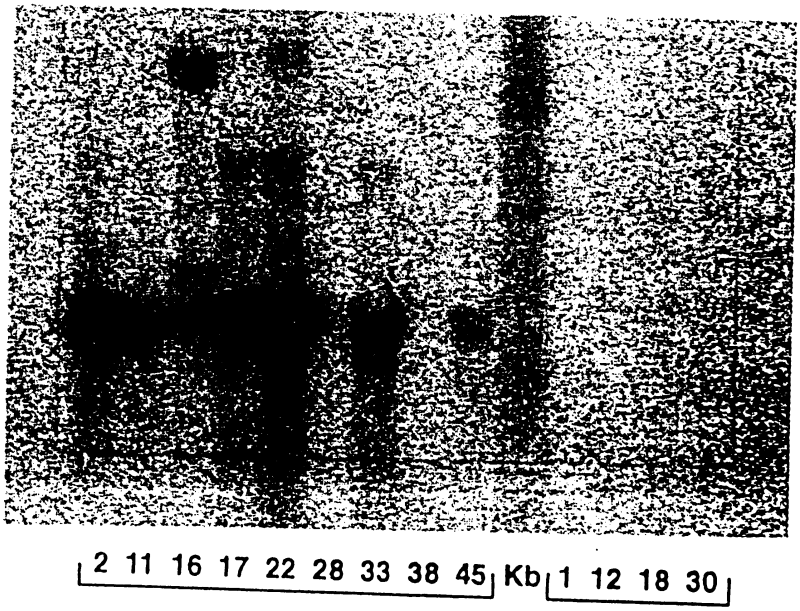


圖 6A

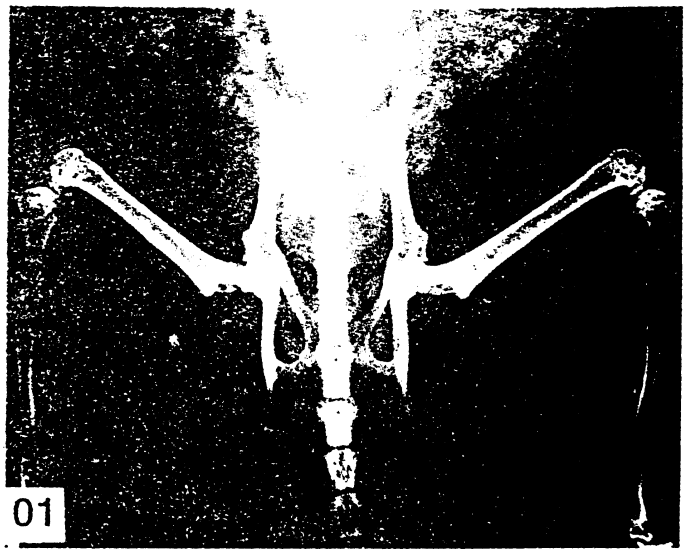


圖 6B

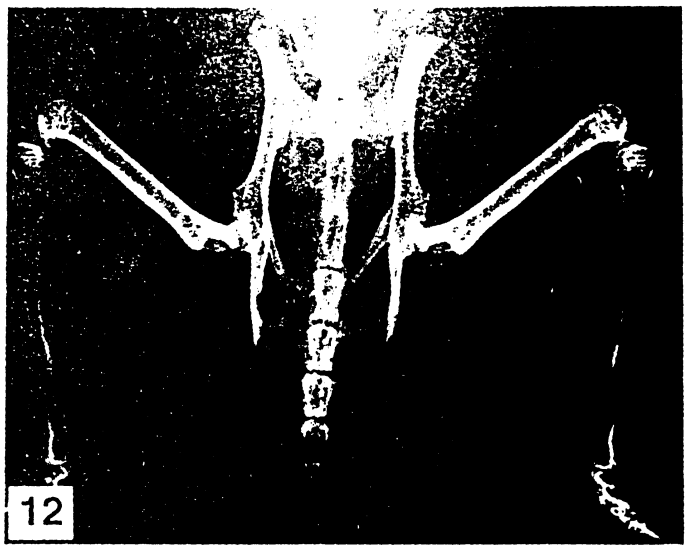


圖 6C

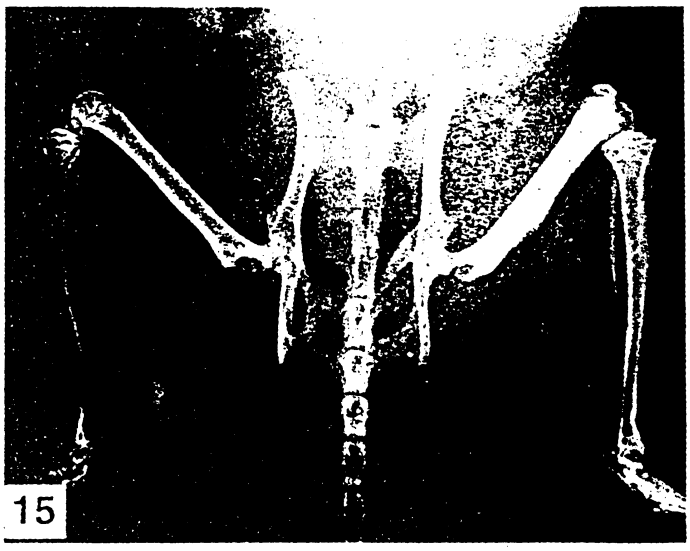


圖 6D

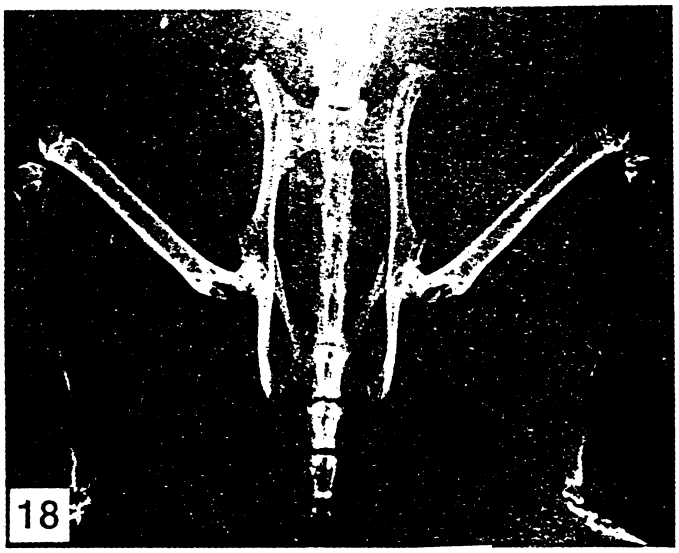


圖 6E

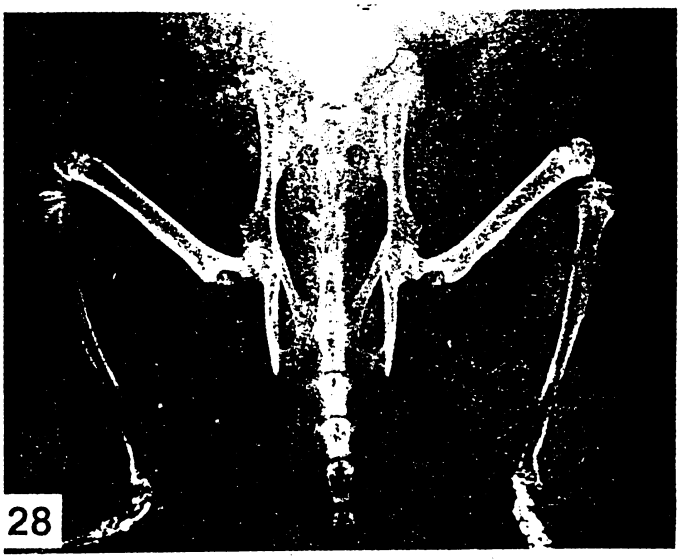


圖 6F

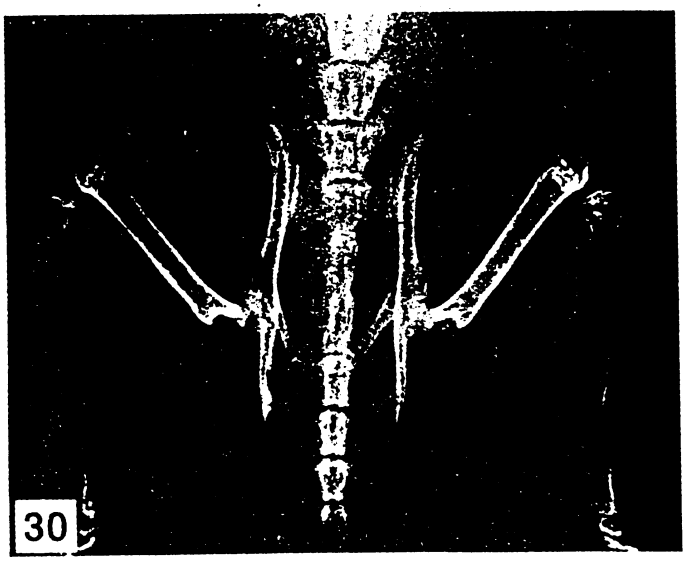


圖 6G

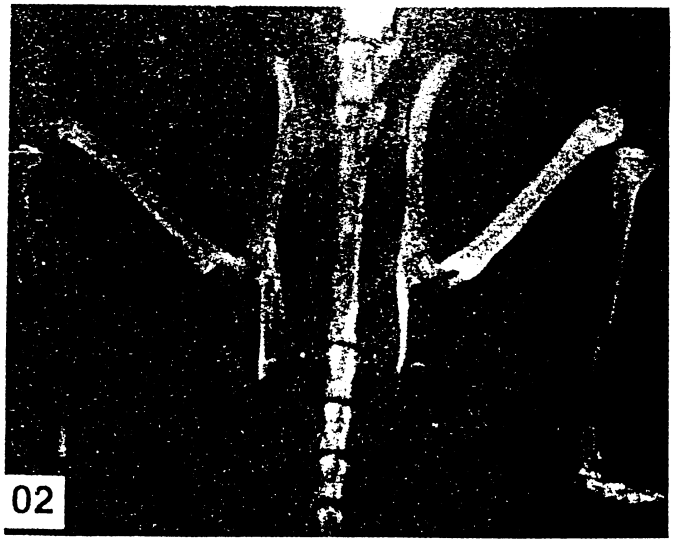


圖 6H

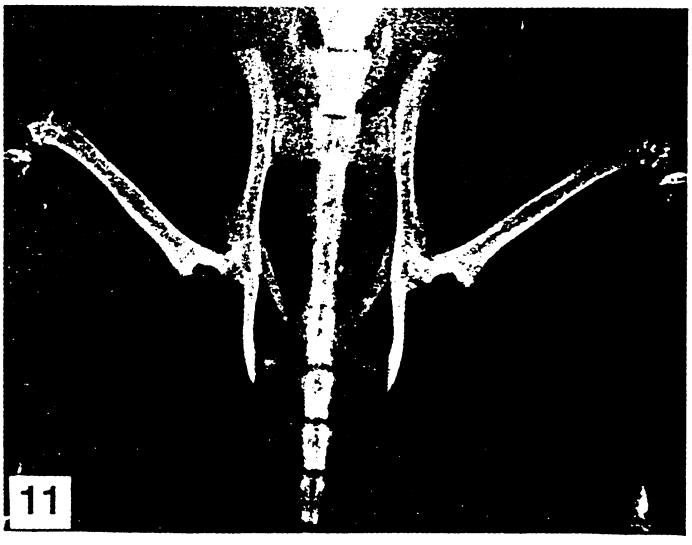


圖 6I

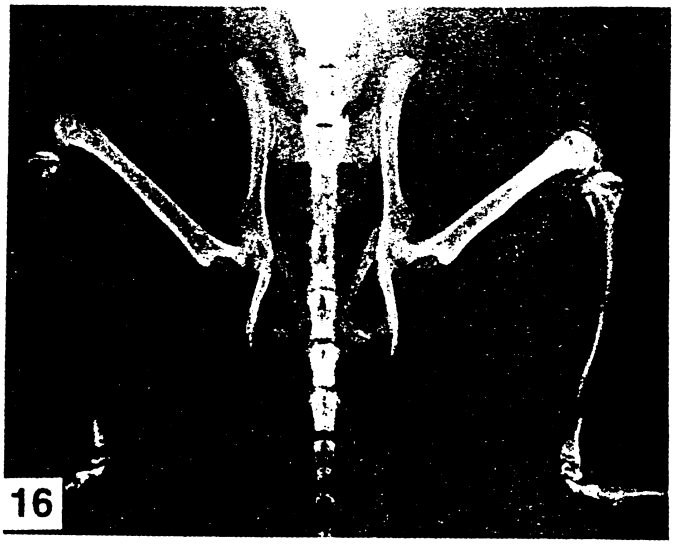


圖 6J

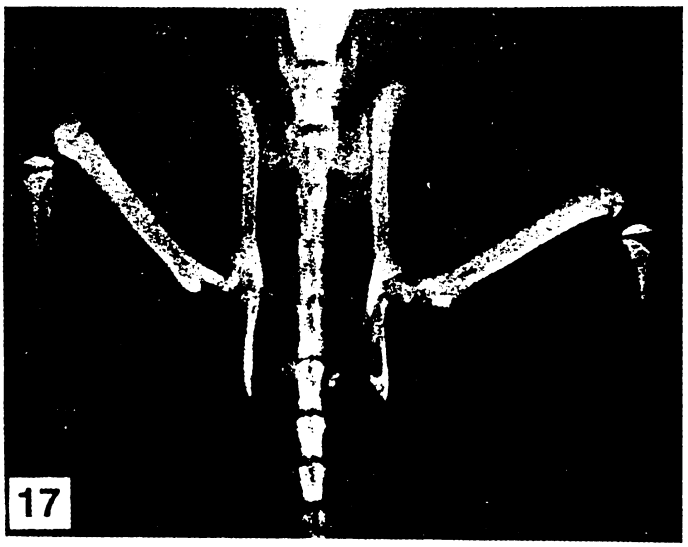


圖 7A

圖 7B

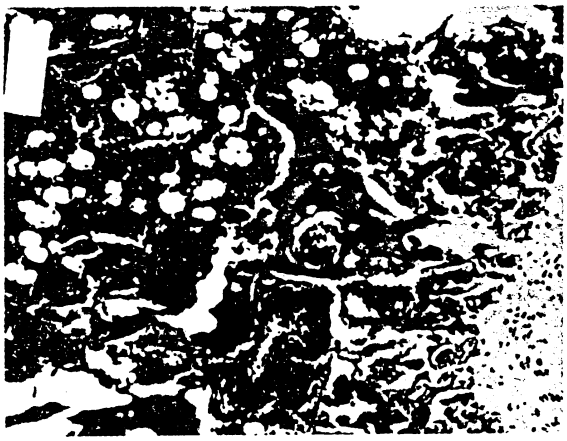


圖 7C

圖 7D

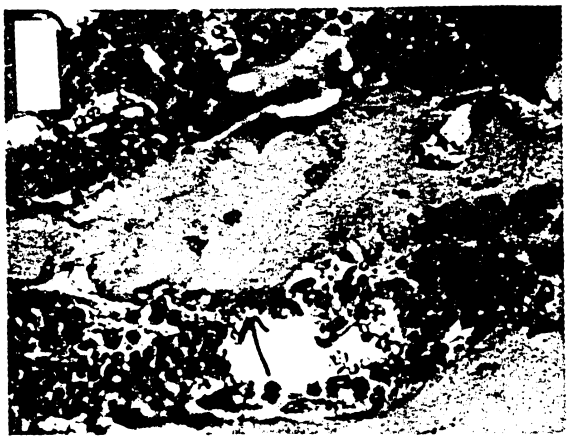


圖 7E

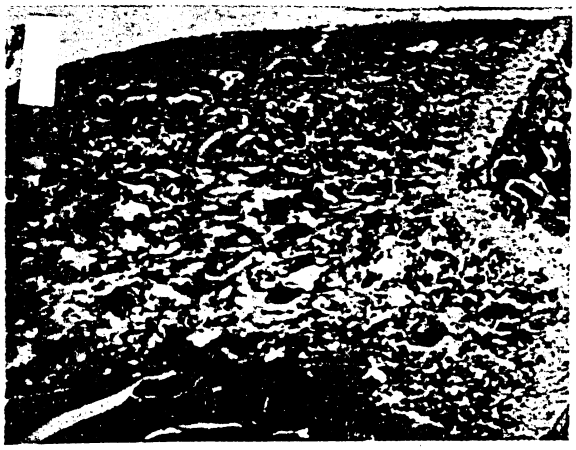


圖 7F

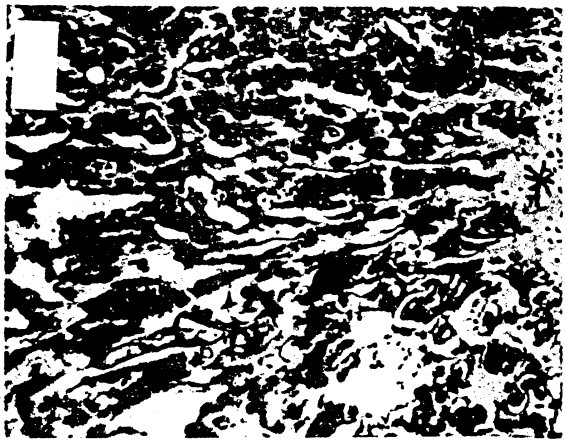


圖 7G

圖 7H

圖 8A

圖 8B

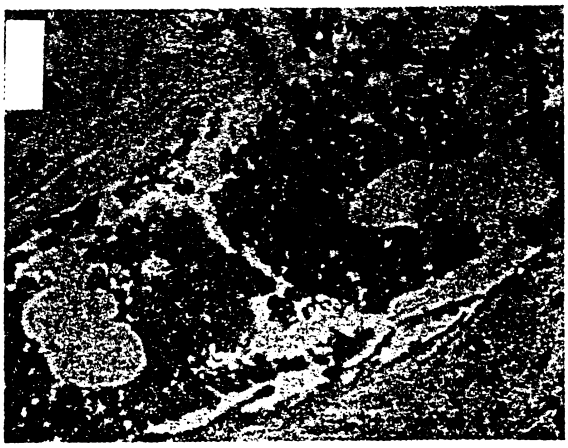


圖 8C

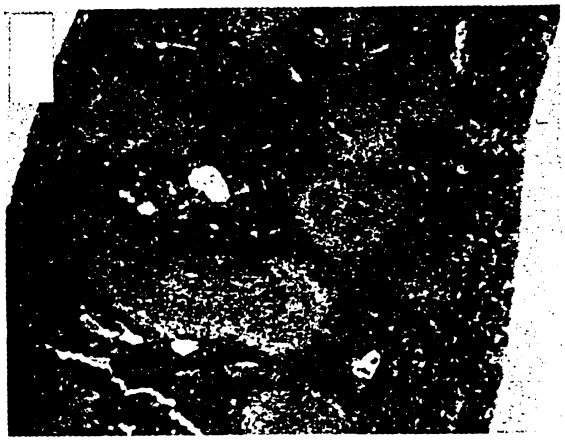


圖 8D

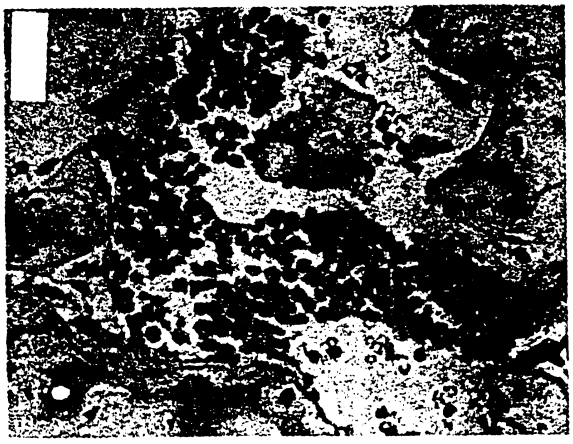


圖 9A

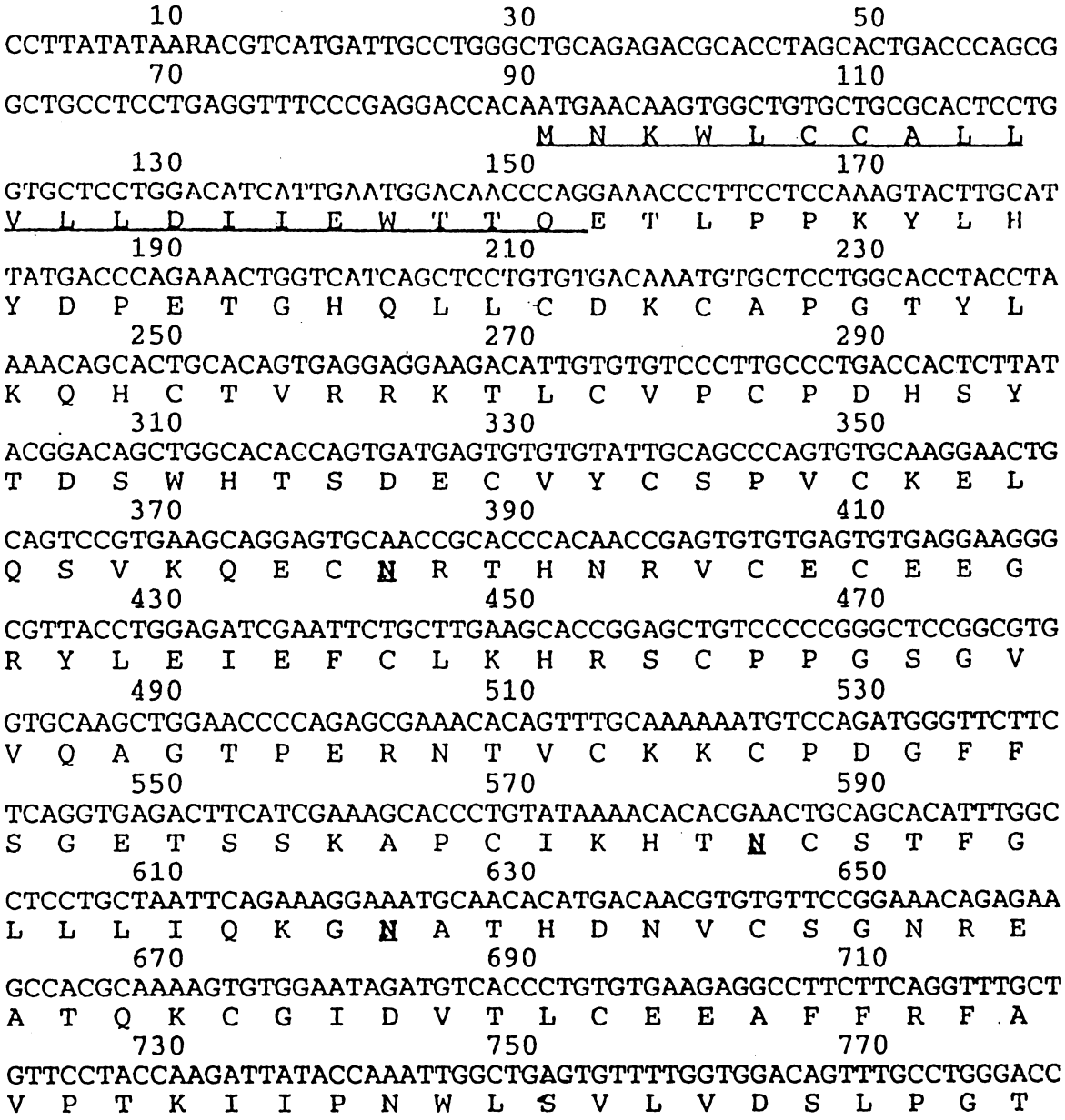

10 30 50
CCTTATATAARACGTCATGATTGCCTGGGCTGCAGAGACGCACCTAGCACTGACCCAGCG
70 90 110
GCTGCCTCCTGAGGTTTCCCGAGGACCACAATGAACAAGTGGCTGTGCTGCGCACTCCTG
M N K W L C C A L L
130 150 170
GTGCTCCTGGACATCATTGAATGGACAACCCAGGAAACCCTTCCTCCAAAGTACTTGCAT
V L L D I I E W T T Q E T L P P K Y L H
190 210 230
TATGACCCAGAAACTGGTCATCAGCTCCTGTGTGACAAATGTGCTCCTGGCACCTACCTA
Y D P E T G H Q L L C D K C A P G T Y L
250 270 290
AAACAGCACTGCACAGTGAGGAGGAAGACATTGTGTGTCCCTTGCCCTGACCACTCTTAT
K Q H C T V R R K T L C V P C P D H S Y
310 330 350
ACGGACAGCTGGCACACCAGTGATGAGTGTGTGTATTGCAGCCCAGTGTGCAAGGAACTG
T D S W H T S D E C V Y C S P V C K E L
370 390 410
CAGTCCGTGAAGCAGGAGTGCAACCGCACCCACAACCGAGTGTGTGAGTGTGAGGAAGGG
Q S V K Q E C N R T H N R V C E C E E G
430 450 470
CGTTACCTGGAGATCGAATTCTGCTTGAAGCACCGGAGCTGTCCCCCGGGCTCCGGCGTG
R Y L E I E F C L K H R S C P P G S G V
490 510 530
GTGCAAGCTGGAACCCCAGAGCGAAACACAGTTTGCAAAAAATGTCCAGATGGGTTCTTC
V Q A G T P E R N T V C K K C P D G F F
550 570 590
TCAGGTGAGACTTCATCGAAAGCACCCTGTATAAAACACACGAACTGCAGCACATTTGGC
S G E T S S K A P C I K H T N C S T F G
