

公告本

A4
C4

申請日期	87 年 2 月 24 日
案 號	87102640
類 別	A61K 38/19, C07K 14/52, C12N 1/19
Int. Cl.	(以上各欄由本局填註)

570801

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	蝕骨細胞增生抑制劑
	英 文	Osteoclastgenic inhibitory agent
二、發明 人	姓 名	(1) 馬修·格里斯派 Gillespie, Matthew Todd (2) 尼克·霍伍德 Horwood, Nicole Joy (3) 宇田川信之 Udagawa, Nobuyuki
	國 籍	(1) 澳洲 (2) 日本 (3) 日本
	住、居所	(1) 澳大利亞聯邦費洛伊維多利亞路四一號 墨爾本大學醫藥系及聖文森醫藥研究學會 Department of Medicine, the University of Melbourne and St, Vincent's Institute of Medical Reserach, 41 (2) 澳大利亞聯邦費洛伊維多利亞路四一號 墨爾本大學醫藥系及聖文森醫藥研究學會 Department of Medicine, the University of Melbourne and St, Vincent's Institute of Medical Research, 41 Victoria (3) 日本國千葉縣柏市明原三丁目一六番七號 16-7, 3-chome, Akehara, Kashiwa-shi, Chiba, Japan
	三、申請人	
	姓 名 (名稱)	(1) 林原生物化學研究所股份有限公司 株式会社林原生物化学研究所
	國 籍	(1) 日本
	住、居所 (事務所)	(1) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號
	代 表 人 姓 名	(1) 林原健

裝

訂

線

申請日期	87 年 2 月 24 日
案 號	87102640
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	(4) 栗木雅司 Kurimoto, Masashi
	國 籍	(4) 日本 (4) 日本國岡山縣岡山市學南町二丁目七番二五號 7-25, 2-chome, Gakunan-cho, Okayama-shi, Okayama, Japan
三、申請人	住、居所	
	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國（地區） 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

日本 1997 年 2 月 25 日 9-55468 ☒有主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

（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

五、發明說明()

發明之背景資料

發明領域

本發明關於一種蝕骨細胞增生抑制劑，其含有間白素-18 (interleukin-18，此後簡寫為“IL-18”)或其功能性同等物。

先前技藝的敘述

骨母細胞的骨形成作用和蝕骨細胞的骨吸收作用在健康的活體內是維持良好的平衡。使得當舊的骨組織被新的骨組織取代時，不會改變原來的骨頭形狀，而將骨組織保持在正常狀態。此現象在維持活體恆定性上扮演一重要角色，如將血鈣濃度控制在一想要的範圍之內。一旦平衡喪失，特別是當骨吸收程度超過骨形成程度時，骨頭相關疾病和其他疾病可能被誘發。因此，基於科學和臨床意義。活體內骨吸收作用完整機制的闡明，特別是蝕骨細胞的闡明更是受到極大關注。

然而，蝕骨細胞形成的機制仍未完整地闡明，即使已發現間白素1是做為啟動者和間白素4是做為抑制者。這是因為和活體內各種現象一樣，蝕骨細胞的形成作用是被啟動者和抑制者之間緊密且複雜的關係所控制。基於此，從科學和臨床觀點來看，亟欲建立一有效的蝕骨細胞增生抑制劑。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明書)

本發明的概要

本發明的目標是提供一新型和有效的蝕骨細胞增生抑制劑。為了解決本目標，本發明者致力研究於在免疫系統中做為溝通傳達物質的其中一種組織介素－I L－1 8。它可誘導對於免疫活性細胞而言是一重要生物活性物質的干擾素－ γ （interferon- γ ，此後縮寫為“I F N－ γ ”，和顆粒性白血球／巨噬細胞群刺激因子（granulocyte/macrophage colony-stimulating factor,此後縮寫為“G M－C S F”）的製造，和增進細胞毒性和誘導殺死細胞的形成。I L－1 8被描述為干擾素－ γ 誘發因子的報導請參閱 Haruki OKAMURA 發表於日本專利公開公報編號 2 7，1 8 9 1 9 6 和 1 9 3，0 9 8／9 6，和 Nature, Vol.378. No.6552, pp.88-91(1995)，然後依照 Shimpei USHIO et al., the Journal of Immunology, Vol.156, pp.4274-4279(1996)的提議稱為 I L－1 8。

本發明者發現一特殊基因，具有抑制體外的蝕骨細胞從蝕骨細胞前驅細胞形成的能力，並且可專一性地在源自於老鼠骨髓瘤的基質細胞中大量表現。他們進一步詳細分析顯示（i）可編碼 I L－1 8 的基因包含 S E Q I D N o：7 做為一核心序列，（i i）I L－1 8 和其功能性同等物可有效抑制蝕骨細胞生成，和（i i i）此抑制作用主要是由 I L－1 8 誘發和產生的 G M－C S F 的作用。

基於這些發現，本發明者藉由含有 I L－1 8 或其功

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

象

五、發明說明書)

能性同等物做為有效成份的蝕骨細胞增生抑制劑而達成了本發明的目標。

附圖的簡要敘述

第 1 圖顯示重組 DNA - p K G F H H 2 的結構。

第 2 圖顯示重組 DNA - p C S H I G I F / M U T 3 5 的結構。

第 3 圖顯示重組 DNA - p C S H I G I F / M U T 4 2 的結構。

第 4 圖顯示重組 DNA - p B G H u G F 的結構。

第 5 圖顯示重組 DNA - p K G F M H 2 的結構。

在這些圖中，K G F H H 2 c D N A 意指可編碼如本發明 I L - 1 8 的 c D N A；I G I F / M U T 3 5 意指可編碼如本發明 I L - 1 8 的 D N A；I G I F / M U T 4 2 意指可編碼如本發明 I L - 1 8 的 D N A；H u I G I F 意指可編碼如本發明 I L - 1 8 的染色體 D N A；K G F M H 2 c D N A 意指可編碼如本發明 I L - 1 8 的 c D N A；5 S 意指 5 S 核糖體 R N A 的基因；P t a c 意指 t a c 啟動子；r r n B T 1 T 2 意指核糖體 R N A 操縱子的終止區域；A m p R 意指抗氨苄青黴素基因；p B R 3 2 2 o r i 意指大腸桿菌複製起始點；C M V 意指細胞巨大性病毒；I F N s s 意指可編碼人類干擾素 $\alpha \alpha 2 b$ 亞型的訊號胜肽的核苷酸序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明 5)

代半胱氨酸的不同胺基酸並不限定於任何種類，只要含有不同胺基酸取代的胺基酸序列所形成的多胜肽具有誘發免疫活性細胞在存在或不存在適當輔因子下，製造 I F N - γ 的活性，如含有 S E Q I D N O s : 1, 2 和 4 做為一致性部分胺基酸序列的野生型多胜肽，和穩定性明顯高於野生型多胜肽。不同的胺基酸包括絲胺酸，蘇胺酸，丙胺酸，纈胺酸，亮胺酸，異亮胺酸，組織胺酸，酪胺酸，苯丙胺酸，白胺酸和甲流胺酸，其中最適宜的胺基酸是絲胺酸或丙胺酸。含有 S E Q I D N O s . 1, 2 和 4 做為一致的部分胺基酸序列且其中一或更多個半胱氨酸被不同胺基酸取代的胺基酸序列具體實例是含有 S E Q I D N O 6 或 7 的野生型多胜肽。S E Q I D N O : 6 含有的半胱氨酸分別位於從 N 端算起第 38, 68, 76 和 127 位置。S E Q I D N O : 7 含有的半胱氨酸分別位於從 N 端算起第 7, 75 和 125 位置。這些多胜肽包括含有 S E Q I D N O s : 20 - 26 任一胺基酸序列的多胜肽，其係源自於含 S E Q I D N O : 6 的野生型多胜肽；含有 S E Q I D N O 27 或 28 胺基酸序列的多胜肽，其係源自於含 S E Q I D N O : 7 胺基酸序列的野生型多胜肽，和含有源自於 S E Q I D N O s : 20 - 28 任一胺基酸序列，藉由添加，去除和 / 或取代一或更多個胺基酸於和 / 或除了半胱氨酸已被取代的位置且保留想要的生物活性和穩定性的多胜肽。“一或更多個胺基酸”意指利用一般方法如位

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明()

置直接突變法可通常加入，去除或取代的胺基酸數目。含有 S E Q I D N O s : 2 0 - 2 8 任一序列的多胜肽所擁有的穩定性和生物活性明顯高於野生型多胜肽。

本發明中所指的功能性同等物進一步包括 I L - 1 8 的糖化多胜肽和以上的多胜肽。任何一種的 I L - 1 8 和其功能性同等物，在本發明中，二者都包括且意指為 “

I L - 1 8 ”，除非有特別說明，都可為本發明所使用而不論其來源，它們的製備係從天然來源如細胞培養分離和使用重組 D N A 技術及胜肽合成法進行人工合成。

以經濟觀點，使用重組 D N A 技術方法較有利。一般而言，將可編碼 I L - 1 8 的 D N A 送入源自於微生物，植物和動物的適當宿主以形成轉型物，然後以一般方式在營養培養基內培養轉型物，並且使用純化組織介素的一般方式純化培養物將可獲得到所想要的 I L - 1 8。如以上的任何一種 D N A 都可使用，只要它們含有可編碼 I L - 1 8 的 D N A，並且基於本蝕骨細胞增生抑制劑所使用的目的或所使用的重組 D N A 技術而可適宜地被篩選。例如，由本發明申請者在日本專利公開公報編號

1 9 3，0 9 8 / 9 6，2 3 1，5 9 8 / 9 6 和

2 7，1 8 9 / 9 6 所發表製造 I L - 1 8 的詳細方法，其係培養已送入可編碼老鼠或人類 I L - 1 8 的 c D N A 的轉型微生物；和由本發明申請者在日本專利公開公報編號 1 8 5，3 0 5 / 9 6 所發表製造人類 I L - 1 8 的詳細方法，其係培養已送入可編碼人類 I L - 1 8 的染色體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明()

D N A 的轉型動物細胞。本發明申請者在日本專利公開公報編號 2 0 , 9 0 6 / 9 7 發表詳細製造 I L - 1 8 的方法，其係培養已送入可編碼人類 I L - 1 8 功能性同等物的 D N A 的轉型動物細胞。

以上所提的重組 D N A 技術具有經濟優點，但決定於所使用的宿主和 D N A，因此所獲得的 I L - 1 8 可能與活體內製造的 I L - 1 8 在物化特性和功能上有所不同。由本發明申請者發表的日本專利公開公報編號

6 7 , 4 3 4 / 9 6 係使用已建立的人類細胞株做為天然來源製備 I L - 1 8，和本發明申請者於日本專利公開公報編號 2 1 3 , 2 6 7 / 9 6 發表的使用間白素 - 1 β - 轉換酶製備 I L - 1 8。這些 I L - 1 8 製備物具有與活體中製造的 I L - 1 8 相同或相等的物化特性和功能，並且產率是稍為較低。然而，此種 I L - 1 8 具有一優點是：當它們做為藥物投予溫血動物（包括人類）時，它具有較小的副作用。當使用本發明申請者於日本專利公開公報編號 2 3 1 , 5 9 8 / 9 6 所發表的使用專一性抗 I L - 1 8 單株抗體純化方法，可以較少的勞力和花費得到相當高純度的 I L - 1 8。

本蝕骨細胞增生抑制劑所含有的上述 I L - 1 8 係包括具有抑制蝕骨細胞於活體內和活體外生成的任何種類和型式的 I L - 1 8。本試劑有利於做為動動細胞培養基的成份，它具有令人滿意地抑制蝕骨細胞形成，維持，增生，和 / 或分化所想要的細胞；做為骨頭相關治療試劑篩選

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

象

五、發明說明 §)

套組的組成份；骨質吸收調節試劑；和做為蝕骨細胞相關疾病的試劑。骨質吸收調節試劑包括醫藥和健康食品，它們具有抑制活體內蝕骨細胞增生的活性，控制骨質吸收至正常狀態，和改善不利的身體狀況如相當無意義的關節痛。做為蝕骨細胞相關疾病之用的試劑包括用以預防和／或治療因過度蝕骨細胞生成和／或其功能造成疾病的藥物。此種疾病例子是高鈣血症，蝕骨細胞瘤，Behcet氏徵候群，骨肉瘤，關節病，慢性風濕性關節炎，骨炎變形，原發性甲狀腺官能過旺症，骨質稀少和骨質疏鬆症。本試劑通常配製成液體，糊膏或固體型式，其含有

0.000002 - 100 w / w % IL - 18，宜為

0.0002 - 0.5 w / w %，而不同型式的試劑主要決定於試劑的種類和被治療的疾病。

本蝕骨細胞增生抑制劑可以只含 IL - 18 或是由 IL - 18 和一或更多種其他成份組成的組成物。其他成份例如媒介物，賦形物，稀釋劑，佐劑，抗生素，和蛋白質如血清白蛋白和明膠做為安定劑；醣類如葡萄糖，麥芽糖，麥芽三糖，麥芽四糖，海藻糖，蔗糖，異麥芽糖，乳糖，6 α 葡萄基麥芽糖，吡喃葡糖基庶糖，宮澱糖 palatinose，乳蔗糖，植物蜜糖，寡果糖，寡半乳糖，蘑菇多醣，糊精，支鏈澱粉，和糖醇包括山梨醇，麥芽糖醇，乳糖醇和麥芽糖三醇；主要由磷酸鹽或檸檬酸鹽組成的緩衝液；和還原劑如 2 - 氫硫基乙醇，二硫代蘇糖醇，和還原穀胱甘肽；和選擇性地生物活性物質如干擾素 - α ，干擾素 - β ，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明()

