

申請日期	85.9.26
案 號	85111819
類 別	Int. C1 ⁶ C07K ¹⁴ /435. C12N ¹⁵ /12. A61K ³⁹ /17

Int. C1⁶ C07K¹⁴/435. C12N¹⁵/12. A61K³⁹/17

(以上各欄由本局填註)

公告本 A4
C4

570926

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	切截之神經膠質細胞株衍生神經營養因子
	英 文	"TRUNCATED GLIAL CELL LINE-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR"
二、發明 人	姓 名	紹凡 蘇菲亞 胡
	國 籍	美國
	住、居所	美國加州千橡市林莫道986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 名 姓	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

裝 訂 線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

美 國(地區) 申請專利，申請日期：1995.9.28 案號：08/535,681，有 無主張優先權

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(1)

發明背景

一般而言，本發明係關於在本文中叫做切截之神經膠質細胞株衍生神經營養因子(亦被稱為神經膠質細胞衍生之神經營養因子或GDNF)的蛋白質，其特徵為它能夠助長多巴胺系的神經元攝入多巴胺，並支持在帕金森氏症中死亡之神經元的存活。本發明更特別地關於一種新穎的切截之GDNF蛋白質。

發明背景

神經營養因子是蛋白質，在神經系統或在由神經系統支配之非-神經的組織中發現，它的功能是促進存活並維持神經及／或神經膠質細胞的表現型分化(Varon等人，Ann. Rev. Neuroscience 1: 327, 1979; Thoenen等人，Science 229: 238, 1985)。因為這樣的生理學角色，可使用神經營養因子來治療在各種神經變性疾病中發生的神經細胞變性和喪失分化功能。

為了使特殊的神經營養因子有用來治療神經損傷的可能性，受到損傷之神經細胞的種類必須是對神經營養因子有感受性的。不同的神經營養因子通常無疑地影響不同種類的神經細胞。因此，利用各種不同的神經營養因子來治療每種因為不同形式之疾病或傷害而受到損傷的神經元是有利的。

神經營養因子可保護易感受的神經元，使其免於受到各種無關的侮辱。例如，神經生長因子(NGF)將可解救感覺神經元的重要部份，使其免於因為切斷其軸突而引起的死

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明³)

Neuro. Sci. Lett. 79 : 65-72, 1987), 因為該疾病之特徵為在以神經支配紋狀體的中腦處, 發生多巴胺系神經元的變性。

Lin等人更描述了新穎神經營養因子的特徵, 係從一種得自神經膠母細胞瘤細胞株B49、經過調節之培養基的來源中將其純化出來(Schubert等人, Nature 249 : 224-27, 1974)。先前已經報告了得自該細胞株之經過調節的培養基含有多巴胺系神經營養活性(Bohn等人, Soc. Neurosci. Abs. 15 : 277, 1989)。在Lin等人的揭示內容之前, 未曾證實神經膠質細胞株-衍生的神經營養因子(GDNF)是個別具有生物活性的物質, 或是分離出大體上純的蛋白質。此外, Lin等人描述了選殖編碼GDNF之人類基因的方法、編碼GDNF之人類基因的核酸序列, 以及該GDNF蛋白質之胺基酸序列。將GDNF基因繼代選殖到表現載體中, 並利用該載體表現出具有生物活性的GDNF。該GDNF蛋白質是一個同二聚體, 由兩個134個胺基酸, 22kDa構成, 藉著雙硫鍵連結亞單元。該說明進一步包含了GDNF在預防或治療神經損傷, 以及諸如帕金森氏症之類神經相關疾病上的用途。

GDNF療法在處理因為危及一或多種神經細胞之存活及/或其獨特功能的狀況所引起之神經損傷是有幫助的。這類的神經損傷可能因各式各樣的原因而產生。對於一或多種神經細胞而言, 發生神經損傷可能是因為:(1)生理傷害, 其引起接近傷害位置之軸突及/或神經細胞本體的變

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁴ ()

性；(2)暫時或永久地停止血流至一部份神經系統，像是腦溢血；(3)故意或偶然地暴露在神經毒素之下，像是爲了治療癌症而使用的化學治療劑(例如氯氮鉑)，或是爲了治療AIDS而使用的二脫氧胞苷(ddC)；(4)慢性的代謝疾病，如糖尿病或腎機能障礙；或(5)神經變性疾病，諸如帕金森氏症、阿耳滋海默症，以及肌萎縮性側索硬化症(ALS)，它們導致特定神經元族群的變性。

GDNF療法在治療涉及黑質之多巴胺系神經元變性的神經變性疾病方面，可能是特別有幫助的，如帕金森氏病。目前對於帕金森氏症的治療只是減緩的手段，企圖增加黑質中多巴胺的含量。GDNF療法的預期影響，不只是單純地在黑質之多巴胺系神經終端處，產生多巴胺系神經傳遞的增加(這將會引起徵候的減輕)，還能減慢或甚至使變性過程的進行停止，並修補受到損傷之黑質通路，而使其功能恢復。也可以在人類患者身上，利用GDNF來治療其他形式之多巴胺系神經細胞的損傷或功能失當。這類損傷或功能障礙，可能是由精神分裂症或其他形式之精神病而引起。目前對於這類病狀的治療，僅是對症和必需的藥物，其作用在多巴胺受體或多巴胺攝入位置上，與可能涉及疾病過程之多巴胺系神經元功能失當的觀點一致，該多巴胺神經元係以神經支配帶有受體的神經元族群。

發明概述

在一個觀點中，本發明提供新穎的切截之神經膠質細胞株衍生神經營養因子(GDNF)蛋白質產物。在一個具體實

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

施例中，係藉著重組之遺傳工程技術來產製該切截之 GDNF 蛋白質。在另一個具體實施例中，係藉著化學技術，或重組與化學技術的組合，來合成該切截之 GDNF 蛋白質。

本發明所產製的切截之 GDNF 蛋白質產物，包括以胺基酸序列 X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y 代表的蛋白質。利用圖 1 之胺基酸殘基編號計劃(序列識別 2 號)，使得比較成熟的 GDNF 蛋白質更為容易。[Cys⁴¹-Cys¹³³] 代表如同圖 1 描述，從 Cys⁴¹ 到 Cys¹³³ 的胺基酸序列(序列識別 2 號)。Y 代表 Cys¹³³ 之羧基終端基團，或 Ile¹³⁴ 之羧基終端的胺基酸殘基。X 代表 Cys⁴¹ 之甲硫胺醯基化或非甲硫胺醯基化的胺基，或選自下列基團之胺基終端的胺基酸殘基：

G

RG

NRG

KNRG (SEQ ID NO : 3)

GKNRG (SEQ ID NO : 4)

RGKNRG (SEQ ID NO : 5)

QRGKNRG (SEQ ID NO : 6)

GQRGKNRG (SEQ ID NO : 7)

RGQRGKNRG (SEQ ID NO : 8)

RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 9)

G RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 10)

五、發明說明⁶ ()

KG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 11)

GKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 12)

RGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 13)

SRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 14)

NSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 15)

ENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 16)

PENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 17)

NPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 18)

ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 19)

A ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 20)

AA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 21)

AAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 22)

QAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 23)

RQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 24)

NRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 25)

RNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 26)

ERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 27)

RERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 28)

RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 29)

P RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 30)

LP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 31)

VLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 32)

AVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 33)

MAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 34)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

QMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 35)

KQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 36)

DKQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 37)

PDKQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 38)

企圖將使如此切截的GDNF蛋白質產物，包括具有如同藉著X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y代表之胺基酸序列的切截GDNF蛋白質，及其變體和衍生物。因此，本發明所產製的切截之GDNF蛋白質產物，亦包括加成、取代和內部刪除的變體，以及藉著X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y代表之胺基酸序列的衍生物。切截之GDNF蛋白質產物更包括了甲硫胺醯基化或非甲硫胺醯基化形式，以及糖基化或非-糖基化形式的切截之GDNF蛋白質。

本發明典型的切截GDNF蛋白質，包括[Arg¹⁶-Ile¹³⁴]、[Asn²²-Ile¹³⁴]、[Pro²³-Ile¹³⁴]、[Ser²⁶-Ile¹³⁴]、[Arg³²-Ile¹³⁴]、[Gly³³-Ile¹³⁴]、[Lys³⁷-Ile¹³⁴]和[Asn³⁸-Ile¹³⁴]之切截GDNF蛋白質，是甲硫胺醯基化或非甲硫胺醯基化的，及其變體和衍生物。目前較佳的本發明之切截GDNF蛋白質，包括[Lys³⁷-Ile¹³⁴]和[Asn³⁸-Ile¹³⁴]之切截GDNF蛋白質，是甲硫胺醯基化或非甲硫胺醯基化的，及其變體和衍生物。典型的取代變體為[Asn²²△Ser²²-Ile¹³⁴]和[Pro²³-Lys³⁷△Asn³⁷-Ile¹³⁴]之切截GDNF蛋白質。典型的加成變體為Ser-[Pro²³-Ile¹³⁴]之切截GDNF蛋白質。

五、發明說明⁽⁸⁾

在本發明另外的觀點中，可將切截之GDNF蛋白質製成糖基化或非-糖基化的形式。切截之GDNF蛋白質的衍生物，通常涉及將該切截GDNF蛋白質附接到水溶性的聚合物上。例如，可以使切截之GDNF蛋白質與一或多種聚乙二醇分子結合，以便減少該切截之GDNF蛋白質產物在含水環境中的沉澱。

本發明的另一個觀點，包括編碼切截之GDNF蛋白質的各種聚核苷酸。通常利用這些核酸序列在真核生物或原核生物的宿主細胞中，表現該切截之GDNF，其中表現產物或其衍生物的特徵為它們能夠使多巴胺能細胞增加攝取多巴胺。聚核苷酸也可以用在細胞療法或基因療法的應用中。適當之核酸序列，包括在圖中特別加以描述的那些，以及其他簡併的序列，和自然發生的對偶變化。

本發明的進一步觀點，涉及含有編碼切截GDNF蛋白質之聚核苷酸的載體，可有效地連接氨基青黴素及／或表現控制序列。利用這類載體可穩定地轉化或轉移感染原核生物或真核生物的宿主細胞，以便表現切截之神經膠質細胞衍生的神經營養因子。本發明更包括切截之GDNF蛋白質的重組產製，其中使如此轉化或轉移感染的宿主細胞在適當的營養培養基中生長，可視需要從該宿主細胞及／或營養培養基中，分離由該細胞表現的切截之GDNF。本發明還包括編碼切截之GDNF之聚核苷酸和含有這類核苷酸之載體，在基因療法或細胞療法上的用途。

在另外的觀點中，本發明涉及以重組方式產製的GDNF組

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁹)

合物，其含有成熟的GDNF蛋白質與一或多個從其中衍生之切截GDNF蛋白質的混合物，其中該成熟的GDNF蛋白質具有大約44kDa的分子量，且其中該切截之GDNF蛋白質具有大約36到40kDa之分子量。該GDNF組合物可含有至少兩個切截之GDNF物種，其中第一種具有大約36kDa之分子量，而第二種則具有大約40kDa之分子量。具有大約40kDa之分子量的切截GDNF物種，是具有大約22kDa之分子量的GDNF單體和具有大約18kDa之分子量的切截GDNF單體的雜二聚體。亦企圖爲了治療之用途，從這類混合物中分離出一或多個切截的GDNF物種。

本發明的另一個觀點，包括含有切截之GDNF蛋白質產物的醫藥組合物。通常將切截之GDNF蛋白質產物與藥學上可接受的載劑一起調製。可使用各種不同的調製材料，以利於製造、儲存、操作、遞送及／或功效。在本發明另一個觀點中，切截之GDNF蛋白質產物增加了多巴胺的攝取，和多巴胺系神經元的存活。因此，切截之GDNF蛋白質產物特別適合用來治療由傷害或疾病，諸如帕金森氏症，對神經元所引起的損傷。

考量以下詳細描述本發明之實施的說明，將使熟諳此藝者明瞭本發明的其他觀點和利益。

圖片說明

在回顧圖片時，將使本發明極多的特徵和優點變得更清楚，其中：

圖1描述編碼成熟人類神經膠質細胞株衍生之神經營養

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(¹⁰)

因子(hGDNF)的核酸序列(序列識別1號)。亦描述成熟人類GDNF蛋白質之胺基酸序列(序列識別2號)。

圖2描述爲了表現重組之切截GDNF蛋白質而製造的質體構築體之圖式。

圖3描述編碼GDNF和切截之GDNF聚核苷酸的另一種核酸序列(序列識別39號)之限制輿圖。

圖4描述編碼GDNF和切截之GDNF聚核苷酸的另一種核酸序列(序列識別40號)之限制輿圖。

圖5描述編碼[Pro²³-Lys³⁷△Asn³⁷-Ile¹³⁴]切截GDNF蛋白質取代變體(序列識別42號)的核酸序列(序列識別41號)。亦可將該蛋白質描述爲Met-Ser-[Pro²³-Lys³⁷△Asn³⁷-Ile¹³⁴]切截GDNF蛋白質之加成/取代變體。

圖6描述編碼[Arg³²-Ile¹³⁴]切截GDNF蛋白質(序列識別44號)的核酸序列(序列識別43號)。

圖7描述編碼[Gly³³-Ile¹³⁴]切截GDNF蛋白質(序列識別46號)的核酸序列(序列識別45號)。

圖8描述成熟hGDNF之核酸序列(序列識別47號)，與數個典型的切截GDNF蛋白質：Met-[Arg³²-Ile¹³⁴](序列識別48號)、Met-[Gly³³-Ile¹³⁴](序列識別49號)和Met-Ser-[Pro²³-Lys³⁷△Asn³⁷-Ile¹³⁴](序列識別50號)的比較。

發明詳述

以前驅物之形式合成人類神經膠質細胞株-衍生之神經營養因子(hGDNF)，將其加以處理並分泌出134個胺基酸的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(¹¹)

成熟蛋白質。預先決定了該成熟人類的GDNF具有圖1中描述的胺基酸序列(序列識別2號)。

本發明係以可將成熟的GDNF蛋白質縮減尺寸(在本文中也可稱作"修剪"或"切截"之本發明,或切截之GDNF蛋白質)但仍保留其生物活性的意外發現為基礎。首先在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中重組產製GDNF的期間內,發現被修剪的蛋白質。簡言之,以下法製備重組的人類GDNF(hGDNF)。將編碼成熟人類GDNF蛋白質之整個打開密碼的核酸序列,選殖到表現質體內。已經證實該核酸序列是正確的(藉著定出DNA序列,與在基因銀行中的hGDNF序列相同),並將其轉譯成與公告之成熟人類GDNF序列相同的胺基酸序列(Lin等人, Science 260, 1130-1132, 1993)。將質體DNA弄成直線狀,並利用磷酸鈣沉澱法將其轉移感染到缺乏-二氫葉酸還原酶的CHO細胞(CHO^{d-}細胞)中。將經過轉移感染的細胞培養在選擇性培養基中,選出在選擇過程中存活的菌落,以便進行個別的hGDNF表現分析。

收集得自個別菌落的不含血清之經過調節的培養基,並利用對hGDNF有專一性之抗血清,對其進行西方墨點分析。該抗血清包含了利用在大腸桿菌(*Escherichia coli*)中表現之重組hGDNF來免疫兔子所誘發的兔子之多株抗體。在還原的條件下,出現在這些試樣中的hGDNF被解析成兩個主要的帶狀區中,其顯然具有大約22kDa和18kDa之分子量。每個帶狀區分別由大約22+22.5kDa和18+17.5kDa緊密隔開的雙重體組成(為了簡化,將這些雙重體稱為22kDa

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()¹²

和 18 kDa 的帶狀區或物種)。

先前已經報告了該 GDNF 係以藉雙硫鍵結合的同二聚體之形式存在，包括兩個相同亞單位之具有大約 20 到 22 kDa 之分子量的成熟 GDNF 蛋白質。當在非還原的條件下分析 GDNF 時，報告中說已經確認出 32 到 42 kDa (Lin 等人，Science 260, 1130-1132, 1993)，或是 33 到 45 kDa (Lin 等人，J. Neurochem. 63(2)758-768, 1994) 的寬闊帶狀區。範圍的存在，被解釋為係因為在成熟單體上糖基化作用的異源性，並進一步利用脫-糖基化實驗來證實之。