610 630 650
CTCCTGCTAATTCAGAAAGGAAATGCAACACATGACAACGTGTGTTCCGGAAACAGAGAA
L L L I Q K G N A T H D N V C S G N R E
670 690 710
GCCACGCAAAAGTGTGGAATAGATGTCACCCTGTGTGAAGAGGCCTTCTTCAGGTTTGCT
A T Q K C G I D V T L C E E A F F R F A
730 750 770
GTTCCTACCAAGATTATACCAAATTGGCTGAGTGTTTTGGTGGACAGTTTGCCTGGGACC
V P T K I I P N W L S V L V D S L P G T

圖 9B

```
       790                   810                   830
AAAGTGAATGCCGAGAGTGTAGAGAGGATAAAACGGAGACACAGCTCACAAGAGCAAACC
K  V  N  A  E  S  V  E  R  I  K  R  R  H  S  S  Q  E  Q  T
       850                   870                   890
TTCCAGCTGCTGAAGCTGTGGAAACATCAAAACAGAGACCAGGAAATGGTGAAGAAGATC
F  Q  L  L  K  L  W  K  H  Q  N  R  D  Q  E  M  V  K  K  I
       910                   930                   950
ATCCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGCAGCGTGCAGCGGCATCTCGGCCACTCGAACCTC
I  Q  D  I  D  L  C  E  S  S  V  Q  R  H  L  G  H  S  N  L
       970                   990                  1010
ACCACAGAGCAGCTTCTTGCCTTGATGGAGAGCCTGCCTGGGAAGAAGATCAGCCCAGAA
T  T  E  Q  L  L  A  L  M  E  S  L  P  G  K  K  I  S  P  E
      1030                  1050                  1070
GAGATTGAGAGAACGAGAAAGACCTGCAAATCGAGCGAGCAGCTCCTGAAGCTACTCAGT
E  I  E  R  T  R  K  T  C  K  S  S  E  Q  L  L  K  L  L  S
      1090                  1110                  1130
TTATGGAGGATCAAAAATGGTGACCAAGACACCTTGAAGGGCCTGATGTATGCCCTCAAG
L  W  R  I  K  N  G  D  Q  D  T  L  K  G  L  M  Y  A  L  K
      1150                  1170                  1190
CACTTGAAAACATCCCACTTTCCCAAAACTGTCACCCACAGTCTGAGGAAGACCATGAGG
H  L  K  T  S  H  F  P  K  T  V  T  H  S  L  R  K  T  M  R
      1210                  1230                  1250
TTCCTGCACAGCTTCACAATGTACAGACTGTATCAGAAGCTCTTTTTAGAAATGATAGGG
F  L  H  S  F  T  M  Y  R  L  Y  Q  K  L  F  L  E  M  I  G
      1270                  1290                  1310
AATCAGGTTCAATCCGTGAAAATAAGCTGCTTATAACTAGGAATGGTCACTGGGCTGTTT
N  Q  V  Q  S  V  K  I  S  C  L

CTTCA
```

圖 9C

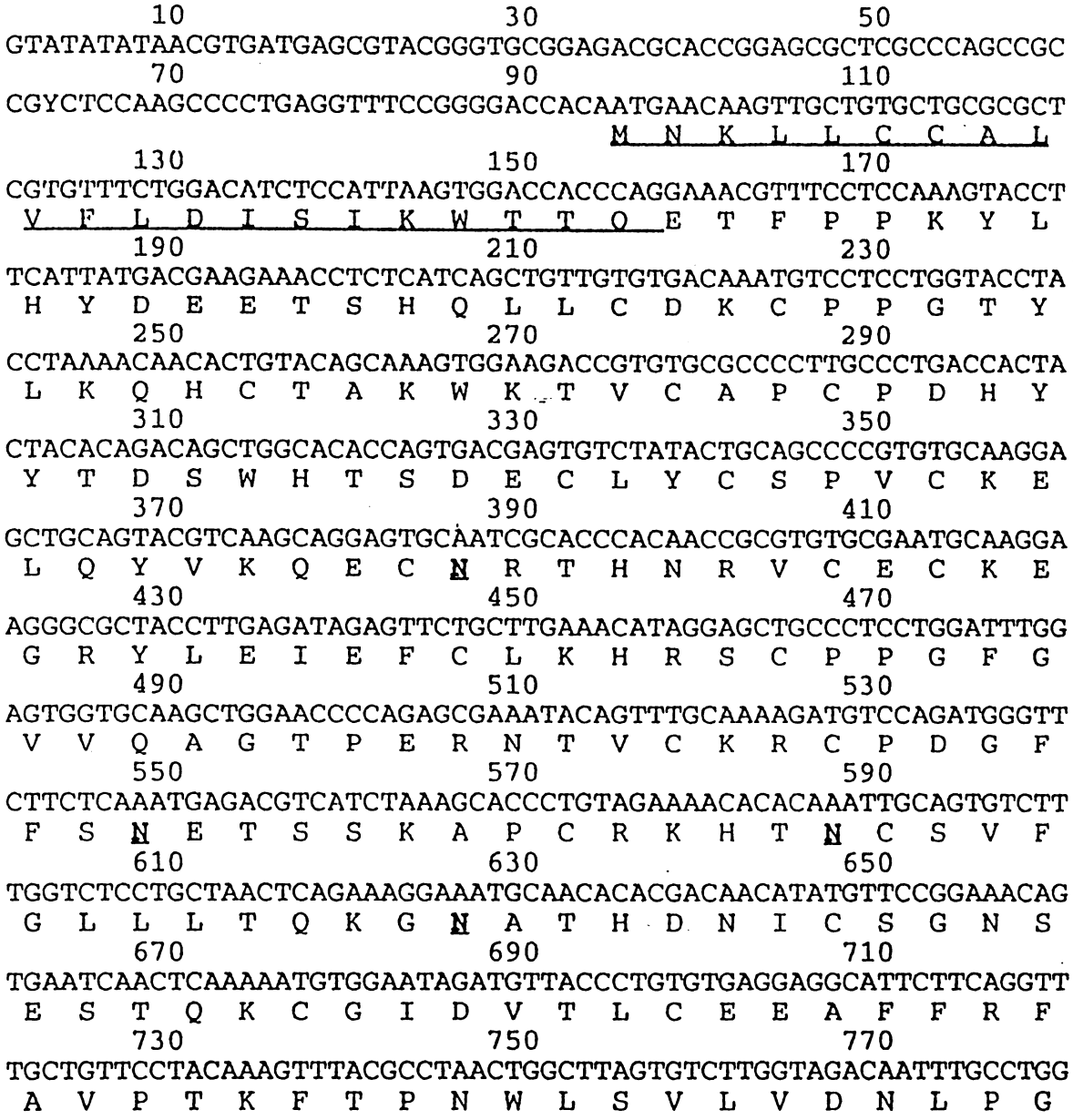
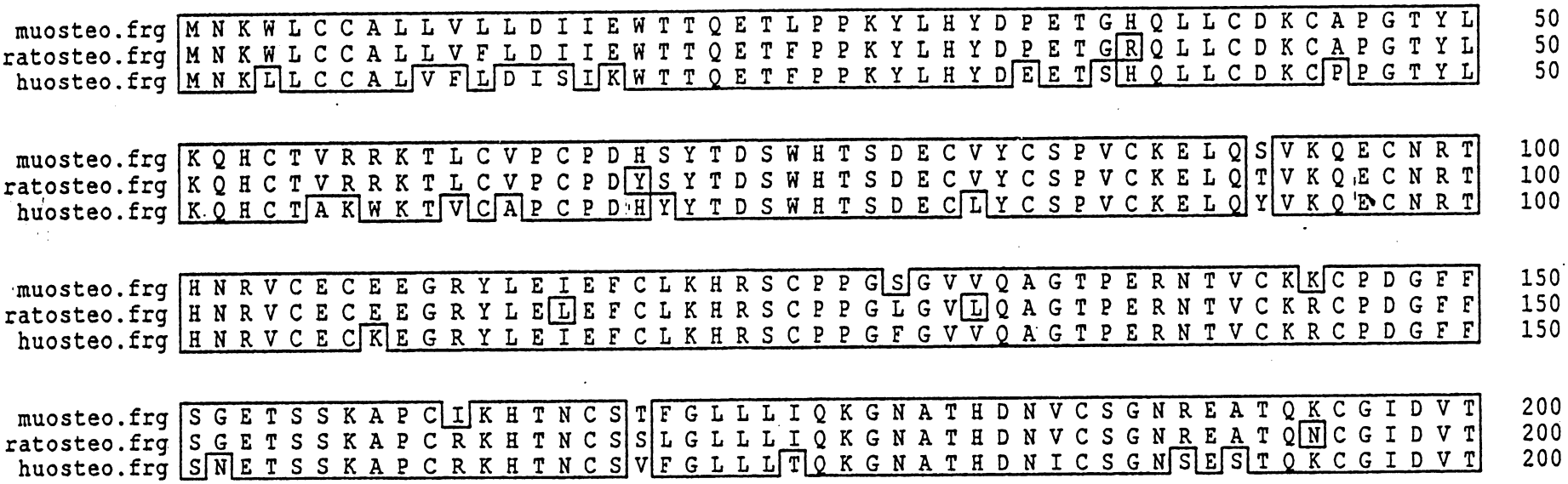