干擾素 - γ ，間白素 - 2，間白素 - 3，間白素 - 6，間白素 - 12，TNF - α ，INF - β ，GM - CSF，軀體介素，促生長因子，胰島素相似生長因子，異丙黃酮 (ipriflavone)，副甲狀腺荷爾蒙 (parathyroid hormone, PTH)，快諾酮，GM - CSF，雌激素，黃體酮，氯地孕酮醋酸鹽，降血鈣素，白消安，ancitabine，阿糖胞嘧啶，尿嘧啶二酮，四氫呋喃甲基尿嘧啶二酮，氨甲蝶呤，維生素 D₂，活性維生素 D，krestin®或多醣類 K，L - 天冬醯胺酶，和 OK - 432 或 picibanil®；和鈣鹽如乳酸鈣，氯化鈣，單氫磷酸鈣，和 L - 鈣 L - 天冬醯胺鹽。當使用做為投予溫血動物 (包括人類) 的試劑時，即做為蝕骨細胞相關疾病之用的試劑，本試劑宜配製成組成物型式，即與以上的一或更多種生理可接受物質適當地結合。

本蝕骨細胞增生抑制劑包括以單位劑量型式使用的藥物，做為投予至溫血動物 (包括人類) 之用。 " 單位劑量型式 " 意指含有的 IL - 18 量適合做為每日劑量或量達到四倍整數或達到 1 / 40 倍劑量，和於物質上分離並配製成適合做為前述投予作用的型式。此種配方實例是注射液，液體，粉末，顆粒，錠劑，膠囊，片劑，洗眼藥，噴霧劑和栓劑。

本試劑做為一蝕骨細胞增生抑制劑，可有效治療和預防蝕骨細胞相關疾病，且與口服和非經腸道投予方式無關。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明(10)

依照病人疾病的徵後群和種類，本試劑投予的方式可以是口服，經皮，皮下，肌肉或經靜脈，每一劑量約 $0.5 \mu\text{g} - 100 \text{mg}$ ，宜為每次 $1 \text{L} - 18$ 劑量約為 $2 \mu\text{g} - 10 \text{mg}$ ，一天 2 - 6 倍量或一星期 2 - 10 倍做為一天至一年之用。

參考以下的實驗，如本發明的 $1 \text{L} - 18$ 的製備，物化特性和生物活性都有所描述：

實驗 1

人類 $1 \text{L} - 18$ 的製備

根據由本發明申請者在日本專利公開公報編號 231, 598 / 96 所提出的方法製備含有可編碼人類 $1 \text{L} - 18$ 的 cDNA 的可自主複製的重組 DNA - pKGFHH2。以雙去氧核糖核苷酸定序法分析重組 DNA 的結果顯示：含有 SEQ ID NO : 8 鹼基序列的 KGFHH2 cDNA 是連接在 Tac 啟動子 - Ptac 的下游（見第 1 圖），重組 DNA - pKGFHH2 含有 SEQ ID NOs 1 - 5 的胺基酸序列；這些胺基酸序列是分別由 SEQ ID NO : 8 中的核苷酸 46 - 63，88 - 105，400 - 420，151 - 165 和 214 - 228 所編碼。

根據日本專利公開公報編號 231, 598 / 96 的方法，將重組 DNA - pKGFHH2 送入大腸桿菌

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

象

五、發明說明(1)

Y 1 0 9 0 菌株 - A T C C 3 7 1 9 7 , 然後培養此菌株。產生的多胜肽以免疫親和層析法純化以得到純度至少 9 5 % 的純化人類 I L - 1 8 , 產率約 2 5 m g / l 培養物。根據由本發明申請者在日本專利公開公報編號

1 9 3 , 0 9 8 / 9 6 所提出的方法, 分析純化的人類

I L - 1 8 的生物活性和物化特性後顯示: 當我們利用一般方法從健康捐贈者體內收集淋巴球, 然後在含有純化的人類 I L - 1 8 狀況下培養人類淋巴球, I F N - γ 的產生是決定於 I L - 1 8 的濃度。此確認了以淋巴球做為免疫活性細胞, I L - 1 8 具有誘導 I F N - γ 製造的活性。

根據 U.K.Laemmli 在 Nature, vol.227,pp.680-685(1970) 所報導的方法, 將 I L - 1 8 置於 S D S - P A G E , 在相當於 1 8 , 5 0 0 $\pm$ 3 , 0 0 0 道耳頓位置的主要帶具有一 I F N - γ 誘導活性。利用一般色譜凝焦法測定 I L - 1 8 的 P I 為 4 . 9 $\pm$ 1 . 0 。使用 Applied Biosystems,

Inc.,Foster City,USA 的 " PROTEIN SEQUENCER MODEL 473A " 裝置顯示 I L - 1 8 具有 S E Q I D N O : 9 的胺基酸序列, 即一甲硫胺酸連接至 S E Q I D N O : 8 胺基酸序列的 N 端。

實驗 2

人類 I L - 1 8 的製備

根據由本發明申請者在日本專利公開公報編號 6 7 ,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明(2)

434 / 96 所提出的方法，將源自於具有急性單核白血球白血病的男性的人類單核白血球細胞株 - THP-1 細胞 (ATCC TIB 202) 接種於新生倉鼠的背部皮下組織，然後飼養倉鼠三週。將生長於每一雙倉鼠皮下組織，與一個約 15 g 重的腫瘤塊萃取，均勻散布於培養基並使其破裂。從破裂細胞得到的多胜肽以免疫親和層析法純化，每隻倉鼠可得到約 50 ng 純化的人類 IL-18。

相同地，利用日本專利公開公報編號 67, 434 / 96 的方法分析純化的人類 IL-18 的生物活性和物化特性後顯示：當我們利用一般方法從健康捐贈者體內收集淋巴球，然後在含有不同濃度的人類 IL-18 狀況下培養人類淋巴球，會造成 IL-18 劑量依賴的 IFN- γ 製造。此顯示以淋巴球做為免疫活性細胞，人類 IL-18 具有誘發 IFN- γ 製造的生物活性。根據 U.K. Laemmli 在 Nature, vol.227, pp.680-685(1970) 所報導的方法，將純化的人類 IL-18 置於含 2 w / v % 二硫代蘇糖醇做為還原劑的 SDS-PAGE，我們發現在相當於 18000 - 19500 道耳頓位置的主要帶具有一 IFN- γ 製造誘導活性。根據日本專利公開公報編號 67, 434 / 96 所刊載的胜肽圖，將人類 IL-18 以購自 Sigma Chemical Company, Missouri, USA 的梭菌肽酶 B 處理以得到多胜肽片段，然後將此片段置於使用 Tosoh Corporation, Tokyo, Japan 的 "ODS-120T" 管柱

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明(13)

的高成形液體色譜法 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 進行分級分離，並且從 N 端分析片段的胺基酸序列。其結果顯示於 SEQ ID NOs : 10 - 13 的胺基酸序列。這些胺基酸序列與 SEQ ID NO : 6 中的胺基酸 148 - 157，1 - 13，45 - 58 和 80 - 96 完全相符合。此資料顯示在實驗 2 得到的人類 IL - 18 具有 SEQ ID NO : 6 的胺基酸序列和 SEQ ID NOs : 1 - 5 的所有部分胺基酸序列。

實驗 3

功能性同等物的製備

根據由本發明申請者在日本專利公開公報編號 20，906 / 97 所提出的方法，製備一含有可編碼人類 IL - 18 的功能性同等物 DNA 的可自主複製的重組 DNA - p C S H I G I F / M U T 3 5，其中在 SEQ ID NO : 6 中的半胱胺酸 38，68 和 76 分別以絲胺酸，絲胺酸和丙胺酸取代。以雙去氧核糖核苷酸定序重組 DNA 的結果顯示在第 2 圖。在此重組 DNA 中，具有 SEQ ID NO : 14 的 DNA I G I F / M U T 3 5 以相同讀錄框構連接至可編碼人類干擾素 - α ， α 2 b 亞型的訊號勝肽的鹼基序列 (如 K.Henco et al., Journal of Molecular Biology, vol.185, pp.227-260(1985

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明(4)

)報導)的下游，並且在更下游有一做為蛋白質合成之用的終止密碼。如 SEQ ID NO: 14 所示，由重組 DNA 編碼的胺基酸序列相當於 SEQ ID NO: 6，其中 SEQ ID NO: 6 中的半胱胺酸 38，68 和 76 分別以絲胺酸，絲胺酸和丙胺酸取代。重組 DNA 含有一可編碼 SEQ ID NOs: 1-4 所有胺基酸序列和 SEQ ID NO: 5 胺基酸序列的核苷酸，其中 SEQ ID NO: 5 中的半胱胺酸 5 以丙胺酸取代。這些胺基酸序列分別由 SEQ ID NO: 14 中的核苷酸 46-63，88-105，400-420，151-165 和 214-228 所編碼。

根據由本發明申請者在日本專利公開公報編號 20，906/97 所提出的方法，將重組 DNA - p C S H I G I F / M U T 35 送入源自於經 S V 40 轉型的非洲綠猴腎臟細胞株 COS-1 細胞 (ATCC CRL 1650)，然後培養該轉型細胞。培養物中所產生的多胜肽以免疫親和色譜法純化以得到一純化的人類 IL-18 功能性同等物，其產率約 40 ng / ml 培養物，根據日本專利公開公報編號 20，906/97 的方法，分析純化的功能性同等物的生物活性和物化特性後顯示：當我們在含有不同濃度純化的人類 IL-18 功能性同等物條件下培養源自於人類急性骨髓性白血病細胞株 KG-1 細胞 (ATCC CCL 246)，IFN- γ 的製造是決定於 IL-18 濃度。此顯示了以 KG-1 細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明 (5)

胞做為免疫活性細胞，IL-18具有誘導IFN- γ 製造的生物活性。根據U.K.Laemmli在Nature, vol.227, pp.680-685(1970)所報導的方法，將純化的功能性同等物置於含2w/v%二硫化蘇糖醇做為還原劑的SDS-PAGE，我們發現在相當於18,000-19,500道耳頓位置的主要帶具有一誘導IFN- γ 製造的活性。使用Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA的“PROTEIN SEQUENCER MODEL 473A”裝置進行胺基酸序列一般分析顯示：功能性同等物N端區域具有SEQ ID NO：15的胺基酸序列，其相當於SEQ ID NO：14中N端區域的胺基酸序列。

實驗 4

功能性同等物的製備

根據由本發明申請者在日本專利公開公報編號20,906/97所提出的方法製備一含有可編碼人類IL-18的功能性同等物DNA的可自主複製的重組DNA-pCSHIGIF/MUT 42，其中在SEQ ID NO：6中的半胱胺酸38, 68, 76和127分別以絲胺酸，絲胺酸，丙胺酸和絲胺酸取代。以雙去氧核糖核苷酸定序重組DNA的結果顯示在第3圖。在此重組DNA中，具有SEQ ID NO：16的DNA I G I F / M U T 4 2以相同讀錄框構連接至可編碼人類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明 (16)

干擾素 - α α 2 b 亞型的訊號胜肽的鹼基序列 (如 K.Henco et al., Journal of Molecular Biology, vol.185, pp.227-260 (1985) 報導) 的下游, 並且在更下游有一做為蛋白質合成之用的終止密碼。如 S E Q I D N O : 1 6 所示, 由重組 D N A 編碼的胺基酸序列相當於 S E Q I D N O : 6, 其中 S E Q I D N O : 6 中的半胱胺酸 3 8, 6 8, 7 6 和 1 2 7 分別以絲胺酸, 絲胺酸, 丙胺酸和絲胺酸取代。重組 D N A 含有一可編碼 S E Q I D N O s : 1 - 4 所有胺基酸序列和 S E Q I D N O : 5 胺基酸序列的核苷酸, 其中 S E Q I D N O : 5 中的半胱胺酸 5 以丙胺酸取代。這些胺基酸序列分別由 S E Q I D N O : 1 6 中的核苷酸 4 6 - 6 3, 8 8 - 1 0 5, 4 0 0 - 4 2 0, 1 5 1 - 1 6 5 和 2 1 4 - 2 2 8 所編碼。

根據由本發明申請者在日本專利公開公報編號 2 0, 9 0 6 / 9 7 所提出的方法, 將重組 D N A - P C S H I G I F / M U T 4 2 送入 C O S - 1 細胞, 然後培養此細胞。培養物中所產生的多胜肽以免疫親和色譜法純化以得到一純化的人類 I L - 1 8 功能性同等物, 其產率約 2 0 n g / m l 培養物。根據日本專利公開公報編號 2 0, 9 0 6 / 9 7 的方法, 分析純化的功能性同等物的生物活性和物化特性後顯示: 當我們在含有不同濃度的純化功能性同等物條件下培養 K G - 1 細胞, I F N - γ 的製造是決定於功能性同等物劑量。此顯示了以 K G - 1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (7)

細胞做為免疫活性細胞，功能性同等物具有誘導 I F N - γ 製造的生物活性。根據 U.K.Laemmli 在 Nature, vol.227, pp.680-685(1970)所報導的方法，將純化的功能性同等物置於含 2 w / v % 二硫代蘇糖醇做為還原劑的 S D S - P A G E，我們發現在相當於 18,000 - 19,500 道耳頓位置的主要帶具有一誘導 I F N - γ 製造的活性。使用 Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA 的 " PROTEIN SEQUENCER MODEL 473A " 裝置進行胺基酸序列分析顯示：功能性同等物 N 端區域具有 S E Q I D N O : 15 的胺基酸序列，其完全相同於 S E Q I D N O : 16 中 N 端區域的胺基酸序列。

實驗 5

人類 I L - 18 製備

根據由本發明申請者日本專利公開公報編號 185,305 / 96 所提出的方法製備含有可編碼人類 I L - 18 的染色體 D N A 的可自主複製的重組 D N A - p B G H u G F。以雙去氧核糖核苷酸定序法分析重組 D N A 的結果顯示：可編碼人類 I L - 18 的染色體 D N A，即具有 S E Q I D N O : 17 的 D N A H u I G I F 是利用 Hind III 限制酶連接至限制酶作用位置的下游。如 S E Q I D N O : 17 所示，染色體 D N A H u I G I F 由 11,464 b p 組成，其中表

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (18)