同時出現的 22 kDa 帶狀區，相當於文獻中報告的成熟 GDNF 蛋白質，以前未曾報告過 18 kDa 的帶狀區。在由個別純種系收集之試樣中，22 kDa 和 18 kDa 蛋白質之相對含量是多變化的。此外，發現得自相同純種系的複數收穫物，顯示出兩個帶狀區有多變的比例。然而，也發現 CHO-表現之 GDNF 蛋白質的儲藏，通常導致 18 kDa 帶狀區出現的增加，同時發生 22 kDa 帶狀區的減少。

當在非還原的條件下，利用西方墨點法來分析得自轉化之 CHO^d-細胞的經過調節之培養基時，觀察到三個具有 36、40 和 44 kDa 之明顯分子量、完全解析的帶狀區。此一發現亦與先前的報告有顯著差別。這些帶狀區的相對強度是多變的，但是它們與出現在每個試樣中之 22 和 18 kDa 單體帶狀區的比例，有頗深的相互關係。在利用單株抗體的進一步分析中，證實了在非還原凝膠中的三個帶狀區，相當於由兩個單體組成的三種可能的二聚體。最大的 44 kDa 蛋

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

13
五、發明說明 ()

白質為兩個如同先前報告之22kDa成熟GDNF蛋白質的二聚體。中間的40kDa蛋白質，包含其中一個成熟蛋白質在分子量上已被減少到18kDa之形式的二聚體。最小的36kDa二聚體，顯然含有兩個18kDa之蛋白質，也就是兩個22kDa形式在分子量上都已經減少。此數據不僅首次證實了新穎形式之GDNF單體的存在，也證實了以二聚體構型之修剪GDNF蛋白質的存在。亦發現自儲藏之時，單體組合物之試樣朝向修剪形式和相對應的二聚體物種轉移，也就是看到36kDa蛋白質的含量增加。

然後進行研究，以便確認是那一部份的蛋白質被除去或改變，而引起與先前報告之成熟GDNF蛋白質分子量相比較的分子量減少。首先證實了分子量的減少，並不是因為糖基化作用的改變。

GDNF蛋白質含有兩個可能的N-連結之糖基化位置，並已經被報告其為經過糖基化了的。然而，經過修剪的蛋白質並非單純地是成熟之GDNF的非糖基化或糖基化不足之形式。這些脫糖基化作用的實驗中被證實了，在其中利用N-聚醣酶、O-聚醣酶和神經胺(糖)酸苷酶來處理試樣。在還原的凝膠上，藉著N-聚醣酶的消化作用，將18kDa的蛋白質減少到13.5kDa的帶狀區，暗示有等值的4.5kDa之N-連結糖的存在。利用神經胺(糖)酸苷酶和O-聚醣酶來處理，引起18kDa的帶狀區稍微被轉移成17kDa。這暗示在該蛋白質上存在著O-連結的糖。已經報告了成熟的22kDa帶狀區是經過糖基化的，而藉著N-聚醣酶亦被減少到

五、發明說明(¹⁴)

18kDa(也就是說，亦被減少了4.5kDa)。經由在凝膠上使用對該22kDa帶狀區有專一性的單株抗體，進一步加以證實。非還原之二聚體的聚醣酶消化模式更加複雜，但也是可以解釋的，並符合三種形式最初的分配。

因此，然後再查看蛋白質分子量中4.5kDa的減少，結果是因為大約30-35個胺基酸殘基的刪除，而不是因為糖基化作用的改變。認為該刪除作用最可能因為下列的理由而發生在成熟GDNF蛋白質的胺基-終端。成熟的GDNF總共含有七個胱胺酸。如果刪除作用來自羧基-終端，將會喪失七個胱胺酸中的2到4個，而這可能將產生失活的蛋白質。然而，當使主要含有修剪形式之受試試樣接受生物分析，以便測量其多巴胺系神經元之神經營養活性時，證實該試樣的活性可與在比例上含有較多成熟形式之GDNF的試樣相比擬。

然後經由經過純化之蛋白質的胺基酸序列分析，來定出切開位置。根據製造者的指示，使用Applied Biosystems 494A蛋白質序列儀，以十次循環定出試樣的序列。同時胺基酸序列分析技術和程序，為熟諳此藝者所熟知，在Fausset等人，Electrophoresis 12:22-27, 1991, 和1990年8月24日提出申請的美國專利申請案第576.316號(歐洲專利申請案第90310899號，公告編號歐洲專利第423 980號，1990年10月4日提出申請，名叫"幹細胞因子")中提供了訂定蛋白質之序列的進一步說明，其揭示內容均合併於此以作為參考。在該分析中定出被修剪之蛋白質的胺基終端為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽¹⁵⁾

"RGQRGK" 或 Arg-Gly-Gln-Arg-Gly-Lys。因此在經過調節的培養基中，已經從成熟蛋白質中移除了前31個胺基酸。經過修剪之蛋白質殘餘的胺基酸序列係從胺基酸 Arg³² 開始，其他的則與圖1中描述的成熟GDNF胺基酸序列(序列識別2號)一致。

發現 [Arg³²-Ile¹³⁴] 切截之GDNF蛋白質在多巴胺系神經元分析中，以定性為基礎具有活性的。利用該多巴胺系之神經營養活性分析來確認在治療帕金森氏症方面可能是有利的神經營養因子。該分析係以先前描述之分析為基礎 (Friedman 等人，Neuro, Sci. Lett. 79: 65-72, 1987, 其揭示內容均合併於此以作為參考)，並可包含如 Lin 等人所描述的修改(參見1994年5月23日提出申請的美國專利申請案第08/182,183號，及其母專利申請案；1992年9月17日提出申請的PCT/US92/07888 (WO 93/06116)；以及歐洲專利申請案第92921022.7號(公告編號歐洲專利610 254號))。在下文的實例5中提供該分析的詳細說明。

在胺基酸訂定序列之後的後續純化程序，導出其他蛋白質的發現，從其中已經由成熟GDNF的N-終端處移除36個胺基酸殘基：[Lys³⁷-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質，具有KNRG(C)VL-的N-終端序列。此外，經過修剪之蛋白質殘餘的胺基酸序列，與成熟人類GDNF胺基酸序列的那些胺基酸序列一致。亦在多巴胺攝取的生物分析中，分析 [Lys³⁷-Ile¹³⁴] 切截之GDNF蛋白質。發現該切截之GDNF蛋白質具有ED50約為50微微克/毫升的活性，類似經過

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

條

五、發明說明⁽¹⁶⁾)

純化之重組大腸桿菌-表現的成熟GDNF。

更進一步發現能夠將以細菌方式表現的成熟GDNF改變成切截之形式。利用CHI-衍生的經過調節之培養基，培養在經過轉化之大腸桿菌中表現的成熟GDNF(如同在Lin等人，美國專利申請案第08/182,183號，在前中的描述)。在還原凝膠上，重組的大腸桿菌GDNF具有17kDa的明顯分子量。當將該物質與CHO細胞調節之培養基混合，並在4°C下培養5天時，該蛋白質完全被修剪成12.5kDa。利用1小時或24小時的培養，該切開作用較不完全，暗示在這樣的條件下是時間-依賴性的過程。亦發現單純地將重組的大腸桿菌GDNF與含有0.1%胎牛血清之培養基一起培養過夜，不能產生修剪之形式。因此，在培養中有活細胞的存在，對發生修剪過程似乎是必要的。因此可能該修剪事件，也可以在某些組織中、在活體內發生。

此外，發現了成熟的大腸桿菌-表現之hGDNF的衍生物，如聚乙二醇化的GDNF(亦描述在Lin等人，美國專利申請案第08/182,183號中，在前)，可在CHO-調節之培養基的存在下，被加工成切截的形式。可在胺基終端將成熟的GDNF聚乙二醇化，以便促進其在循環中的清除時間。聚乙二醇化作用增加了蛋白質的大小，而經過修改的成熟GDNF，在還原的條件下移動到大約45kDa之處。像未-聚乙二醇化的成熟形式一樣，將聚乙二醇化之大腸桿菌GDNF與CHO細胞(未被轉移感染的)調節之培養基一起培養，產生12.5kDa之帶狀區。在這兩個案例中，該12.5kDa

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(17)

之物種均以雙硫鍵結的二聚體形式存在，如同在非-還原凝膠上所顯示的。從N-終端聚乙二醇化之成熟蛋白質中產生修剪形式，進一步證實了修剪事件發生在蛋白質的N-終端，因為在修剪過程中喪失了聚乙二醇化的殘基。

以這些發現為基礎，且因為修剪事件亦可能發生在活體內，所以切截形式之GDNF蛋白質可以是在生理條件下，hGDMF經過最後天然加工的形式。因此，為了治療之用途而產製切截之GDNF蛋白質或其衍生物被視為是有利的。例如，直接表現或合成的切截之GDNF蛋白質，諸如[Arg³²-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質，將預期它們對上述之蛋白水解活性是具抵抗力的。然而，若想要產製切截之GDNF的衍生物，諸如聚乙二醇化的[Arg³²-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質，將會預期所得之衍生物具有的優點，不是對專一性修剪有感受性的，這是在成熟GDNF蛋白質中觀察到的。

也可以預期到切截之GDNF蛋白質產物的其他優點。首先，切截蛋白質，如[Arg³²-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質的pI，將會從大約10降至大約8.0-8.5。這使得該蛋白質明顯地減少了鹼性，而能夠依序提供有利的影響，包括較佳的受體結合，並在諸如脊髓腔內注射部位之類的投藥部位降低細胞毒性。其次，在成熟GDNF之胺基酸序列的前26個胺基酸中，為兩個脫醯胺的位置：Arg-Asn-Arg(胺基酸14-16)，以及Glu-Asn-Ser(胺基酸24-26)。在缺乏這些位置其中一個或兩個的切截之GDNF蛋白質中，預期將或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

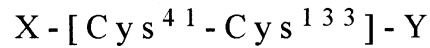
訂

五、發明說明(¹⁸)

增加該蛋白質的穩定性。

切截之GDNF蛋白質產物

在基本的具體實施例中，本發明的切截之GDNF蛋白質可藉著下列的胺基酸序列來表示，其中係使用圖1的胺基酸殘基編號計劃，以便與成熟的GDNF蛋白質相比較：



其中

[Cys⁴¹-Cys¹³³]代表如圖1(序列識別2號)中描述的Cys⁴¹到Cys¹³³之胺基酸序列；

Y代表Cys¹³³之羧基終端基團或Ile¹³⁴之羧基終端的胺基酸殘基；且

X代表Cys⁴¹之甲硫胺醯基化或非甲硫胺醯化的胺基，或選自下列基團的胺基-終端的胺基酸殘基：

G

RG

NRG

KNRG (SEQ ID NO : 3)

GKNRG (SEQ ID NO : 4)

RGKNRG (SEQ ID NO : 5)

QRGKNRG (SEQ ID NO : 6)

GQRGKNRG (SEQ ID NO : 7)

五、發明說明 (¹⁹)

RGQRGKNRG (SEQ ID NO : 8)

RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 9)

G RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 10)

KG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 11)

GKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 12)

RGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 13)

SRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 14)

NSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 15)

ENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 16)

PENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 17)

NPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 18)

ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 19)

A ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 20)

AA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 21)

AAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 22)

QAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 23)

RQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 24)

NRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 25)

RNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 26)

ERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 27)

RERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 28)

RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 29)

P RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 30)

LP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 31)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (20)

VLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 32)

AVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 33)

MAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 34)

QMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 35)

KQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 36)

DKQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 37)

PDKQMAVLP RRERNRQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 38)

當本文中使用的"切截之GDNF蛋白質產物"一詞時，包括具有生物活性之合成或重組的切截之GDNF蛋白質、得自成熟GDNF的切截之GDNF蛋白質產物、具有生物活性的切截之GDNF變體(包括插入、取代和刪除的變體)，以及其化學修改的衍生物。也包括大體上與人類GDNF蛋白質同源，具有在序列識別2號中陳述之胺基酸序列的切截之GDNF蛋白質。

當本文中使用的"生物活性"一詞時，意指該切截之GDNF蛋白質顯露出類似神經營養的特性，但不一定是像具有序列識別2號中陳述之胺基酸序列的GDNF蛋白質一樣的全部特性，也不一定是同樣的程度。依據所投予之切截GDNF蛋白質產物的用途，來選擇感興趣之特定神經營養特性。切截之GDNF蛋白質產物具有生物活性，並顯露出多巴胺系神經元的生存特徵，類似利用作為代表性生物分析之多巴胺攝取和酪胺酸羥化酶(TH)表現，如同在下文實例中所討論的，由成熟的GDNF蛋白質顯露出的。

五、發明說明 (21)

當本文中使用了"大體上同源的"一詞時，意指與具有序列識別2號中陳述之胺基酸序列的人類GDNF，同源的程度較好是超過70%，更佳的是超過80%，而再佳的是超過90%，甚至高達95%。在本文中說明的同源性之百分比，係按照在兩個序列的較小序列中所發現之胺基酸的百分比來計算，將欲比較之序列中相同的胺基酸殘基排整齊，此時可100個胺基酸長的地方將四個缺口導入，以便協助排列，如同Dayhoff在Atlas of Protein Sequence and Structure第5冊，124頁(1972)，National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C.中所陳述的，其揭示內容均合併於此以作為參考。大體上同源的也包括可以藉著與序列識別2號之GDNF的抗體發生交互反應來分離的任何切截之GDNF蛋白質，或是其基因可經由與編碼序列識別1號之GDNF的基因或基因片段雜交來分離的切截之GDNF蛋白質。

在閱讀了本發明說明之後，熟諳此藝者將會知曉，大體上同源的蛋白質將涉及從以X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y代表之切截GDNF蛋白質的胺基酸殘基中發生一或多個的刪除，或是對其加成或取代。在下文中會更詳細地描述這類變體的產製。將會進一步察知，因為本發明清楚地稱呼"切截之GDNF蛋白質，胺基-終端加成的變體預期包括甲硫胺酸殘基，或非-GDNF之胺基酸殘基或序列的添加，但是並未包括添加會導致成熟GDNF蛋白質再建構的胺基酸殘基。以天然存在的對偶突變體或變體為基礎的切截之GDNF蛋白質，亦在本發明的範圍內。在下文中更詳細地描述變體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽²²⁾

之切截GDNF蛋白質的產製。

Lin等人(美國專利申請案第08/182,183號,在前)描述了在羧基終端,藉著第六和第五殘基之Lys-Arg殘基的蛋白水解過程,分別從成熟GDNF之羧基終端,切截成熟GDNF的作用(也就是根據圖1之胺基酸殘基編號的Lys²⁹-Arg¹³⁰(亦如同序列識別1號或序列識別2號中的)。這樣的切截作用,將會從成熟的GDNF蛋白質中除去兩個半胱胺酸。這將可能造成蛋白質不適當的折疊,並因此將導致失活蛋白質的形成。相反的,本發明之X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y切截之GDNF蛋白質產物,保留了Cys¹³¹和Cys¹³³殘基,並藉著多巴胺攝取分析證實了它是有活性的蛋白質。

在本發明的一個具體實施例中,較佳的切截之GDNF蛋白質產物缺少一或多個脫醯胺位置。這類脫醯胺位置的缺少,將會導致經過純化之蛋白質增進其生化穩定性,並減少可能的降解產物,藉此產生更具儲藏穩定性的蛋白質。典型切截之GDNF蛋白質產物是[Ser²⁶-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質,其缺乏另一個也可以引導成熟蛋白質之脫醯胺作用的位置。此外,[Arg¹⁶-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質,至少會缺乏出現在成熟蛋白質中的第一個脫醯胺位置。

目前較佳的切截之GDNF蛋白質產物為[Arg³²-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質。該切截之GDNF蛋白質缺少位在或接近使成熟蛋白質發生蛋白水解修剪的位置。因此,預期該切截之GDNF蛋白質對於可能在活體內發生的加工處理是有抵抗力的。其他目前較佳的切截之GDNF蛋白質產物為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(²³)