10 30 50
GTATATATAACGTGATGAGCGTACGGGTGCGGAGACGCACCGGAGCGCTCGCCCAGCCGC
70 90 110
CGYCTCCAAGCCCCTGAGGTTTCCGGGGACCACAATGAACAAGTTGCTGTGCTGCGCGCT
M N K L L C C A L
130 150 170
CGTGTTTCTGGACATCTCCATTAAGTGGACCACCCAGGAAACGTTTCCTCCAAAGTACCT
V F L D I S I K W T T Q E T F P P K Y L
190 210 230
TCATTATGACGAAGAAACCTCTCATCAGCTGTTGTGTGACAAATGTCCTCCTGGTACCTA
H Y D E E T S H Q L L C D K C P P G T Y
250 270 290
CCTAAAACAACACTGTACAGCAAAGTGGAAGACCGTGTGCGCCCCTTGCCCTGACCACTA
L K Q H C T A K W K T V C A P C P D H Y
310 330 350
CTACACAGACAGCTGGCACACCAGTGACGAGTGTCTATACTGCAGCCCCGTGTGCAAGGA
Y T D S W H T S D E C L Y C S P V C K E
370 390 410
GCTGCAGTACGTCAAGCAGGAGTGCAATCGCACCCACAACCGCGTGTGCGAATGCAAGGA
L Q Y V K Q E C N R T H N R V C E C K E
430 450 470
AGGGCGCTACCTTGAGATAGAGTTCTGCTTGAAACATAGGAGCTGCCCTCCTGGATTTGG
G R Y L E I E F C L K H R S C P P G F G
490 510 530
AGTGGTGCAAGCTGGAACCCCAGAGCGAAATACAGTTTGCAAAAGATGTCCAGATGGGTT
V V Q A G T P E R N T V C K R C P D G F
550 570 590
CTTCTCAAATGAGACGTCATCTAAAGCACCCTGTAGAAAACACACAAATTGCAGTGTCTT
F S N E T S S K A P C R K H T N C S V F
610 630 650
TGGTCTCCTGCTAACTCAGAAAGGAAATGCAACACACGACAACATATGTTCCGGAAACAG
G L L L T Q K G N A T H D N I C S G N S
670 690 710
TGAATCAACTCAAAAATGTGGAATAGATGTTACCCTGTGTGAGGAGGCATTCTTCAGGTT
E S T Q K C G I D V T L C E E A F F R F
730 750 770
TGCTGTTCCTACAAAGTTTACGCCTAACTGGCTTAGTGTCTTGGTAGACAATTTGCCTGG
A V P T K F T P N W L S V L V D N L P G

圖 9D

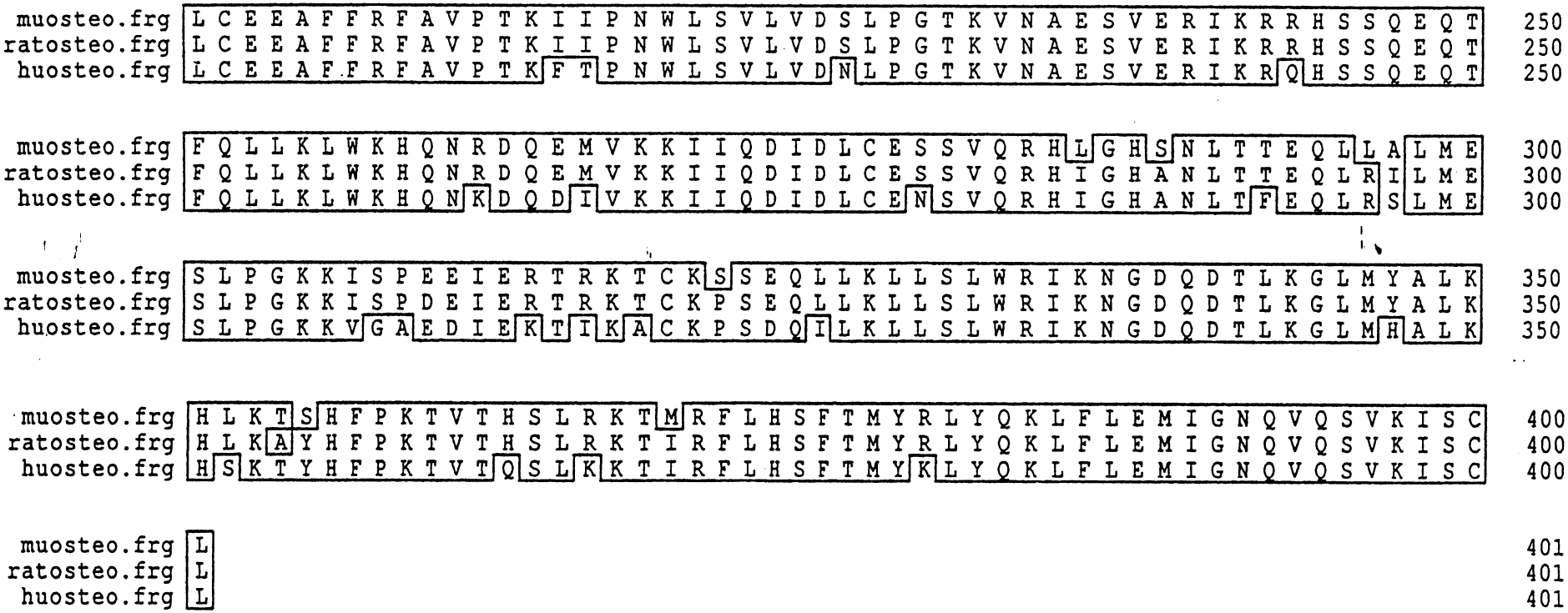
```
      790                   810                   830
CACCAAAGTAAACGCAGAGAGTGTAGAGAGGATAAAACGGCAACACAGCTCACAAGAACA
 T  K  V  N  A  E  S  V  E  R  I  K  R  Q  H  S  S  Q  E  Q
      850                   870                   890
GACTTTCCAGCTGCTGAAGTTATGGAAACATCAAAACAAAGACCAAGATATAGTCAAGAA
 T  F  Q  L  L  K  L  W  K  H  Q  N  K  D  Q  D  I  V  K  K
      910                   930                   950
GATCATCCAAGATATTGACCTCTGTGAAAACAGCGTGCAGCGGCACATTGGACATGCTAA
 I  I  Q  D  I  D  L  C  E  N  S  V  Q  R  H  I  G  H  A  N
      970                   990                  1010
CCTCACCTTCGAGCAGCTTCGTAGCTTGATGGAAAGCTTACCGGGAAAGAAAGTGGGAGC
 L  T  F  E  Q  L  R  S  L  M  E  S  L  P  G  K  K  V  G  A
     1030                  1050                  1070
AGAAGACATTGAAAAAACAATAAAGGCATGCAAACCCAGTGACCAGATCCTGAAGCTGCT
 E  D  I  E  K  T  I  K  A  C  K  P  S  D  Q  I  L  K  L  L
     1090                  1110                  1130
CAGTTTGTGGCGAATAAAAAATGGCGACCAAGACACCTTGAAGGGCCTAATGCACGCACT
 S  L  W  R  I  K  N  G  D  Q  D  T  L  K  G  L  M  H  A  L
     1150                  1170                  1190
AAAGCACTCAAAGACGTACCACTTTCCCAAAACTGTCACTCAGAGTCTAAAGAAGACCAT
 K  H  S  K  T  Y  H  F  P  K  T  V  T  Q  S  L  K  K  T  I
     1210                  1230                  1250
CAGGTTCCTTCACAGCTTCACAATGTACAAATTGTATCAGAAGTTATTTTTAGAAATGAT
 R  F  L  H  S  F  T  M  Y  K  L  Y  Q  K  L  F  L  E  M  I
     1270                  1290                  1310
AGGTAACCAGGTCCAATCAGTAAAAATAAGCTGCTTATAACTGGAAATGGCCATTGAGCT
 G  N  Q  V  Q  S  V  K  I  S  C  L
     1330                  1350
GTTTCCTCACAATTGGCGAGATCCCATGGATGATAA
```

圖 9E


muosteo.frg MNKWLCCALLVLLDIIEWTTQETLPPKYLHYDPETGHQLLCDKCAPGTYL 50
ratosteo.frg MNKWLCCALLVFLDIIEWTTQETFPPKYLHYDPETGRQLLCDKCAPGTYL 50
huosteo.frg MNKLLCCALVFLDISIKWTTQETFPPKYLHYDEETSHQLLCDKCPPGTYL 50
muosteo.frg KQHCTVRRKTLCVPCPDHSYTDSWHTSDECVYCSPVCKELQSVKQECNRT 100
ratosteo.frg KQHCTVRRKTLCVPCPDYSYTDSWHTSDECVYCSPVCKELQTVKQECNRT 100
huosteo.frg KQHCTAKWKTVCAPCPDHYYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYVKQECNRT 100
muosteo.frg HNRVCECEEGRYLEIEFCLKHRSCPPGSGVVQAGTPERNTVCKKCPDGFF 150
ratosteo.frg HNRVCECEEGRYLELEFCLKHRSCPPGLGVLQAGTPERNTVCKRCPDGFF 150
huosteo.frg HNRVCECKEGRYLEIEFCLKHRSCPPGFGVVQAGTPERNTVCKRCPDGFF 150
muosteo.frg SGETSSKAPCIKHTNCSTFGLLLIQKGNATHDNVCSGNREATQKCGIDVT 200
ratosteo.frg SGETSSKAPCRKHTNCSSLGLLLIQKGNATHDNVCSGNREATQNCGIDVT 200
huosteo.frg SNETSSKAPCRKHTNCSVFGLLLTQKGNATHDNICSGNSESTQKCGIDVT 200

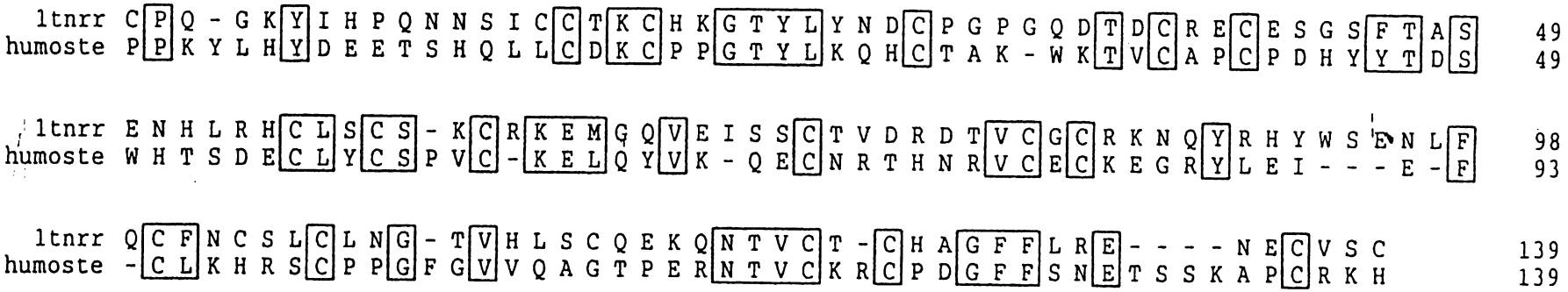
I221482

圖 9F


muosteo.frg LCEEAFFRFAVPTKIIPNWLSVLVDSLPGTKVNAESVERIKRRHSSQEQT 250
ratosteo.frg LCEEAFFRFAVPTKIIPNWLSVLVDSLPGTKVNAESVERIKRRHSSQEQT 250
huosteo.frg LCEEAFFRFAVPTKFTPNWLSVLVDNLPGTKVNAESVERIKRQHSSQEQT 250
muosteo.frg FQLLKLWKHQNRDQEMVKKIIQDIDLCESSVQRHLGHSNLTTEQLLALME 300
ratosteo.frg FQLLKLWKHQNRDQEMVKKIIQDIDLCESSVQRHIGHANLTTEQLRILME 300
huosteo.frg FQLLKLWKHQNKDQDIVKKIIQDIDLCENSVQRHIGHANLTFEQLRSLME 300
muosteo.frg SLPGKKISPEEIERTRKTCKSSEQLLKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMYALK 350
ratosteo.frg SLPGKKISPDEIERTRKTCKPSEQLLKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMYALK 350
huosteo.frg SLPGKKVGAEDIEKTIKACKPSDQILKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMHALK 350
muosteo.frg HLKTSHFPKTVTHSLRKTMRFLHSFTMYRLYQKLFLEMIGNQVQSVKISC 400
ratosteo.frg HLKAYHFPKTVTHSLRKTIRFLHSFTMYRLYQKLFLEMIGNQVQSVKISC 400
huosteo.frg HSKTYHFPKTVTQSLKKTIRFLHSFTMYKLYQKLFLEMIGNQVQSVKISC 400
muosteo.frg L 401
ratosteo.frg L 401
huosteo.frg L 401

I221482

圖 10


ltnrr C P Q - G K Y I H P Q N N S I C C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D T D C R E C E S G S F T A S 49
humoste P P K Y L H Y D E E T S H Q L L C D K C P P G T Y L K Q H C T A K - W K T V C A P C P D H Y Y T D S 49
ltnrr E N H L R H C L S C S - K C R K E M G Q V E I S S C T V D R D T V C G C R K N Q Y R H Y W S E N L F 98
humoste W H T S D E C L Y C S P V C - K E L Q Y V K - Q E C N R T H N R V C E C K E G R Y L E I - - - E - F 93
ltnrr Q C F N C S L C L N G - T V H L S C Q E K Q N T V C T - C H A G F F L R E - - - - N E C V S C 139
humoste - C L K H R S C P P G F G V V Q A G T P E R N T V C K R C P D G F F S N E T S S K A P C R K H 139