現序列被四個位於核苷酸 83 - 1453, 1466 - 4848, 4984 - 6317 和 6452 - 11224 的插入序列分成未連續的結構。排除這些插入序列的剩餘核苷酸序列中, 從 5' 端算起的核苷酸 3 - 11443 部分可編碼人類 IL - 18 前驅物, 並且核苷酸 4866 - 4983 部分可編碼一活性的人類 IL - 18。染色體 DNA 含有可編碼 SEQ ID NOs: 1 - 5 的核苷酸序列; 這些胺基酸分別由 SEQ ID NO: 17 中的核苷酸 4911 - 4928, 4953 - 4970, 11372 - 11392, 6350 - 6364 和 6413 - 6427 所編碼。

根據日本專利公開公報編號 185,305/96 的方法, 將重組 DNA - pBGHuGF 送入源自於中國倉鼠卵巢的細胞株 CHO - K1 細胞 (ATCC CCL 61), 然後培養此細胞。將培養物上清液與從 THP - 1 細胞培養物製得的細胞破裂物上清液接觸以製造一多胜肽, 然後使用免疫親和色譜法純化可得到純化的人類 IL - 18, 其產率約 15 mg / 1 培養物。根據日本專利公開公報編號 185,305/96 所提出的方法, 分析多胜肽的生物活性和物化特性後顯示: 當我們從健康捐贈者體內收集淋巴球, 然後在含有不同濃度的人類 IL - 18 條件下培養淋巴球, 所產生的 IFN - γ 決定於純化的人類 IL - 18 濃度。此顯示了以淋巴球做為免疫活性細胞, 人類 IL - 18 具有誘導 IFN - γ 製造的生物活性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

東

五、發明說明 (9)

根據 U.K.Laemmli 在 Nature, vol.227, pp.680-685(1970)所報導的方法，將純化的人類 IL - 18 置於含 2 w / v % 二硫代蘇糖醇做為還原劑的 SDS - PAGE，我們發現在相當於 18000 - 19500 道耳頓位置的主要帶具有一誘導 IFN - γ 製造的活性。人類 IL - 18 的 N 端區域含有 SEQ ID NO : 15 的胺基酸序列，其完全相同於做為活性的 IL - 18 的 SEQ ID NO : 17 中的 N 端區域的胺基酸序列。

實驗 6

老鼠 IL - 18 的製備

在 - 0.5 ml 反應試管中加入 8 μ l 的 25 mM 氯化鎂，10 μ l 的 10 $\times$ PCR 緩衝液，1 μ l 的 25 mM d N T P 混合物，1 μ l 2.5 單位 / μ l 的 taq . DNA 聚合酶，1 ng 的重組 DNA (此重組 DNA 可編碼老鼠 IL - 18，具有 SEQ ID NO : 18 的核苷酸序列和 SEQ ID NO : 7 的胺基酸序列；並且根據日本專利公開公報編號 27, 189 / 96 的方法從一噬菌體 DNA 菌落製備)，和適量的分別具有 5' - A T A G A A T T C A A A T G A A C T T T G G C C G A C T T C A C T G - 3' 和 5' - A T A A A G C T T C T A A C T T T G A T G T A A G T T - 3' 核苷酸序列的感應鏈和對感應鏈引子 (此引子係根據接近 SEQ

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明(20)

I D N O : 7 的 N 和 C 端的胺基酸序列以化學法合成) , 並且以消毒過的蒸餾水調整此混合物溶液體積為 1 0 0 μ l 。然後將得到的此溶液進行 P C R , 其設定如下 :

9 4 $^{\circ}$ C 1 分鐘 , 4 3 $^{\circ}$ C 1 分鐘和 7 2 $^{\circ}$ C 1 分鐘 , 進行三次循環 ; 然後 9 4 $^{\circ}$ C 1 分鐘 , 6 0 $^{\circ}$ C 1 分鐘和 7 2 $^{\circ}$ C 1 分鐘 , 進行 4 0 次循環。

將由 P C R 反應得到的產物和 " pCR-Script SK(+)" (一種由 Stratagene Cloning Systems, California, USA 商業化的質體載體) , 依照一般方式使用 D N A 連接酶將其連接在一起成為重組 D N A , 然後送入由 Stratagene Cloning Systems, California, USA 商業化的大腸桿菌株 " X L - 1 Blue MRF, kan " , 以得到一轉型物。將轉型物接種於含 5 0 μ g / m l 氨苄青黴素的 L - 培養物 (p H 7 . 2) , 於 3 7 $^{\circ}$ C 振盪培養 1 8 小時。離心此培養物以得到增殖的轉型物 , 然後以傳統的鹼 - S D S 方法處理而分離出重組 D N A 。取一部分分離得到的重組 D N A 以雙去氧核糖核苷酸定序法分析。其結果顯示 , 此重組 D N A 含有

S E Q I D N O : 1 8 序列 , 此序列在 5 ' - 和 3 ' - 一端分別有 E c o R I 和 H i n d I I I 限制酶作用位置 , 和一含有甲硫胺酸密碼子做為起始多胜肽合成的 D N A 和一做為終止多胜肽合成的 T A G 密碼子 , 其分別位於 S E Q I D N O : 1 8 胺基酸序列的 N - 端之前和 C - 端之後。重組 D N A 含有 S E Q I D N O s : 1 - 5 的核苷酸序列。這些胺基酸序列是由 S E Q I D

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

裝

五、發明說明(1)

NO: 18 中的核苷酸 46-63, 85-102, 394-414, 148-162 和 211-225 所編碼。

將剩餘的重組 DNA 部分以 EcoRI 和 HindIII 限制酶切斷。取 0.1 μ g 的 EcoRI-HindIII DNA 片段和已事先經過限制酶處理的 10 ng pKK223-3 質體載體 (為 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 商品), 利用 DNA 連接套組 "DNA LIGATION KIT VER 2" (為 Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan 商品), 於 16 $^{\circ}$ C 反應 30 分鐘, 而得到一可自主複製的重組 DNA-pKGF MH2。使用勝任細胞法, 將大腸桿菌 Y1090 菌株 (ATCC 37197) 以重組 DNA-pKGF MH2 轉型, 然後把形成的轉型物-pKGF MH2 接種至含 50 μ g / ml 氨苄青黴素的 L-培養物 (pH 7.2), 於 37 $^{\circ}$ C 振盪培養 18 小時。將培養物離心以收集增殖的轉型物, 然後取部分的轉型物以傳統的 SDS-鹼方法萃取重組 DNA-pKGF MH2。再使用雙去氧核糖核苷酸定序法分析重組 DNA。其結果顯示: 在重組 DNA-pKGF MH2 中, 含有 SEQ ID NO: 18 核苷酸序列的 kGFMH2 cDNA 是連接至 Tac 啟動子的下游 (第 5 圖)。

氨苄青黴素加至已經過滅菌消毒的 L-培養物 (pH 7.2), 使其濃度為 50 μ g / ml, 冷卻至 37 $^{\circ}$ C,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

裝

五、發明說明(2)

並以轉型物 K G F M H 2 接種，然後於 37℃ 培養 18 小時。取 18 ℓ 新鮮製備的相同培養基於 20 ℓ 發酵瓶，如上進行相似的滅菌工作，與氨基青黴素混合，冷卻至 37℃，並以上述得到 1 v / v % 種子培養物接種，然後在 37℃ 振盪培養 8 小時。把形成的培養物進行離心，以收集培養的細胞，然後懸浮於含 150 mM 氯化鈉，16 mM 氫磷酸二鈉和 4 mM 二氫磷酸鈉的混合物溶液 (pH 7.3)，利用超音波使細胞破裂，並離心去除細胞破裂物，產生約 2 ℓ 的上清液。

於 2 ℓ 上清液中加入含硫酸銨的 10 mM 磷酸鹽緩衝劑 (pH 7.3) 使其達至 40% 銨飽和度。形成的沉澱物以離心去除，上清液與硫酸銨混合使其達到 85% 銨飽和度，然後於 4℃ 靜置 18 小時，於 8000 rpm 離心 30 分鐘以得到新形成的沉澱物。將得到的沉澱物溶解於含 1.5 M 硫酸銨的 10 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 6.6)，使其總體積約 1300 ml，過濾此溶液，然後灌注於填充 800 ml " P H E N Y L S E P H A R O S E C L - 6 8 " (一種由 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 製造的凝膠) 的管柱，再以新鮮製備相同的緩衝液清洗管柱，並以存在於 10 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 6.6) 從 1.5 M 降至 0 M 的硫酸銨直線梯度緩衝液，以 S V (空間速度, space velocity) 1.5 注入管柱。將在 1 M 硫酸銨附近沖提出來的沖提物收集合併，以膜過濾物進行濃縮，再以 10 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (23)

6.5) 於 4 °C 透析 18 小時。將經過透析的溶液置於填充 55 ml "DEAE-5pw" (一種由 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 製造的凝膠)，且事先以 10 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 6.5) 平衡的管柱。此管柱以新鮮製備的相同緩衝液進行沖洗，注入存在於 10 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 6.5) 氯化鈉濃度從 0 M 增至 0.5 M 的直線梯度緩衝液，其 SV 為 5.5，然後收集在 0.2 M 氯化鈉附近沖提出來的沖提物。之後把沖提物合併並以上述相似方法進行濃縮，使成 9 ml，再以 PBS (phosphate buffered saline, 磷酸鹽緩衝性鹽水) 於 4 °C 對濃縮物進行透析 18 小時，然後將透析液置於填充 "SUPERDEX 75" (一種由 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 製造的凝膠)，且事先以新鮮製備相同的 PBS 平衡的管柱。以新鮮製備的 PBS 注入管柱，並收集且 IFN- γ 誘導活性的部分，並且將收集的部分合併，再以膜過濾物濃縮而得到純化的老鼠 IL-18，其產率約為 350 μ g / l 培養液。

如日本專利公開公報編號 27, 189 / 96 所發表的方法，分析純化的老鼠 IL-18 的生物活性和物化特性後顯示：當我們以一般方式收集老鼠脾臟細胞，並於不同濃度的老鼠 IL-18 條件下培養該細胞，會造成

IFN- γ 的製造決定於老鼠 IL-18 的濃度。此顯示以脾臟細胞做為免疫活性細胞，老鼠 IL-18 具有誘導 IFN- γ 製造的活性。根據 U.K.Laemmli 在 Nature, vol.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明 (24)

227, pp. 680-685 (1970) 所報導的方法，將純化的人類 IL-18 置於非還原狀態下的 SDS-PAGE，我們發現在相當於 18000-19500 道耳頓位置的主要帶具有一誘導 IFN- γ 製造的活性，老鼠 IL-18 的 N 端區域含有 SEQ ID NO: 19 的胺基酸序列，其相當於 SEQ ID NO: 18 的 N 端區域。

參考實驗 7：如本發明的 IL-18 的生物活性將更詳細描述，和實驗 8 描述 IL-18 的細胞毒性：

實驗 7

生物活性

實驗 7-1

GM-CSF 製造的誘導作用

使用一肝素化的針筒，從健康自願者的身上收集血液並以不含血清的 RPMI 1640 培養基 (pH 7.4) 稀釋二倍。將稀釋液置於離心管 ficoll 並離心，然後將收集到的淋巴球以添加 10 v/v % 胎牛血清的 RPMI 1640 培養基 (pH 7.4) 清洗，並懸浮於新鮮製備的相同培養基內，使細胞密度為 1×10^6 細胞/ml，然後將細胞懸浮液分置於每個孔為 2 ml 的 12 孔微盤內。

使用添加 10 v/v % 胎牛血清的 RPMI 1640 培養基 (pH 7.4)，將利用實驗 1 方法獲得的 IL-18 製備物製備成含 1 μ g/ml 溶液，然後將此溶液分置

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

裝

五、發明說明 (25)

於以上的微盤內，每孔內 20 - 200 μ l。然後每孔再加入 10 μ l 添加 500 μ l / ml 刀豆球蛋白 A 的新鮮製備相同緩衝液，再於 37℃，5 v / v % CO₂ 培養箱內反應 48 小時。經過完全培養過程，每一孔取 0.1 ml 上清液做為樣品，利用一般酵素免疫法測量 GM - CSF 含量。相同地，將不含 IL - 18 的培養系統做為控制組，並以以上相同地方方式處理。結果顯示於第 1 表：

第 1 表

IL-18*(nm)	GM-CSF 產率 (pg / ml)
0	510
0.7	2150
2.8	3050
5.6	3950

註：符號 “*” 意指 IL - 18 添加至含有 2.5 μ g / ml 刀豆球蛋白 A 的培養系統

第 1 表結果顯示以淋巴球做為免疫活性細胞，當在含有刀豆球蛋白 A 做為輔因子與 IL - 18 接觸時，GM - CSF 的製造決定於 IL - 18 的濃度。它也確認了，藉由實驗 2 - 5 方法獲得的所有 IL - 18 製備物和其功能性同等物可誘導 GM - CSF 的製造，即使如上述單獨地使用。將利用實驗 6 方法獲得的 IL - 18 製備物根據實驗 7 - 1 方法進行試驗，除了以從老鼠製備取得的脾細胞

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 26)

取代實驗中的人類淋巴球，我們發現 I L - 1 8 製備物也會誘導 G M - C S F 的製造。

實驗 7 - 2蝕骨細胞生成作用的抑制作用實驗 7 - 2 (a)

如 T.J.Martin 和 L.W.Ng 於 Tournal of Cellular Biochemistry, vol.56,pp.357-366(1994)報導，將源自於造血幹細胞的蝕骨細胞前驅者細胞與造骨細胞或骨髓基質相接觸，對於蝕骨細胞前驅者細胞分化成成熟蝕骨細胞被認為是必需的。如 G.D.Roodman 於 Endocrine Reviews, vol.17,No.4,pp.308-332(1996)描述，蝕骨細胞一般被確認具有多核細胞特徵，抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartaric acid-resistant acid phosphatase，此後縮寫成 " T R A P ") 活性，和一降鈣血素接受體。如 Nobuyuki UDAGAWA 等人於 Journal of Experimental Medicine, vol. 182,pp.1461-1468(1995)報導，在一造骨細胞和骨髓細胞共同培養系統，這些細胞對一些因子如 1α ，25 - 二羥維生素 D 3，前列腺素 E 2，腎上腺皮質素，間白素 1，間白素 6 和間白素 11 具有反應而形成蝕骨細胞相似細胞 (osteoclast-like cells,此後可能縮寫為 " O C L ")。形成的 O C L 具有在活性內蝕骨細胞的特徵。因此，共同培養系統可將活體內蝕骨細胞形成的過程完善地在活體外中反應出來。使用此系統，對於蝕骨細胞形