[Cys³⁷-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質。該切截作用更減少了切截蛋白質的pI，如同其中分別從N-和C-終端移除高達並包含Gly⁴⁰和Ile¹³⁴的其他切截作用。現在最佳的切截之GDNF蛋白質產物，保留了所有在成熟GDNF蛋白質中發現的半胱胺酸，但缺少任何在表現和製造期間，或是在下列的活體內投藥時，關於切截之GDNF蛋白質迅速蛋白水解加工的可辨別位置。這些較佳的蛋白質包括[Arg³²-Ile¹³⁴]、[Gly³³-Ile¹³⁴]、[Gln³⁴-Ile¹³⁴]、[Arg³⁵-Ile¹³⁴]、[Gly³⁶-Ile¹³⁴]、[Lys³⁷-Ile¹³⁴]、[Asn³⁸-Ile¹³⁴]和[Arg³⁹-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質產物。

類似先前由Lin等人(美國專利申請案第07/855,413號，在前)對於成熟GDNF所描述的結果，本發明之切截GDNF蛋白質已經顯露出藉著黑質之多巴胺系神經元的胚胎前驅物，來增加多巴胺攝取的能力。在下文的實例4中更進一步描述了切截之GDNF蛋白質的生物分析。

通常分離和純化該新穎的切截之GDNF蛋白質，以便形成大體上不含其他(非-GDNF)蛋白質性物質存在的切截之GDNF蛋白質。較佳的是切截之GDNF蛋白質產物約有80%不含其他的蛋白質，可因為在製造切截之GDNF蛋白質產物中所使用的產製技術而使其出現。更佳的是該切截之GDNF蛋白質產物約有90%不含其他的蛋白質，特佳的是約有95%不含其他的蛋白質，而最佳的是大約>98%不含其他的蛋白質。此外，本發明供給提供製造同質性切截之GDNF蛋白質之聚核苷酸序列的獨特優點。例如，使用編

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (²⁴)

碼 [Arg³²-Ile¹³⁴] 切截之 GDNF 蛋白質的聚核苷酸序列，容許在大腸桿菌及其他適當的表現系統中，重組產製該切截之 GDNF 蛋白質。換句話說，該新穎的聚核苷酸容許產製對蛋白水解之加工處理不敏感，或是對這類加工處理或如同上述的其他生化加工影響具有降低之敏感性的切截之 GDNF 蛋白質。因此，該新穎之聚核苷酸使得製備及／或分離單一物種之切截 GDNF 蛋白質更為容易，並因此使切截之 GDNF 蛋白質及／或其產物不含或含有減低含量的上述異-或同二聚體之混合物。然而，將會明瞭到最後的切截之 GDNF 蛋白質可在投藥之前，與其他因子、化學組合物及／或適當之藥學調配物質混合，如同在下文中詳細描述的。

在本發明的一項觀點中，經由重組技術來有利地產製切截之 GDNF 蛋白質，因為它們能夠以較高的純度，達到較高含量的蛋白質。重組的切截之 GDNF 蛋白質形式包括該蛋白質的糖基化和非-糖基化形式，且該蛋白質在細菌、哺乳動物或昆蟲細胞系統中表現。另外，該切截之 GDNF 蛋白質也可以是化學合成的。在下文中更詳細地描述目前較佳的產製方法。

切截之 GDNF 變體和衍生物

A. 切截之 GDNF 變體

本發明的其他觀點包括切截之 GDNF 蛋白質的變體。當本文中使用的 "切截之 GDNF 蛋白質產物" 一詞時，包括從天然存在之 GDNF 的胺基酸序列內的殘基中，已經刪除了胺基

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(²⁵)

酸("刪除變體")、插入胺基酸("插入變體")，或將其取代("取代變體")的變體蛋白質。這類變體係藉著將適當的核苷酸變化導入編碼蛋白質之DNA中，或是藉著想要蛋白質在活體外的化學合成來製備之。熟諳此藝者將會察知可以進行各種組合的刪除、插入和取代作用，其限制條件為最後的蛋白質必須具有GDNF之生物活性。

熟諳此藝者熟知有關一或多個選定胺基酸殘基之置換、插入或刪除的突變生成技術(例如，美國專利第4,518,584號，其揭示內容均合併於此以作為參考)。在胺基酸序列變體之建構作用中，有兩個主要的變數：突變位置所在之處和突變的性質。在設計切截之GDNF變體時，突變位置所在之處和突變的性質將依據待修改的生化特徵。可以個別地或連續地修改突變的位置，例如藉著(1)首先利用保守的胺基酸選擇，然後利用較激進的選擇，係依據所要達到的結果，(2)刪除該目標胺基酸殘基，或(3)在鄰近已設定位置之處插入胺基酸殘基。

胺基酸序列的刪除通常範圍在大約1到30個胺基酸殘基之間，較常見的是從大約1到10個殘基，而代表性的是從大約1到5個殘基。例如，位在N-終端到Cys⁴¹之胺基酸殘基的"X"部份的刪除作用中，可能範圍在大約1到30個殘基之間，而在[Cys⁴¹-Cys¹³³]的半胱胺酸殘基之間的刪除作用，通常是從大約1到5個殘基，係依據免於使蛋白質折疊破裂的位置而定。在切截之GDNF蛋白質中的刪除作用，可以在與轉化生長因子-β(TGF-β)之家族成員具有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(26)

較低同源性的區域上進行。在大體上與其他TGF- β 家族序列同源之區域上，從切截之GDNF蛋白質中刪除，將更有可能修改了較重要的生物活性。將會選擇總刪除及／或連續刪除的數量，以便保護切截之GDNF蛋白質在受到影響之功能部位，例如半胱胺酸交聯中的三級結構。

胺基酸序列的加成作用，可包括胺基-及／或羧基-終端的融合，其長度範圍從一個殘基到一百個或更多的殘基，以及單一或多數胺基酸殘基的内部序列內插入作用。内部加成作用的範圍通常可從大約1到10個胺基酸殘基，較具代表性的是從大約1到5個胺基酸殘基，通常是從大約1到3個胺基酸殘基。如同上述，意圖使本發明之胺基-終端的加成變體，包括甲硫胺酸(例如，像是在細菌重組之細胞培養中，GDNF之直接表現的人工製品)，或非-GDNF之胺基酸殘基或序列的加成。胺基-終端加成變體並未包含將會導致成熟GDNF蛋白質再建構之胺基酸殘基的加成。終端插入的較佳實例，包括異源性-N-終端信號序列與N-終端的融合，而使得從重組的宿主細胞中分泌該蛋白質更為容易。這類信號序列通常將會從預定的宿主細胞物種中獲得，並因此與之同源。插入或加成作用也可以包括衍生自其他神經營養因子之序列的胺基酸序列。

其他種類的變體為胺基酸取代變體。這些變體至少有一個在切截之GDNF蛋白質中的胺基酸殘基被移除，並將一個不同的殘基插入其位置中。參見例如圖5，其中將天然存在的Asn²²更換為Ser，以便進一步移除Met殘基。利用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (27)

X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y胺基酸序列代表，以及本定義之切截之GDNF蛋白質產物，可將這類的切截GDNF蛋白質稱為取代變體Met-[Asn²²△Ser²²-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質，或加成變體Met-Ser-[Pro²³-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質。取代變體包括對偶變體，其特徵為在物種族群中自然發生的核苷酸序列改變，其可能或可能不會導致胺基酸的改變。

切截之GDNF蛋白質的序列專一性突變，可能涉及糖基化位置的修改(例如，絲胺酸、蘇胺酸或天冬醯胺)。糖基化作用的缺少或只有部份的糖基化作用，可能起因於在任何天冬醯胺-連結之糖基化辨認位置之處，或在任何藉著加入O-連結之碳水化合物來修改蛋白質的位置之處，有胺基酸的取代或刪除。一個天冬醯胺-連結的糖基化辨認位置包括可由適當的細胞糖基化酵素專一性辨認出的三肽序列。這些三肽序列為Asn-Xaa-Thr或Asn-Xaa-Ser，此處之Xaa可以是任何Pro以外的胺基酸。在糖基化辨認位置的第一或第三個胺基酸位置中的一或兩個之上，各種胺基酸的取代或刪除(及/或在第二個位置處的胺基酸刪除)，會導致經過修改之三肽序列的非-糖基化作用。因此，適當改變之核苷酸序列的表現，產生了該位置處未被糖基化的變體。另外，可將序列修改成在切截之GDNF蛋白質中加入糖基化位置。

將一種確認切截之GDNF胺基酸殘基或突變生成區域的方法叫做"丙胺酸掃描突變生成法"，如同Cunningham和

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明²⁸ ()

Wells所描述的 (Science, 244: 1081-1085, 1989)。在此方法中，確認胺基酸殘基或一群目標殘基(例如帶電荷的殘基，像是Arg、Asp、His、Lys和Glu)，並藉著中性或帶負電荷的胺基酸來替換之(最佳的是丙胺酸或聚丙胺酸)，以便完成胺基酸與在細胞內或外側之周圍含水環境的交互作用。然後藉著在取代位置導入額外或其他的殘基，將那些被證實對取代作用有功能敏感性的功能部位精製。因此，預先決定導入胺基酸序列修改的位置，並在指定的位置上使突變的效率達到最高，可經營丙胺酸掃描或隨機的突變生成，並篩選具有想要活性及活性程度之最佳組合的變體。

對於取代突變生成，最感興趣的位置包括在得自各種物種之GDNF蛋白質中找到的胺基酸，它大體上在側鏈主體、電荷及／或忌水性等方面是不同的。其他感興趣的位置，包括其中獲自各種物種的類似-GDNF蛋白質之特定殘基是相同的那些。這類位置通常對蛋白質之生物活性是很重要的。一開始藉著取代作用，以相對上較保守的方式來修改這些位置。在表1中，在較佳取代物的標題之下顯示這類保守的取代作用。如果這類取代物導致生物活性的改變，此時導入更豐富的改變(代表性的取代物)，及／或可以進行其他的加成／刪除作用，並篩選所得的產物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (29)

表 1

胺基酸取代作用

原始殘基	較佳的取代物	代表性的取代物
Ala(A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg(R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn(N)	Gln	Gln; His; Lys; Arg
Asp(D)	Glu	Glu
Cys(C)	Ser	Ser
Gln(Q)	Asn	Asn
Glu(E)	Asp	Asp
Gly(G)	Pro	Pro
His(H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile(I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala Phe; 正亮胺酸
Leu(L)	Ile	正亮胺酸; Ile; Val Met; Ala; Phe
Lys(K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met(M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe(F)	Leu	Leu; Val; Ile; Ala
Pro(P)	Gly	Gly
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Ser	Ser
Trp(W)	Tyr	Tyr
Tyr(Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val(V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮胺酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(³⁰)

預期對胺基酸序列的保守修改(以及對於編碼核酸序列的相對應修改),產生切截之GDNF蛋白質,具有類似如下文實例中描述之切截GDNF蛋白質的那些功能和化學特性。相反的,在切截之GDNF蛋白質的功能及/或化學特性上的豐富修改,可藉著選擇取代物來完成之,該取代物在它們對於維持(a)在取代物區域中的多肽主鏈結構,例如像是片狀或螺旋構象,(b)蛋白質在目標位置的電荷或忌水性,或(c)側鏈的主體之影響上有明顯的差異。天然存在的殘基,以一般側鏈特性為基礎而被分成數群:

- 1) 忌水性的: Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- 2) 中性忌水性的: Cys、Ser、Thr;
- 3) 酸性的: Asp、Glu;
- 4) 鹼性的: Asn、Gln、His、Lys、Arg;
- 5) 影響鏈方向的: Gly、Pro; 以及
- 6) 芳香族的 Trp、Tyr、Phe。

非-保守的取代物可涉及這些群中的一員與其他成員的交換。可將這類被取代的殘基導入切截之GDNF蛋白質與其他TGF- β 蛋白質同源的區域中,或將其導入該蛋白質之非-同源的區域中。

B. 切截之GDNF衍生物

可由熟諳本文提供之揭示內容的技師,來製備切截之GDNF或切截之GDNF變體的化學修改衍生物。最適合切截之GDNF蛋白質衍生作用的化學部份包括水溶性聚合物。想要水溶性的聚合物,因為將蛋白質附接於其上時,不會

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽³¹⁾)

在諸如生理學環境之類的含水環境中沉澱。較佳的是，該聚合物對於製備治療產物或組合物而言將是藥學上可接受的。熟諳此藝者將能夠選擇想要的聚合物，係以該聚合物／蛋白質共軛物是否將被使用在治療上，而如果是這樣，則以想要的劑量、循環時間、對蛋白水解作用的抵抗力及其他考量之類的考量為基礎。衍生作用的效力，可藉著以想要的形式來投予該衍生物來探知(也就是藉著滲透幫浦，或更佳的藉著注射或輸液，或進一步為了口服、肺部或其他遞送途徑來調製的)，並定出它的效力。

適當的水溶性聚合物包括但不限於聚乙二醇(PEG)、乙二醇／丙二醇共聚物、單甲氧基-聚乙二醇、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯／順丁烯二酸酐共聚物、多元胺基酸(同聚物或任意的共聚物)、聚(正-聚乙炔吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇同聚物、聚環氧丙烷／環氧乙烷共聚物、聚氧乙基化之多元醇(例如甘油)、聚乙二醇丙醛，及其混合物。當在本文中使用时，聚乙二醇意味者包括已經使用在衍生其他蛋白質的任何形式之PEG，諸如單-(C₁-C₁₀)烷氧基或芳氧基-聚乙二醇。聚乙二醇丙醛在製造上也可能是有利的，因為它在水中的穩定性。該聚合物可以具有任何的分子量，且可以是分支或未分支的。

本發明特別關於切截之GDNF蛋白質產物，包括與至少一個PEG分子連結的切截之GDNF蛋白質。在其他的觀點中，本發明係關於經由醯基或烷基連結，與至少一個PEG分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(³²)

子附接的切截之GDNF蛋白質。

可藉著此項技藝中已熟知的任何聚乙二醇化反應來完成聚乙二醇化作用。參見例如：Focus on Growth Factors 3(2)：4-10 (1992)；歐洲專利0 154 316號；歐洲專利0 401 384號；以及Malik等人，Exp. Hematol. 20：1028-1035 (1992)(報告使用崔斯基(tresyl)氯的GM-CSF聚乙二醇化作用)。較佳的是與具反應性的水溶性聚合物，經由醯基化反應或烷基化反應來完成聚乙二醇化作用。在下文中更詳細地討論這些衍生作用的較佳方法。關於醯基化反應，該聚合物最好是選擇具有單一反應性的酯基團。關於還原烷基化反應，該聚合物最好是選擇具有單一反應性的醛基團。此外，可將選定的聚合物修改成具有單一反應性的基團，諸如醯基化作用的活性酯或烷基化作用的醛，以便於可控制聚合作用的程度。一般而言，水溶性的聚合物將不會選自天然存在的糖基化殘基，因為這些通常更便利地藉著哺乳動物重組表現系統來製造。

醯基化作用

在本發明中，藉著醯基化作用的聚乙二醇化作用，通常涉及使聚乙二醇的活性酯衍生物與切截之GDNF蛋白質反應。可以使用任何已知或後續發現的反應性PEG分子來完成該聚乙二醇化之程序。較佳的活化PEG酯是將PEG酯化成N-羥基琥珀醯亞胺("NHS")。當在本文中使用的"醯基化作用"一詞時，企圖包括但不限於下列在切截之GDNF蛋白質和諸如PEG之類水溶性聚合物之間的連結形式：醯胺、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽³³⁾

胺基甲酸、尿烷及其類似物。參見Bioconjugate Chem. 5 : 133-140 (1994)。反應條件可選自任何此項聚乙二醇化之技藝中已熟知的，或是後續發展的那些，但應該避免或限制暴露在將會使待修改之切截GDNF蛋白質失活，諸如溫度、溶劑和pH值之類的反應條件下。

藉著醯基化作用的聚乙二醇化作用，通常產生多-聚乙二醇的切截之GDNF蛋白質，其中經由醯基連結的基團將離胺酸 ϵ -胺基聚乙二醇化。連結之鍵結最好是醯胺。所得的產物也最好大體上只是(例如 $\geq 95\%$)單-、二-或三-聚乙二醇化的。然而，依據所使用的特定反應條件，形成一些在數量上具有較高含量聚乙二醇的共軛物。如果需要，可藉著標準純化技術，其中包括透析、鹽析、超過濾作用、離子-交換層析法、凝膠過濾層析法和電泳法，從混合物中製備更加純化的聚乙二醇化之共軛物。