I221482

圖 11

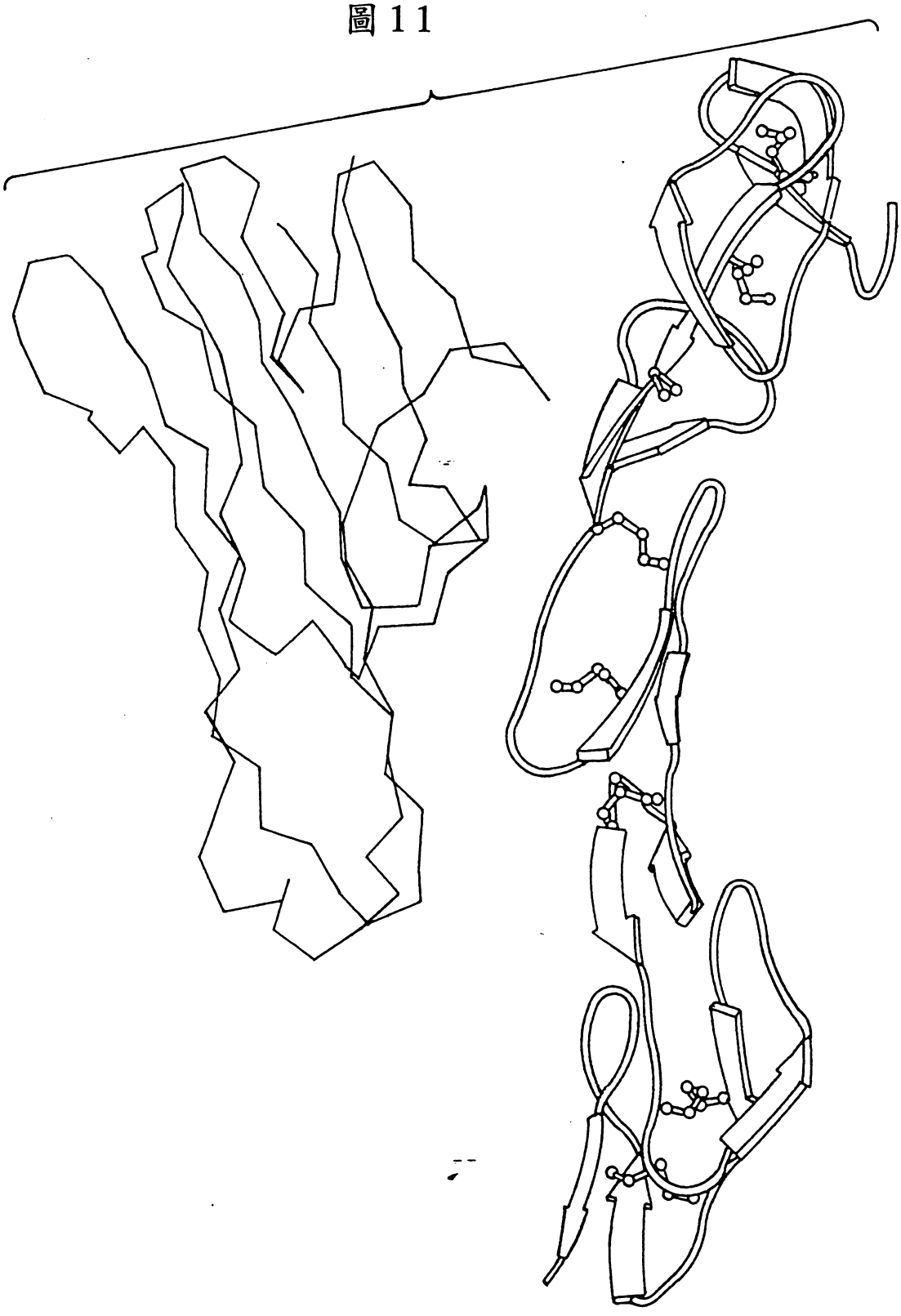
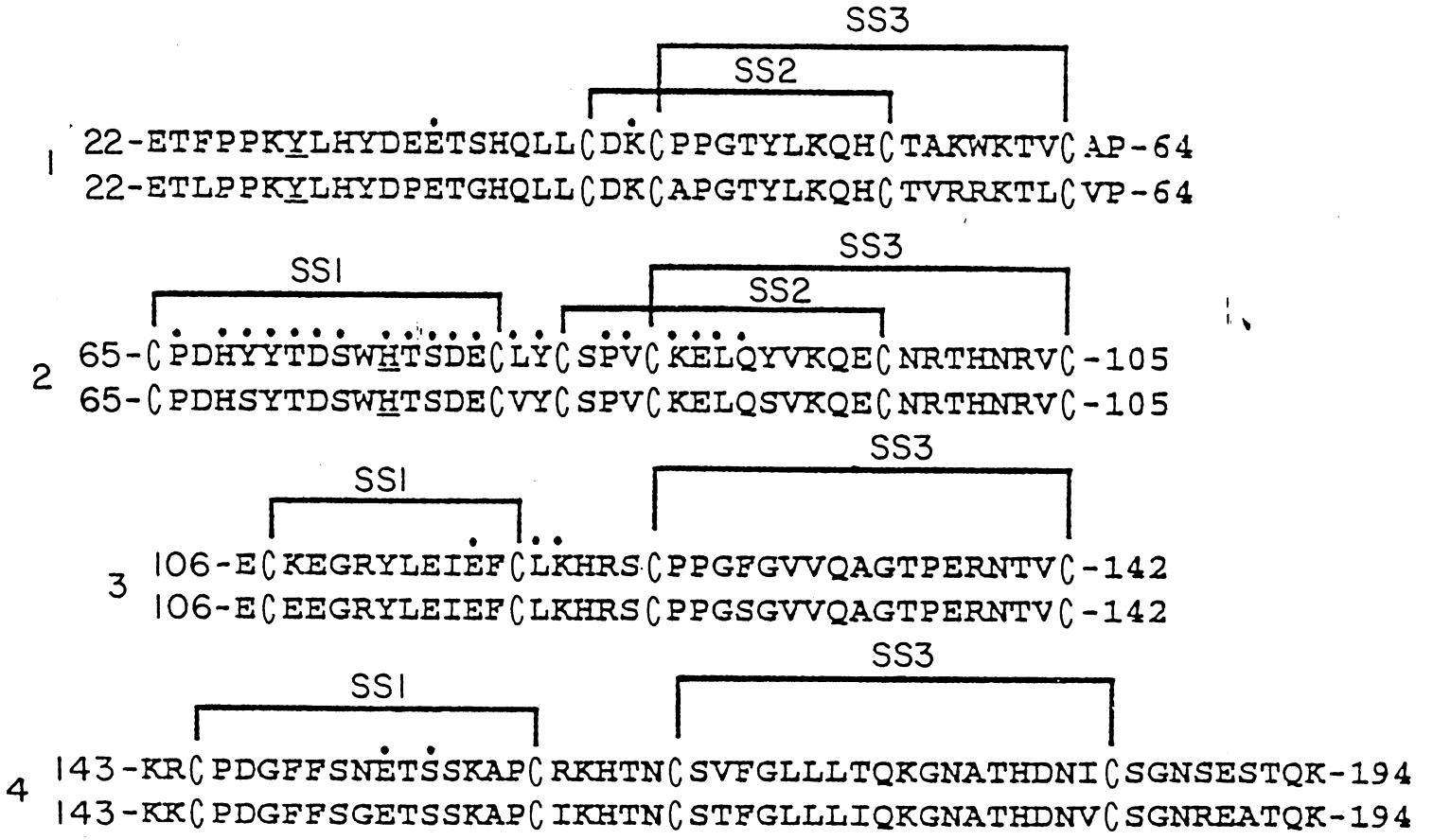
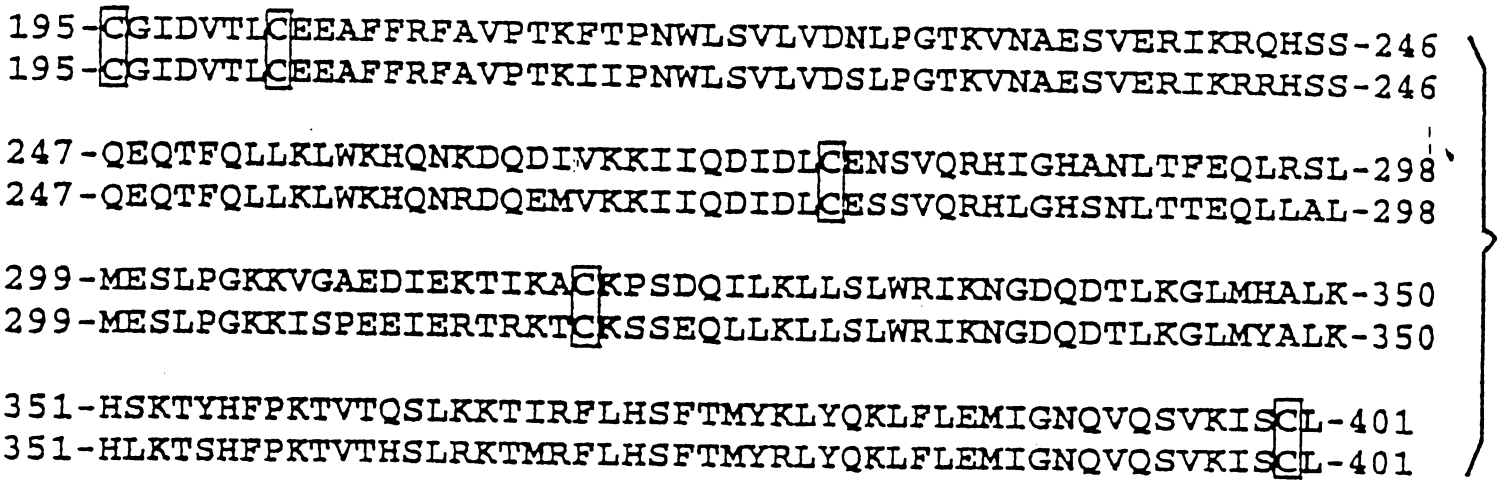


圖 12A



I221482

圖 12B



I221482

圖13A

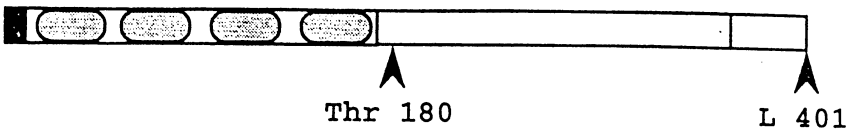


圖13B

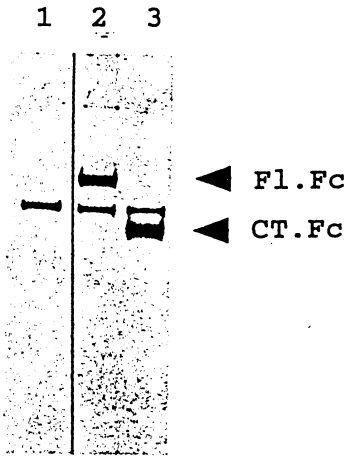


圖13C

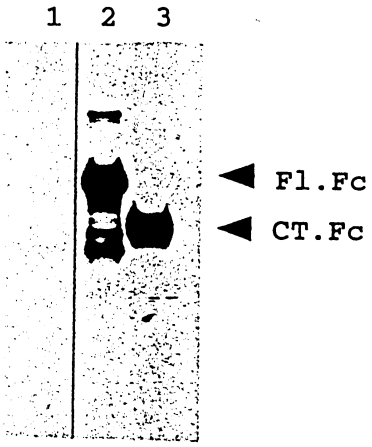


圖 14A

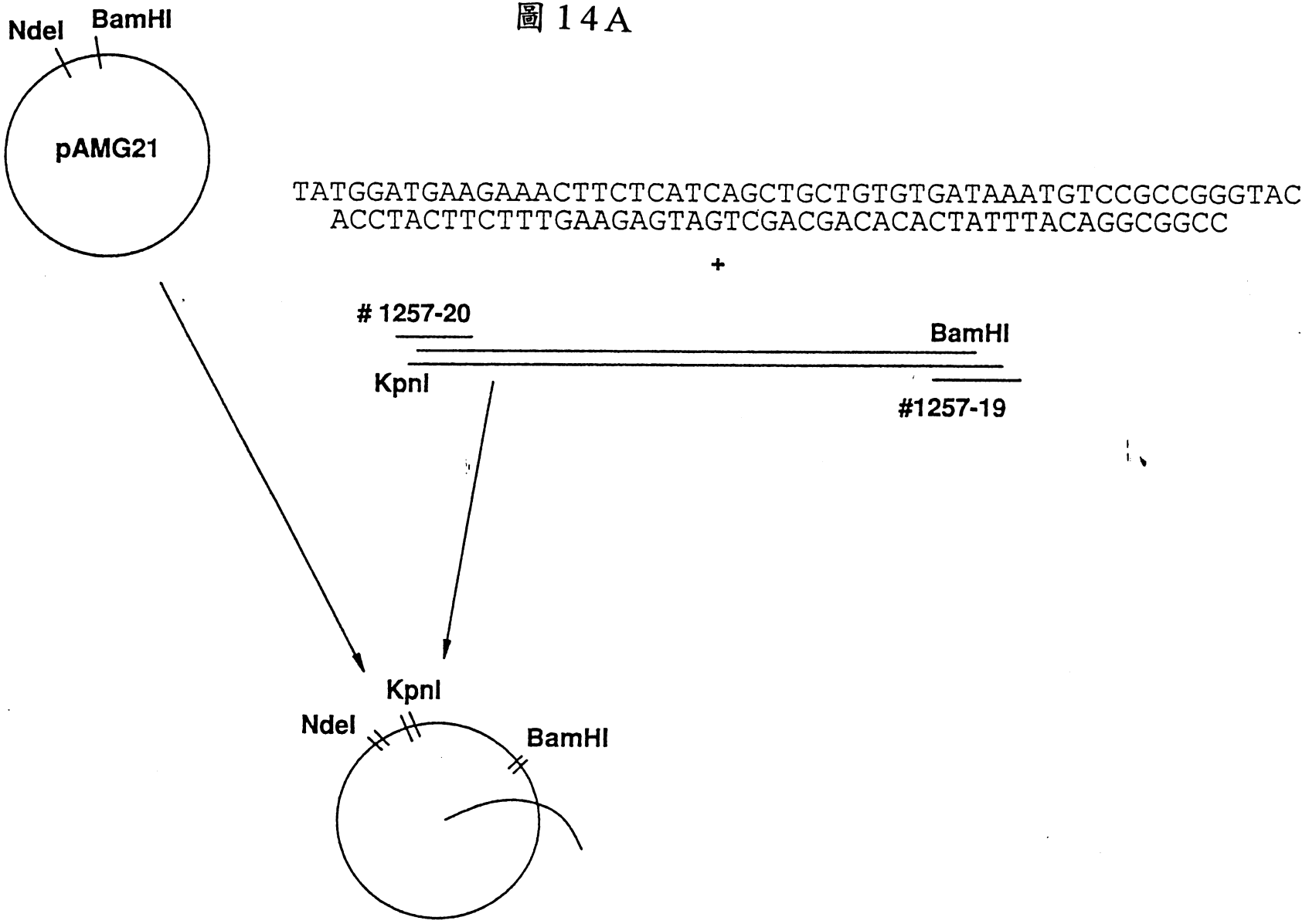

NdeI
BamHI
pAMG21
TATGGATGAAGAAACTTCTCATCAGCTGCTGTGTGATAAATGTCCGCCGGGTAC
ACCTACTTCTTTGAAGAGTAGTCGACGACACACTATTTACAGGCGGCC
+
1257-20
BamHI
KpnI
#1257-19
KpnI
NdeI
BamHI