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明 (27)

成和蝕骨細胞增生抑制劑的實驗可以實行。

使用以上的共同培養系統，我們對如本發明的 IL - 18 的蝕骨細胞增生抑制活性進行研究。本實驗中所使用的造骨細胞係使用一般方式製備。將新生老鼠的顱頂以 0.1 w / v % 膠原蛋白酶 (Worthington Biochemical Co., Freefold, Australia 製的商品) 和 0.2 w / v % dispase 酶 (Godo Shusei Co., Ltd., Tokyo, Japan 製的商品) 處理。利用一般方式從成熟老鼠製備骨髓細胞。將 2×10^4 細胞的造骨細胞初級細胞培養物和 5×10^5 細胞的骨髓細胞共同培養於，每一孔含 0.4 ml 添加 10 v / v % 胎牛血清的 α - MEM 培養基 (此後在實驗 7 - 2 皆命名為 "培養基") 的 48 孔微盤，於 37 °C，5 v / v % CO₂ 培養箱中反應 7 天，此組為陰性控制組。陽性控制組則與陰性控制組相似，將二種細胞共同培養，除了培養於含 10^{-8} 1 α ，25 - 二羥維生素 D₃ (Wako Pure Chemicals, Tokyo, Japan 製造的商品) 和 10^{-7} M 前列腺素 E₂ (Sigma Chemical Company, Missouri, USA 製造的商品) 的其他孔內。將上述的二種細胞共同培養於與陽性控制組相似環境，除了將其培養於含 10^{-8} 1 α ，25 - 二羥維生素 D₃ (Wako Pure Chemicals, Tokyo, Japan 製造的商品) 和 10^{-7} 前列腺素 E₂ (Sigma Chemical Company, Missouri, USA 製造的商品) 和依照實驗 6 製造的 IL - 18 製備物，0.01 - 10 ng / ml 濃度的其他孔內。在每一共同培養系統，每一孔內的培養基在開始培養後的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 28)

第三天，都以新鮮的相同培養基取代。如 Nobuyuki UDAGA WA 於 Journal of Experimental Medicine, vol.182,pp.1461-1468(1995),的方法，基於 T R A P 活性，細胞在開始培養後的第六天都被固定和染色，然後計算每一孔內染色的細胞（此後稱為“T R A P－陽性細胞”）。整個實驗 7－2 過程，每一共同培養系統都在相同條件下，進行相同四個孔實驗，並且計算每一系統每一孔的 T R A P－陽性細胞的平均值。結果在第 2 圖：

第 2 表

IL-18(ng/ml)	蝕骨細胞增生生成因子*1	每孔內 TRAP－陽性細胞數目*2
0	-	2
0	+	110
0.01	+	114
0.1	+	111
0.5	+	106
1	+	63
2	+	29
4	+	12
8	+	2
10	+	2

註：*1:符號“+”和“-”分別顯示共同培養系統含有和

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

後

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (29)

不含有 10^{-8} M $1\alpha, 25$ -二羥維生素 D_3 和
 10^{-7} 前列腺素 E_2 。

*2:它顯示在相同條件下從相同四個孔培養所獲得的資料平均值。

如第 2 表所示，T R A P - 陽性細胞的生成現象並未在陰性控制組中觀察到，但在陽性控制組則有明顯生成現象。在共同培養系統，即陽性控制組額外添加 I L - 1 8，T R A P - 陽性細胞生成的抑制決定於 I L - 1 8 的濃度，並且最大的抑制作用，即程度相同於陰性控制組，是在每 ml 含有 8 ng 或更多 I L - 1 8 條件下。這些資料強烈地顯示 I L - 1 8 具有明顯抑制活體外 D C L 形成的活性和也抑制蝕骨細胞形成。

實驗 7 - 2 (b)

如前所述，它確認了在實驗 7 - 2 的共同培養系統中，存在的因子可誘導蝕骨細胞相似細胞的生成。因此，在實驗 7 - 2 (b)，我們將研究是否在實驗 7 - 2 (a) 觀察到的 I L - 1 8 對蝕骨細胞生成作用的抑制活性是專一於一些因子或不是；蝕骨細胞相似細胞是依照實驗 7 - 2 (a) 陰性控制組所使用的相同方式培養，除了使用添加 10^{-8} M $1\alpha, 25$ -二羥維生素 D_3 ； 10^{-7} M 前列腺素 E_2 ，200 ng / ml 副甲狀腺荷爾蒙，100 ng / ml 間白素 1 或 20 ng / ml 間白素 1 1 的培養基。這些培養系統是做為陽性控制組。相同地，細胞利用陽性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 60)

控制組所使用的相同方法培養於其他孔內，除了使用含有 1 0 n g / ml 利用實驗 6 方法獲得的 I L - 1 8 製備物，此外加入如上述任何一種相同濃度的因子。經過完整的細胞培養，計算每一孔中 T R A P - 陽性細胞，其數目如實驗 7 - 2 (a) 相同地做比較。結果顯示於第 3 表：

第 3 表

蝕骨細胞生成因子 * 1 濃度)	IL-18*2	每孔內 TRAP-陽性 細胞數目 *3
D ₃ (10 ⁻⁸ M)	-	94
	+	3
PGE ₂ (10 ⁻⁷ M)	-	77
	+	3
PTH(200ng/ml)	-	63
	+	3
IL-11(100ng/ml)	-	84
	+	3
IL-1(20ng/ml)	-	71
	+	3

註 : *1 : D₃, PEG₂, PTH, IL-11 和 IL-1 分別為 1 α , 25-二羥維生素 D₃, 前列腺素 E₂, 副甲狀腺荷爾蒙, 間白素 -11 和間白素 -1, 將它們加到孔內使其濃度如括號中所示。

*2 : 符號 : “ + ” 和 “ - ” 分別代表加入 I L - 1 8 至每一孔內使其濃度為 1 0 n g / ml 和不加入。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

裝

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(61)

*3:它顯示在相同條件下從相同四個孔培養所獲得的資料平均值。

如第3表所示，在每一陽性控制組都可觀察到明顯的T R A P－陽性細胞生成；但在含有I L－18時，生成作用幾乎完全被抑制。此強烈顯示I L－18具有廣泛和一般的抑制蝕骨細胞生成活性，且與蝕骨細胞生成相關因子無關連。

實驗7-2(c)

本實驗的目的是研究：是否在實驗7-2(a)和7-2(b)中，經由I L－18的蝕骨細胞增生抑制作用是由於I L－18誘導的G M－C S F作用而造成的。使用實驗7-2(a)應用的共同培養系統進行陽性和陰性控制組實驗。其他孔內則依照陽性控制組的相似方法，將造骨細胞和骨髓細胞共同培養，除了使用與陽性控制組中相同濃度的 $1\alpha, 25$ -二羥維生素D₃和前列腺素E₂，並添加(i) $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗老鼠G M－C S F多株抗體(R & D Systems, Minnesota, USA製造的商品)，(i i) $10\text{ng}/\text{ml}$ 依實驗6方法製得的I L－18，(i i i) (i i)加上 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗老鼠多株抗體，(i v) $0.1\text{ng}/\text{ml}$ 老鼠G M－C S F(R & D Systems, Minnesota, USA製造的商品)或(v)，(i v)，加上 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗老鼠G M－C S F多株抗體。經過完整培養，計算每一孔內T R A P－陽性細胞，並且依照實驗7-2

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(2)

(b) 相似法進行比較。結果顯示於第4表，其中符號“i”至“v”表示共同培養系統內所使用的系統，而非控制系統。

第4表

培養系統*1	蝕骨細胞 增生因子*2	IL-18*3	GM-CSF*4	抗-GM-CSF 抗體*5	每一孔內 陽性細胞數目*6
N	—	—	—	—	3
P	+	—	—	—	122
i	+	—	—	+	112
i i	+	+	—	—	3
i i i	+	+	—	+	111
i v	+	—	+	—	4
v	+	—	+	+	106

註：*1：其中“N”和“p”分別代表陰性和陽性控制組，

“i”至“v”相當於所使用的5種共同培養系統。

*2：其中“+”代表， 1α ， 25 -二羥維生素 D_3 和前列腺素 E_2 分別加至孔內，其濃度分別為 $10^{-8}M$ 和 $10^{-7}M$ ，而“—”代表未加入這些化合物。

*3：符號：“+”代表加入IL-18於每一孔內，使其濃度為 $10ng/ml$ ，“—”代表未加入IL-18。

*4：符號：“+”代表加入GM-CSF於每一孔內，使其濃度為 $0.1ng/ml$ ，“—”代表未加入GM-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (3)

C S F。

*5:符號“+”代表加入抗-GM-CSF多株抗體於每一孔內，其濃度為 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ，“-”代表未加入抗GM-CSF多株抗體。

如第4表所示，TRAP-陽性細胞的生成幾乎完全被IL-18抑制，如共同培養系統(i i)，但此抑制作用完全被加入的抗-老鼠多株抗體所抑制，如共同培養系統(i i i)。老鼠GM-CSF具有相似於IL-18的抑制TRAP-陽性細胞生成的活性，如共同培養系統(i v)，和此抑制作用幾乎完全被加入的抗-老鼠GM-CSF多株抗體所抑制，如共同培養系統(v)。單獨使用抗-老鼠GM-CSF多株抗體對於TRAP-陽性細胞的生成並無影響，如共同培養系統(i)。這些資料強烈地顯示由IL-18造成的蝕骨細胞增生抑制作用是由於IL-18誘導的GM-CSF的作用而致。

實驗 8

急性毒性試驗

將8週大的老鼠依照經皮、口腔或腹腔內注射法方式，投予依照實驗1-6方法獲得的IL-18製備物。這些結果顯示：這些IL-18製備物對於老鼠來說，其LD₅₀約為 $1\text{mg}/\text{kg}$ 或更多，並且與投予途徑無關。這資料顯示IL-18可併入於一般溫血動物（包括人類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

裝

五、發明說明 34)

) 的製藥中且不會造成嚴重的副作用。

如 Nikkei Biotechnology Annual Report 1996, pp.498-499(1995)所描述〔由 Nikkei BP Publisher, Tokyo, Japan(1995)出版〕, I L - 1 8 - 誘導的 G M - C S F 並未在日本進行臨床上使用, 但在美國和歐洲已應用於臨床上。這事實可能顯示: 事實上 I L - 1 8 並無嚴重的副作用。這些事實顯示: 如本發明的蝕骨細胞增生抑制劑可連續地投予一般溫血動物(包括人類)以誘導蝕骨細胞形成, 並且對與蝕骨細胞相關的疾病具有令人滿意的治療和/或預防效果, 且不造成嚴重的副作用。

下列的實施例將描述如本發明的蝕骨細胞增生抑制劑。

實施例 1

液體

將利用實驗 1 - 6 方法製備得到的 I L - 1 8 製備物溶解於含有 1 w / v % 人類血清白蛋白(做為安定劑)的生理食鹽水內, 使其濃度為每毫升含 2 m g I L - 1 8 的溶液。然後使用一般的膜過濾方式將此溶液消毒。

此液體具有令人滿意的安定性, 並且可任意地使用做為細胞培養成份, 和做為調節骨質吸收, 和蝕骨細胞相關疾病之用的注射液, 眼藥水或洗鼻藥試劑, 以治療和/或預防高鈣血症, 蝕骨細胞瘤, 骨質疏鬆症等。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (5)

實施例 2

乾燥試劑

將 50 mg 經由實驗 1 - 6 方法得到的 IL - 18 製備物溶解於含 1 w / v % 純化明膠做為安定劑的 100 ml 生理食鹽水內。然後利用一般膜過濾方式把此溶液進行消毒，再均分於 1 ml 的小瓶內，冷凍乾燥，和以蓋子封瓶。

此產品具有令人滿意的安定性，並且可任意地使用做為細胞培養成份，和做為調節骨質吸收和蝕骨細胞相關疾病之用的乾性注射液試劑，以治療和 / 或預防高鈣血症，蝕骨細胞瘤、骨質疏鬆症等。

實施例 3

乾燥試劑

將 50 mg 經由實驗 1 - 6 方法得到的 IL - 18 製備物溶解於含 1 w / v % 海藻糖做為安定劑的 100 ml 生理食鹽水內。然後利用一般膜過濾方式把此溶液進行消毒，再均分於 1 ml 小瓶內，冷凍乾燥，和以蓋子封瓶。

此產品具有令人滿意的安定性，並且可任意地使用做為細胞培養成份，和做為調節骨質吸收和蝕骨細胞相關疾病之用的乾性注射液試劑，以治療和 / 或預防高鈣血症，蝕骨細胞瘤，骨質疏鬆症等。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (6)

實施例 4

軟膏

將 "HIVIS WAKO GEL®104" (一種由 Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan 製造的羧乙烯聚合物產品) 和高純度海藻糖溶解於消毒過的蒸餾水，使其濃度分別為 1.4 w/w % 和 2.0 w/w %，然後將此溶液與由實驗 1-6 方法製得的 IL-18 製備物混合至均質化，並調整 pH: 7.2。每 g 的糊膏產品含有約 1 mg IL-18 製備物。

所製得的每一個產品都具有令人滿意的塗敷能力和安定性，並且可任意地使用做為調節骨質吸收和蝕骨細胞相關疾病之用的軟膏試劑，以治療和/或預防高鈣血症，蝕骨細胞瘤，骨質疏鬆症等。

實施例 5

錠劑

將 "FINETOSE®" (一種由 Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan 製造的無水結晶 α -麥芽糖粉末產品)，和由實驗 1-6 方法製得的 IL-18 製備物，和 "LUMIN" 或 1-1'-1"-三庚基-11-喹啉基(4)·4·4'-penthamethinchyno 花青

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(37)

苷 - 1, 1" - 二 iodide 混合至均質化。利用一般製造錠劑方法將此混合物製成錠劑。每一顆錠劑約為 200 mg, 其內含大約 2 mg 的 IL - 18 製備物和 2 mg 的 LUMIN。