烷基化作用

在本發明中，藉著烷基化作用的聚乙二醇化作用，通常涉及在還原試劑的存在下，使PEG終端的醛衍生物與切截之GDNF蛋白質反應。藉著烷基化作用的聚乙二醇化作用，也可產生多-聚乙二醇的切截之GDNF蛋白質。此外，可以操縱反應條件，以便使大體上僅在該蛋白質之 α -胺基和N-終端處(也就是單-聚乙二醇化之物種)的聚乙二醇化作用更順利。在單-聚乙二醇化或多聚乙二醇化的案例中，最好是經由-CH₂-NH-基團將PEG基團附接在該蛋白質上。特別提及-CH₂-基團，這類鍵結在本文中被稱為"烷基"鍵

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽³⁴⁾

結。

可藉著還原性烷基化作用來完成選擇性N-終端的化學修改，其利用不同種類之一級胺基的(離胺酸對N-終端的)不同反應性，可供特定蛋白質的衍生作用使用。在適當的反應條件下，大體上在N-終端與含有羰基之聚合物完成蛋白質的選擇性衍生作用。例如可藉著在容許利用在離胺酸殘基之 ϵ -胺基和該蛋白質之N-終端殘基的 α -胺基之間的pKa差異的pH值下執行反應，而選擇性地在蛋白質之N-終端聚乙二醇化。藉著這類選擇性衍生作用，來控制水溶性聚合物對蛋白質的附接作用：利用聚合物的共軛作用主要發生在蛋白質的N-終端，並且未出現諸如離胺酸側鏈胺基之類其他反應基團的重大修改。使用還原性烷基化作用，該水溶性聚合物最好具有供偶聯蛋白質使用的單一反應性醛。可以使用含有單一反應性醛的聚乙二醇丙醛。

本發明包括聚乙二醇化的切截之GDNF蛋白質，其中該PEG基團係經由醯基或烷基來附接之。如同上文所討論的，這類切截之GDNF蛋白質產物可以是單-聚乙二醇或多-聚乙二醇化的(例如，含有2-6個PEG基團，較佳的是2-5個PEG基團)。PEG基團通常在胺基酸的 α -或 ϵ -胺基處被附接在蛋白質上，但是亦企圖使PEG基團能夠被附接在蛋白質的任何反應性基團上，該基團具有足以在適當之反應條件下附接PEG基團的反應性。因此，聚乙二醇可經由一個反應性基團而被共價結合到蛋白質上，像是自由的胺基或羧基。反應性基團是可以結合被活化之PEG分子的那

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(35)

些。具有自由胺基的胺基酸殘基可包括離胺酸殘基和N-終端的胺基酸殘基。具有自由羧基的那些可包括天冬胺酸殘基、穀胺酸殘基和C-終端的胺基酸殘基。也可以使用硫氫基作為附接PEG分子的反應性基團。為了治療之目的，胺基的附接，諸如在N-終端或離胺酸基團處的附接作用通常是較佳的。若是想要受體結合作用，應該避免在對受體結合作用有重要性之殘基處的附接作用。

在一個觀點中，本發明提供單-聚合物/切截之GDNF蛋白質共軛物大體上同源的製備作用，其中已經將該聚合物大體上僅(也就是 $\geq 95\%$)附接到單一的位置中。更特別的是，如果使用PEG，本發明亦提供缺乏可能抗原連接基團之聚乙二醇化的切截之GDNF蛋白質，並具有直接與切截之GDNF蛋白質偶聯的PEG分子。

此外，也可以利用糖基化、非-糖基化或脫-糖基化的切截之GDNF蛋白質來製備衍生物。代表性使用非-糖基化的切截之GDNF蛋白質。例如，可將原核生物表現的[Arg³²-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質以化學方式衍生，成為包含單-或多-，例如2-4個PEG部份，並經由醯基或烷基附接之。

通常，可在使用任何適當的條件下，使具有生物活性的物質與活化的聚合物分子反應，來完成化學性衍生作用。製備聚乙二醇化的切截之GDNF蛋白質的方法，通常將包括下列步驟(a)使切截之GDNF蛋白質與聚乙二醇(像是具有反應性的PEG之酯或醛衍生物)在條件下反應，藉此使切截之GDNF蛋白質附接在一或多個PEG基團上，和(b)獲

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(³⁶)

得反應產物。一般而言，醯基化反應之最適當的反應條件，隨各個不同場合，並以已知之參數和想要的結果為基礎來決定之。例如，PEG：蛋白質的比例越高，多-聚乙二醇化之產物的百分比便越高。可藉著諸如想要的衍生程度(例如單-、二-、三-等等)、選定之聚合物的分子量聚合物是否是分支或未分支的，以及所使用的反應條件之類的因子來決定最適當的比例(由反應效力來看，在其中沒有過量的未反應蛋白質或聚合物)。

產製大體上同源族群之單-聚合物／切截之GDNF蛋白質共軛物的還原性烷基化作用，通常將包括下列步驟(a)使切截之GDNF蛋白質在還原性烷基化作用條件下，在適合容許切截之GDNF蛋白質之胺基酸終端處的 α -胺基之選擇性修改作用的pH值之下，與具有反應性之PEG分子反應，以及(b)獲得反應產物。

關於大體上同源族群之單-聚合物／切截之GDNF蛋白質共軛物，還原性烷基化作用的反應條件是容許水溶性聚合物部份與切截之GDNF蛋白質之N-終端的選擇性附接作用的那些。這類反應條件通常提供在離胺酸胺基和位在N-終端之 α -胺基之間的pKa差異(pKa為在該處有50%胺基被質子化而50%未被質子化的pH值)。該pH值也影響聚合物與所使用之蛋白質的比例。一般而言，若pH值較低，將會想要比蛋白質過量更多的聚合物(也就是說，N-終端之 α -胺基的反應性越低，需要更多的聚合物來達到最適當的條件)。為了本發明之目的，pH值通常將會落在3-9的範圍內

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (³⁷)

，較佳的是3-6。

其他的考量是聚合物的分子量。一般而言，聚合物的分子量越高，可被附接到蛋白質上的聚合物分子數量就越少。類似地，在應用這些參數時，應該也將聚合物的分支狀況列入考量。通常分子量越高(或較多的分支)，則聚合物：蛋白質的比例就越高。一般而言，在本文中企圖進行聚乙二醇化的反應時，較佳的平均分子量為大約2kDa到大約100kDa("大約"一詞代表在聚乙二醇的製備作用中，有些分子較重而有一些較輕，然後再指定分子量)。較佳的平均分子量為大約5kDa到大約50kDa，特佳的是大約12kDa到大約25kDa。水溶性聚合物對切截之GDNF蛋白質的比例將是在從1：1到100：1的範圍內，較佳的是(對多聚乙二醇化作用而言)1：1到20：1，和(對單-聚乙二醇化作用而言)1：1到5：1。

利用上文指示的條件，還原性烷基化作用將提供聚合物對任何在胺基終端具有 α -胺基的切截之GDNF蛋白質的選擇性附接作用，並提供單-聚合物/切截之GDNF蛋白質共軛物的大體上同源之製品。當在本文中使用"單-聚合物/切截之GDNF蛋白質共軛物"一詞時，意指含有附接在切截GDNF蛋白質上之單一聚合物分子的衍生物。單-聚合物/切截之GDNF蛋白質共軛物最好將具有位在N-終端的聚合物分子，但不是在離胺酸胺基的副基團上。製品最好是含有90%以上的單-聚合物/切截之GDNF蛋白質共軛物，更佳的是95%以上的單-聚合物/切截之GDNF蛋白質共軛物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽³⁸⁾)

，其餘可觀察到的蛋白質為未反應的(也就是缺乏聚合物部份的蛋白質)。

關於還原性烷基化作用，該還原試劑在水溶液中應該是穩定的，且最好能夠只還原在還原性烷基化作用之初期過程中形成的西福鹽基(Schiff base)。典型的還原試劑可以選自硼氫化鈉、氰基硼氫化鈉、二甲胺甲硼烷、三甲胺甲硼烷和吡啶甲硼烷。特佳的還原試劑為氰基硼氫化鈉。其他的反應參數，諸如溶劑、反應時間、溫度等等，以及純化產物的方法，可隨著各種不同的場合，以與蛋白質與水溶性聚合物之衍生作用有關的常用資訊為基礎來決定之。

可以選擇藉著醯基化作用及／或烷基化作用方法來製備聚合物／蛋白質共軛物的混合物，而其所提供的優點為可以選擇在該混合物中所包含之單-聚合物／蛋白質共軛物的比例。因此，如果想要則可以製備具有各種數量之聚合物分子(也就是二-、三-、四-等等)附接於其上的蛋白質之混合物，並與使用本方法製備之單-聚合物／蛋白質共軛物物質混合，而具有攜帶預先決定比例之單-聚合物／蛋白質共軛物的混合物。

編碼切截之GDNF蛋白質的聚核苷酸

本發明更進一步提供編碼切截之GDNF蛋白質的新穎聚核苷酸。當作爲雜交探針或括大引子來使用時，該核酸序列大體上將不含所有其他的核酸序列。爲了使用在重組蛋白質的表現中，該核酸序列通常大體上不含編碼其他蛋白質的核酸序列，除非打算使用融合蛋白。以本說明爲基礎，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (³⁹)

並使用完整的密碼表，熟諳此藝者可輕易地定出編碼切截之GDNF蛋白質之胺基酸序列的所有核酸序列。目前較佳的核酸序列包括那些編碼 [Arg¹⁶-Ile¹³⁴]、[Ser²⁶-Ile¹³⁴]、[Arg³²-Ile¹³⁴]和 [Lys³⁷-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質的聚核苷酸。在圖5、6和7中描述了各種聚核苷酸的實例，以及在圖1、3和4中編碼切截之GDNF蛋白質的那些部份。熟諳此藝者亦將會知曉編碼切截之GDNF蛋白質的新穎聚核苷酸，包括編碼變體切截之GDNF蛋白質的那些核酸序列，無論是人造或天然存在的。

根據下文的說明來經營之重組表現的技術，可以伴隨在產製這些聚核苷酸之後，並表現出各種切截之GDNF蛋白質。例如，藉著將編碼該切截之GDNF蛋白質的核酸序列插入適當的載體中，熟諳此藝者得以輕易地產製出大量想要的核苷酸序列。然後可以利用該序列來產生檢測探針或擴大引子。另外，也可以將編碼切截之GDNF蛋白質的聚核苷酸插入表現載體內。藉著將該表現載體導入適當的宿主中，而可以大量生產想要的切截之GDNF蛋白質。

當在文中進一步說明時，有極多的宿主／載體系統可供核酸序列的繁殖，及／或切截之GDNF蛋白質的產製使用。這包括但不限於質體、病毒和插入載體，以及原核生物與真核生物之宿主。熟諳此藝者能夠改編有能力繁殖或表現異源性DNA的宿主／載體系統，以便產製或表現本發明之序列。

藉著這類重組技術，可輕易地大量生產本發明之切截之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁴⁰⁾

GDNF蛋白質。而且由於本揭示內容的緣故，熟諳此藝者將會知曉該新穎的核酸序列包括編碼特別陳述於表中之切截之GDNF蛋白質的簡併核酸序列，這類切截之GDNF蛋白質的變體，以及最好是在嚴格的雜交條件下，與這些核酸序列之互補物雜交的那些核酸序列(參見Maniatis等人，Molecular Cloning (A Laboratory Manual); Cold Spring Harbor Laboratory, 第387-389頁, 1982)。典型的嚴格雜交條件為在4xSSC中，在62-67°C下的雜交作用，接著在62-67°C下以0.1xSSC沖洗大約1小時。另外，典型的嚴格雜交條件也可以是在45-55%甲醯胺、4xSSC中，在40-45°C下的雜交作用。在放寬的雜交條件下與切截之GDNF蛋白質之互補序列雜交的DNA序列，以及編碼本發明的切截之GDNF蛋白質者亦包括於其中。這類放寬的嚴格雜交條件之實例為4xSSC，在45-55°C下，或是在40-45°C下利用30-40%甲醯胺的雜交作用。

亦由本發明提供的是重組的DNA構築體，其包括與載體DNA在一起、編碼切截之GDNF蛋白質的DNA序列。在這樣的DNA構築體中，編碼切截之GDNF蛋白質的核酸序列(攜帶或不攜帶信號肽)，與有能力指揮切截之GDNF蛋白質，在所選擇之宿主中複製及/或表現的適當之表現控制或調節序列有操作上的關連。

切截之GDNF蛋白質的重組表現

製備編碼切截之GDNF的聚核苷酸

可經由各種方式，包括但不限於化學合成、cDNA或基因

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁴¹⁾

組庫篩選、表現基因庫的篩選、及／或cDNA的PCR擴大作用，輕易地獲得編碼切截之GDNF的核酸序列或成熟的GDNF起始物質。這些方法及其他可用來分類這類核酸序列的方法，由例如 Sambrook 等人 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)、Ausubel 等人編著 (Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press, 1994)，以及 Berger 和 Kimmel (Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Technique, 第 152 冊, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1987) 描述過了。較佳之編碼GDNF的核酸序列是哺乳動物的序列。

也可利用此項技藝中已熟知的方法，像是由 Engels 等人 (Angew. Chem. Intl. Ed., 28: 716-734, 1989) 陳述的那些方法，來完成編碼切截之GDNF蛋白質之核酸序列的化學合成。這些方法包括，特別是核酸序列合成的磷酸三酯、類核苷酸法和H-磷酸鹽法。編碼切截之GDNF蛋白質的核酸序列在長度上將是數百個鹼基對(bp)或核苷酸。可以數個片段的形式來合成大的核酸序列，例如在長度上超過大約100個核苷酸的那些。然後可將這些片段連結在一起，而形成編碼切截之GDNF蛋白質的核酸序列。較佳的方法是利用標準核苷酸化學的聚合物-支撐合成作用。

另外，也可以藉著篩選適當的cDNA庫(也就是從一或多個相信能表現該蛋白質的組織來源來製備的資料庫)，或是基因組庫(由全部基因組DNA來製備的資料庫)，而獲得適

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁴²⁾

當的核酸序列。cDNA庫的來源，通常是得自被認為能以合理的量來表現GDNF之任何物種的組織。基因組庫的來源，可以是被認為能藏匿編碼GDNF或GDNF同源物之基因的任何組織，或得自任何哺乳動物或其他物種的組織。可對資料庫篩選有關GDNF cDNA / 基因的存在，係利用一或多個核酸探針(寡核苷酸、cDNA或基因組DNA片段，相對於待選殖之GDNF或GDNF同源性的cDNA或基因其具有可接受的同源程度)，使其與出現在資料庫中的GDNF或GDNF同源性的cDNA或基因，選擇性地雜交。典型供這類資料庫篩選使用的探針，通常得自與製備該基因庫之物種的相同或類似物種、編碼GDNF DNA序列的小區域。此外，該探針也可以是簡併的，如同在本文中討論的。

資料庫的篩選通常是藉著使寡核苷酸探針或cDNA，在防礙非-專一性結合但容許那些與探針或引子有明顯的同源程度之純種系的結合的嚴格條件下，連接到資料庫中的純種系來完成之。典型的雜交作用和沖洗嚴格條件，一部份依據cDNA或寡核苷酸探針的大小(也就是核苷酸在長度上的數目)，以及是否該探針是簡併的。亦考慮到在經過設計的雜交溶液中獲得純種系的可能性(也就是說，cDNA或基因組庫是已經篩選過的，如果是cDNA庫，感興趣的cDNA就可能以高含量存在)。

在使用DNA片段(如cDNA)作為探針之處，典型的雜交條件包括在Ausubel等人，編著，在前中陳述的那些。在雜交之後，以適當的嚴格度沖洗含有資料庫的墨點，係依據

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁴³⁾)

諸如探針大小、預期探針對純種系的同源性、待篩選之資料庫的種類、待篩選之純種系的數目，及其類似物等等的數個因素來決定。嚴格的沖洗溶液之實例(其通常具有低的離子強度，並可在相對上較高的溫度下來使用)如下。一種這類的嚴格沖洗液為在55°C下的0.015M NaCl、0.005M檸檬酸鈉和0.1%SDS。另一種這類的嚴格緩衝溶液為在大約40-50°C下的1mM Na₂EDTA、40 mM NaHPO₄，pH值7.2，和1% SDS。另外一種嚴格的沖洗液為在大約50-65°C下的0.2xSSC和0.1% SDS。