圖14B

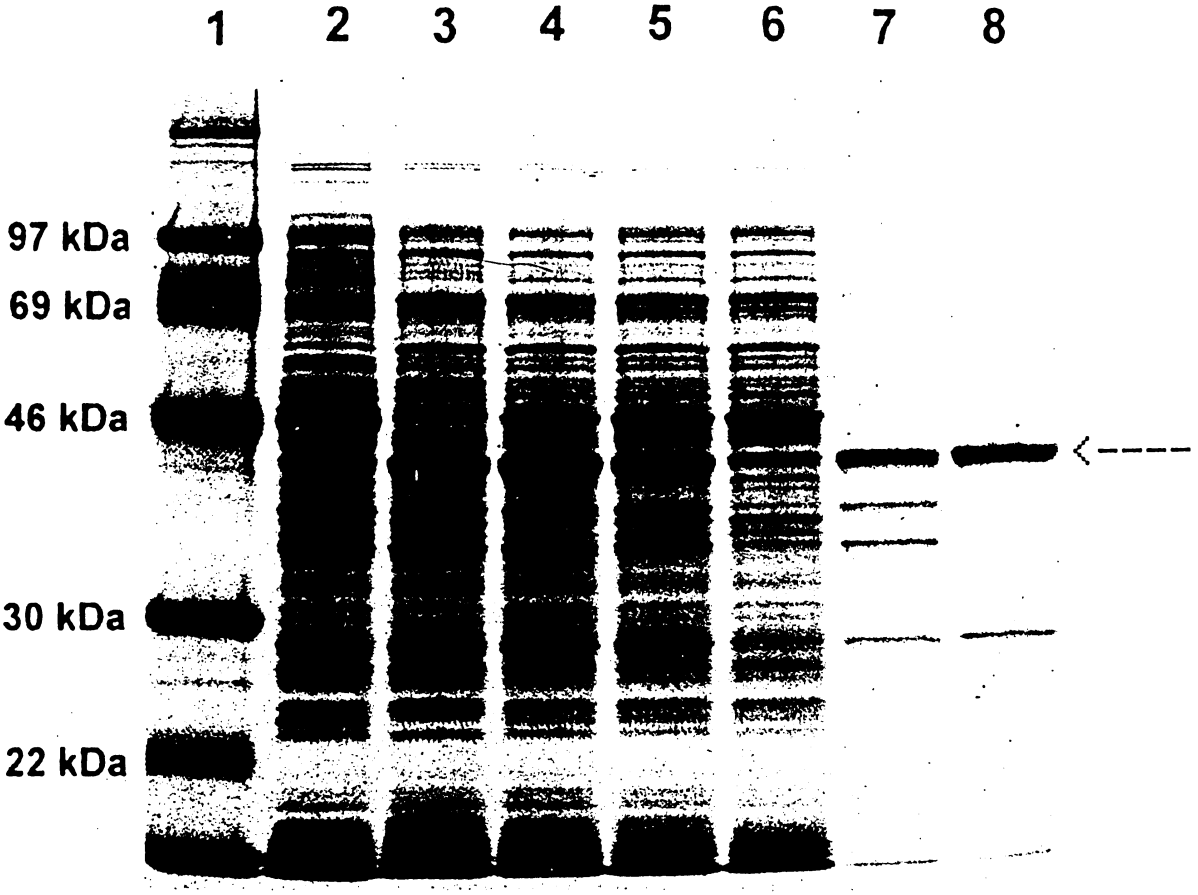


圖 15

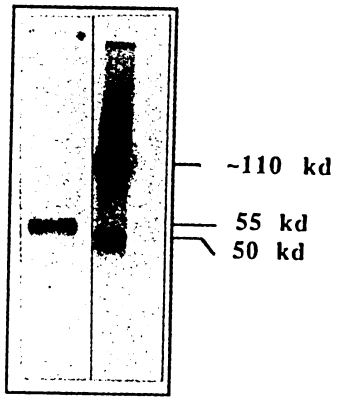


圖16A

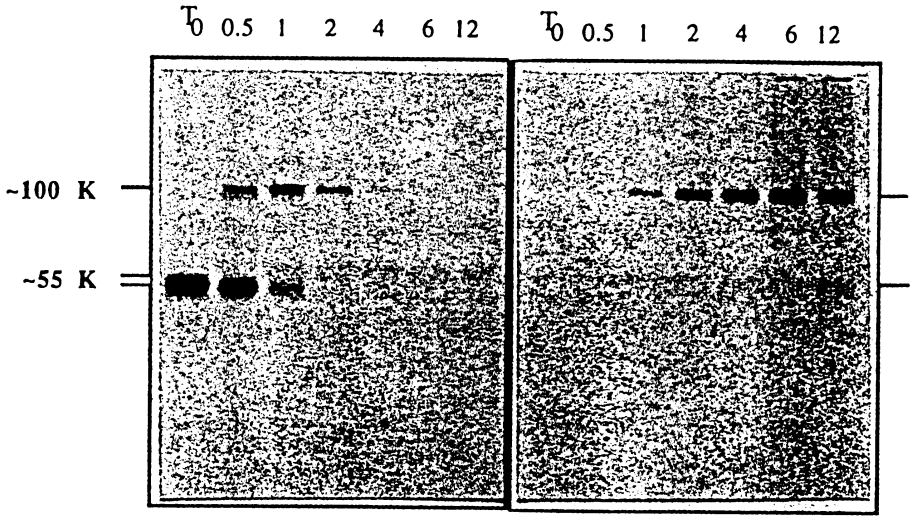

T0 0.5 1 2 4 6 12
T0 0.5 1 2 4 6 12
~100 K
~55 K

圖16B

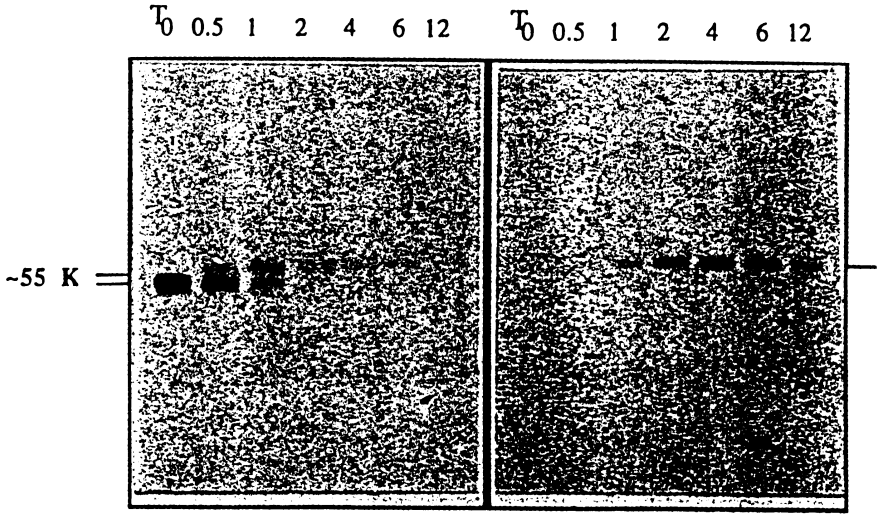

T0 0.5 1 2 4 6 12
T0 0.5 1 2 4 6 12
~55 K

圖 17

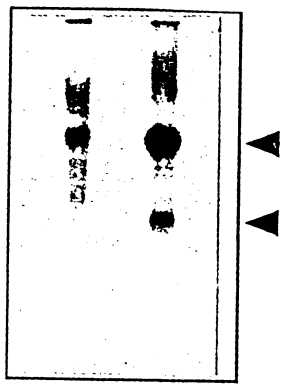


圖 18

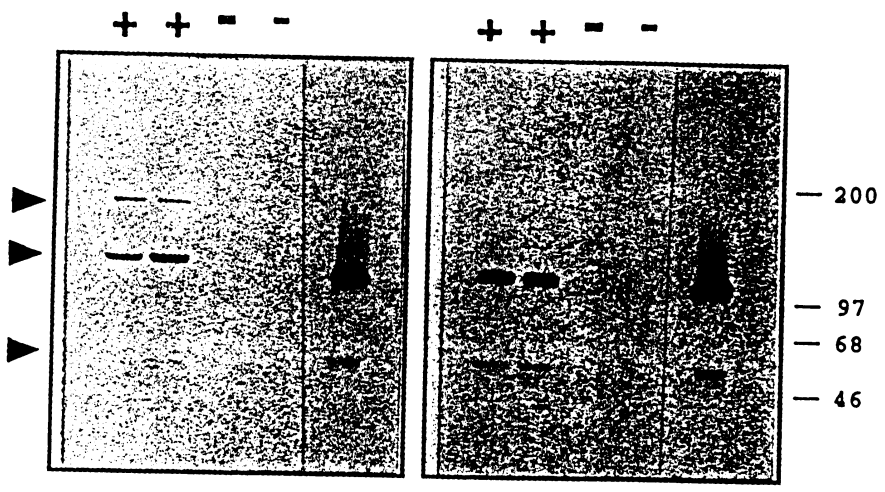


圖 19A

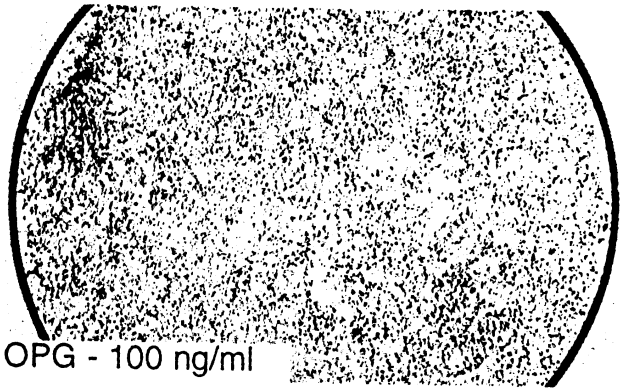


圖 19B

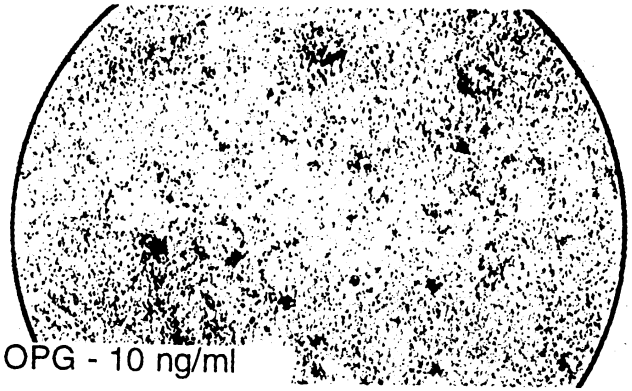


圖 19C

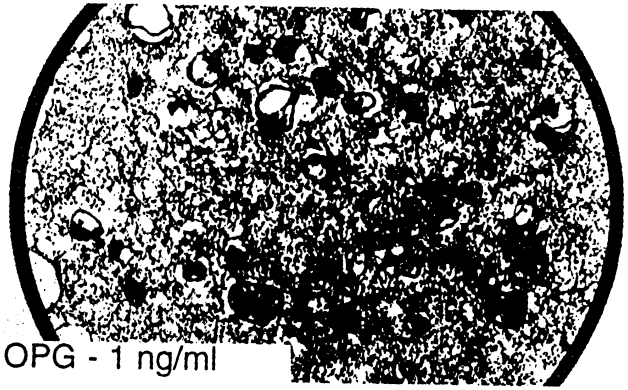


圖 19D

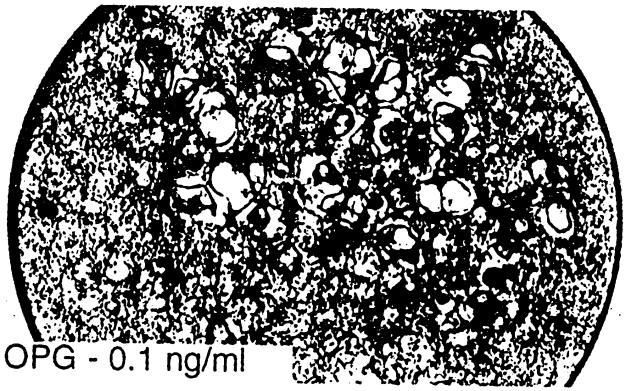


圖 19E

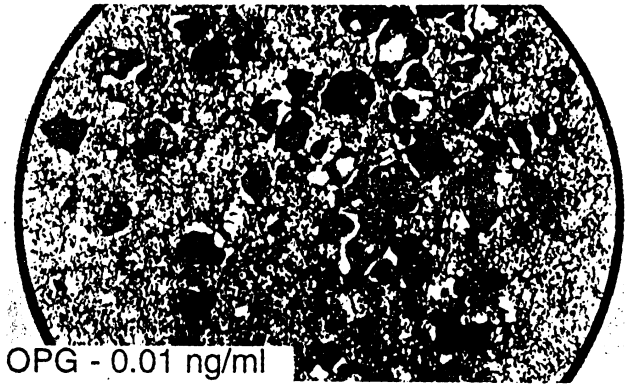


圖 19F

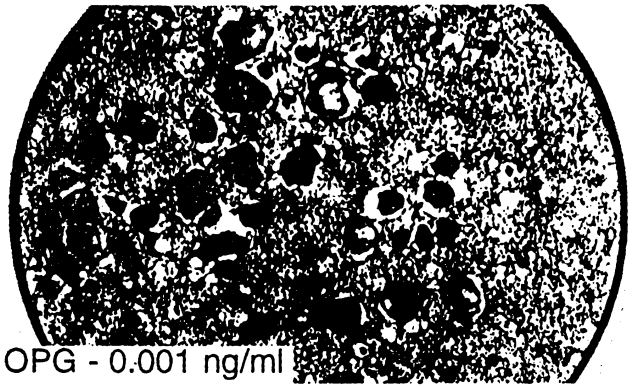


圖 19G

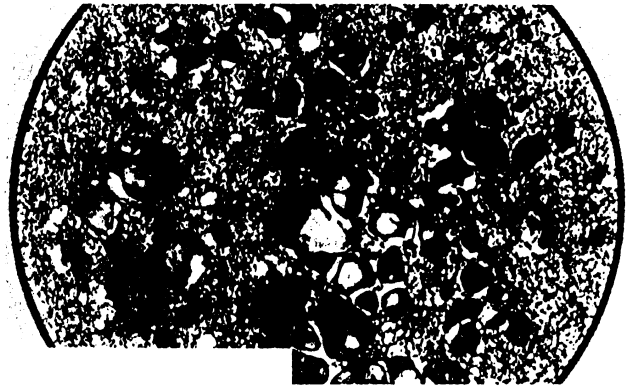


圖20

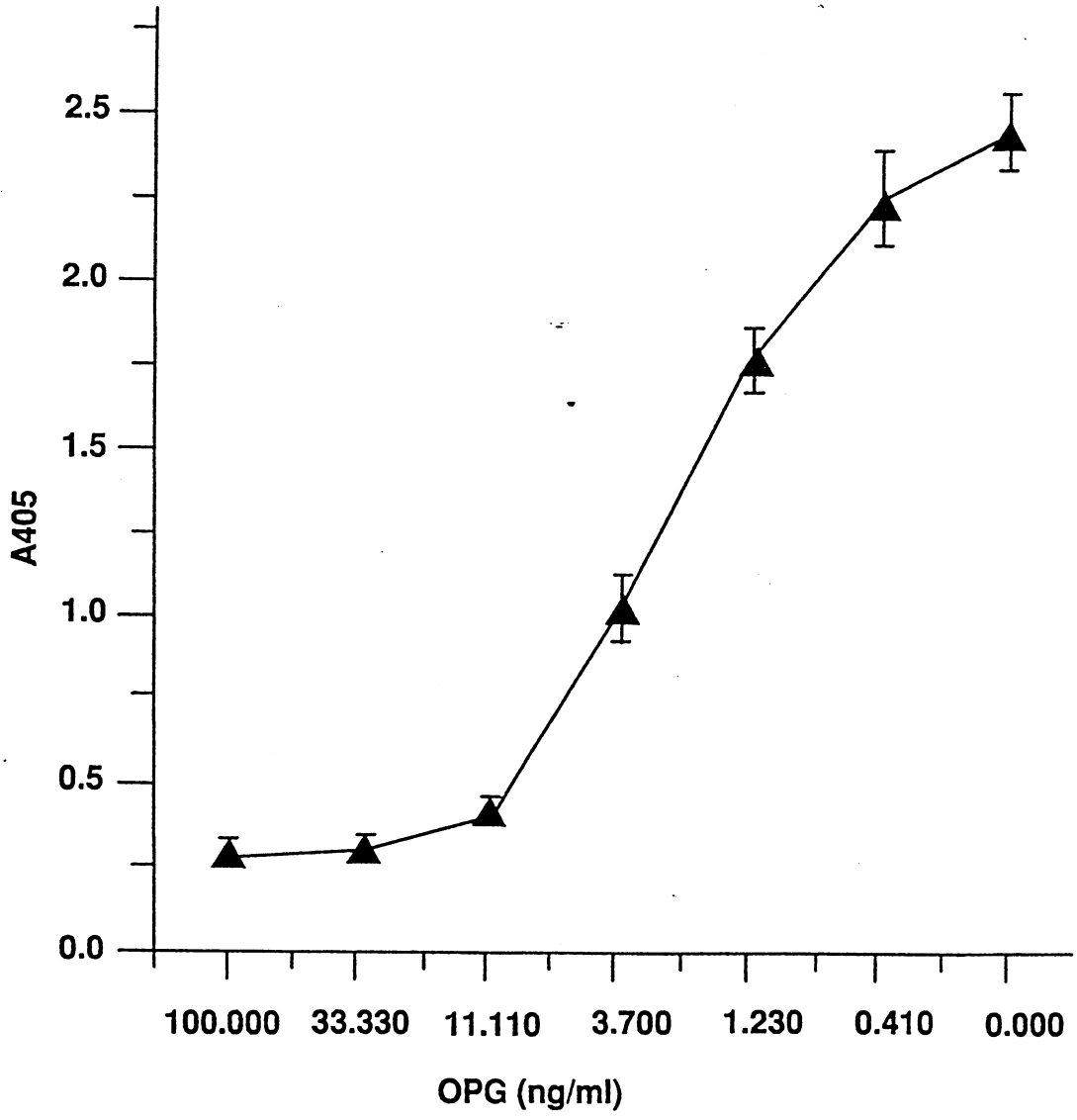
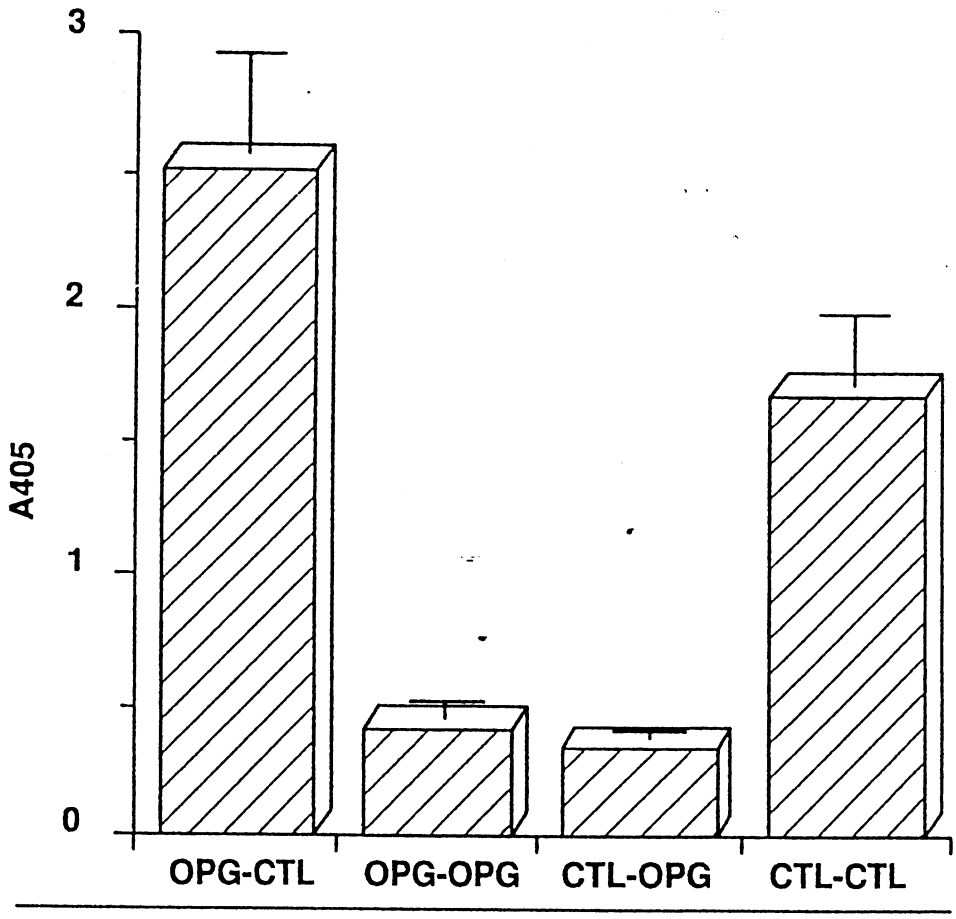

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
A405
100.000
33.330
11.110
3.700
1.230
0.410
0.000
OPG (ng/ml)

圖 21


3
2
1
0
A405
OPG-CTL
OPG-OPG
CTL-OPG
CTL-CTL

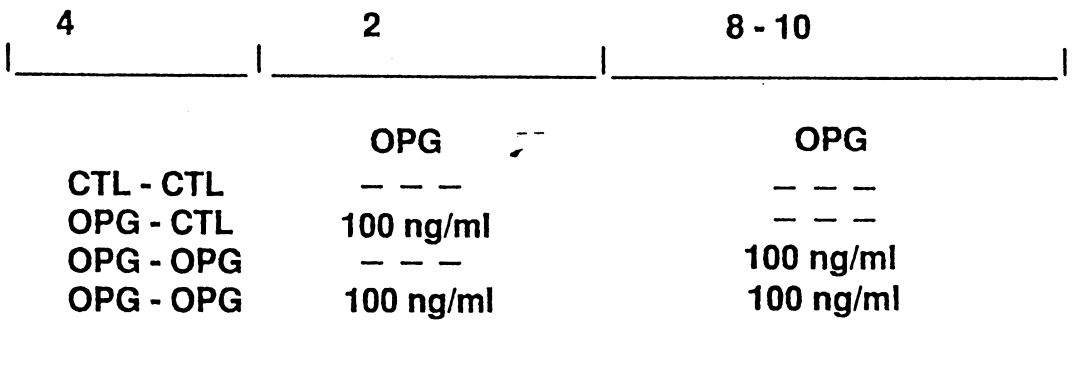

4
2
8 - 10
OPG
OPG
CTL - CTL
OPG - CTL
OPG - OPG
OPG - OPG
– – –
100 ng/ml
– – –
100 ng/ml
– – –
– – –
100 ng/ml
100 ng/ml

圖22A

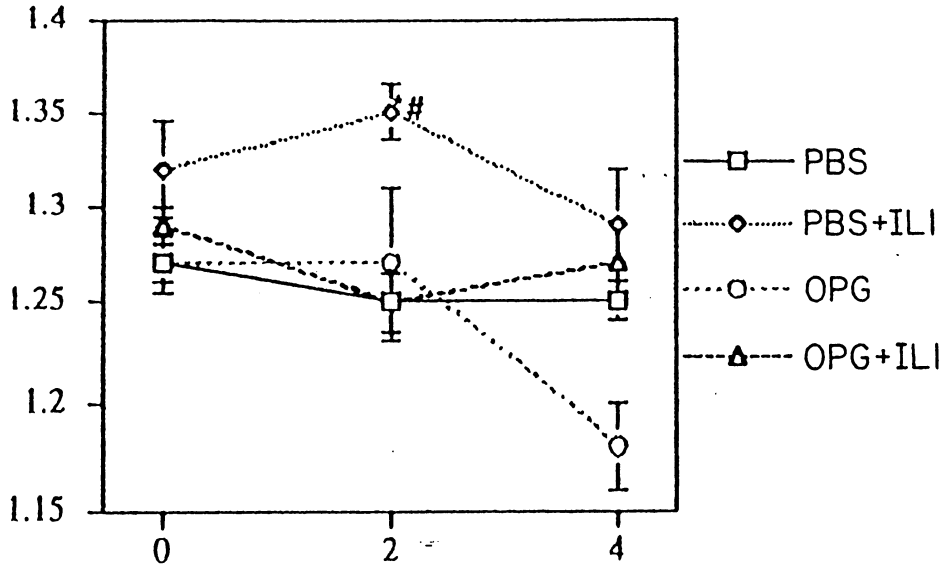
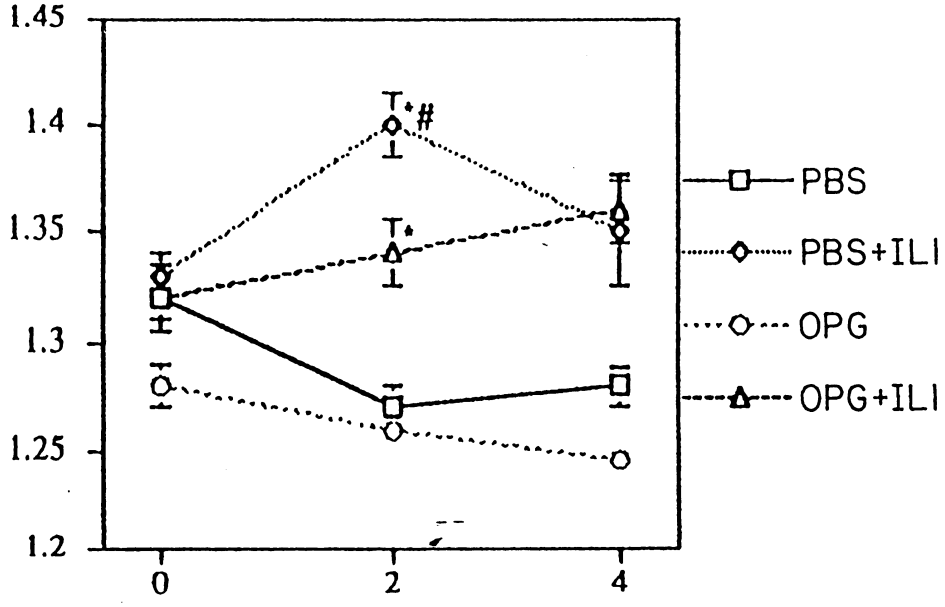