此產品具有令人滿意的吞嚥特性, 安定性和活化細胞的活性, 並且可任意地使用做為調節骨質吸收和蝕骨細胞相關疾病之用的錠劑試劑, 以治療和 / 或預防高鈣血症, 蝕骨細胞瘤, 骨質疏鬆症等。

如上述, 如本發明的蝕骨細胞增生抑制劑可有效抑制蝕骨細胞形成, 因此, 此試劑可任意地使用做為細胞培養成份和做為調節骨質吸收和蝕骨細胞相關疾病之用的試劑, 以治療和 / 或預防高鈣血症, 蝕骨細胞瘤, 骨質疏鬆症等。

因此具有這些有益活性和功能的本發明對於此領域來說是一有意義的發明。

此所描述的是本發明的較佳具體實例, 而我們都了解, 我們可以做各種不同的修飾, 所有的此種修飾都將涵蓋於附加的申請專利範圍, 並落於本發明的真正精神和目標之內。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

裝

五、發明說明 (88)

(1) S E Q I D N O : 1 的資料

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 6 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 胜肽

(v) 片段種類 : 內部片段

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 :

Asn	Asp	Gln	Val	Leu	Phe
1				5	

(2) S E Q I D N O : 2 的資料

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 6 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 內部片段

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 2 :

Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp
1				5	

(3) S E Q I D N O : 3 的資料

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 7 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 胜肽

(v) 片段種類 : 內部片段

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

頁

五、發明說明 (39)

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 3 :

Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys
1				5		

(4) S E Q I D N O : 4 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 5 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 內部片段

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 4 :

Met	Tyr	Lys	Asp	Ser
1				5

(5) S E Q I D N O : 5 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 5 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 內部片段

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 5 :

Ser	Thr	Leu	Ser	Cys
1				5

(6) S E Q I D N O : 6 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 1 5 7 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明(40)

(D) 拓撲學：直線

(ii) 分子種類：胜肽

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：6：

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

(7) SEQ ID NO：7 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度：157 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：直線

(ii) 分子種類：胜肽

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：7：

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (41)

Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser
				85					90					95	
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu
			100					105					110		
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu
		115					120					125			
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp
	130					135					140				
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser			
145					150					155					

(8) S E Q I D N O : 8 的 資 料

(i) 序 列 特 徵

(A) 長 度 : 4 7 1 個 鹼 基 對

(B) 種 類 : 核 酸

(C) 股 : 雙 鏈

(D) 拓 撲 學 : 直 線

(i i) 分 子 種 類 : c D N A

(v i) 來 源

(A) 有 機 體 : 人

(G) 細 胞 種 類 : 肝

(i x) 特 性

(A) 名 稱 / 關 鍵 : 主 胜 肽

(B) 位 置 : 1 4 7 1

(C) 確 認 方 法 : E

(x i) 序 列 描 述 S E Q I D N O : 8 :

TAC	TTT	GGC	AAG	CTT	GAA	TCT	AAA	TTA	TCA	GTC	ATA	AGA	AAT	TTG	AAT	48
Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	
1				5				10						15		
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	ATT	GAC	CAA	GGA	AAT	CGG	CCT	CTA	TTT	GAA	GAT	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
		20					25					30				
ATG	ACT	GAT	TCT	GAC	TGT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明42)

Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
		35					40					45				
ATA	AGT	ATG	TAT	AAA	GAT	AGC	CAG	CCT	AGA	GGT	ATG	GCT	GTA	ACT	ATC	192
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
		50					55					60				
TCT	GTG	AAG	TGT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	TGT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile	
					70					75					80	
ATT	TCC	TTT	AAG	GAA	ATG	AAT	CCT	CCT	GAT	AAC	ATC	AAG	GAT	ACA	AAA	288
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
				85					90					95		
AGT	GAC	ATC	ATA	TTC	TTT	CAG	AGA	AGT	GTC	CCA	GGA	CAT	GAT	AAT	AAG	336
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
			100					105					110			
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TGT	GAA	384
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	
			115				120					125				
AAA	GAG	AGA	GAC	CTT	TTT	AAA	CTC	ATT	TTG	AAA	AAA	GAG	GAT	GAA	TTG	432
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
		130				135						140				
GGG	GAT	AGA	TCT	ATA	ATG	TTC	ACT	GTT	CAA	AAC	GAA	GAC				471
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				
					150					155						

(9) S E Q I D N O : 9 的 資 料

(i) 序 列 特 徵

(A) 長 度 : 1 1 個 胺 基 酸

(B) 種 類 : 胺 基 酸

(D) 拓 撲 學 : 直 線

(i i) 分 子 種 類 : 胜 肽

(v) 片 段 種 類 : N 端 片 段

(x i) 序 列 描 述 : S E Q I D N O : 9 :

(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

五、發明說明(43)

Met Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser
1 5 10

(1 0) S E Q I D N O : 1 0 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度：1 0 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：直線

(i i) 分子種類：胜肽

(v) 片段種類：C 端片段

(x i) 序列描述：S E Q I D N O : 1 0 :

Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
1 5 10

(1 1) S E Q I D N O : 1 1 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度：1 3 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：直線

(i i) 分子種類：胜肽

(v) 片段種類：N 端片段

(x i) 序列描述：S E Q I D N O : 1 1 :

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg
1 5 10

(1 2) S E Q I D N O : 1 2 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度：1 4 個胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(44)

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：直線

(i i) 分子種類：胜肽

(v) 片段種類：內部片段

(x i) 序列描述：S E Q I D N O : 1 2 :

Thr	Ile	Phe	Ile	Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg
1				5					10				

(1 3) S E Q I D N O : 1 3 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度：1 7 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：直線

(i i) 分子種類：胜肽

(v) 片段種類：內部片段

(x i) 序列描述：S E Q I D N O : 1 3 :

Ile	Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
1				5					10					15		

(1 4) S E Q I D N O : 1 4 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度：4 7 1 個鹼基對

(B) 種類：核酸

(C) 股：雙股

(D) 拓撲學：直線

(i i) 分子種類：c D N A

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

後

五、發明說明 (45)

(i x) 特性 :

(A) 名稱 / 關鍵 : 主胜肽

(B) 位置 : 1 . . . 4 7 1

(C) 確認方法 : S

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 4 :

TAC	TTT	GGC	AAG	CTT	GAA	TCT	AAA	TTA	TCA	GTC	ATA	AGA	AAT	TTG	AAT	48
Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	
1			5					10					15			
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	ATT	GAC	CAA	GGA	AAT	CGG	CCT	CTA	TTT	GAA	GAT	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
		20						25					30			
ATG	ACT	GAT	TCT	GAC	TCT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
		35						40				45				
ATA	AGT	ATG	TAT	AAA	GAT	AGC	CAG	CCT	AGA	GGT	ATG	GCT	GTA	ACT	ATC	192
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
		50						55				60				
TCT	GTG	AAG	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	GCT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Asn	Lys	Ile	
		65						70			75			80		
ATT	TCC	TTT	AAG	GAA	ATG	AAT	CCT	CCT	GAT	AAC	ATC	AAG	GAT	ACA	AAA	288
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
				85					90					95		
AGT	GAC	ATC	ATA	TTC	TTT	CAG	AGA	AGT	GTC	CCA	GGA	CAT	GAT	AAT	AAG	336
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
				100				105					110			
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TGT	GAA	384
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	
		115						120				125				
AAA	GAG	AGA	GAC	CTT	TTT	AAA	CTC	ATT	TTG	AAA	AAA	GAG	GAT	GAA	TTG	432
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
		130					135				140					
GGG	GAT	AGA	TCT	ATA	ATG	TTC	ACT	GTT	CAA	AAC	GAA	GAC				471
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				
					145		150				155					

(1 5) S E Q I D N O : 1 5 的 資 料

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 1 0 個 胺 基 酸

(B) 種類 : 胺 基 酸

(D) 拓 撲 學 : 直 線

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

象

五、發明說明(46)

(i i) 分子種類：胜肽

(v) 片段種類：N端片段

(x i) 序列描述：S E Q I D N O : 1 5 :

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser
1				5				10	

(1 6) S E Q I D N O : 1 6 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度：4 7 1 個鹼基對

(B) 種類：核酸

(C) 股：雙股

(D) 拓撲學：直線

(i i) 分子種類：c D N A

(i x) 特性

(A) 名稱／關鍵：主胜肽

(B) 位置：1 . . . 4 7 1

(C) 確認方法：S

(x i) 序列描述：S E Q I D N O : 1 6 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

裝

五、發明說明(47)

TAC	TTT	GGC	AAG	CTT	GAA	TCT	AAA	TTA	TCA	GTC	ATA	AGA	AAT	TTG	AAT	48
Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	
1				5					10					15		
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	ATT	GAC	CAA	GGA	AAT	CGG	CCT	CTA	TTT	GAA	GAT	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
			20					25					30			
ATG	ACT	GAT	TCT	GAC	TCT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
		35					40					45				
ATA	AGT	ATG	TAT	AAA	GAT	AGC	CAG	CCT	AGA	GGT	ATG	GCT	GTA	ACT	ATC	192
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
	50					55					60					
TCT	GTG	AAG	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	GCT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Asn	Lys	Ile	
65					70					75				80		
ATT	TCC	TTT	AAG	GAA	ATG	AAT	CCT	CCT	GAT	AAC	ATC	AAG	GAT	ACA	AAA	288
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
				85					90					95		
AGT	GAC	ATC	ATA	TTC	TTT	CAG	AGA	AGT	GTC	CCA	GGA	CAT	GAT	AAT	AAG	336
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
			100					105					110			
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TCT	GAA	384
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ser	Glu	
		115					120					125				
AAA	GAG	AGA	GAC	CTT	TTT	AAA	CTC	ATT	TTG	AAA	AAA	GAG	GAT	GAA	TTG	432
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
	130					135					140					
GGG	GAT	AGA	TCT	ATA	ATG	TTC	ACT	GTT	CAA	AAC	GAA	GAC				471
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				
145					150					155						

(1 7) S E Q I D N O : 1 7 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 1 1 4 6 4 個鹼基對

(B) 種類 : 核酸

(C) 股 : 雙股

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 基因 D N A

(v i) 來源 :

(A) 有機體 : 人

(G) 細胞種類 : 胎盤

(i x) 特性 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (48)

(A) 名稱 / 關鍵 : 5 ' U T R

(B) 位置 : 1 . . 3

(C) 確認方法 : E

(A) 名稱 / 關鍵 : 前導胜肽

(B) 位置 : 4 . . 8 2

(C) 確認方法 : S

(A) 名稱 / 關鍵 : 插入序列

(B) 位置 : 8 3 . . . 1 4 5 3

(C) 確認方法 : E

(A) 名稱 / 關鍵 : 前導胜肽

(B) 位置 : 1 4 5 4 . . 1 4 6 5

(C) 確認方法 : S

(A) 名稱 / 關鍵 : 插入序列

(B) 位置 : 1 4 6 6 . . . 4 8 4 8

(C) 確認方法 : E

(A) 名稱 / 關鍵 : 前導胜肽

(B) 位置 : 4 8 4 9 . . . 4 8 6 5

(C) 確認方法 : S

(A) 名稱 / 關鍵 : 主胜肽

(B) 位置 : 4 8 6 6 . . . 4 9 8 3

(C) 確認方法 : S

(A) 名稱 / 關鍵 : 插入序列

(B) 位置 : 4 9 8 4 . . . 6 3 1 7

(C) 確認方法 : E

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(49)

- (A) 名稱／關鍵：主胜肽
- (B) 位置：6 3 1 8 . . . 6 4 5 1
- (C) 確認方法：S
- (A) 名稱／關鍵：插入序列
- (B) 位置：6 4 5 2 . . . 1 1 2 2 4
- (C) 確認方法：E
- (A) 名稱／關鍵：主胜肽
- (B) 位置：1 1 2 2 5 . . . 1 1 4 4 3
- (C) 確認方法：S
- (A) 名稱／關鍵：3' U T R
- (B) 位置：1 1 4 4 4 . . . 1 1 4 6 4
- (C) 確認方法：E
- (x i) 序列描述 S E Q I D N O : 1 7 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

AAG ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA	48
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala	
-35 -30 -25	
ATG AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA G GTAAGG CTAATGCCAT	98
Met Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala	
-20 -15 -10	
AGAACAAATA CCAGGTTTCAG ATAAATCTAT TCAATTAGAA AAGATGTTGT GAGGTGAACT	158
ATTAAGTGAC TCTTTGTGTC ACCAAATTTTCT ACTGTAATAT TAATGGCTCT TAAAAAATA	218
GTGGACCTCT AGAAATTAAC CACAACATGT CCAAGGTCTC AGCACCTTGT CACACCACGT	278
GTCCTGGCAC TTTAATCAGC AGTAGCTCAC TCTCCAGTTG GCAGTAAGTG CACATCATGA	338

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(60)