亦有一種嚴格沖洗條件的典型草案，為使用寡核苷酸探針來篩選cDNA或基因組庫。例如，第一個草案係依據所使用的探針長度，在大約35到62°C之間的溫度下，使用帶有0.05%焦磷酸鈉的6xSSC。例如，在35-40°C下沖洗14個鹼基的探針，在45-50°C下沖洗17個鹼基的探針，在52-57°C下沖洗20個鹼基的探針，在57-63°C下沖洗23個鹼基的探針。可將溫度升高2-3°C，此時背景的非-專一性結合顯然較高。第二個草案係利用氯化四甲銨(TMAC)來沖洗，一個這類的嚴格沖洗溶液為3M TMAC、50 mM Tris-HCl，pH8.0和0.2% SDS。

其他獲得編碼GDNF蛋白質之核酸序列的適當方法為聚合酶連鎖反應(PCR)。在該方法中，從表現GDNF的組織中萃取聚(A)+RNA或全部的RNA。然後利用酵素逆轉錄酶，從RNA中製備cDNA。然後將兩個引子，通常是與GDNF cDNA的兩個分離區域(寡核苷酸)互補的，連同諸如Taq聚

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁴⁴)

合酶之類的聚合酶一起加至cDNA中，而該聚合酶在兩個引子之間擴大了該cDNA區域。

爲了製備編碼想要之切截GDNF蛋白質的核酸序列所選擇的方法，需要使用寡核苷酸引子或探針(例如PCR、cDNA或基因組庫篩選)，被選出來作爲探針或引子的寡核苷酸序列應該具有適當的長度，並且是充份明白的，以便將會在資料庫篩選或PCR擴大作用期間發生的非-專一性的結合減到最少。探針或引子的確實序列，通常以得自相同基因或來自不同生物之類似基因的被保存或較具同源性之序列或區域爲基礎。可視需要將探針或引子全部或部份地簡併，也就是說，含有探針／引子的混合物，都可以編碼相同的胺基酸序列，但是使用不同的密碼子來這樣做。另一種製備簡併探針的方法，是將纖維核苷放置在那些密碼子位置的一些或全部中，係依據物種而有所改變。可藉著上述之DNA的化學合成法來製備寡核苷酸探針或引子。

以編碼GDNF的這些核酸序列爲基礎的切截之GDNF蛋白質，亦打算將其突變或變體序列包含在本發明的範圍內。如同上述，突變或變體序列是與野外型序列相比較之下，含有一或多個核苷酸的取代、刪除及／或插入，並且與野外型胺基酸序列相比較，產生胺基酸序列改變的表現。在一些案例中，可能出現天然存在的GDNF胺基酸突變或變體，係歸因於天然對偶基因改變的存在。以這類天然存在之突變或變體爲基礎的切截之GDNF蛋白質，亦在本發明的範圍內。合成的突變序列之製備亦是此項技藝中已熟知

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁴⁵)

的，並描述在例如 Wells 等人 (Gene, 34: 315, 1985) 和在 Sambrook 等人，在前之中。

載體

爲了進一步選殖 (DNA 的擴大) 或是爲了表現，將編碼切截之 GDNF 蛋白質的 cDNA 或基因組 DNA 插入載體中。適當的載體是可以購得的，或是特地建構的載體。適當載體的選擇或建構，將依據：1) 它是否可以供 DNA 擴大或 DNA 表現使用，2) 被插入載體中的 DNA 的大小，以及 3) 利用該載體來轉化的宿主細胞 (例如哺乳動物、昆蟲、酵母、真菌、植物或細菌細胞)。每個載體依據其功能 (DNA 的擴大或 DNA 的表現) 及其與想要宿主細胞的可相容性，而含有各種組成。載體組成通常包括但不限於一或多種下列物質：信號序列、複製起點、一或多個選擇或標記基因、促進子要素、啓動基因、轉錄終止序列及其類似物。這些組成可從天然來源獲得，或藉著已知的程序來合成之。本發明之載體包含編碼感興趣之切截 GDNF 蛋白質的核酸序列，將其有效地連接到一或多個下列的表現控制或調節序列，而能夠藉著所選出之宿主細胞來指揮、控制或完成切截之 GDNF 蛋白質的表現。

信號序列

信號序列可以是載體的一個組成，或者是被插入載體之 GDNF DNA 的一部份。天然的 GDNF DNA 在蛋白質的胺基終端編碼信號序列，它在蛋白質的轉譯後加工期間內被切開，而形成成熟的 GDNF 蛋白質。亦包括在本發明範圍內

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁴⁶⁾)

的切截之GDNF聚核苷酸，具有天然的信號序列和其他的前-pro序列，以及切截之GDNF聚核苷酸，其中刪除了天然的信號序列，並以異源性的信號序列來替換。該異源性的信號序列應該選擇能被宿主細胞辨認並加工處理的，也就是藉著信號肽酶將其切開。因為原核生物的宿主細胞無法辨認並處理天然的GDNF信號序列，所以藉著選自例如鹼性磷酸酶、青黴素酶或熱-穩定的腸毒素II引導子的原核生物之信號序列來取代該信號序列。為了酵母分泌，可藉酵母轉化酶、 α 因子或酸性磷酸酶引導子來取代天然的GDNF信號序列。在哺乳動物細胞的表現中，天然的信號序列是令人滿意的，雖然其他哺乳動物的信號序列也是適合的。

複製起點

表現和選殖載體通常含有使該載體能夠在一或多種選定之宿主細胞中複製的核酸序列。在選殖載體中，該序列通常是一個能夠使該載體不依賴宿主染色體DNA而進行複製的，並含有複製起點或自動複製的序列。已熟知有關於各種細菌、酵母和病毒的這類序列。得自質體pBR322的複製起點，適用於大部份的革蘭氏陰性細菌，且可利用各種起點(例如SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV)將該載體選殖到哺乳動物細胞中。一般而言，哺乳動物表現載體並不需要複製起點的成份(例如，往往僅使用SV40起點，因為它含有早期啓動基因)。

選擇基因

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(47)

表現和選殖載體通常含有選擇基因。該基因編碼"標記"蛋白質，這是當經過轉化之宿主細胞在選擇性培養基中生長時，細胞存活或生長所必需的蛋白質。未利用載體轉化的宿主細胞將不含該選擇基因，並因此而無法在培養基中存活。典型的選擇基因所編碼之蛋白質，其(a)賦與對抗生素或其他毒素的抵抗力，例如氨基青黴素、新黴素、胺甲碟呤或四環素，(b)補充營養的缺陷；或(c)提供無法從培養基中獲得的重要營養物。

可利用其他的選擇基因來擴大將要表現的基因。擴大作用是一個過程，其中在產製對生長具有決定性之蛋白質方面非常需要的基因，在重組細胞之連續世代的染色體中，以縱向方式重複排列。哺乳動物細胞的適當選擇標記之實例包括二氫葉酸還原酶(DHFR)和胸腺核苷激酶。將哺乳動物細胞轉化物放置在選擇性壓力之下，只有轉化物由於載體中存在有標記，獨自適應而得以存活。藉著將經過轉化的細胞培養在下述的條件下來施加選擇性壓力，在該條件中連續地改變選擇試劑在培養基中的濃度，藉此來引導選擇基因和編碼切截之GDNF的DNA兩者的擴大作用。結果，從經過擴大的DNA中合成了增加數量的切截之GDNF。

例如，首先藉著將所有的轉化物培養在含有胺甲碟呤，DHFR之競爭性拮抗物的培養基中，來確認以DHFR選擇基因轉化的細胞。當使用野外型DHFR時，適當的宿主細胞為在DHFR活性上有缺陷的中國倉鼠卵巢細胞株(參見例

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(48)

如 Urlaub 和 Chasin, Proc, Natl, Acad. Sci., USA 77(7) : 4216-4220 (1980))。然後將經過轉化的細胞暴露在漸增含量的胺甲碟呤中。這引導 DHFR 基因之多重副本的合成，並伴隨著出現在表現載體中的其他 DNA 多重副本的合成，諸如編碼切截之 GDNF 蛋白質的 DNA。

啓動基因

本發明之表現和選殖載體通常將會含有由宿主生物辨認的啓動基因，並可實施將其連接到編碼切截之 GDNF 蛋白質的核酸序列上。啓動基因是未經轉譯的序列，位在結構基因之起始密碼子的上游(5')(通常在大約 100 到 1000bp 內)，控制特定核酸序列，諸如編碼切截之 GDNF 的核酸序列的轉錄和轉譯。啓動基因傳統上被分類成兩種中之一：可誘發的啓動基因和組成的啓動基因。可誘發的啓動基因回應一些諸如營養物的出現或缺乏，或是溫度改變之類的培養條件上的改變，開始在它們的控制之下增加來自 DNA 的轉錄程度。很多由各種可能的宿主細胞辨認的啓動基因都是爲人所熟知的。可藉著從起源 DNA 中經由限制酶消化作用移出該啓動基因並將想要的啓動基因序列插入載體中，而將這些啓動基因連接到編碼切截之 GDNF 的 DNA 上。也可以使用天然的 GDNF 啓動基因序列來指揮切截之 GDNF DNA 的擴大作用及／或表現。然而，若異源性啓動基因比天然的啓動基因，容許更多的轉錄作用和更高的表現蛋白質之產量，且若它能與已經被選用的宿主細胞系統相容共存，則該異源性啓動基因是較佳的。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁴⁹⁾

適用於原核生物宿主的啓動基因包括 β -內醯胺酶和乳糖啓動基因系統；鹼性磷酸酶，色胺酸(trp)啓動基因系統；以及諸如tac啓動基因之類的雜交啓動基因。其他已知的細菌啓動基因也是適合的。已經公告了它們的核苷酸序列，藉此使得熟諳此藝者能夠利用供給任何必要之限制位置所需的連接子或轉接子，將它們與想要的DNA序列連接。

供酵母宿主使用之適當的啓動序列也是熟諳此藝者已知的。酵母促進子可有利地與酵母啓動基因一起使用。供哺乳動物宿主細胞使用的適當啓動基因已爲人所熟知，並且包括獲自病毒基因組的那些，像是多瘤病毒、雞痘病毒、腺病毒(如腺病毒2型)、牛乳頭狀瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨大細胞病毒、反轉錄病毒、B型肝炎病毒和最佳的猿病毒(SV40)。其他適當的哺乳動物啓動基因包括異源性的哺乳動物啓動基因，例如熱-休克(heat-shock)啓動基因和肌動蛋白啓動基因。目前在CHO細胞中產製GDNF蛋白質所使用的啓動基因是SR α 。參見Takebe等人，Mol. Cell. Biol. 8(1): 466-472 (1988)。適當的表現載體爲pDSR α 2，在下文中進一步說明。

促進子要素

可將促進子序列插入載體中，以便藉著較高級的真核生物增加編碼本發明之切截之GDNF蛋白質的DNA序列的轉錄作用。促進子是DNA的順向作用要素，在長度上通常約爲10-300bp，其作用在啓動基因上，係增加它的轉錄作用。促進子具有相關的方位和獨立的位置。已經發現它們在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(50)

轉錄單位的5'和3'。已知可從哺乳動物的基因中獲得數個促進子序列(例如血球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -胎兒-蛋白質和胰島素)。然而，通常將會使用得自病毒的促進子。SV40促進子、巨大細胞病毒早期啓動基因促進子、多瘤病毒促進子和腺病毒促進子，是活化真核生物啓動基因的典型促進序列。也可以在切截之GDNF DNA的5'或3'位置處將促進子接合到載體內，它通常是位在啓動基因的5'位置處。

轉錄終止

在真核生物宿主細胞中(酵母；真菌、昆蟲、植物、動物、人類或得自其他多細胞生物的有核細胞)所使用的表現載體，亦將含有轉錄終止所必需的序列，並用以穩定mRNA。這類序列通常獲自真核生物DNA或cDNA的5'未轉譯區域，偶爾獲自3'未轉譯區域。這些區域所含有的核苷酸片段，在編碼切截之GDNF的mRNA未轉譯部份中，轉錄成聚腺苷酸化的片段。

含有一或多個上文列舉之組成，與想要的切截之GDNF密碼序列在一起之適當載體的建構，係藉著標準連接技術來完成。切開經過分離之質體的DNA片段，縫製，並以想要的順序再連接，而產生所需的質體。要證實已經建構了正確的序列，可利用連接混合物來轉化大腸桿菌，並藉著已知的技術來選擇成功的轉化物，像是如同上述的氨基青黴素或四環素抗藥性。然後從轉化物中製備質體，藉著核酸內切限制酶的消化作用來分析，並／或定出序列，而證實

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(51)

想要構築體的存在。

也可以使用在哺乳動物細胞中提供暫時表現編碼切截之GDNF的DNA的載體。一般而言，暫時性表現涉及使用能夠在宿主細胞中有效地複製的表現載體，如此使宿主細胞累積了許多表現載體的副本，接著合成高含量的、由該表現載體編碼的想要蛋白質。暫時性表現系統包括適當的表現載體和宿主細胞，容許方便肯定地確認由經過選殖之DNA編碼的蛋白質，以及迅速地對於想要的生物或生理特性來篩選這類蛋白質。因此，暫時性表現系統在確認蛋白質變體上是特別有用的。

宿主細胞的選擇和轉化

以用來表現重組之切截GDNF蛋白質的核酸序列來轉化的宿主細胞(例如細菌、哺乳動物、昆蟲、酵母或植物細胞)，亦由本發明來提供。在適當的條件下培養經過轉化的宿主細胞，容許該核酸序列表現。適當之宿主細胞的選擇和轉化、培養、擴大與產物產製及純化的方法是此項技藝中已熟知的。參見例如 Gething和 Sambrook, Nature 293: 620-625 (1981), 或者是 Kaufman等人, Mol. Cell. Biol. 5(7): 1750-1759 (1985) 或 Howley等人, 美國專利第4,419,446號。可根據 Lin等人的敘述(美國專利申請案第07/855,413號; 申請案第PCT/US92/07888; WO 93/06116)在大腸桿菌中表現切截之GDNF, 其涉及成熟GDNF的表現。在下文中更詳細地討論其他的代表性材料及方法。將經過轉化的宿主細胞培養在適當的培養基中, 然後可視需要從培養基

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(52)

中(或是從細胞中，如果是在細胞內表現)藉著熟諳此藝者已知的適當方法回收、分離及純化表現因子。

在本文中供選殖或表現載體用的適當宿主細胞為原核生物，酵母或如同上述的較高級之真核生物細胞。原核生物宿主細胞包括但不限於真細菌，像是革蘭氏陰性和革蘭氏陽性的生物，例如大腸桿菌、桿菌，如枯草桿菌，假單孢菌，如綠膿桿菌，鼠傷寒沙門氏桿菌或萎垂桿菌。另外，在活體外選殖的方法，例如PCR或其他的核酸聚合酶反應也是適合的。

除了原核生物宿主細胞之外，真核微生物，像是絲狀真菌或酵母也是適合用來表現切截之GDNF蛋白質的宿主。在低級真核生物宿主微生物中，酒酵母菌或常見的麵包酵母是最常用的，但是各種其他的屬、種和品系也是為人所熟知的並經常被使用的。

為了表現糖基化的切截之GDNF蛋白質，適當的宿主細胞係衍生自多細胞生物。這類宿主細胞可以複雜加工並具有糖基化活性。原則上可以使用任何高級的真核生物細胞培養物，無論這類培養物是否涉及脊椎動物或無脊椎動物細胞，包括植物和昆蟲細胞。通常利用脊椎動物細胞在培養中繁殖脊椎動物細胞(組織培養)，是已為人所熟知的過程。有用的哺乳動物宿主細胞株之實例包括但不限於：以SV40轉化的猴子腎臟CV1細胞株(COS-7)、人類胚胎腎臟細胞株(為了在懸浮培養基中生長，傳代選殖293或293細胞)、幼倉鼠腎臟細胞株和中國倉鼠卵巢細胞。其他適合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁵³⁾

的細胞株包括但不限於HeLa、老鼠L-929細胞、衍生自Swiss、Balb-c或NIH鼠的3T3細胞株、BHK或HaK倉鼠細胞株。

同樣地，細菌細胞亦適合本發明，而可用來作為宿主細胞。例如在生物技術的領域中，已熟知各種擔任宿主細胞的大腸桿菌品系(例如HB101、DH5 α 、DH10或MC1061)。也可以使用各種品系的鏈黴菌及其類似物。目前用來產製切截之GDNF蛋白質的最佳宿主細胞是細菌細胞(例如大腸桿菌)和哺乳動物細胞(諸如中國倉鼠卵巢細胞、COS細胞等等)。