1.4
1.35
1.3
1.25
1.2
1.15
0
2
4
#
PBS
PBS+ILI
OPG
OPG+ILI

圖22B


1.45
1.4
1.35
1.3
1.25
1.2
0
2
4
*
#
PBS
PBS+ILI
OPG
OPG+ILI

*

#

圖23A

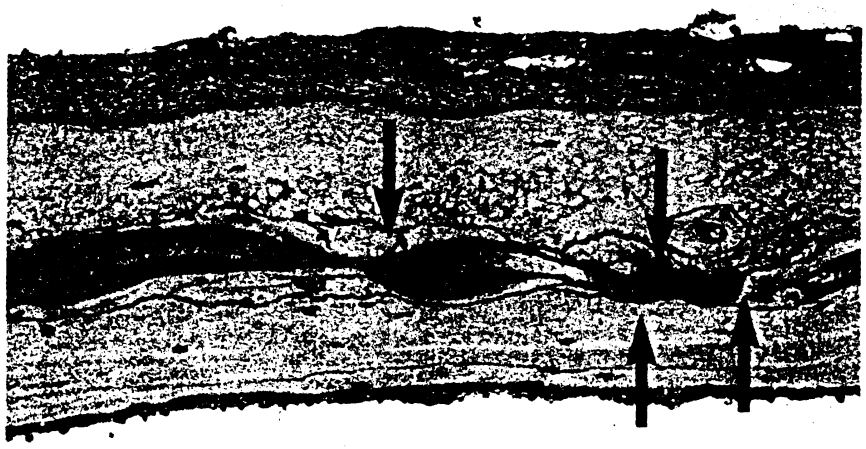


圖23B

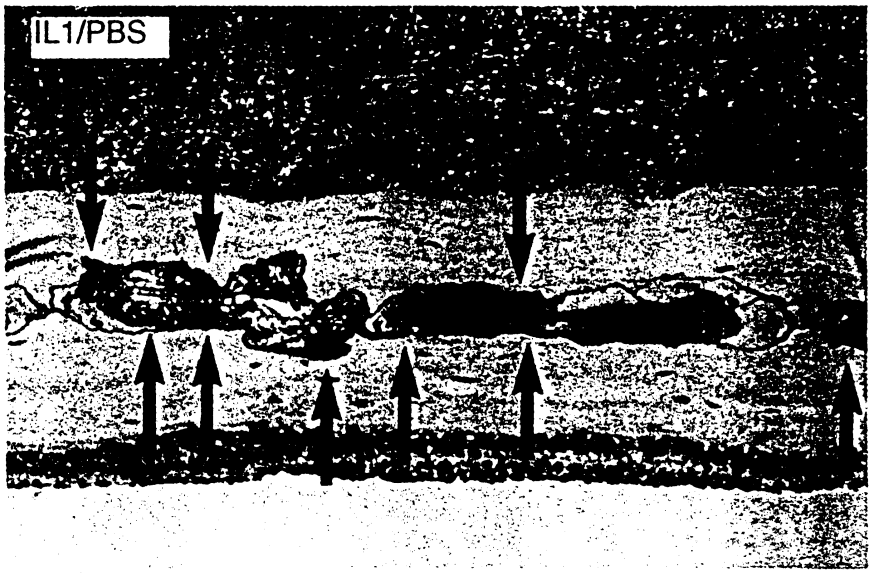


圖23C

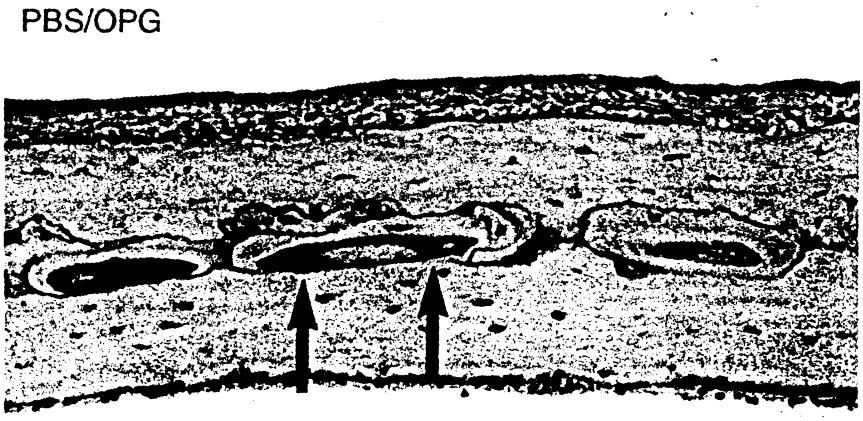
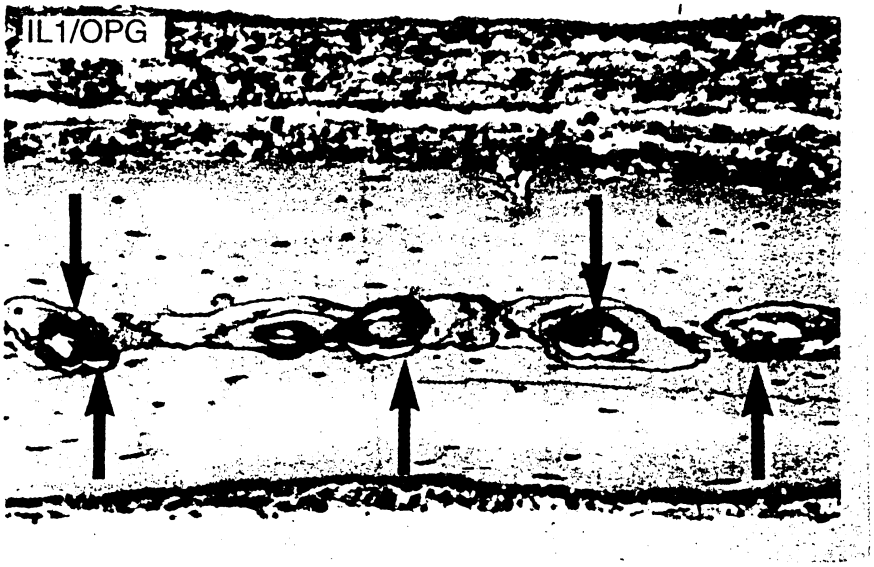


圖23D



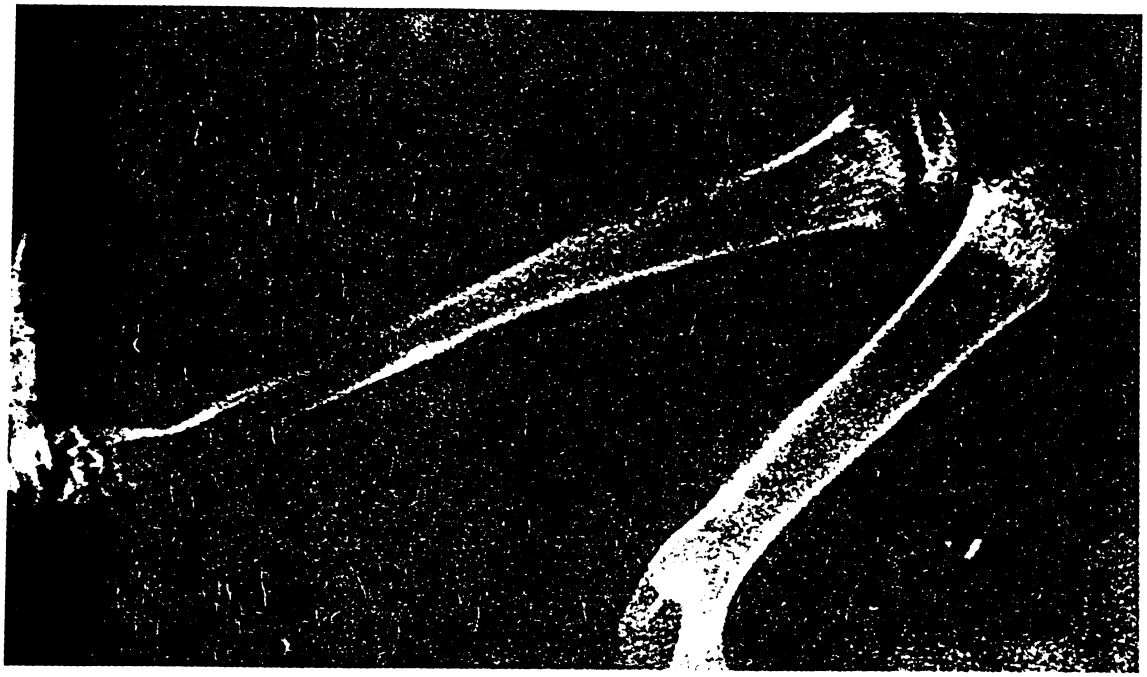


圖24A

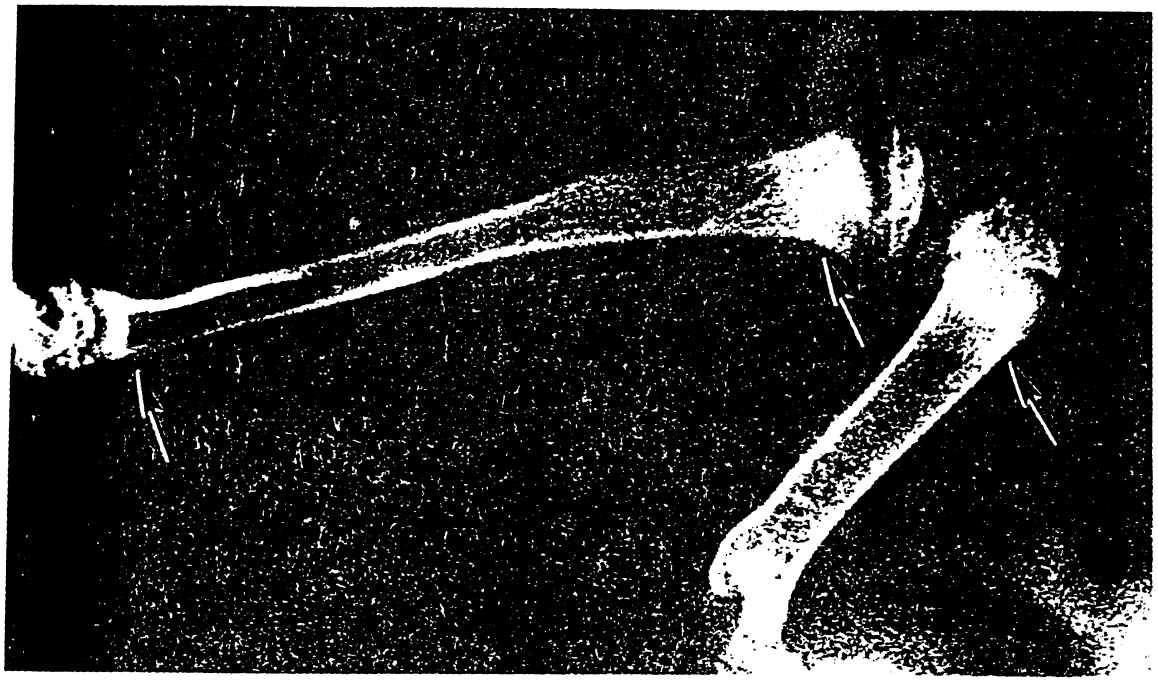


圖24B

圖 2 5

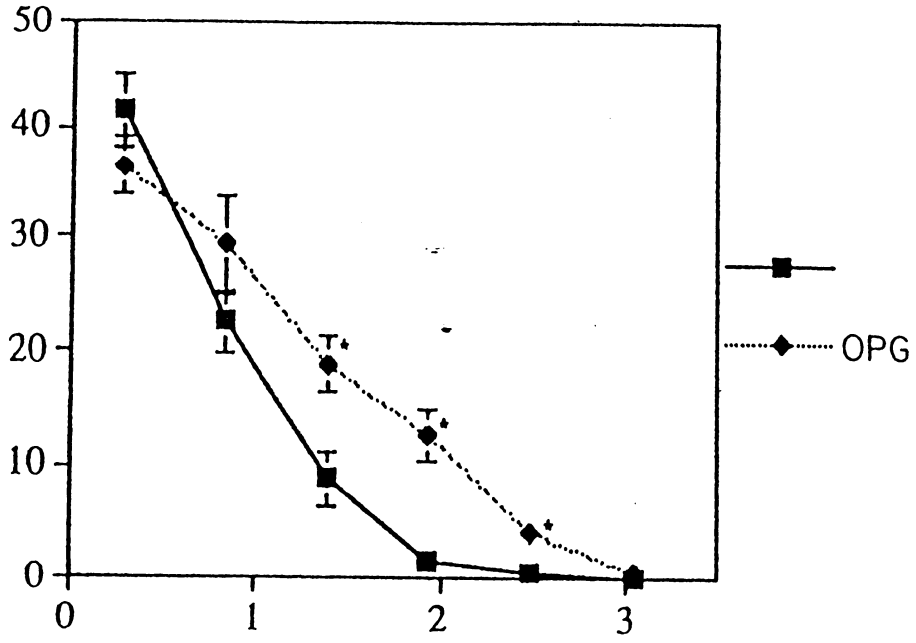


圖26A

圖26B

圖 27

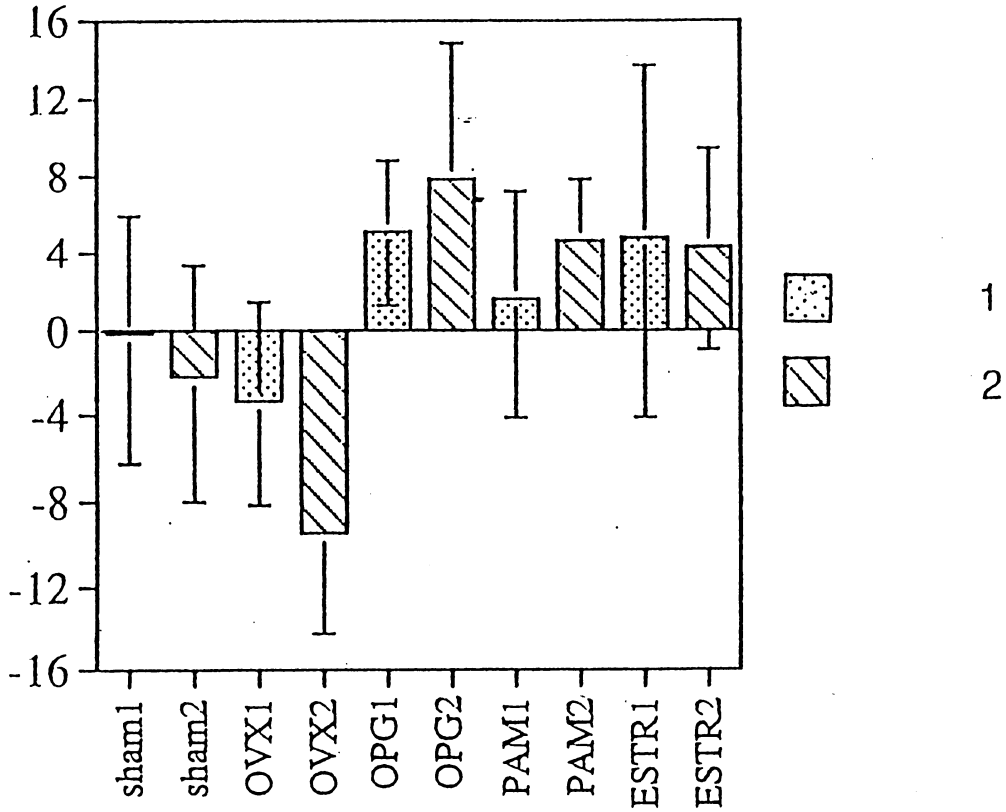
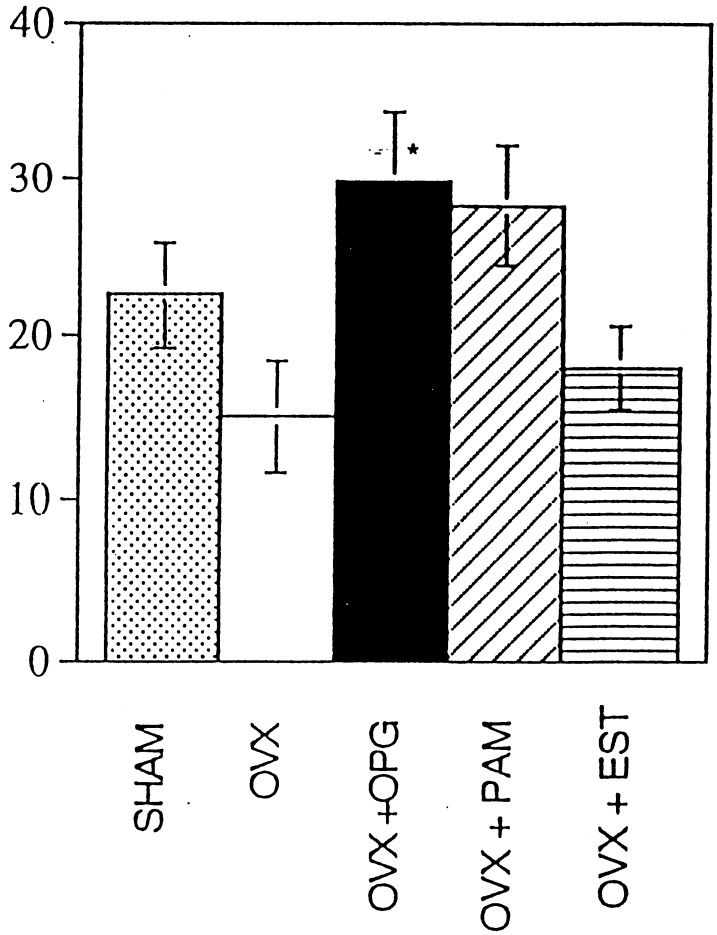