AAATCCCAGT	TTTCATGGGA	AAATCCCAGT	TTTCATTGGA	TTTCCATGGG	AAAAATCCCA	398
GTACAAAAC	GGGTGCATTC	AGGAAATACA	ATTTCCCAA	GCAAATTGGC	AAATTATGTA	458
AGAGATTCTC	TAAATTTAGA	GTTCCGTGAA	TTACACCATT	TTATGTAAAT	ATGTTTGACA	518
AGTAAAAATT	GATTCTTTTT	TTTTTTTTCT	GTTGCCAGG	CTGGAGTGCA	GTGGCACAAT	578
CTCTGCTCAC	TGCAACCTCC	ACCTCCTGGG	TTCAAGCAAT	TCTCCTGCCT	CAGCCTTCTG	638
AGTAGCTGGG	ACTACAGGTG	CATCCCGCCA	TGCCTGGCTA	ATTTTTGGGT	ATTTTTACTA	698
GAGACAGGGT	TTTGGCATGT	TGTCCAGGCT	GGTCTTGGAC	TCCTGATCTC	AGATGATCCT	758
CCTGGCTCGG	GCTCCCAAAG	TGCTGGGATT	ACAGGCATGA	ACCACCACAC	ATGGCCTAAA	818
AATTGATTCT	TATGATTAAT	CTCCTGTGAA	CAATTGGGCT	TCATTTGAAA	GTTTGCCTTC	878
ATTTGAAACC	TTCATTTAAA	AGCCTGAGCA	ACAAAGTGAG	ACCCCATCTC	TACAAAAAAC	938
TGCAAAATAT	CCTGTGGACA	CCTCCTACCT	TCTGTGGAGG	CTGAAGCAGG	AGGATCACTT	998
GAGCCTAGGA	ATTTGAGCCT	GCAGTGAGCT	ATGATCCAC	CCCTACACTC	CAGCCTGCAT	1058
GACAGTAGAC	CCTGACACAC	ACACACAAAA	AAAAACCTTC	ATAAAAAATT	ATTAGTTGAC	1118
TTTTCTTAGG	TGACTTTCCG	TTTAAGCAAT	AAATTTAAAA	GTAAAAATCTC	TAATTTTAGA	1178
AAATTTATTT	TTAGTTACAT	ATTGAAATTT	TAAACCCTA	GGTTTAAAGT	TTATGTCTAA	1238
ATTACCTGAG	AACACACTAA	GTCTGATAAG	CTTCATTTTA	TGGGCCTTTT	GGATGATTAT	1298
ATAATATTCT	GATGAAAGCC	AAGACAGACC	CTTAAACCAT	AAAAATAGGA	GTTTCGAGAA	1358
GAGGAGTAGC	AAAAGTAAAA	GCTAGAATGA	GATTGAATTC	TGAGTCGAAA	TACAAAATTT	1418
TACATATTCT	GTTTCTCTCT	TTTTCCCCCT	CTTAG CT	GAA GAT GAT G	GTAAA	1470
Ala Glu Asp Asp Glu						
-10						
GTAGAAATGA	ATTTATTTTT	CTTTGCAAAC	TAAGTATCTG	CTTGAGACAC	ATCTATCTCA	1530
CCATTGTCAG	CTGAGGAAAA	AAAAAAATGG	TTCTCATGCT	ACCAATCTGC	CTTCAAAGAA	1590
ATGTGGACTC	AGTAGCACAG	CTTTGGAATG	AAGATGATCA	TAAGAGATAC	AAAGAAGAAC	1650
CTCTAGCAAA	AGATGCTTCT	CTATGCCTTA	AAAAATTCTC	CAGCTCTTAG	AATCTACAAA	1710
ATAGACTTTG	CCTGTTTCAT	TGGTCCTAAG	ATTAGCATGA	AGCCATGGAT	TCTGTTGTAG	1770
GGGGAGCGTT	GCATAGGAAA	AAGGGATTGA	AGCATTAGAA	TTGTCCAAAA	TCAGTAACAC	1830
CTCCTCTCAG	AAATGCTTTG	GGAAGAAGCC	TGGAAGGTTT	CGGGTTGGTG	GTGGGGTGGG	1890
GCAGAAAATT	CTGGAAGTAG	AGGAGATAGG	AATGGGTGGG	GCAAGAAGAC	CACATTCAGA	1950
GGCCAAAAGC	TGAAAGAAAC	CATGGCATTT	ATGATGAATT	CAGGGTAATT	CAGAATGGAA	2010
GTAGAGTAGG	AGTAGGAGAC	TGGTGAGAGG	AGCTAGAGTG	ATAAACAGGG	TGTAGAGCAA	2070
GACGTTCTCT	CACCCCAAGA	TGTGAAATTT	GGACTTTTAT	TTGGAGATAA	TAGGGTTAAT	2130
TAAGCACAAT	ATGTATTAGC	TAGGGTAAAG	ATTAGTTTGT	TGTAACAAAG	ACATCCAAAG	2190
ATACAGTAGC	TGAATAAGAT	AGAGAATTTT	TCTCTCAAAG	AAAGTCTAAG	TAGGCAGCTC	2250
AGAAGTAGTA	TGGCTGGAAG	CAACCTGATG	ATATTGGGAC	CCCCAACCTT	CTTCAGTCTT	2310
GTACCCATCA	TCCCCTAGTT	GTTGATCTCA	CTCACATAGT	TGAAAATCAT	CATACTTCCT	2370
GGGTTTCATAT	CCCAGTTATC	AAGAAAGGGT	CAAGAGAAGT	CAGGCTCATT	CCTTTCAAAG	2430
ACTCTAATTG	GAAGTTAAAC	ACATCAATCC	CCCTCATATT	CCATTGACTA	GAATTTAATC	2490
ACATGGCCAC	ACCAAGTGCA	AGGAAATCTG	GAAAATATAA	TCTTTATTCC	AGGTAGCCAT	2550
ATGACTCTTT	AAAATTCAGA	AATAATATAT	TTTTTAAATA	TCATTCTGGC	TTTGGTATAA	2610
AGAATTGATG	GTGTGGGGTG	AGGAGGCCAA	AATTAAGGGT	TGAGAGCCTA	TTATTTTAGT	2670
TATTACAAGA	AATGATGGTG	TCATGAATTA	AGGTAGACAT	AGGGGAGTGC	TGATGAGGAG	2730
CTGTGAATGG	ATTTTAGAAA	CACCTGAGAG	AATCAATAGG	ACATGATTTA	GGGTTGGATT	2790
TGGAAAGGAG	AAGAAAGTAG	AAAAGATGAT	GCCTACATTT	TTCACCTAGG	CAATTTGTAC	2850
CATTCACTGA	AATATGGGAAC	ACAGGAGGAA	GAGCAGGTTT	TGGTGTATAC	AAAGAGGAGG	2910
ATGGATGACG	CATTTCTGTTT	TGGATCTGAG	ATGTCTGTGG	AACGTCCTAG	TGGAGATGTC	2970
CACAAACTCT	TCTACATGTG	GTTCTGAGTT	CAGGACACAG	ATTTGGGCTG	GAGATAGAGA	3030
TATTGTAGGC	TTATACATAG	AAATGGCATT	TGAATCTATA	GAGATAAAAA	GACACATCAG	3090
AGGAAATGTG	TAAAGTGAGA	GAGGAAAAGC	CAAGTACTGT	GCTGGGGGGA	ATACCTACAT	3150
TTAAAGGATG	CAGTAGAAAG	AAGCTAATAA	ACAACAGAGA	GCAGACTAAC	CAAAAGGGGA	3210
GAAGAAAAAC	CAAGAGAATT	CCACCGACTC	CCAGGAGAGC	ATTTCAAGAT	TGAGGGGATA	3270
GGTGTGTGT	TGAATTTTGC	AGCCTTGAGA	ATCAAGGGCC	AGAACACAGC	TTTTAGATTT	3330
AGCAACAAGG	AGTTTGGTGA	TCTCAGTGAA	AGCAGCTTGA	TGGTGAAATG	GAGGCAGAGG	3390
CAGATTGCAA	TGAGTGAAAC	AGTGAATGGG	AAGTGAAGAA	ATGATACAGA	TAATTCCTTG	3450
TAAAAGCTTG	GCTGTTAAAA	GGAGGAGAGA	AACAAGACTA	GCTGCAAAGT	GAGATTGGGT	3510
TGATGGAGCA	GTTTAAATC	TCAAAATAAA	GAGCTTTGTG	CTTTTTTGAT	TATGAAAATA	3570

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(51)

ATGTGTTAAT	TGTAACATAAT	TGAGGCAATG	AAAAAAGATA	ATAATATGAA	AGATAAAAAAT	3630
ATAAAAAACCA	CCCAGAAATA	ATGATAGCTA	CCATTTTGTAT	ACAATATTTT	TACACTCCTT	3690
TCTATGTATA	TATACAGACA	CAGAAATGCT	TATATTTTTTA	TTAAAAGGGA	TTGTACTATA	3750
CCTAAGCTGC	TTTTTCTAGT	TAGTGATATA	TATGGACATC	TCTCCATGGC	AACGAGTAAT	3810
TGCAGTTATA	TTAAGTTCAT	GATATTTTAC	AATAAGGGCA	TATCTTTGCC	CTTTTTATTT	3870
AATCAATTCT	TAATTGGTGA	ATGTTTGT	CCAGTTTGT	GTTGTTATTA	ACAATGTTCC	3930
CATAAGCATT	CCTGTACACC	AATGTTTACA	CATTTGTCTG	ATTTTTTCTT	CAGGATAAAA	3990
CCCAGGAGGT	AGAATTGCTG	GGTTGATAGA	AGAGAAAGGA	TGATTGCCAA	ATTAAAGCTT	4050
CAGTAGAGGG	TACATGCCGA	GCACAAATGG	GATCAGCCCT	AGATACCAGA	AATGGCATT	4110
TCTCATTTCC	CCTTGGGACA	AAAGGGAGAG	AGGCAATAAC	TGTGCTGCCA	GAGTTAAATT	4170
TGTACGTGGA	GTAGCAGGAA	ATCATTTGCT	GAAAATGAAA	ACAGAGATGA	TGTTGTAGAG	4230
GTCTGAAGA	GAGCAAAGAA	AATTTGAAAT	TGCGGCTATC	AGCTATGGAA	GAGAGTGCTG	4290
AACTGGAAAA	CAAAAGAAGT	ATTGACAATT	GGTATGCTTG	TAATGGCACC	GATTTGAACG	4350
CTTGTGCCAT	TGTTTACCAG	CAGCACTCAG	CAGCCAAGTT	TGGAGTTTTG	TAGCAGAAAG	4410
ACAAATAAGT	TAGGGATTTA	ATATCCTGGC	CAAATGGTAG	ACAAAATGAA	CTCTGAGATC	4470
CAGCTGCACA	GGGAAGGAAG	GGAAGACGGG	AAGAGGTTAG	ATAGGAAATA	CAAGAGTCAG	4530
GAGACTGGAA	GATGTTGTGA	TATTTAAGAA	CACATAGAGT	TGGAGTAAAA	GTGTAAGAAA	4590
ACTAGAAGGG	TAAGAGACCG	GTCAGAAAGT	AGGCTATTTG	AAGTTAACAC	TTCAGAGGCA	4650
GAGTAGTTCT	GAATGGTAAC	AAGAAATTGA	GTGTGCCTTT	GAGAGTAGGT	TAAAAACAA	4710
TAGGCAACTT	TATTGTAGCT	ACTTCTGGAA	CAGAAGATTG	TCATTAATAG	TTTTAGAAAA	4770
CTAAAATATA	TAGCATACTT	ATTTGTCAAT	TAACAAAGAA	ACTATGTATT	TTTAAATGAG	4830
ATTTAATGTT	TATTGTAG	AA AAC CTG	GAA TCA GAT	TAC TTT GGC	AAG CTT	4880
Glu Asn Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu						
-5 1 5						
GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT	GAC CAA GTT CTC TTC	4928				
Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn	Asp Gln Val Leu Phe					
10 15 20						
ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT	ATG ACT GAT TCT GAC	4976				
Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp	Met Thr Asp Ser Asp					
25 30 35						
TGT AGA G GTATTTTTT TTAATTCGCA AACATAGAAA	TGACTAGCTA CTTCTTCCCA	5032				
Cys Arg Asp 40						
TTCTGTTTTTA CTGCTTACAT TGTTCCGTGC TAGTCCCAAT	CCTCAGATGA AAAGTCAACAG	5092				
GAGTGACAAT AATTTCACTT ACAGGAAACT TTATAAGGCA	TCCACGTTTT TTAGTTGGGG	5152				
TAAAAAATTG GATACAATAA GACATTGCTA GGGGTCATGC	CTCTCTGAGC CTGCCCTTGA	5212				
ATCACCAATC CCTTTATTGT GATTGCATTA ACTGTTTAAA	ACCTCTATAG TTGGATGCTT	5272				
AATCCCTGCT TGTTACAGCT GAAAATGCTG ATAGTTTACC	AGGTGTGGTG GCATCTATCT	5332				
GTAATCCTAG CTACTTGGGA GGCTCAAGCA GGAGGATTGC	TTGAGGCCAG GACTTTGAGG	5392				
CTGTAGTACA CTGTGATCGT ACCTGTGAAT AGCCACTGCA	CTCCAGCCTG GGTGATATAC	5452				
AGACCTTGTC TCTAAAATTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	CTTAGGAAAG GAAATTGATC	5512				
AAGTCTACTG TGCCTTCCAA AACATGAATT CCAAATATCA	AAGTTAGGCT GAGTTGAAGC	5572				
AGTGAATGTG CATTCTTTAA AAATACTGAA TACTTACCTT	AACATATATT TTAAATATTT	5632				
TATTTAGCAT TTTAAAGTTA AAAACAATCT TTTAGAATTC	ATATCTTTAA AATACTCAA	5692				
AAAGTTGCAG CGTGTGTGTT GTAATACACA TTAAACTGTG	GGGTTGTTTG TTTGTTTGAG	5752				
ATGCAGTTTC ACTCTGTCAC CCAGGCTGAA GTGCAGTGCA	GTGCAGTGGT GTGATCTCGG	5812				
CTCACTACAA CCTCCACCTC CCACGTTCAA GCGATTCTCA	TGCCCTCAGTC TCCCGAGTAG	5872				
GTGGGATTAC AGGCATGCAC CACTTACACC CGGCTAATTT	TTGTATTTTT AGTAGAGCTG	5932				
GGGTTTCACC ATGTTGGCCA GGCTGGTCTC AAACCCCTAA	CCTCAAGTGA TCTGCCTGCC	5992				
TCAGCCTCCC AAACAAACAA ACAACCCAC AGTTTAATAT	GTGTTACAAC ACACATGCTG	6052				
CAACTTTTAT GAGTATTTTA ATGATATAGA TTATAAAAGG	TTGTTTTTAA CTTTTAAATG	6112				
CTGGGATTAC AGGCATGAGC CACTGTGCCA GGCCTGAECT	GTGTTTTTAA AAATGTCTGA	6172				
CCAGCTGTAC ATAGTCTCCT GCAGACTGGC CAAGTCTCAA	AGTGGGAACA GGTGTATTAA	6232				
GGACTATCCT TTGGTTAAAT TTCCGCAAAT GTTCCTGTGC	AAGAATTCTT CTAAGTAGAG	6292				
TTCTCATTTA TTATATTTAT TTCAG AT AAT GCA CCC	CGG ACC ATA TTT ATT	6343				
Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile						