轉移感染宿主細胞，而最好是以上述的表現或選殖載體來轉化之，並將其培養在傳統的營養培養基中。可將該培養基修改成適合誘發啟動基因、選擇轉化物或擴大編碼想要序列之基因的。利用熟諳此藝者已熟知，並為了適合所涉及之宿主細胞而選擇的標準技術，來完成轉移感染和轉化作用。例如，不含細胞壁的哺乳動物細胞，可使用磷酸鈣沉澱法。也可以使用電穿透作用、微量注射和其他已知的技術。

培養宿主細胞

將產製本發明之切截之GDNF蛋白質所使用的轉化細胞培養在適當的培養基中。按照需求，將培養基補充荷爾蒙及／或其他的生長因子(如胰島素、鐵傳遞蛋白或上皮生長因子)、鹽(如氯化鈉、鈣、鎂和磷酸)、緩衝溶液(如HEPES)、核苷(如腺核苷和胸腺核苷)、抗生素(如健大黴素)微量

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(54)

元素(限定無機化合物，通常以毫莫耳範圍之終濃度存在)和葡萄糖或其他能量來源。亦可包含熟諳此藝者所熟知的其他添加物，以適當的濃度存在。諸如溫度、pH值及其類似物等等，選擇宿主細胞所使用的適當培養條件，亦是熟諳此藝者所熟知的。

也有可能藉著同源重組，或以重組的產製方法，利用對照要素導入已經含有編碼GDNF之DNA的細胞中，來產製切截之GDNF蛋白質。同源重組是原本爲了在具有轉錄活性的基因中，使目標基因誘發或修正突變而發展出的技術(Kucherlapati, Prog. in Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol. 36: 301 (1989))。將基礎的技術發展成將特定的突變導入哺乳動物基因組之特定區域中的方法(Thomas等人, Cell. 44: 419-428, 1986; Thomas和 Capecchi, Cell. 51: 503-512, 1987; Doetschman等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8583-8587, 1988)，或是在缺陷基因內修正特定突變的方法(Doetschman等人, Nature. 330: 576-578, 1987)。典型的同源重組技術被描述於美國專利第5,272,071號(歐洲專利91 90 3051號，歐洲專利出版物第505 500號；PCT/US90/07642，國際出版物第WO 91/09955號)，其揭示內容均合併於此以作爲參考。

經由同源重組，可藉著將待插入基因組內的DNA序列附接在目標DNA上，而將其指引到感興趣基因的特定區域。目標DNA是與基因組DNA之區域互補的(同源的)DNA。在DNA複製過程中，使一小片與基因組之特定區域互補的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (55)

目標DNA與親代股接觸。這是已經插入細胞中以便雜交之DNA的一般特性，並因此通過共享的共源區域與內源DNA的其他部份進行重組。如果該互補股被附接在含有突變或不同DNA序列的寡核苷酸上，則由於重組的結果，它也被合併到重新合成的股中。由於校讀功能的結果，新的DNA序列擔任模板之職務是可能的。因此，將被轉移的DNA合併到基因組中。

如果特殊的基因序列是已知的，像是GDNF的核酸序列、前-pro序列或表現控制序列等等，則可合成或相反地獲得與選定之基因區域互補的一小片DNA，如藉著天然DNA在與感興趣之區域結合的特定辨認位置處的適當限制作用。將這一小片擔任目標序列的碎片插入細胞中，而它將會與基因組中其同源區域雜交。若是在DNA複製期間發生該雜交作用，這一小片DNA和任何附接於其上的其他序列，將會像岡崎片段一樣地發生作用，並會被倒縫於新合成之DNA後裔股內。

在本發明中，附接在這些目標DNA片段上的，是可與GDNF蛋白質之表現進行交互作用的DNA區域。例如，被插入預定之宿主細胞的基因組中，接近並具有足以影響編碼想要之切截GDNF的DNA之轉錄方位的啓動基因／促進子要素、抑制基因或外源係轉錄調節要素。控制要素不編碼切截之GDNF，但轉而控制宿主細胞基因組中存在的部份DNA。因此切截之GDNF蛋白質的表現，並未藉著編碼切截之GDNF基因本身的DNA轉移感染來完成，而是藉著

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁵⁶⁾)

使用與DNA調節片段偶聯的目標DNA(含有與感興趣之內源基因同源的區域)來完成之，該DNA調節片段提供的內源係基因序列，帶有可供切截之GDNF蛋白質的轉錄作用來辨認的信號。

根據本發明，也可以使用同源重組方法來修改含有正常在轉錄上無聲之GDNF基因的細胞，而產生能表現GDNF的細胞。然後可加工處理該GDNF蛋白質，形成切截之GDNF蛋白質。

切截之GDNF的醫藥組合物

切截之GDNF蛋白質產製醫藥組合物，通常含有治療有效量的切截之GDNF蛋白質產物，與一或多種藥學上或生理上可接受的調配物質混合。適當的調配物質包括但不限於抗氧化劑、防腐劑、色素、香料和稀釋劑、乳化劑、懸浮劑、溶劑、填料、填充劑、緩衝溶液、遞送載劑、稀釋劑、賦形劑及／或藥學佐劑，例如，適當的載劑可以是注射用水、生理鹽水溶液，或人造的腦脊髓液(CSF)，可補充一般在非經腸投藥之組合物中的其他物質。中性的緩衝鹽水溶液或是與血清白蛋白混合的鹽水更典型的載劑。

在載劑中主要溶劑實際上可以是含有水或非-含水的。此外，載劑可含有其他藥學上可接受的賦形劑，用來修改或維持pH值、滲透性、黏度、澄清度、顏色、無菌性、穩定性、溶解速率或調配物的氣味。同樣地，載劑也可以含有另外的藥學上可接受之賦形劑，用來修改或維持切截之GDNF蛋白質產物的穩定性、溶解速率或釋放速率，或是

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (57)

用來促進切截之GDNF蛋白質產物通過血-腦障礙的吸收或通透性。這類賦形劑是經常或習慣上用來調配以單位劑量或多重-劑量之形式來進行非經腸投藥，或是藉著從植入幫浦連續或定期輸液而直接輸液至CSF中之劑量的那些物質。

一旦已經調配好了治療組合物，便可將它以溶液、懸浮液、凝膠、乳劑、固體或脫水或冷凍乾燥之粉末的形式儲存在小瓶中。這類調配物也可以立即可用之形式，或是例如在投藥前需要再組成的冷凍乾燥之形式來儲存。

最適宜的醫藥調配物，將由熟諳此藝者依據投藥的途徑及想要的劑量來決定。參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版(1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042)第1435-1712頁，其揭示內容合併於此以作為參考。該組合物也可以涉及特殊聚合化合物的製備，諸如多乳酸、多乙醇酸等等，或是在微脂粒內。也可以使用亥勞若尼酸(hyaluronic acid)，這可能具有在循環期間中促進維持的效果。這類組合物可能影響生理狀態、穩定性、在活體內的釋放速率，以及在活體內清除本發明蛋白質和衍生物的速率。

其他有效的投藥形式也是可以預見的，諸如非經腸的緩慢釋放之調配物、吸入的霧、具有口服活性的調配物或坐劑。目前將切截之GDNF蛋白質產物醫藥組合物調製成供非經腸投藥使用，例如腦室內注射。這類以非經腸方式投藥之治療組合物，通常以不含熱原、以非經腸方式可接受

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (58)

之含水溶液形式，其包括在藥學上可接受之載劑中的切截之GDNF蛋白質產物。一種較佳的載劑為生理鹽水。

也想要某種含有切截之GDNF蛋白質產物的口服調配物。以此種形式投藥的切截之GDNF蛋白質產物，可能被包封到膠囊中，也可與或不與在固體劑量形式混合時所習慣使用的那些載劑一起調製。可將膠囊設計成與胃腸道中的某一處釋放調配物的活性部份，此時生物利用率最大，而前-全身性降解作用為最小。可含有額外的賦形劑，以便促進切截之GDNF蛋白質產物的吸收。也可以使用稀釋劑、香料、低熔點的蠟、植物油、潤滑劑、懸浮劑、錠劑崩解劑和粘合劑。

切截之GDNF蛋白質產物的投藥

可經由皮下、肌肉內、靜脈內、經肺、經皮、脊髓腔內或大腦內之途徑，以非經腸方式來投予切截之GDNF蛋白質產物。無法通過血-腦障礙的蛋白質生長因子，可直接以大腦內的方式給予，或是與其他可將其運送通過該障礙的要素結合。以腦室內方式投予切截之GDNF蛋白質產物，或使其進入大腦或脊髓蜘蛛膜下腔是較佳的。也可以大腦內之方式將切截之GDNF蛋白質產物直接投予至大腦實質中。在大腦中緩慢-釋放的植入器，含有被埋在可經生物降解之聚合物基質中的神經營養因子，也可以遞送切截之GDNF蛋白質產物。切截之GDNF蛋白質產物，可利用已經以化學方式修改或加以包裝而使其得以通過血-腦障礙的形式，以大腦外的方式來投予，或是可將其與一或多種能夠

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(59)

促進切截之GDNF蛋白質產物通過該障礙之通透性的試劑連結，再投予之。例如，已經顯示NGF和單株抗-鐵傳遞蛋白受體抗體的共軛物，經由與鐵傳遞蛋白受體的結合而被運送至大腦。要達到切截之GDNF蛋白質產物的想要劑量，可每天重複投藥或以較低之頻率注射，或是可將切截之GDNF蛋白質產物從恆定-或可設計之-慢速植入幫浦中連續或定時地輸液。劑量的頻度將依據如何調配切截之GDNF蛋白質的藥物動力學參數以及投藥的途徑來決定。

不考慮投藥的方式，通常根據體重或體表面積來計算特定的劑量。關於涉及大腦的疾病，通常根據患者的概略腦重來計算特定的劑量，這也可以按體重或體表面積為基礎來建立。決定適當治療劑量所需要的更精確計算，涉及每種由熟諳此藝者日常製造的上文提及之調配物，尤其是根據在本文中揭示的劑量資訊和分析。經由使用確定劑量的建立分析，連同使用適當的劑量-反應數據，可以探知適當的劑量。涉及治療特定狀況之方法的最終劑量攝生法，將由負責照顧的主治醫師，考量各種修改藥物作用的因子來決定，例如患者的年齡、狀況、體重、性別和飲食、任何感染的嚴重性、投藥時間及其他臨床因子。

也可以單獨或與其他治療神經疾病的生長因子混合使用本發明的切截之GDNF蛋白質產物。例如可將切截之GDNF蛋白質產物與神經生長因子混合，用來治療某些形式的神經疾病。此外，其他因子或其他分子，包括化學組合物，也可以與切截之GDNF蛋白質產物一起使用。在治療帕金森

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(60)

森氏症時，企圖單獨使用切截之GDNF蛋白質產物，或是結合左旋多巴胺(Levodopa)的投予，其中切截之GDNF將會促進內源性多巴胺的產製，並促使神經攝取增加濃度的多巴胺。

如同上述，亦期待額外的神經營養或神經元營養因子，對於治療某些神經元細胞群或某種類型之傷害或疾病將是有用的或必需的。可與切截之GDNF一同使用的其他因子包括但不限於：有絲分裂原，如胰島素、類-胰島素生長因子、上皮生長因子、影響血管之生長因子、腦下垂體腺苷酸環化酶活化多肽、干擾素和生長激素釋放抑制因子；神經營養因子，如腦衍生之神經營養因子，神經營養素-3、神經營養素-4/5、神經營養素-6、類-胰島素生長因子、纖毛的神經營養因子、酸性及鹼性之纖維母細胞生長因子、纖維母細胞生長因子-5、轉化生長因子- β 、可卡因-苯異丙胺調節轉錄本(CART)和成熟的GDNF；以及其他的生長因子，如上皮生長因子、白血病抑制因子、介白素、干擾素，以及菌落刺激因子；還有與這些因子功能相等的分子和物質。

期望切截之GDNF蛋白質產物的連續投藥或持續遞送，可有利於特定的治療。連續投藥可經由機械方式來完成，像是利用輸液幫浦，企圖實施連續或接近連續投藥的其他模式。例如，化學衍生作用可產生持續釋放形式的蛋白質，其具有以可預測之含量連續出現在血流中的效果，該含量係以已經決定的劑量攝生法為基礎。因此，切截之GDNF

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁶¹⁾

蛋白質產物，包括進行衍生以便實現這類連續投藥的切截之GDNF蛋白質。

切截之GDNF蛋白質的細胞療法也是令人期待的，例如大腦內移植產製切截之GDNF蛋白質的細胞。本發明的具體實施例包括將能夠合成並分泌具有生物活性形式的切截之GDNF蛋白質移殖到患者的細胞內。這類產製切截之GDNF蛋白質的細胞，可以是無法正常產製神經營養因子，但是被修改成產製切截之GDNF的細胞，或是藉著利用適合表現和分泌切截之GDNF蛋白質的聚核苷酸來轉化，已經將其產製GDNF的能力增強的細胞。為了減少患者因投予外來物種之GDNF引起可能的免疫反應，該細胞最好是人類來源的並能產製切截之人類GDNF蛋白質。

可將移殖細胞包封於膠囊中，以免細胞浸潤到腦組織內。可利用生物可相容的半透性聚合包封物或膜，將人類或非人類的動物細胞移殖到患者體內，其容許切截之GDNF蛋白質產物的釋放，但防止該細胞被患者的免疫系統或其他來自周圍組織的有害因子破壞。另外，在活體外被轉化成產製切截之GDNF的患者自己的細胞，可直接移殖到患者體內，而不需要這類的包膠作用。

活細胞之膜包膠作用的方法學，是熟諳此藝者所熟悉的，並可完成包膠細胞的製備和將其移殖到患者體內的。參見例如美國專利第4,892,538號、5,011,472號和5,106,627號，將其揭示內容合併於此以作為參考。亦將包膠活細胞的方法描述於Aebischer等人的PCT申請案WO 91/10425中，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (62)

特別合併於此以作為參考。也可參見Aebischer等人的PCT申請案WO 91/10470；Winn等人，Exper. Neurol., 113：322-329, 1991；Aebischer等人，Exper. Neurol., 111：269-275, 1991；Tresco等人，ASAIO，38：17-23，1992，將其揭示內容合併於此以作為參考。

切截之GDNF蛋白質在活體外的基因療法也是令人期待的，其中將編碼切截之GDNF蛋白質的核酸序列直接導入患者體內。例如，經由局部注射帶有或不帶有適當遞送載體，如與腺苷酸有關之病毒載體的核酸構築體，將編碼切截之GDNF蛋白質的核酸序列導入目標細胞中。其他的病毒載體包括但不限於逆轉錄病毒、腺病毒、單純疱疹病毒和乳頭狀瘤病毒載體。在活體內的物理運送，可藉著局部注射想要的核酸構築體或其他含有想要之核酸序列的適當遞送載體、微脂粒-調節的運送、直接注射(裸露的DNA)、受體-調節的運送(配體-DNA複合物)或微粒撞擊(基因槍)來完成之。

應該注意到在本文中描述的切截之GDNF蛋白質產物調配物，可供獸醫和人類應用使用，而"患者"一詞不應該以限定的方式來解釋。在獸醫應用的案例中，劑量範圍應該與上文列舉的相同。

如同進一步描述本發明之切截之GDNF蛋白質的方法，可發展出與切截之GDNF蛋白質結合的抗體，像是在X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y胺基酸序列中的抗原決定位。熟諳此藝者可使用已熟知的公告程序，獲得專一性地辨認並與由

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(63)

本發明之胺基酸序列編碼的各種蛋白質結合的單株或多株抗體，或是重組抗體。然後可利用這類抗體來純化並定出切截之GDNF蛋白質的特徵。另外，也可以利用該抗體作為其管理之蛋白質的治療抑制劑。

藉由考量下列作為例證之實例，將會瞭解本發明的其他觀點和優點。實例1提出成熟之GDNF在哺乳動物細胞系統中的表現，和切截之GDNF蛋白質的製備。實例2提出成熟GDNF在細菌細胞系統中的表現。實例3提出各種切截之GDNF蛋白質在細菌細胞中的表現。實例4在多巴胺系神經元之神經營營養活性分析中，比較成熟GDNF蛋白質和切截之GDNF蛋白質的生物活性。