16
12
8
4
0
-4
-8
-12
-16
sham1
sham2
OVX1
OVX2
OPG1
OPG2
PAM1
PAM2
ESTR1
ESTR2
1
2

圖 28



年 月 日 修正
93 6. 21 補充

A6
B6

（由本局填寫）

承辦人代碼：
大　　類：
ＩＰＣ分類：

本案已向：

國（地區）　申請專利，申請日期：　　案號：　　，□有　□無主張優先權

美	1996.9.3.	08/706,945

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	86.04.03	CCRC 940155
		CCRC 940156
		CCRC 940157
		CCRC 940158
		CCRC 940159

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

五、發明說明（125）

上述二體拼合物可用離子交換或尺寸排斥層析術進一步純化。

用上述程序製備的二體物PEG-OPG拼合物(其中的OPG為HuOPG met[22-194] P25A)包括雙硫鍵結OPG二體物，具有脂族胺類交聯劑的共價硫醚OPG二體物，3.4 kD和8 kD PEG啞鈴和單鈴。

使用實施例11A中所述蝕骨細胞成熟化檢定測試PEG-OPG拼合物的活體外活性並依實施例11C中所述在注射到小鼠體內之後測量增加的骨密度以測定其活體內活性。其活體內活性列於下面表3之中。

表3

聚乙二醇化OPG的活體內生物活性

OPG構成物	脛骨骨密度之增加
muOPG met [22-194]	-
muOPG met [22-194] 5k PEG	+
muOPG met [22-194] 20k PEG	+
huOPG met [22-194] P25A	-
huOPG met [22-194] P25A 5k PEG	+
huOPG met [22-194] P25A 20k PEG	+
huOPG met [22-194] P25A 31k PEG	+
huOPG met [22-194] P25A 57k PEG	+
huOPG met [22-194] P25A 12k PEG	+
huOPG met [22-194] P25A 20k 分枝PEG	+
huOPG met [22-194] P25A 8k PEG二體物	+
huOPG met [22-194] P25A雙硫鍵交換	+

雖然本發明已就其視為較佳的實施例說明過，但本發明不限於所揭示的實施例，且相反地，其意欲涵蓋在後附申請專利範圍的旨意和範圍之內的各種修改和相當物，該範圍要根據最廣的解釋以期涵蓋所有彼等修改和相當例。

圖式簡單說明

圖1 EST LORF之FASTA分析及剖面分析，以及TNFR超族之構造圖。

圖2 全長度老鼠OPG基因的構造及序列。

圖3 預測老鼠OPG蛋白質序列之PepPlot分析。

圖4 OPG cDNA在人類組織中之mRNA表現樣式。

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)
裝 訂 線

五、發明說明（126）

圖 5 HE-OPG 外來基因在小鼠肝中之北方吸漬分析。

圖 6 對照組動物及 OPG 外來基因導入小鼠之輻射相片。

圖 7 對照組動物及 OPG 外來基因導入小鼠之骨顯微照片。

圖 8 正常表現子、CR1 過度表現子及 HE-OPG 過度表現子之脾顯微照片。

圖 9 小鼠及人類 OPG cDNA 株之構造及序列。

圖 10 TNFR-1 及人類 OPG 細胞外域中的守恆序列比較。

圖 11 人類 OPG 之三次元模型。

圖 12 OPG 富含半胱胺酸域之構造。

圖 13 全長度及截頭小鼠 OPG-Fc 融合蛋白之表現及分泌。

圖 14 人類 OPG 在大腸桿菌中之表現。

圖 15 CHO 細胞產生之重組鼠類 OPG 經 SDS-PAGE 及西方吸漬分析之結果。

圖 16 CHO 細胞產生之重組鼠類 OPG 之脈衝-追踪分析。

圖 17 在 CTLL-2 細胞系中之 OPG 表現。

圖 18 對照小鼠及 OPG 導入外來基因小鼠之血清樣品及肝萃取物所得 OPG 表現之檢測。

圖 19 huOPG[22-401]-Fc 融合蛋白質於活體外對蝕骨細胞形成之影響。

圖 20 蝕骨細胞培養物 TRAP 活性隨 OPG 量之增加而減低。

圖 21 OPG 對蝕骨細胞分化終段之影響。

圖 22 IL-1β、IL-1α 及 OPG 對小鼠血液離子化鈣之影響。

圖 23 OPG 對於對照小鼠及 IL-1 處理小鼠頭頂蝕骨細胞之影響。

圖 24 正常小鼠骨髓腔骨質蓄積之放射攝影分析。

圖 25 正常小鼠骨髓腔骨質蓄積之組織形態測定分析。

圖 26 正常小鼠骨髓腔骨質蓄積之組織學分析。

圖 27 施用於 OPG 之卵巢切除小鼠之活性

圖 28 骨幹骺 端之骨密度。

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

六、申請專利範圍 93.6.21 修正 補充

1. 一種分離出的核酸，其編碼具有至少抑制骨重吸收活性之促骨堆積肽(OPG)之多肽，其中該核酸係選自下列所成組合之中者：

a)SEQ ID NO：120，SEQ ID NO：122，和SEQ ID NO：124中所示核酸或其互補股；

b)可於42℃下5X SSC、50%甲醯胺及0.5% SDS之嚴格條件與SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 122及SEQ ID NO: 124所示之多肽編碼區之互補股雜合，並可於室溫下2X SSC、55℃下1X SSC及55℃下0.5X SSC之連續沖洗條件下保持雜合狀態之核酸，

SEQ ID NO: 120:

```
ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTGTTGCCC AGACCTTATA TAAAACGTCA TGTTCGCCTG      60

GGCAGCAGAG AAGCACCTAG CACTGGCCCA GCGGCTGCCG CCTGAGGTTT CCAGAGGACC     120

ACA ATG AAC AAG TGG CTG TGC TGT GCA CTC CTG GTG TTC TTG GAC ATC        168
    Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile
      1               5                  10                  15

ATT GAA TGG ACA ACC CAG GAA ACC TTT CCT CCA AAA TAC TTG CAT TAT        216
Ile Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr
                20                  25                  30

GAC CCA GAA ACC GGA CGT CAG CTC TTG TGT GAC AAA TGT GCT CCT GGC        264
Asp Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly
            35                  40                  45

ACC TAC CTA AAA CAG CAC TGC ACA GTC AGG AGG AAG ACA CTG TGT GTC        312
Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val
        50                  55                  60

CCT TGC CCT GAC TAC TCT TAT ACA GAC AGC TGG CAC ACG AGT GAT GAA        360
Pro Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu
    65                  70                  75
```


本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂 線

六、申請專利範圍

```
TGC GTG TAC TGC AGC CCC GTG TGC AAG GAA CTG CAG ACC GTG AAA CAG        408
Cys Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln
 80                  85                  90                  95

GAG TGC AAC CGC ACC CAC AAC CGA GTG TGC GAA TGT GAG GAA GGG CGC        456
Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg
                100                 105                 110

TAC CTG GAG CTC GAA TTC TGC TTG AAG CAC CGG AGC TGT CCC CCA GGC        504
Tyr Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly
            115                 120                 125

TTG GGT GTG CTG CAG GCT GGG ACC CCA GAG CGA AAC ACG GTT TGC AAA        552
Leu Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys
        130                 135                 140

AGA TGT CCG GAT GGG TTC TTC TCA GGT GAG ACG TCA TCG AAA GCA CCC        600
Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro
    145                 150                 155

TGT AGG AAA CAC ACC AAC TGC AGC TCA CTT GGC CTC CTG CTA ATT CAG        648
Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Gln
160                 165                 170                 175

AAA GGA AAT GCA ACA CAT GAC AAT GTA TGT TCC GGA AAC AGA GAA GCA        696
Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala
                180                 185                 190

ACT CAA AAT TGT GGA ATA GAT GTC ACC CTG TGC GAA GAG GCA TTC TTC        744
Thr Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe
            195                 200                 205

AGG TTT GCT GTG CCT ACC AAG ATT ATA CCG AAT TGG CTG AGT GTT CTG        792
Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu
        210                 215                 220

GTG GAC AGT TTG CCT GGG ACC AAA GTG AAT GCA GAG AGT GTA GAG AGG        840
Val Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg
    225                 230                 235

ATA AAA CGG AGA CAC AGC TCG CAA GAG CAA ACT TTC CAG CTA CTT AAG        888
Ile Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys
240                 245                 250                 255

CTG TGG AAG CAT CAA AAC AGA GAC CAG GAA ATG GTG AAG AAG ATC ATC        936
Leu Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile
                260                 265                 270

CAA GAC ATT GAC CTC TGT GAA AGC AGT GTG CAA CGG CAT ATC GGC CAC        984
Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Ile Gly His
            275                 280                 285
```


本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂

六、申請專利範圍

```
GCG AAC CTC ACC ACA GAG CAG CTC CGC ATC TTG ATG GAG AGC TTG CCT      1032
Ala Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Arg Ile Leu Met Glu Ser Leu Pro
        290                 295                 300

GGG AAG AAG ATC AGC CCA GAC GAG ATT GAG AGA ACG AGA AAG ACC TGC      1080
Gly Lys Lys Ile Ser Pro Asp Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys
    305                 310                 315

AAA CCC AGC GAG CAG CTC CTG AAG CTA CTG AGC TTG TGG AGG ATC AAA      1128
Lys Pro Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys
320                 325                 330                 335

AAT GGA GAC CAA GAC ACC TTG AAG GGC CTG ATG TAC GCA CTC AAG CAC      1176
Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His
                340                 345                 350

TTG AAA GCA TAC CAC TTT CCC AAA ACC GTC ACC CAC AGT CTG AGG AAG      1224
Leu Lys Ala Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys
            355                 360                 365

ACC ATC AGG TTC TTG CAC AGC TTC ACC ATG TAC CGA TTG TAT CAG AAA      1272
Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys
        370                 375                 380

CTC TTT CTA GAA ATG ATA GGG AAT CAG GTT CAA TCA GTG AAG ATA AGC      1320
Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser
    385                 390                 395

TGC TTA TAGTTAGGAA TGGTCACTGG GCTGTTTCTT CAGGATGGGC CAACACTGAT       1376
Cys Leu
400

GGAGCAGATG GCTGCTTCTC CGGCTCTTGA AATGGCAGTT GATTCCTTTC TCATCAGTTG    1436

GTGGGAATGA AGATCCTCCA GCCCAACACA CACACTGGGG AGTCTGAGTC AGGAGAGTGA    1496

GGCAGGCTAT TTGATAATTG TGCAAAGCTG CCAGGTGTAC ACCTAGAAAG TCAAGCACCC    1556

TGAGAAAGAG GATATTTTTA TAACCTCAAA CATAGGCCCT TTCCTTCCTC TCCTTATGGA    1616

TGAGTACTCA GAAGGCTTCT ACTATCTTCT GTGTCATCCC TAGATGAAGG CCTCTTTTAT    1676

TTATTTTTTT ATTCTTTTTT TCGGAGCTGG GGACCGAACC CAGGGCCTTG CGCTTGCGAG    1736

GCAAGTGCTC TACCACTGAG CTAAATCTCC AACCCCTGAA GGCCTCTTTC TTTCTGCCTC    1796

TGATAGTCTA TGACATTCTT TTTTCTACAA TTCGTATCAG GTGCACGAGC CTTATCCCAT    1856

TTGTAGGTTT CTAGGCAAGT TGACCGTTAG CTATTTTTCC CTCTGAAGAT TTGATTCGAG    1916

TTGCAGACTT GGCTAGACAA GCAGGGGTAG GTTATGGTAG TTTATTTAAC AGACTGCCAC    1976
```


本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂

六、申請專利範圍

```
CAGGAGTCCA GTGTTTCTTG TTCCTCTGTA GTTGTACCTA AGCTGACTCC AAGTACATTT    2036

AGTATGAAAA ATAATCAACA AATTTTATTC CTTCTATCAA CATTGGCTAG CTTTGTTTCA    2096

GGGCACTAAA AGAAACTACT ATATGGAGAA AGAATTGATA TTGCCCCCAA CGTTCAACAA    2156

CCCAATAGTT TATCCAGCTG TCATGCCTGG TTCAGTGTCT ACTGACTATG CGCCCTCTTA    2216

TTACTGCATG CAGTAATTCA ACTGGAAATA GTAATAATAA TAATAGAAAT AAAATCTAGA    2276

CTCCATTGGA TCTCTCTGAA TATGGGAATA TCTAACTTAA GAAGCTTTGA GATTTCAGTT    2336

GTGTTAAAGG CTTTTATTAA AAAGCTGATG CTCTTCTGTA AAAGTTACTA ATATATCTGT    2396

AAGACTATTA CAGTATTGCT ATTTATATCC ATCCAG                              2432
```

SEQ ID NO: 122:

```
CCTTATATAA ACGTCATGAT TGCCTGGGCT GCAGAGACGC ACCTAGCACT GACCCAGCGG      60

CTGCCTCCTG AGGTTTCCCG AGGACCACA ATG AAC AAG TGG CTG TGC TGC GCA        113
                                Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala
                                  1               5

CTC CTG GTG CTC CTG GAC ATC ATT GAA TGG ACA ACC CAG GAA ACC CTT        161
Leu Leu Val Leu Leu Asp Ile Ile Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu
     10                  15                  20

CCT CCA AAG TAC TTG CAT TAT GAC CCA GAA ACT GGT CAT CAG CTC CTG        209
Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu
 25                  30                  35                  40

TGT GAC AAA TGT GCT CCT GGC ACC TAC CTA AAA CAG CAC TGC ACA GTG        257
Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val
                 45                  50                  55

AGG AGG AAG ACA TTG TGT GTC CCT TGC CCT GAC CAC TCT TAT ACG GAC        305
Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp
             60                  65                  70

AGC TGG CAC ACC AGT GAT GAG TGT GTG TAT TGC AGC CCA GTG TGC AAG        353
Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys
         75                  80                  85
```


本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

```
GAA CTG CAG TCC GTG AAG CAG GAG TGC AAC CGC ACC CAC AAC CGA GTG          401
Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val
     90                  95                 100

TGT GAG TGT GAG GAA GGG CGT TAC CTG GAG ATC GAA TTC TGC TTG AAG          449
Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys
105                 110                 115                 120

CAC CGG AGC TGT CCC CCG GGC TCC GGC GTG GTG CAA GCT GGA ACC CCA          497
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro
                125                 130                 135

GAG CGA AAC ACA GTT TGC AAA AAA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA GGT          545
Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly
            140                 145                 150

GAG ACT TCA TCG AAA GCA CCC TGT ATA AAA CAC ACG AAC TGC AGC ACA          593
Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Ile Lys His Thr Asn Cys Ser Thr
        155                 160                 165

TTT GGC CTC CTG CTA ATT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAT GAC AAC GTG          641
Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val
    170                 175                 180

TGT TCC GGA AAC AGA GAA GCC ACG CAA AAG TGT GGA ATA GAT GTC ACC          689
Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr
185                 190                 195                 200

CTG TGT GAA GAG GCC TTC TTC AGG TTT GCT GTT CCT ACC AAG ATT ATA          737
Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile
                205                 210                 215

CCA AAT TGG CTG AGT GTT TTG GTG GAC AGT TTG CCT GGG ACC AAA GTG          785
Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val
            220                 225                 230

AAT GCC GAG AGT GTA GAG AGG ATA AAA CGG AGA CAC AGC TCA CAA GAG          833
Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu
        235                 240                 245

CAA ACC TTC CAG CTG CTG AAG CTG TGG AAA CAT CAA AAC AGA GAC CAG          881
Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln
    250                 255                 260

GAA ATG GTG AAG AAG ATC ATC CAA GAC ATT GAC CTC TGT GAA AGC AGC          929
Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser
265                 270                 275                 280
```