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(52)

ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC	40	45	6391
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile			
50	55	60	
TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT			6439
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile			
65	70	75	80
ATT TCC TTT AAG GTAAG ACTGAGCCTT ACTTTGTTTT CAATCATGTT AATATAATCA			6496
Ile Ser Phe Lys			
ATATAATTAG AAATATAACA TTATTTCTAA TGTTAATATA AGTAATGTAA TTAGAAAAC			6556
CAAAATATCCT CAGACCAACC TTTTGTCTAG AACAGAAATA ACAAGAAGCA GAGAACCATT			6616
AAAGTGAATA CTTACTAAAA ATTATCAAAC TCTTTACCTA TTGTGATAAT GATGGTTTTT			6676
CTGAGCCTGT CACAGGGGAA GAGGAGATAC AACACTTGTT TTATGACCTG CATCTCCTGA			6736
ACAATCAGTC TTTATACAAA TAATAATGTA GAATACATAT GTGAGTTATA CATTTAAGAA			6796
TAACATGTGA CTTTCCAGAA TGAGTTCTGC TATGAAGAAT GAAGCTAATT ATCCTTCTAT			6856
ATTTCTACAC CTTTGTAAT TATGATAATA TTTTAATCCC TAGTTGTTTT GTTGCTGATC			6916
CTTAGCCTAA GTCTTAGACA CAAGCTTCAG CTTCCAGTTG ATGTATGTTA TTTTAAATGT			6976
TAATCTAATT GAATAAAAGT TATGAGATCA GCTGTAAAAG TAATGCTATA ATTATCTTCA			7036
AGCCAGGTAT AAAGTATTTT TGGCCTCTAC TTTTCTCTTA TTATTTCTCA TTATTATTCT			7096
CTATTATTTT TCTCTATTTT CTCCATTATT GTTAGATAAA CCACAATTAA CTATAGCTAC			7156
AGACTGAGCC AGTAAGAGTA GCCAGGGATG CTTACAAATT GGCAATGCTT CAGAGGAGAA			7216
TTCCATGTCA TGAAGACTCT TTTTGAGTGG AGATTTGCCA ATAAATATCC GCTTTCATGC			7276
CCACCCAGTC CCCACTGAAA GACAGTTAGG ATATGACCTT AGTGAAGGTA CCAAGGGGCA			7336
ACTTGGTAGG GAGAAAAAAG CCACTCTAAA ATATAATCCA AGTAAGAACA GTGCATATGC			7396
AACAGATACA GCCCCAGAC AAATCCCTCA GCTATCTCCC TCCAACCAGA GTGCCACCCC			7456
TTCAGGTGAC AATTTGGAGT CCCCATTTCTA GACCTGACAG GCAGCTTAGT TATCAAAAATA			7516
GCATAAGAGG CCTGGGATGG AAGGGTAGGG TGGAAAGGGT TAAGCATGCT GTTACTGAAC			7576
AACATAATTA GAAGGGAAGG AGATGGCCAA GCTCAAGCTA TGTGGGATAG AGGAAAAC			7636
AGCTGCAGAG GCAGATTCAG AAAGTGGGAT AAGTCCGAAC CTACAGGTGG ATTCTTGTG			7696
AGGGAGACTG GTGAAAATGT TAAGAAGATG GAAATAATGC TTGGCACTTA GTAGCACTG			7756
GGCAAATCCA TATTTGGGGG AGCCTGAAGT TTATTCAATT TTGATGGCCC TTTTAAATAA			7816
AAAGAATGTG GCTGGGCGTG GTGGCTCACA CCTGTAATCC CAGCACTTTG GGAGGCCGAG			7876
GGGGGCGGAT CACCTGAAGT CAGGAGTTCA AGACCAGCCT GACCAACATG GAGAAACCCC			7936
ATCTCTACTA AAAATACAAA ATTAGCTGGG CGTGGTGGCA TATGCCTGTA ATCCCAGCTA			7996
CTCGGGAGGC TGAGGCAGGA GAATCTTTTG AACCCTGGGAG GCAGAGGTTG CGATGAGCCT			8056
AGATCGTGCC ATTGCACTCC AGCCTGGGCA ACAAGAGCAA AACTCGGTCT CAAAAA			8116
AAAAAAAAAG TGAAATTAAC CAAAGGCATT AGCTTAATAA TTTAATACTG TTTTAAAGTA			8176
GGGCGGGGGG TGGCTGGAAG AGATCTGTGT AAATGAGGGA ATCTGACATT TAAGCTTCAT			8236
CAGCATCATA GCAAATCTGC TTCTGGAAGG AACTCAATAA ATATTAGTTG GAGGGGGGGA			8296
GAGAGTGAGG GGTGGACTAG GACCAGTTTT AGCCCTTGTC TTTAATCCCT TTTCCTGCCA			8356
CTAATAAGGA TCTTAGCAGT GGTATAAAAA GTGGCCTAGG TTCTAGATAA TAAGATACAA			8416
CAGGCCAGGC ACAGTGGCTC ATGCCTATAA TCCAGCACT TTGGGAGGGC AAGGCGAGTG			8476
TCTCACTTGA GATCAGGAGT TCAAGACCAG CCTGGCCAGC ATGGCGATAC TCTGTCTCTA			8536
CTAAAAAATA TACAAAAATT AGCCAGGCAT GGTGGCATGC ACCTGTAATC CCAGCTACTC			8596
GTGAGCCTGA GGCAGAAGAA TCGCTTGAAA CCAGGAGGTG TAGGCTGCAG TGAGCTGAGA			8656
TCGCACCACT GCACTCCAGC CTGGGCGACA GAATGAGACT TTGTCTCAA AAAAGAAAAA			8716
GATACAACAG GCTACCCCTA TGTGCTCACC TTTCACTGTT GATTACTAGC TATAAAGTCC			8776
TATAAAGTTC TTTGGTCAAG AACCTTGACA AACTAAGAG GGATTTGCTT TGAGAGGTTA			8836
CTGTCAGAGT CTGTTTCATA TATATACATA TACATGTATA TATGTATCTA TATCCAGGCT			8896
TGGCCAGGGT TCCCTCAGAC TTTCCAGTGC ACTTGGGAGA TGTTAGGTCA ATATCAACTT			8956
TCCCTGGATT CAGATTCAAC CCCTTCTGAT GTAAAAAATA AAAAAAATA GAAAGAAATC			9016
CCTTTCCCTT TGGAGCACTC AAGTTTACC AGGTGGGGCT TTCCAAGTTG GGGGTTCTCC			9076
AAGGTCATTG GGATTGCTTT CACATCCATT TGCTATGTAC CTTCCCTATG ATGGCTGGGA			9136
GTGGTCAACA TCAAACTAG GAAAGCTACT GCCAAGGAT GTCCTTACCT CTATTCTGAA			9196
ATGTGCAATA AGTGTGATTA AAGAGATTGC CTGTTCTACC TATCCACACT CTCGCTTTCA			9256
ACTGTAACCT TCTTTTTTCT TTTTTTCTT TTTTTCTTTT TTTTTGAAAC GGAGTCTCGC			9316

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (53)

TCTGTCGCCC	AGGCTAGAGT	GCAGTGGCAC	GATCTCAGCT	CACTGCAAGC	TCTGCCTCCC	9376
GGGTTCACGC	CATTCTCCTG	CCTCACCCCTC	CCAAGCAGCT	GGGACTACAG	GCGCCTGCCA	9436
CCATGCCCAG	CTAATTTTTT	GTATTTTTTAG	TAGAGACGGG	GTTTCACCGT	GTTAGCCAGG	9496
ATGGTCTCGA	TCTCCTGAAC	TTGTGATCCG	CCCGCCTCAG	CCTCCCAAAG	TGCTGGGATT	9556
ACAGGCGTGA	GCCATCGCAC	CCGGCTCAAC	TGTAACCTTTC	TATACTGGTT	CATCTTCCCC	9616
TGTAATGTTA	CTAGAGCTTT	TGAAGTTTTG	GCTATGGATT	ATTTCTCAT	TATACATTAG	9676
ATTTTCAGATT	AGTTCCAAAT	TGATGCCCAC	AGCTTAGGGT	CTCTTCTTAA	ATTGTATATT	9736
GTAGACAGCT	GCAGAAGTGG	GTGCCAATAG	GGGAAGTAGT	TTATACTTTC	ATCAACTTAG	9796
GACCCACACT	TGTTGATAAA	GAACAAAGGT	CAAGAGTTAT	GACTACTGAT	TCCACAAGT	9856
ATTGAGAAGT	TGGAGATAAC	CCCGTGACCT	CTGCCATCCA	GAGTCTTTCA	GGCATCTTTG	9916
AAGGATGAAG	AAATGCTATT	TTAATTTTTG	AGGTTTCTCT	ATCAGTGCTT	AGGATCATGG	9976
GAATCTGTGC	TGCCATGAGG	CCAAAATTAA	GTCCAAAACA	TCTACTGGTT	CCAGGATTAA	10036
CATGGAAGAA	CCTTAGGTGG	TGCCACATG	TTCTGATCCA	TCCTGCAAAA	TAGACATGCT	10096
GCACTAACAG	GAAAAGTGCA	GGCAGCACTA	CCAGTTGGAT	AACCTGCAAG	ATTATAGTTT	10156
CAAGTAATCT	AACCATTTCT	CACAAGGCC	TATTCTGTGA	CTGAAACATA	CAAGAATCTG	10216
CATTTGGCCT	TCTAAGGCAG	GGCCCAGCCA	AGGAGACCAT	ATTCAGGACA	GAAATTCAAG	10276
ACTACTATGG	AACTGGAGTG	CTTGGCAGGG	AAGACAGAGT	CAAGGACTGC	CAACTGAGCC	10336
AATACAGCAG	GCTTACACAG	GAACCCAGGG	CCTAGCCCTA	CAACAATTAT	TGGGTCTATT	10396
CAGTGTAAGT	TTTAATTTCA	GGCTCCACTG	AAAGAGTAAG	CTAAGATTCC	TGGCACTTTC	10456
TGTCTCTCTC	ACAGTTGGCT	CAGAAATGAG	AACTGGTCAG	GCCAGGCATG	GTGGCTTACA	10516
CCTGGAATCC	CAGCACTTTG	GGAGGCCGAA	GTGGGAGGGT	CACTTGAGGC	CAGGAGTTCA	10576
GGACCAGCTT	AGGCAACAAA	GTGAGATACC	CCCTGACCCC	TTCTCTACAA	AAATAAATTT	10636
TAAAAATTAG	CCAAATGTGG	TGGTGTATAC	TTACAGTCCC	AGCTACTCAG	GAGGCTGAGG	10696
CAGGGGGATT	GCTTGAGCCC	AGGAATTCAA	GGCTGCAGTG	AGCTATGATT	TCACCACTGC	10756
ACTTCTGGCT	GGGCAACAGA	GCGAGACCCT	GTCTCAAAGC	AAAAAGAAAA	AGAACTAGA	10816
ACTAGCCTAA	GTTTGTGGGA	GGAGGTCATC	ATCGTCTTTA	GCCGTGAATG	GTTATTATAG	10876
AGGACAGAAA	TTGACATTAG	CCCAAAAAGC	TTGTGGTCTT	TGCTGGAAC	CTACTTAATC	10936
TTGAGCAAAT	GTGGACACCA	CTCAATGGGA	GAGGAGAGAA	GTAAGCTGTT	TGATGTATAG	10996
GGGAAAATA	GAGGCCTGGA	ACTGAATATG	CATCCCATGA	CAGGGAGAAT	AGGAGATTTC	11056
GAGTTAAGAA	GGAGAGGAGG	TCAGTACTGC	TGTTTCAGAGA	TTTTTTTTTAT	GTAACCTTTG	11116
AGAAGCAAAA	CTACTTTTGT	TCTGTTTGGT	AATATACTTC	AAAACAAACT	TCATATATTC	11176
AAATTGTTCA	TGTCCTGAAA	TAATTAGGTA	ATGTTTTTTT	CTCTATAG	GAA ATG AAT	11233
Glu Met Asn						85
CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG						11281
Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Glu						90 95 100
AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA						11329
Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser						105 110 115
TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA						11377
Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys						120 125 130 135
CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC						11425
Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe						140 145 150
ACT GTT CAA AAC GAA GAC TAGCTATTAA AATTTTCATGC C						11464
Thr Val Gln Asn Glu Asp						155

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (64)

(1 8) S E Q I D N O : 1 8 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 4 7 1 個鹼基對

(B) 種類 : 核酸

(C) 股 : 雙股

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 對應於 m D N A 之 c D N A

(v i) 來源 :

(A) 有機體 : 老鼠

(G) 細胞種類 : 肝

(i x) 特性 :

(A) 名稱 / 關鍵 : 主胜肽

(B) 位置 : 1 . . . 4 7 1

(C) 確認方法 : S

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 8 :

AAC	TTT	GGC	CGA	CTT	CAC	TGT	ACA	ACC	GCA	GTA	ATA	CGG	AAT	ATA	AAT	48
Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn	
1				5					10					15		
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	GTT	GAC	AAA	AGA	CAG	CCT	GTG	TTC	GAG	GAT	ATG	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	
			20					25					30			
ACT	GAT	ATT	GAT	CAA	AGT	GCC	AGT	GAA	CCC	CAG	ACC	AGA	CTG	ATA	ATA	144
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile	
			35				40					45				
TAC	ATG	TAC	AAA	GAC	AGT	GAA	GTA	AGA	GGA	CTG	GCT	GTG	ACC	CTC	TCT	192
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	
			50				55				60					
GTG	AAG	GAT	AGT	AAA	ATG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT	240
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	
65					70					75				80		
TCC	TTT	GAG	GAA	ATG	GAT	CCA	CCT	GAA	AAT	ATT	GAT	GAT	ATA	CAA	AGT	288
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	
				85					90					95		
GAT	CTC	ATA	TTC	TTT	CAG	AAA	CGT	GTT	CCA	GGA	CAC	AAC	AAG	ATG	GAG	336
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu	
			100					105						110		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (55)