實例

實例1

成熟人類之GDNF在CHO細胞中的表現，以及CHO細胞衍生-切截之GDNF蛋白質的純化

材料

使用下列的材料，在二氫葉酸還原酶-缺乏的CHO細胞中(CHO^{d-}細胞；例如像是由Urlaub和Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (7): 4216-4220 (1980)描述的)表現人類的GDNF。

CHO^{d-}培養基含有：杜必可(Dulbecco's)經過修改的鷹氏培養基(DMEM)-高葡萄糖(Gibco/BRL)；5%胎牛血清(Hyclone)；MEM非-必需胺基酸(1%Gibco/BRL)；次黃嘌呤/胸腺核昔(1%)(Gibco/BRL)；以及穀胺醯胺/青

五、發明說明 (⁶⁴)

徽素 / 鏈徽素 (1%) (Irvine Scientific)。

選擇性培養基含有：DMEM(高葡萄糖)；5%經過透析的胎牛血清(HyClone)；MEM非-必需胺基酸；以及穀胺醯胺 / 青徽素 / 鏈徽素。

2X HEPES-緩衝的生理鹽水(HBS)含有：280 mM NaCl；10 mM KCl；1.5 mM Na₂HPO₄；12. mM右旋糖；和 50 mM HEPES。

Tris-緩衝的生理鹽水加上吐溫(TBST)含有：137mM NaCl；20mM Tris/HCl pH 7.5；和 0.1%吐溫-20。

方法

轉移感染和選擇

將 CHOd⁻細胞(繼代20次)播種到60毫米的組織培養盤(Falcon)中，在 CHOd⁻生長培養基中的濃度為每盤 8×10^5 個細胞。在第二天時，於轉移感染之前大約3小時，以新鮮的培養基更換細胞上的培養基。

利用已熟知的技術製備含有適當之GDNF cDNA的質體構築體。例如，大體上根據描述在同一作者且同在申請中，1990年3月29日提出申請的美國專利申請案序列編號501,904(也可參見1990年5月18日提出申請之歐洲專利申請案第90305433，公告編號歐洲專利398 753號，以及WO 90/14363 (1990)，將其揭示內容合併於此以作為參考)中的過程，來製備質體構築體pDSR α 2。說明載體之結構組織的典型質體與圖描述於圖2中。熟諳此藝者將會知曉各種編碼成熟之GDNF蛋白質的核酸序列，也可以使用諸如圖1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁶⁵⁾)

、3和4中描述的序列。

藉著限制酶消化作用從以 pcDNA3 為基礎的表現載體 (Invitrogen, San Diego, CA) 中，將含有人類 GDNF 密碼序列的 HindIII-XbaI DNA 片段，和一致的 Kozak 序列 CCACC(ATG) 退回。將該 DNA 片段直接選殖到 HindIII/XbaI 切割的 pDSR α 2。所得的質體叫做 pSW5。在轉移感染之前，先在 PuvI 位置處將 pSW5 的 DNA 弄成直線。

pDSR α 2 (圖 2) 是質體 pCD 的衍生物 (Okayama & Berg, Mol. Cell Biol. 3 : 280-289, 1983)，具有三個主要的修改：(i) 已經利用得自牛促濾泡激素之 α -亞單元， α -bFSH (Goodwin 等人，Nucleic Acids Res. 11 : 6873-6882, 1983) 的信號來代替 SV40 聚腺苷酸化的信號；(ii) 已經將老鼠二氫葉酸還原酶的迷你基因 (Gooser 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. 79 : 6522-6526, 1982) 插入表現卡匣的下游，以便容許轉化物的選擇和擴大；以及 (iii) 按照先前的描述 (Takebe 等人，Mol. Cell. Biol. 8 : 466-472, 1988)，已經將含有 "R-要素" 的 267bp 片段和人類 T-細胞白血病病毒 1 型 (HTLV-1) 之長終端重複段 (LTR) 的 "U5" 序列部份，選殖並插入 SV40 啟動基因和接合信號之間。

製備含有終濃度 3.0 微克 / 盤的 GDNF-質體 DNA，7.0 微克 / 盤的老鼠腎臟基因組媒體 DNA (Clontech)、25 微升 / 盤的 2.5M CaCl₂ 和終體積為 250 微升 / 盤之蒸餾水的 DNA 溶液。以類似方式製備單獨含有 pDSR α 2 載體 DNA 和媒體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁶⁶⁾)

DNA的DNA溶液，分別作為正和負對照組。將該DNA溶液築滴加至等體積的2X HEPES-緩衝的生理鹽水中，同時使氣泡通過該溶液。將DNA/HBS溶液培養在室溫下30分鐘。

從CHOd⁻細胞培養物中移除培養基，每盤中加入500微升的DNA溶液。在室溫下培養這些培養盤30分鐘，隨後將CHOd⁻培養基(5.0毫升)加至每盤中。然後將培養盤培養在37°C下過夜。

第二天，以新鮮的CHOd⁻培養基來更換培養基。隔天，當細胞達到匯合之時，以胰蛋白酶消化培養物，並以1x60毫米培養盤對8x100毫米培養盤之比例填滿100毫米之培養盤(Falcon)。以選擇培養基填滿細胞。每隔二到三天以新鮮的培養基再-餵食培養物。

在15天之後，利用玻璃選殖滾筒來分離已經轉移感染之細胞的菌落、以胰蛋白酶消化，並填滿到24-孔的培養盤(Falcon)內。從GDNF-pSW5轉移感染的細胞中總共分離出40個菌落。以胰蛋白酶消化培養盤中殘餘的細胞，收集並填滿到兩個100毫米培養盤內(每個DNA構築體一個集合)。

篩選轉移感染的細胞

使24-孔和集合培養物生長至匯合，在此時移除生長培養基，並以不含-血清的培養基(400微升/孔或4毫升/盤)來替換。培養細胞48小時，收獲經過調節的培養基。藉著西方墨點法來分析經過調節之培養基試樣的GDNF蛋白質

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁶⁷⁾)

之表現。以電泳試樣緩衝溶液(含有或不含 β -巰基乙醇)稀釋一等份經過調節的培養基(20微升或40微升)。將含有 β -巰基乙醇的試樣煮沸3分鐘(還原條件)。在16%的Tris-甘胺酸凝膠(Novex)上跑還原和未-還原的試樣。在硝基纖維素濾紙(Schleicher和Schuell BA-83, 0.2u)上對凝膠進行電子墨點分析。以TBST清洗墨點,然後在室溫下將其培養在含有5%無水牛奶(Carnation)之TBST的阻斷溶液中30分鐘。然後在室溫下以GDNF抗血清(對大腸桿菌衍生之GDNF會昇高的兔子多株抗體;在5%牛奶/TBST中為1:1000)處理墨點1小時。然後以TBST清洗墨點,並沖洗1x10分鐘,並以1%牛奶/TBST沖洗2x5分鐘。然後再以抗-兔子Ig的馬-蘿蔔過氧化酶-結合的二次抗體(在1%牛奶/TBST中為1:15,000)處理20分鐘。清洗墨點並以TBST沖洗1x20分鐘和2x10分鐘,隨後利用ECL試劑(Amersham)處理1分鐘,並暴露在高感軟片(Hyperfilm)-ECL(Amersham)下。

下列的過程說明從一公升經過調節的培養基中,純化CHO-表現之GDNF和CHO-衍生之經過修剪的GDNF同二聚體。因為在CHO培養基中有明顯的蛋白酶活動,所以剪去了在殘基31處的鏈,這個程序可包含在純化作用期間蛋白酶抑制劑的使用。

步驟1. 小珠層析法

藉著加入50分之1體積的1M MES, pH6.0, 將不含血清的調節培養基製成20mM 2-[N-嗎啉基]磺酸乙酯(MES),

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁶⁸⁾

pH6.0。加入25毫升以20 mM MES, pH6.0平衡過的SP瓊脂糖大珠樹脂(Pharmacia),並在4°C下攪拌1小時。藉著容許其沉降並慢慢倒出上方的調節培養基來收集樹脂。通過多孔圓盤濾紙過濾傾倒出的培養基,以便移除任何未沉降的樹脂。將沉降和藉著過濾回收的樹脂再懸浮,並倒入2.5公分直徑的管柱中,再以三倍管柱體積的0.15M NaCl、20mM MES, pH6.0(緩衝溶液A)沖洗之。利用300毫升從A緩衝溶液到1.0M NaCl、20mM MES, pH6.0(B緩衝溶液)的梯度,以0.2管柱體積/分鐘的流速來洗脫蛋白質,在280毫微米處以吸光度來監視。收集含有1.1管柱體積的溶離份。藉著西方墨點分析來檢測溶離份中GDNF的存在。收集含有GDNF的溶離份以供進一步的純化作用。在0.3到0.6M NaCl之間洗脫出GDNF。

步驟2. HPLC C4層析法

將得自步驟1之收集物溶解於0.1%(體積/體積)的三氟乙酸(TFA)中,通過0.45微米之濾紙真空過濾,並施用在以10%含水乙腈、0.1% TFA(緩衝溶液A)調整過的Vydac C4管柱(0.46x25公分)中。以2%/分鐘之直線梯度,在50分鐘內利用從A緩衝溶液到90%含水乙腈、0.1%TFA(B緩衝溶液)來洗脫蛋白質,在280毫微米處測量吸光度。收集1毫升的溶離份,藉著西方墨點分析來檢測溶離份中GDNF的存在。在45%到55%乙腈之間洗脫出GDNF。取得溶離份,以便在真空中脫水。

步驟3. 高效率S層析法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (69)

將得自步驟2含有GDNF的溶離份再度溶解於1毫升0.15M NaCl、10mM Tris, pH8.0中, 並施用在0.75x7.5公分的TSK-Gel 5WP高效率S管柱(Toso Haas)中。在50分鐘內, 以1毫升/分鐘之流速, 進行從0.15M NaCl、10mM Tris, pH8.0(A緩衝溶液)到1.0M NaCl、10mM Tris, pH8.0(B緩衝溶液), 0.4%/分鐘的直線梯度。收集一分鐘的溶離份並在280毫微米處測量吸光度。在35%B緩衝溶液之處, 在10分鐘內將梯度改變成6.5%/分鐘。溶離份的西方墨點分析顯示出四個主要的GDNF成份。在0.4%/分鐘梯度的期間, 洗脫出其中三個成份, 而在6.5%/分鐘梯度期間中洗脫出第四個。以同類的成份來製造適當的收集物, 並使其接受訂定序列。訂定序列的分析確認了大約29-36kD之收集物即為[Arg³²-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質。在大約38-40kD處之成份被確認為[Arg³²-Ile¹³⁴]切截之GDNF/成熟GDNF雜二聚體。最後, 在梯度的較晚部份期間中被分離出的大約41-44kD之成份, 藉著訂定序列確認其為成熟之GDNF同二聚體。

實例2

在大腸桿菌中產製成熟人類的GDNF

在細菌中表現成熟人類的GDNF, 可根據描述在Lin等人(1994年5月23日提出申請的美國專利申請案第08/182,183號; 及其母申請案; 1992年9月17日提出申請的PCT/US92/07888(WO 93/06116); 以及歐洲專利申請案第92921022.7號(公告編號: 歐洲專利610 254號); 將其揭示

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁷⁰)

內容合併於此以作為參考)中的方法來完成。以本發明之說明為基礎，熟諳此藝者將會知曉各種可以容易使用，或適合在大腸桿菌及其他細菌之適當表現的材料和方法。例如，也可以在表現方法中使用另外的聚核苷酸，像是在圖1、3或4中描述的那些。

經過表現之成熟GDNF的再摺疊及純化

在5°C下(除非另外指定)，按照下述來處理經過轉化的細胞；利用含有5mM EDTA的25mM Tris，pH8.5，將細胞糊懸浮至終體積為200毫升，產生15%(重量/體積)的終細胞淤漿。利用Biospec手握式低剪力均質機使細胞徹底分散。使該淤漿以14,500磅/平方英尺通過微量流化器(microfluidizer)兩次，以便弄破細胞並釋放出包涵體。然後以16,000xg離心所得的勻漿30分鐘。藉著再懸浮於冷卻水中至240毫升之終體積，沖洗從離心作用中獲得的包涵體小球，利用Biospec均質機，如前，形成淤漿。保留該淤漿之試樣以供GDNF表現程度的HPLC分析使用。以16,000xg離心剩餘的淤漿30分鐘。拋棄上清液，將少量的冷水加至離心瓶中並溫和的攪動，以便移除在包涵體小球頂端上方鬆散形成的細胞膜層。以Biospec均質機，利用足夠體積之冷水將小球再懸浮，產生濃度為2毫克/毫升的GDNF。然後藉著使最終的包涵體懸浮液(25毫升)與含有180mM半胱胺酸HCl和50mM Tris HCl，pH 8.7的8M胍HCl(25毫升)混合，而將包涵體溶解。在25°C下攪拌溶解混合物60到90分鐘，隨後將其倒入含有20mM Tris HCl，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁷¹)

pH 8.75 和 0.2M 胍 HCl 的 2M 尿素 (450 毫升，在 5°C 下) 中，並加以混合。在 5°C 下慢慢地攪拌該再摺疊的混合物 72 小時。

按照下述將再摺疊之 GDNF 部份純化：在 5°C 下將醋酸鈉緩衝溶液 (250 毫升，pH 5) 加至再摺疊的混合物中，並迅速地攪拌，以冰醋酸將 pH 值調整到 5。藉著在 5°C 下以 13,600xg 離心 45 分鐘，移除所得的沉澱物。得自該離心作用的上清液，用來當作下一個純化步驟的裝填溶液，該步驟涉及使用 SP-大珠樹脂 (Pharmacia) 的陽離子交換層析法。在 5°C 下操作管柱，利用 20mM 醋酸鈉 (pH 5) 作為平衡、清洗和洗脫的緩衝溶液系統。以 5 倍管柱體積 (CV) 之 0.2N NaOH 洗滌樹脂床 (5 毫升)，然後以醋酸緩衝溶液 (5 CV) 平衡之。以 0.5 CV / 分鐘將裝填溶液 (190 毫升) 施用於管柱中，接著以相同的流速以 10 CV 醋酸緩衝溶液清洗。然後以 0.1 CV / 分鐘之流速，利用 20 CV 在醋酸緩衝溶液中 0.3 M 到 0.9 M 的 NaCl 直線梯度，將 GDNF 從樹脂中洗脫出來。藉著在 280 毫微米處的吸光度來監視管柱洗脫物，並收集經由 SDS-PAGE 分析的溶離份。從在 10% 峰高處的 GDNF 高峰前部到 10% 峰高處的高峰後部，收集含有 GDNF 的溶離份。在該收集物中的蛋白質完全是 GDNF，並依據所使用的產製品系，含有 32% 到 12% 污染物則為經過修改的 GDNF 形式。然後將收集物對 PBS 或其他配方之緩衝溶液進行透析，而在一些案例中，藉著超透析濃縮成 25 毫克 / 毫升。藉著逆相 HPLC、陽離子交換 HPLC、質譜分析及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁷²)

內毒素含量，定出藉此程序純化之GDNF野外型 and 類似物形式的特徵，以便比較製品純度與相對應之產製品系的關係。

實例3

在大腸桿菌中重組產製切截之GDNF

大體上根據在Lin等人(1994年5月23日提出申請之美國專利申請案第08/182,183號，在前)中描述的技術來產製典型的切截之GDNF蛋白質。也可以使用如同上述之其他細菌表現的材料和方法。大腸桿菌表現的切截之GDNF蛋白質包括[Pro²³-Ile¹³⁴]、[Arg³²-Ile¹³⁴]和[Gly³³-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質，分別如同圖5、6和7中的描述。按照圖5、6和7中的描述，建構編碼這些典型切截之GDNF蛋白質的聚核苷酸，但是也可以使用相對應的聚核苷酸，像是在圖1、3和4中描述的那些。藉著標準PCR程序，如圖在PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, Henry A. Erlich編著，Stockton Press, NY, 1989(第6章，Using PCR to Engineer DNA)中所描述的，來建構聚核苷酸，將其揭示內容合併於此以作為參考。

實例4

多巴胺系神經元神經營養活性的生物分析

在定性的基礎上，評估實例3的[Pro²³-Ile¹³⁴]、[Arg³²-Ile¹³⁴]、[Gly³³-Ile¹³⁴]和[Lys³⁷-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質，及實例1的CHO-衍生之[Arg³²-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質，它們促進黑質之多巴胺系神經元攝