本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

```
GTG CAG CGG CAT CTC GGC CAC TCG AAC CTC ACC ACA GAG CAG CTT CTT        977
Val Gln Arg His Leu Gly His Ser Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu
                285                 290                 295

GCC TTG ATG GAG AGC CTG CCT GGG AAG AAG ATC AGC CCA GAA GAG ATT       1025
Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile
            300                 305                 310

GAG AGA ACG AGA AAG ACC TGC AAA TCG AGC GAG CAG CTC CTG AAG CTA       1073
Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu
        315                 320                 325

CTC AGT TTA TGG AGG ATC AAA AAT GGT GAC CAA GAC ACC TTG AAG GGC       1121
Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly
    330                 335                 340

CTG ATG TAT GCC CTC AAG CAC TTG AAA ACA TCC CAC TTT CCC AAA ACT       1169
Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr
345                 350                 355                 360

GTC ACC CAC AGT CTG AGG AAG ACC ATG AGG TTC CTG CAC AGC TTC ACA       1217
Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr
                365                 370                 375

ATG TAC AGA CTG TAT CAG AAG CTC TTT TTA GAA ATG ATA GGG AAT CAG       1265
Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln
            380                 385                 390

GTT CAA TCC GTG AAA ATA AGC TGC TTA TAACTAGGAA TGGTCACTGG             1312
Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
        395                 400

GCTGTTTCTT CA                                                        1324
```

SEQ ID NO:124:

```
GTATATATAA CGTGATGAGC GTACGGGTGC GGAGACGCAC CGGAGCGCTC GCCCAGCCGC      60

CGCTCCAAGC CCCTGAGGTT TCCGGGGACC ACA ATG AAC AAG TTG CTG TGC TGC      114
                                     Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys
                                       1               5

GCG CTC GTG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG       162
Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr
        10                  15                  20
```


本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

```
TTT CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG          210
Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu
     25                  30                  35

TTG TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA          258
Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr
 40                  45                  50                  55

GCA AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CCT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA          306
Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr
                 60                  65                  70

GAC AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TGC AGC CCC GTG TGC          354
Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys
             75                  80                  85

AAG GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC          402
Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg
         90                  95                 100

GTG TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTG          450
Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu
    105                 110                 115

AAA CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA GTG GTG CAA GCT GGA ACC          498
Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr
120                 125                 130                 135

CCA GAG CGA AAT ACA GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA          546
Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser
                140                 145                 150

AAT GAG ACG TCA TCT AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT          594
Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser
            155                 160                 165

GTC TTT GGT CTC CTG CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC          642
Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn
        170                 175                 180


ATA TGT TCC GGA AAC AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA GAT GTT          690
Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val
    185                 190                 195
```


本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

```
ACC CTG TGT GAG GAG GCA TTC TTC AGG TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT        738
Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe
200                 205                 210                 215

ACG CCT AAC TGG CTT AGT GTC TTG GTA GAC AAT TTG CCT GGC ACC AAA        786
Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys
                220                 225                 230

GTA AAC GCA GAG AGT GTA GAG AGG ATA AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA        834
Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln
            235                 240                 245

GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA TGG AAA CAT CAA AAC AAA GCC        882
Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Ala
        250                 255                 260

CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA GAT ATT GAC CTC TGT GAA AAC        930
Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn
    265                 270                 275

AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC TTC GAG CAG CTT        978
Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu
280                 285                 290                 295

CGT AGC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG GGA GCA GAA GAC       1026
Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp
                300                 305                 310

ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC CAG ATC CTG AAG       1074
Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys
            315                 320                 325

CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA GAC ACC TTG AAG       1122
Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys
        330                 335                 340

GGC CTA ATG CAC GCA CTA AAG CAC TCA AAG ACG TAC CAC TTT CCC AAA       1170
Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys
    345                 350                 355

ACT GTC ACT CAG AGT CTA AAG AAG ACC ATC AGG TTC CTT CAC AGC TTC       1218
Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe
360                 365                 370                 375

ACA ATG TAC AAA TTG TAT CAG AAG TTA TTT TTA GAA ATG ATA GGT AAC       1266
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn
                380                 385                 390
```


本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

```
CAG GTC CAA TCA GTA AAA ATA AGC TGC TTA TAACTGGAAA TGGCCATTGA          1316
Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
            395                 400

GCTGTTTCCT CACAATTGGC GAGATCCCAT GGATGATAA                          1355
```

；

c)可於 42℃下 5X SSC、50%甲醯胺及 0.5% SDS 之嚴格條件與編碼如下示自胺基酸 148 至 337(含)之核苷酸雜合，並可於室溫下 2X SSC、55℃下 1X SSC 及 55℃下 0.5X SSC 之連續沖洗條件下保持雜合狀態之核酸，

```
        148       178       208       238       268       298
FRI-1   ALLVFLDIIEWTTQETFPPKYLHYDPETGRQLLCDKCAPGTYLKQHCTVRRKTLCVPCPD
                                          |: | ||:||   |  ||    |:| :| |
        HALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCED
              30        40        50        60        70        80

        328
FRI-1   YSYTDSWHTS
         .:||: |:
        STYTQLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPL
               90       100       110       120       130       140
```

；及

d) (a)、(b)及(c)之核酸之簡併核酸。

2. 根據申請專利範圍第1項之核酸，其為cDNA，基因體DNA，合成DNA或RNA。

3. 一種為根據申請專利範圍第1項所述核酸，所編碼的多肽。

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂

六、申請專利範圍

4. 根據申請專利範圍第1項之核酸，其包括一或多種適於大腸桿菌(Escherichia coli)表現之密碼子。

5. 根據申請專利範圍第1項之核酸，其具有接著在其上的一種可偵檢之標記。

6. 根據申請專利範圍第1項之核酸，其包括SEQ ID NO：120，SEQ ID NO：122或SEQ ID NO：124的多肽編碼區。

7. 根據申請專利範圍第6項之核酸，其具有SEQ ID NO：124所示從核苷酸158-1297之序列。

8. 一種表現載體，其包括根據申請專利範圍第1項之核酸。

9. 根據申請專利範圍第8項之表現載體，其中該核酸包括SEQ ID NO：124中所示之多肽編碼區。

10. 一種經根據申請專利範圍第8項所述表現載體轉形或轉染過之宿主細胞。

11. 根據申請專利範圍第10項之宿主細胞，其為一種真核生物細胞。

12. 根據申請專利範圍第11項之宿主細胞，其選自CHO，COS，293，3T3，CV-1和BHK細胞所成組合之中者。

13. 根據申請專利範圍第10項之宿主細胞，其為一種原核生物細胞。

14. 根據申請專利範圍第13項之宿主細胞，其為大腸桿菌。

15. 一種產生OPG的方法，其包括：

在適當的營養條件生長經用根據申請專利範圍第1項所

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂

六、申請專利範圍

述核酸轉形或轉染過之宿主細胞；及

分離出該核酸表現所得多肽產物。

16. 一種經分離之 OPG 多肽，其可增加骨密度或抑制骨重吸收，具有如下所示一或多者之胺基酸序列：

(a)如 SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 123 或 SEQ ID NO: 125 所示胺基酸序列第 1 至 401 殘基(含)；

(b)如 SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 123 或 SEQ ID NO: 125 所示胺基酸序列第 22 至 401 殘基(含)；及

(c)含(a)或(b)所載片段之胺基酸序列：

SEQ ID NO: 121:

```
Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile Ile
 1               5                  10                  15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
            20                  25                  30

Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr
        35                  40                  45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro
    50                  55                  60

Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
65                  70                  75                  80

Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln Glu
                85                  90                  95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr
            100                 105                 110

Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Leu
        115                 120                 125
```


本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂

六、申請專利範圍

Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
130 135 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
145 150 155 160

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys
165 170 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr
180 185 190

Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
195 200 205

Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
210 215 220

Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
225 230 235 240

Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
245 250 255

Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln
260 265 270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
275 280 285

Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Arg Ile Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
290 295 300

Lys Lys Ile Ser Pro Asp Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys
305 310 315 320

Pro Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
325 330 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu
340 345 350

Lys Ala Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr
355 360 365

Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu
370 375 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
385 390 395 400

Leu

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂

六、申請專利範圍

SEQ ID NO: 123:

```
Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Leu Leu Asp Ile Ile
 1               5                  10                  15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
            20                  25                  30

Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr
        35                  40                  45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro
    50                  55                  60

Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
65                  70                  75                  80

Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu
                85                  90                  95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr
            100                 105                 110

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys
    130                 135                 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
145                 150                 155                 160

Ile Lys His Thr Asn Cys Ser Thr Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys
                165                 170                 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr
            180                 185                 190

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
        195                 200                 205

Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
    210                 215                 220

Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
225                 230                 235                 240

Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
                245                 250                 255
```


本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂

六、申請專利範圍

Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln
260 265 270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Leu Gly His Ser
275 280 285

Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
290 295 300

Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys
305 310 315 320

Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
325 330 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu
340 345 350

Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr
355 360 365

Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu
370 375 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
385 390 395 400

Leu

SEQ ID NO:125:

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile
1 5 10 15

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
20 25 30

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr
35 40 45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro
50 55 60

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
65 70 75 80

Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu
85 90 95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr
100 105 110

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe
115 120 125

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
130 135 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
145 150 155 160

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys
165 170 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr
180 185 190

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
195 200 205

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
210 215 220

Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
225 230 235 240

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
245 250 255

Trp Lys His Gln Asn Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln
260 265 270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
275 280 285

Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
290 295 300

Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys
305 310 315 320

Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
325 330 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser
340 345 350

Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr
355 360 365

Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu
370 375 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
385 390 395 400

Leu

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

17. 根據申請專利範圍第16項之多肽，其為哺乳動物OPG。

18. 根據申請專利範圍第17項之多肽，其為人類OPG。

19. 根據申請專利範圍第16項之多肽，其實質地不含其他人類蛋白質。

20. 根據申請專利範圍第16項之多肽，其具有SEQ ID NO：125中所示殘基22-401(包括殘基22和401)之胺基酸序列。

21. 根據申請專利範圍第16項之多肽，其具有SEQ ID NO：125中所示殘基32-401(包括殘基32和401)之胺基酸序列。

22. 根據申請專利範圍第16項之多肽，其特徵在於其為外源DNA序列的表現產物。

23. 根據申請專利範圍第22項之多肽，其中該DNA為cDNA，基因體DNA或合成DNA。

24. 根據申請專利範圍第16項之多肽，其更經水溶性聚合物改質過。

25. 根據申請專利範圍第24項之多肽，其中該水溶性聚合物為聚乙二醇。

26. 一種多肽，其包含：

一有至少約164胺基酸的胺基酸序列，其中包括四個具有腫瘤壞死因子受體細胞外區所含富含半胱胺酸域的特性之富含半胱胺酸的區域，其中該胺基酸序列為SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 123及SEQ ID NO: 125所示胺基酸序列之一部份或全部；及

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

一增加骨密度之活性。

27. 一種多肽，其具有SEQ ID NO：121，SEQ ID NO：123或SEQ ID NO：125中所示胺基酸序列，其具有在殘基22處之胺基端，且其中1至216胺基酸從羧基端缺失掉。

28. 根據申請專利範圍第27項之多肽，其包括殘基22-185(包括殘基22和185)，22-189(包括22和189)，22-194(包含殘基22和194)，或22-201(包含殘基22和201)諸胺基酸序列。

29. 根據申請專利範圍第28項之多肽，其更包括從羧基端延伸出的人類IgG1所含Fc區。

30. 一種多肽，其具有SEQ ID NO：121，SEQ ID NO：123或SEQ ID NO：125中所示胺基酸序列且在殘基22處具有一胺基端，其中從胺基端缺失掉1至10胺基酸。

31. 根據申請專利範圍第30項之多肽，其另從羧基端缺失掉1至216胺基酸。

32. 根據申請專利範圍第30項之多肽，其具有殘基27-185(包含殘基27和185)，27-189(包含殘基27和189)，27-194(包括殘基27和194)，27-401(包含殘基27和401)，或32-401(包含殘基32和401)之胺基酸序列。

33. 根據申請專利範圍第32項之多肽，其更包括從其羧基端延伸出的人類IgG1所含Fc區。

34. 一種多肽，其係選自下列所成組合之中者：

huOPG [22-201]-Fc

huOPG [22-401]-Fc

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

huOPG [22-180]-Fc

huOPG met [22-401]-Fc

huOPG Fc-met [22-201]

huOPG met [22-185]

huOPG met [22-189]

huOPG met [22-194]

huOPG met [27-185]

huOPG met [27-189]

huOPG met [27-194]

huOPG met [32-401]

huOPG met-lys [22-401]

huOPG met [22-401]

huOPG met [22-401]-Fc(P25A)

huOPG met [22-401] (P25A)

huOPG met [22-401] (P26A)

huOPG met [22-401] (P26D)

huOPG met [22-194] (P25A)

huOPG met [22-194] (P26A)

huOPG met met-$(lys)_3$ [22-401]

huOPG met met-arg-gly-ser-$(his)_6$[22-401]，

其中huOPG含有SEQ ID NO:125所示胺基酸序列。

35. 一種編碼根據申請專利範圍第34項所述多肽之核酸。

36. 一種用以評估候選物質結合到OPG的能力之方法，其包

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

裝 訂

六、申請專利範圍

括：

用根據申請專利範圍第3、16、26、27、30或34項之OPG與該候選物質在可促成結合的條件下培育；及

測量被結合的該物質。

37. 一種調節動物體內OPG含量之醫藥組合物，其含有治療有效量之根據申請專利範圍第1項之核酸。

38. 根據申請專利範圍第37項之醫藥組合物，其中該核酸可促成組織OPG水平之增加。

39. 根據申請專利範圍第38項之醫藥組合物，其中該動物為人類。

40. 一種治療骨病之醫藥組合物，其包括治療有效量之根據申請專利範圍第3、16、26、27、30或34項之多肽與醫藥可接受的載體，佐劑，溶解化劑，安定劑及/或抗氧化物。

41. 根據申請專利範圍第40項之組合物，其中該OPG為人類OPG。

42. 根據申請專利範圍第41項之組合物，其中該OPG具有下示之胺基酸序列

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

```
       790                  810                  830
AAAGTGAATGCCGAGAGTGTAGAGAGGATAAAACGGAGACACAGCTCACAAGAGCAAACC
K  V  N  A  E  S  V  E  R  I  K  R  R  H  S  S  Q  E  Q  T
       850                  870                  890
TTCCAGCTGCTGAAGCTGTGGAAACATCAAAACAGAGACCAGGAAATGGTGAAGAAGATC
F  Q  L  L  K  L  W  K  H  Q  N  R  D  Q  E  M  V  K  K  I
       910                  930                  950
ATCCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGCAGCGTGCAGCGGCATCTCGGCCACTCGAACCTC
I  Q  D  I  D  L  C  E  S  S  V  Q  R  H  L  G  H  S  N  L
       970                  990                 1010
ACCACAGAGCAGCTTCTTGCCTTGATGGAGAGCCTGCCTGGGAAGAAGATCAGCCCAGAA
T  T  E  Q  L  L  A  L  M  E  S  L  P  G  K  K  I  S  P  E
      1030                 1050                 1070
GAGATTGAGAGAACGAGAAAGACCTGCAAATCGAGCGAGCAGCTCCTGAAGCTACTCAGT
E  I  E  R  T  R  K  T  C  K  S  S  E  Q  L  L  K  L  L  S
      1090                 1110                 1130
TTATGGAGGATCAAAAATGGTGACCAAGACACCTTGAAGGGCCTGATGTATGCCCTCAAG
L  W  R  I  K  N  G  D  Q  D  T  L  K  G  L  M  Y  A  L  K
      1150                 1170                 1190
CACTTGAAAACATCCCACTTTCCCAAAACTGTCACCCACAGTCTGAGGAAGACCATGAGG
H  L  K  T  S  H  F  P  K  T  V  T  H  S  L  R  K  T  M  R
      1210                 1230                 1250
TTCCTGCACAGCTTCACAATGTACAGACTGTATCAGAAGCTCTTTTTAGAAATGATAGGG
F  L  H  S  F  T  M  Y  R  L  Y  Q  K  L  F  L  E  M  I  G
      1270                 1290                 1310
AATCAGGTTCAATCCGTGAAAATAAGCTGCTTATAACTAGGAATGGTCACTGGGCTGTTT
N  Q  V  Q  S  V  K  I  S  C  L

CTTCA
```

43. 一種治療骨病之醫藥組合物，其含有治療有效量的根據申請專利範圍第16項之多肽。

44. 根據申請專利範圍第43項之醫藥組合物，其中該多肽為人類OPG。

45. 根據申請專利範圍第43項之醫藥組合物，其中該骨病為過份的骨質流失。

46. 根據申請專利範圍第45項之醫藥組合物，其中該骨病係選自下列所成組合之中者：骨疏鬆病，柏哲德氏骨病，高鈣血症，副甲狀腺官能過旺症，類固醇誘發貧骨症，風濕性關節炎所致骨質流失，骨髓炎所致骨質流失，溶

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)

六、申請專利範圍

骨性轉移及齒骨膜骨質流失。

47. 根據申請專利範圍第43項之醫藥組合物，其更包括給用治療有效量的選自下列所成組合之中的物質：骨形態發育性蛋白質BMP-1至BMP-12，TGF-β族員，IL-1抑制劑，TNFα抑制劑，副甲狀腺激素和其類似物，副甲狀腺激素相關性蛋白質和其類似物，E系前列腺素，雙膦酸鹽，及骨增強性礦物質。

48. 一種由根據申請專利範圍第3、16、26、27、30或34項之促骨堆積肽單體聯合所形成之促骨堆積肽二體物。

49. 根據申請專利範圍第48項之二體物，其係由鏈間雙硫鍵所形成者。

50. 根據申請專利範圍第48項之二體物，其係經由締合衍生自人類IgG1的Fc區所形成的。

51. 根據申請專利範圍第48項之二體物，其基本上不含促骨堆積肽單體物和不具活性的二體物。

52. 根據申請專利範圍第48項之二體物，其中該單體物包括SEQ ID NO：125所示殘基22-401的胺基酸序列或其衍生物。

53. 根據申請專利範圍第48項之二體物，其中該單體物包括SEQ ID NO：125所示殘基22-194的胺基酸序列。

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS) A4規格(210×297公釐)