TTT	GAA	TCT	TCA	CTG	TAT	GAA	GGA	CAC	TTT	CTT	GCT	TGC	CAA	AAG	GAA	384
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu	
		115					120					125				
GAT	GAT	GCT	TTC	AAA	CTC	ATT	CTG	AAA	AAA	AAG	GAT	GAA	AAT	GGG	GAT	432
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp	
		130				135					140					
AAA	TCT	GTA	ATG	TTC	ACT	CTC	ACT	AAC	TTA	CAT	CAA	AGT				471
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser				
145					150					155						

(1 9) S E Q I D N O : 1 9 的 資 料

(i) 序 列 特 徵

(A) 長 度 : 9 個 胺 基 酸

(B) 種 類 : 胺 基 酸

(D) 拓 撲 學 : 直 線

(i i) 分 子 種 類 : 胜 肽

(v) 片 段 種 類 : N 端 片 段

(x i) 序 列 描 述 : S E Q I D N O : 1 9 :

Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr
1				5				

(2 0) S E Q I D N O : 2 0 的 資 料

(i) 序 列 特 徵

(A) 長 度 : 1 5 7 個 胺 基 酸

(B) 種 類 : 胺 基 酸

(D) 拓 撲 學 : 直 線

(i i) 分 子 種 類 : 胜 肽

(x i) 序 列 描 述 : S E Q I D N O : 2 0 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (56)

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

(2 1) S E Q I D N O : 2 1 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 1 5 7 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 胜肽

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 2 1 :

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

五、發明說明(57)

(2 2) S E Q I D N O : 2 2 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度：1 5 7 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：直線

(i i) 分子種類：胜肽

(x i) 序列描述：S E Q I D N O : 2 2 :

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

(2 3) S E Q I D N O : 2 3 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度：1 5 7 個胺基酸

(B) 種類：胺基酸

(D) 拓撲學：直線

(i i) 分子種類：胜肽

(x i) 序列描述：S E Q I D N O : 2 3 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (68)

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

(2 4) S E Q I D N O : 2 4 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 1 5 7 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 胜肽

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 2 4 :

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

五、發明說明 (59)

(2 5) S E Q I D N O : 2 5 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 1 5 7 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線

(i . i) 分子種類 : 胜肽

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 2 5 :

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

(2 6) S E Q I D N O : 2 6 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 1 5 7 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 胜肽

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 2 6 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (60)

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

(2 7) S E Q I D N O : 2 7 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度 : 1 5 7 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 胜肽

(x i) 序列描述 : S E Q I D N O : 2 7 :

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(61)

(28) SEQ ID NO: 28 的資料

(i) 序列特徵

(A) 長度: 157 個胺基酸

(B) 種類: 胺基酸

(D) 拓撲學: 直線

(ii) 分子種類: 胜肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 28:

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 蝕骨細胞增生抑制劑)

一種蝕骨細胞增生抑制劑，其含有間白素 - 18 和 / 或其功能性同等物。此試劑可任意地使用做為細胞培養成份和做為調節骨質吸收和蝕骨細胞相關疾病之用的試劑，以治療和 / 或預防高鈣血症，蝕骨細胞瘤，骨質疏鬆症等。

英文發明摘要 (發明之名稱： Osteoclastgenic inhibitory agent)

An osteoclastgenic inhibitory agent which comprises an interleukin-18 and/or its functional equivalent. The agent can be arbitrarily used as an ingredient for cell culture and agents for regulating bone resorption and for osteoclast-related diseases, directed to treat and/or prevent hypercalcemia, osteoclastoma, osteoporosis, etc.

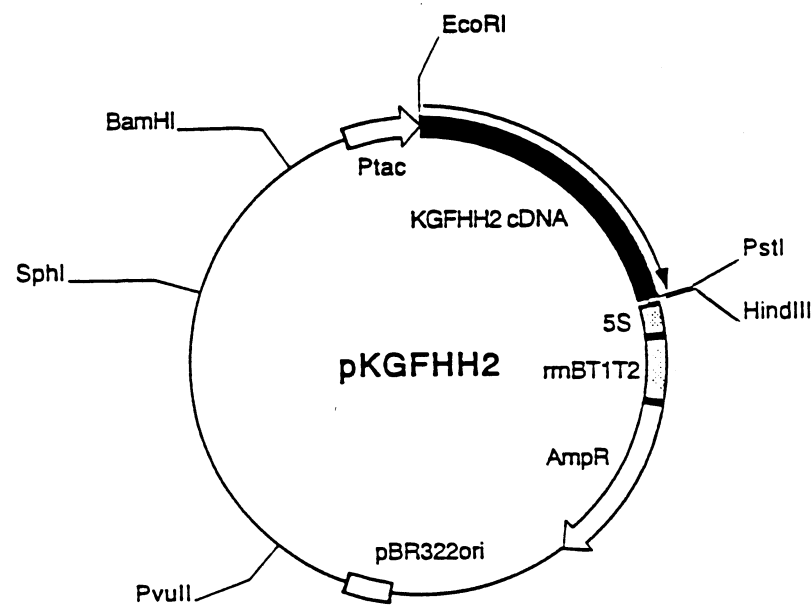
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

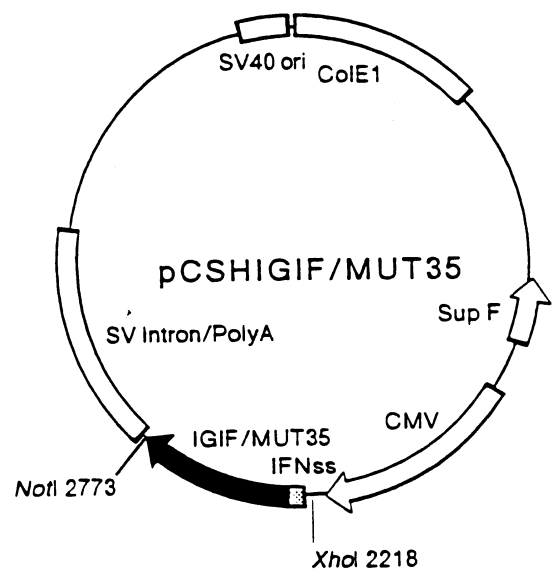
訂

線

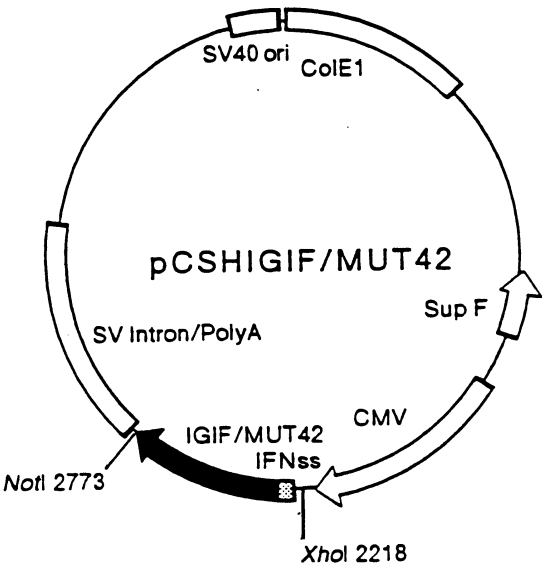
730715



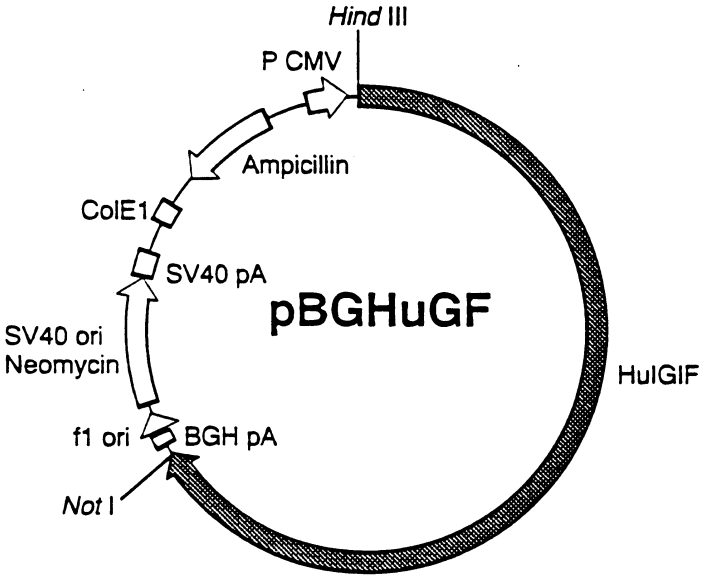
第 1 圖



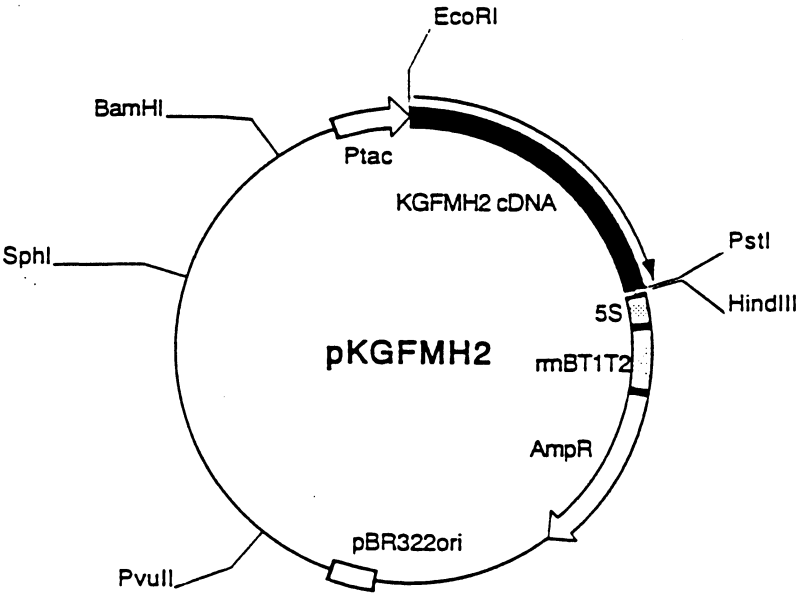
第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖



第 5 圖

五、發明說明 (4)

91.3.15

修正
補充發明的詳細敘述

本發明關於一種蝕骨細胞增生抑制劑，其包含 I L - 1 8 或其功能性同等性做為一有效成份。 " I L - 1 8 " 在本發明中意指具有以上特性而不論其來源的多胜肽。例如，本發明所使用的 I L - 1 8 包括，做為內部部分胺基酸序列的 S E Q I D N O s : 1 - 5 和做為個胺基酸序列的 S E Q I D N O 6 或 7。 " 功能性同等物 " 在本發明中意指得包括 (i) 在 I L - 1 8 胺基酸序列中，有一或更多個胺基酸被不同胺基酸取代的胜肽， (i i) 一或更多個胺基酸添加至 I L - 1 8 胺基酸序列 N - 和 / 或 C - 端的胜肽， (i i i) 一或更多個胺基酸被嵌入 I L - 1 8 胺基酸序列內部的胜肽， (i v) 在 I L - 1 8 胺基酸序列 N - 和 / 或 C - 端有一或更多個胺基酸被刪除的胜肽，和 (v) 在 I L - 1 8 胺基酸序列的內部區域有一或更多個胺基酸被刪除的胜肽，所有這些修飾作用所形成的胜肽都無喪失 I L - 1 8 對抑制蝕骨細胞生成作用影響的特性。此種功能性同等物例子的描述是伴隨在由本發明申請者發表的日本專利公開公報編號 2 0 , 9 0 6 1 9 7 中的詳細胺基酸序列，即藉由免疫活性細胞具有誘發干擾素 - γ 製造的多胜肽，其中該多胜肽含有的胺基酸中，一或更多個半胱胺酸是以不同胺基酸取代，而剩餘分別一致的序列是顯示於完整的 S E Q I D N O s : 1 , 2 和 4，或者一或更多個胺基酸是被加入，去除和 / 或取代於不包括取代的半胱胺酸序列的其他一致性序列位置。取

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

六、申請專利範圍

第 87102640 號 專利 申請 案

中文 申請 專利 範圍 修正 本

民國 92 年 3 月 4 日 修正

1 . 一種蝕骨細胞增生抑制劑，其包含具有 SEQ ID No: 6 或 7 之胺基酸序列的間白素 - 18(IL-18)或其功能性同等物，該功能性同等物係上述之 2 個胺基酸序列的 1 或多個半胱胺酸殘基係由其他之胺基酸殘基取代。

SEQ ID NO: 6:

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

SEQ ID NO: 7:

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

2 . 如申請專利範圍第 1 項之抑制劑,其中該 IL-18 包括 SEQ ID NO:1、2 及 3 之胺基酸序列以作為部份胺基酸序列。

SEQ ID NO: 1:

Asn	Asp	Gln	Val	Leu	Phe
1				5	

SEQ ID NO: 2:

Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp
1				5	

SEQ ID NO: 3:

Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys
1				5		

3 . 如申請專利範圍第 1 項之抑制劑,其中該 IL-18

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

包括 SEQ ID NO: 4 和 5 之胺基酸序列以作為部份胺基酸序列。

SEQ ID NO: 4:

Met Tyr Lys Asp Ser
1 5

SEQ ID NO: 5:

Ser Thr Leu Ser Cys
1 5

4 . 如申請專利範圍第 1 項之抑制劑，其中該 I L - 1 8 是人類來源。

5 . 如申請專利範圍第 1 項之抑制劑，其係蝕骨細胞相關疾病之治療劑。

6 . 如申請專利範圍第 1 項之抑制劑，其含有蛋白質、緩衝劑或醣類以作為安定劑。

7 . 如申請專利範圍第 1 項之抑制劑，其係為液體、糊膏或固體之型式。

8 . 如申請專利範圍第 1 項之抑制劑，其含有 0 . 0 0 0 0 0 2 - 1 0 0 w / w % 的該 I L - 1 8 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線