五、發明說明 (⁷³)

取多巴胺的能力。

材料

在評估多巴胺系神經元在切截之GDNF蛋白質存在下的存活分析中，使用下列的材料：

細胞培養基

高葡萄糖-杜必可經過修改的鷹氏培養基(DMEM；目錄#11965-092)、漢氏(Ham's)F12培養基(F12；#11765-021)、不含碳酸氫鈉的賴伯菲崔氏(Leibovitz's)L15培養基(#41300-039)、B27培養基添加物(#17504-010)、青黴素／鏈黴素(#15070-014)、L-穀胺醯胺(#25030-016)、杜必可磷酸-緩衝的生理鹽水(D-PBS；#14190-052)、含有鈣和鎂鹽之漢克氏(Hank's)平衡鹽溶液(HBSS；#24020-026)、N-2-羥乙基六氫吡啶-N'-2-乙烷磺酸(HEPES；#15630-015)、老鼠昆布胺酸(1 α -minin)(#23017-015)，以及牛血清白蛋白餵份V(#110-18-017)，均得自GIBCO，Grand Island，NY。熱-失活的馬血清，得自HyClone，Logan，Utah。伴清蛋白(C-7786)、多-L-鳥胺酸 氫溴化物(P-3655)、牛胰島素(I-5500)、人類鐵傳遞蛋白(T-2252)、腐胺(P-6024)、黃體酮(P-6149)、亞硒酸鈉(S-9133)、米翠醯胺(metrizamide)(M-3383)，均得自Sigma Chemical Company，Saint-Louis，MO。木瓜蛋白酶、脫氧核糖核酸酶(DNA酶)，以及卵清蛋白(木瓜蛋白酶解離系統)均得自Worthington Biochemicals，Freehold，NJ。

Falcon滅菌的96-孔微量培養盤(#3072)、組織培養的塑

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁷⁴)

膠製品和聚丙烯離心管，均得自 Becton-Dickinson，Oxnard，CA。Nunc Lab-Tek 組織培養室的保護玻璃 (#136439) 係得自 Baxter，Irvine，CA；20 微米 (#460) 尼龍網係得自 Tetko，Elmsford，NY；而 4" 解剖鑷子和 4" 解剖剪刀係得自 Roboz Surgical，Washington，DC。

抗體和相關試劑

多株的兔抗-酪胺酸羥化酶抗體 (TE101)，係得自 Eugene Tech，Ridgefield Park，NJ；多株的兔抗-神經元專一性之烯醇酶抗體 (NSE AB051) 係得自 Chemicon，Temecula，CA；以及生物素基化之羊抗-兔 IgG 和過氧化酶-連結的抗生物素蛋白 / 生物素複合物 (ABC Elite；Vectastain kit PK-6100) 係得自 Vector Laboratories，Burlingame，CA。3',3'-二胺基聯苯胺係得自 Cappel Laboratories，West Chester，PA。在 PBS 中的超阻擋之封阻緩衝溶液 (#37515) 係得自 Pierce Chemical Company，Rockford，IL。三通 X-100 (X100)、Nonidet P-40 (N6507) 過氧化酶 (30%，體積 / 體積；H1009) 係得自 Sigma。GBR-12909 多巴胺攝取抑制劑 (D-052) 係得自 RBI，Natick，MA。³H-多巴胺 (氘化的多巴胺，NE-131；21 居里 / 毫莫耳) 係得自 New England Nuclear，Boston，MA。光相超混合閃爍雞尾酒 (Optiphase Supermix scintillation cocktail) 係得自 Wallac，Turku，Finland。White ViewPlate-96 孔微量培養盤 (#6005182) 係得自 Packard Instruments Corporation，Meriden，CT。除非另行指定，所有其他的試劑均獲自 Sigma Chemical

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (75)

Company。

培養基之製備

按照DMEM和F12的1:1混合物來製備基礎培養基，並補充B27培養基添加物，做成50倍濃縮的母溶液。加入L-穀胺醯胺至大約2mM的終濃度，青黴素至大約100IU/公升，和鏈黴素至大約100毫克/公升的終濃度。加入熱-失活的馬血清至大約15%的終濃度。在混合之後，將pH值調整到大約7.3，並將培養基保持在4°C下。在使用之前才製備新鮮的培養基，以便將實驗中的變數減到最少。完全使用塑膠的吸移管和容器，以便減少蛋白質的吸附。

培養物底層

要促進底層神經元的最佳附著和軸突的自然生長，藉著按照下述連續塗覆多-L-鳥胺酸和昆布胺酸，來修改微量滴定盤的表面(培養物底層)。以0.1毫克/毫升在0.1M硼酸(pH8.4)中的滅菌多-L-鳥胺酸溶液，在室溫下完全塗覆盤的表面至少1小時，接著以超級Q水滅菌沖洗。然後吹乾沖洗的水，加入1.0微克/毫升在PBS中的老鼠昆布胺酸溶液，並在37°C下培養2小時。在使用滴定盤之前才進行這些程序，以便確保結果的可再現性。

製備大鼠胚胎的黑質培養物

利用大鼠胚胎的腦作為黑質之多巴胺系神經元的來源。使用確定懷孕時間之Sprague-Dawley鼠的15日齡胚胎。每個實驗最多處理36個胚胎。藉著暴露在CO₂下殺死懷孕鼠，以解剖剪刀打開牠們的腹腔，並從子宮中移出胎兒。然

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (76)

後切開胎兒的腦，清除血和腦膜，並利用明確定義的解剖界標 (Altman和 Bayer, Atlas of Prenatal Rat Brain Development, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995) 切開含有黑質的大腦腳蓋腹面區域。將該組織收集在冰冷的D-PBS中，移至10毫升的解離培養基(在HBSS中有120單位的木瓜蛋白酶和2000單位的DNA酶)中，然後在大約37°C下，在旋轉平台式振盪器上以大約200rpm培養45分鐘。然後通過火琢的巴斯德吸移管，藉著研製使細胞分散，通過20微米的Nitex網來篩選，以便拋棄未解離的組織，並利用IEC臨床離心機以200xg將其離心5分鐘。將所得的細胞小球再懸浮於含有卵清蛋白和大約500單位之DNA酶的HBSS中，在頂部的層中含有4%卵清蛋白溶液(在HBSS中)，並以500xg離心大約10分鐘。將最後的小球再懸浮於完整的培養基中(參見上文)，調節成大約28,000細胞/毫升，並按每一等份(90微升)播種到預先以多-烏胺酸和昆布胺酸塗覆之6毫米-孔的96-孔微量培養盤中。迅速地發生細胞的附著，而形成平面的效力約為75%。

多巴胺系神經元的免疫組織化學

按照下述，利用稍加修改、由Louis等人(J. Pharmacol. Exp. Therap., 262: 1274-1283, 1992; Science, 259: 689-692, 1993)描述的間接免疫過氧化酶法，定出多巴胺系神經元在黑質培養物中的特徵。在室溫下，以在D-PBS中4%的仲甲醛，pH7.4固定該培養物30分鐘，接著以D-PBS(每個6-毫米孔各200微升)沖洗三次。然後將已經固

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (77)

定的培養物培養在PBS中、含有1%NP-40的超阻擋之封阻緩衝溶液中，以便增加抗體的滲透性。然後以在相同的緩衝溶液中大約1:2000的稀釋度，來應用一級兔抗-酪胺酸羥化酶抗體，並在37°C下，在旋轉振盪器上培養1小時。以D-PBS沖洗三次之後，利用大約1:500稀釋度的羊-抗-兔生物素基化之IgG來檢測已經結合的抗體；將這些二次抗體與細胞一起培養在37°C下大約1小時。然後以D-PBS沖洗該細胞三次，並以稀釋成1:500的抗生物素蛋白-生物素-過氧化酶複合物來檢測二次抗體，並將該細胞培養在37°C下大約45分鐘。以D-PBS沖洗三次此上之後，使該培養物在含有0.04% 3',3'-二胺基聯苯胺-(HCl)₄、0.06% NiCl₂和0.02%過氧化氫的0.1M Tris-HCl, pH 7.4中反應5-20分鐘。

決定神經元的存活

按照上述固定黑質培養物，並免疫染色處理之，然後在200X放大倍率下以亮-光光學來檢查。計算在96-孔微量培養盤全部的6-毫米孔中，被酪胺酸羥化酶染色之神經元的數目。定出存活神經元有關具有形狀規則的細胞體、帶有主要類似軸突之突起和數個類似樹突之突起等特徵。從計數中排除顯示變性徵兆的神經元，如具有不規則、空泡化的核外原漿(perikarya)或破碎的軸突(然而，大部份的變性神經元都脫離培養物底層)。以TH-陽性神經元/6-毫米孔或相對於對照組多巴胺系神經元密度的倍率變化，來表示多巴胺系神經元細胞的數目。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (78)

決定多巴胺的攝取

在已經建立於white ViewPlate-96微量培養盤中的15日齡胚胎鼠黑質神經之培養物上，決定多巴胺的攝取。以預先-加溫的攝取緩衝溶液(約100微升)沖洗該培養物，該攝取緩衝溶液包括經過修改的Krebs-Ringer溶液，pH7.4，含有大約 120mM NaCl、4.7 mM KCl、1.8mM CaCl₂、1.2mM MgSO₄、32mM NaHPO₄、1.3mM EDTA和 5.6mM D-葡萄糖。攝取緩衝溶液亦含有1mM抗壞血酸和50uM優降寧(pargyline)，以避免多巴胺的氧化。然後在37°C下將該細胞預培養在攝取緩衝溶液中大約10分鐘。然後以在75微升攝取緩衝溶液中約有50nM的濃度，將氙化的多巴胺(³H-DA，21居里/毫莫耳)加至黑質培養物中，並在37°C下培養該培養物大約60分鐘。藉著將培養物與含有多巴胺攝取抑制劑GBR-12909(1uM)的攝取緩衝溶液一起培養，定出非-特異性多巴胺的攝取。非-專一性的攝取大約相當於低於1%的總攝取量。藉著抽吸培養基，接著以冰冷的攝取緩衝溶液(約120微升)迅速沖洗三次，而中止該攝取分析。然後藉著加入光相超混合閃爍雞尾酒(200微升)將細胞溶解，並藉著閃爍分光測定法，利用Wallac MicrobetaPlus 96-孔微量培養盤計數器定出放射性(也就是說，藉著在培養物中殘留之氙的閃爍計數來分析多巴胺的攝取)，以dpm/6-毫米孔或相對於對照組培養物的倍率變化來表示結果。

分析

多巴胺系神經元的存活和形態學上的發展

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁷⁹)

使用富含多巴胺系神經元之15日齡胚胎(E15)鼠黑質的培養物，並出切截之GDNF蛋白質對多巴胺系神經元存活之影響。使該培養物在單獨以多-烏胺酸和昆布胺酸-塗覆之96-孔微量培養盤中，或是在各種濃度(範圍從約1微微克/毫升到約10毫微微克/毫升)的下列蛋白質的存在下生長高達6天：大腸桿菌-表現的成熟hGDNF；大腸桿菌-表現的 $[\text{Pro}^{23}\text{-Ile}^{134}]$ 、 $[\text{Arg}^{32}\text{-Ile}^{134}]$ 、 $[\text{Gly}^{33}\text{-Ile}^{134}]$ ，以及 $[\text{Lys}^{37}\text{-Ile}^{134}]$ 切截之GDNF蛋白質；CHO細胞-表現的成熟hGDNF，以及CHO細胞衍生的 $[\text{Arg}^{32}\text{-Ile}^{134}]$ 切截之GDNF蛋白質。培養基由DMEM/F12構成，補充有15%熱-失活馬血清(E15培養物)或2.5%熱-失活馬血清、D-葡萄糖、HEPES、胰島素和鐵傳遞蛋白(P6培養物)。酪胺酸羥化酶(TH)的免疫染色，使用在多巴胺生物合成作用中的速率-限制酵素，作為多巴胺系神經元的標記。因為在菱腦中具有正腎上腺素功能的神經元在TH染色上也是陽性的，因此特別小心地切開受限於中腦之大腦腳蓋腹面的區域，並避開含有正腎上腺功能之細胞體的較尾端區域。在6天之後，該E15培養物通常含有大約70%的神經元，係由神經元專一性的稀醇酶免疫染色法(上述)確認之，以及30%非-神經元之細胞(其具有扁平、暗相位的外觀)；多巴胺系神經元佔神經元族群約10-15%。

在6天之後，以仲甲醛固定該培養物，並進行酪胺酸羥化酶之免疫染色，它是確認在這些培養物中之多巴胺系神經元的標記。在亮場光學下計算出現在6-毫米孔中所有的酪

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (80)

胺酸-羥化酶-陽性之神經元。對每個實驗條件分析3到6個不同的孔。以在對照組培養物中發現的酪胺酸-羥化酶-陽性之神經元數目的百分比來表示結果。

以1.0毫微克/毫升之GDNF、CHO細胞-表現之GDNF或大腸桿菌-表現之GDNF處理的E15黑質培養物，分別含有比未處理對照組培養物多大約38%和27%的TH-具有免疫反應性之神經元，暗示兩種GDNF物種都促進了多巴胺系神經元的存活。以1.0毫微克/毫升切截之GDNF蛋白質處理的E15黑質培養物，顯示在活體外6天後的培養物上，於TH-陽性神經元的數量上有類似的增加；CHO細胞-衍生的[Arg³²-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質為42%；而大腸桿菌-表現的[Arg³²-Ile¹³⁴]和[Gly³³-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質則分別為26%和17%。

對照組培養物與利用成熟和切截之GDNF蛋白質處理之培養物的比較，亦顯示所有的GDNF蛋白質對於多巴胺系神經元之形態學分化上的顯著影響。確認[Arg³²-Ile¹³⁴]和[Gly³³-Ile¹³⁴]切截之GDNF蛋白質的效果，和它們各自的成熟GDNF蛋白質對應物相同。比起對照組培養物中TH-陽性的神經元，在所有以GDNF處理過培養物中，具有TH-免疫反應性的神經元明顯地擁有較複雜且更廣泛的軸突之樹狀分枝，以及較高程度的軸突分支和整體上較大的軀幹尺寸。

多巴胺攝取

多巴胺攝取係測量高親和力之多巴胺再攝入運送者位置

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (81)

的數目和活性，並反映出多巴胺系神經元的功能性分化。在6天之後、在活體外、含有或不含成熟GDNF或切截之GDNF蛋白質的E15鼠黑質培養物中，測量多巴胺的攝取。在這些培養物中，多巴胺的攝取具有多巴胺系神經元的藥學輪廓特徵，也就是說它被1.0uM GBR-12909，一種對多巴胺系神經元有專一性的多巴胺運送者抑制劑，幾乎完全地阻斷了($ID_{50}=20nM$)。這顯示多巴胺攝取的測量值，並未反映出污染之具有正腎上腺素功能系之神經元的出現，該神經元能夠經由正腎上腺素運送者來攝取多巴胺，但是對GBR-12909的抑制作用不具有敏感性。確認CHO-細胞-表現的成熟GDNF和CHO-衍生的 $[Arg^{32}-Ile^{134}]$ 切截之GDNF蛋白質的效果：關於大約20微微克/毫升之 ED_{50} ，增加了大約65%。證實如圖5所述之大腸桿菌-表現的 $[Pro^{23}-Lys^{37}\Delta Asn^{37}-Ile^{134}]$ 切截之GDNF蛋白質，關於大約40微微克/毫升之 ED_{50} ，增加了大約65%。大腸桿菌-表現的成熟蛋白質，以及大腸桿菌-表現之 $[Arg^{32}-Ile^{134}]$ 、 $[Gly^{33}-Ile^{134}]$ 和 $[Lys^{37}-Ile^{134}]$ 切截之GDNF蛋白質對多巴胺攝取的影響也是相同的：關於大約50微微克/毫升之 ED_{50} ，增加了大約50%。

這些結果顯示，切截之GDNF蛋白質作用就像是黑質多巴胺系神經元的可能促進-存活及誘發-分化之因子。如此，期望它們在治療帕金森氏症、情緒敏銳度降低、隨意和不隨意肌的運動變慢、肌肉強直和顫抖之特徵的神經學失調，是特別有用的。這類症狀被認為是位在黑質之產製多巴

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁸²)

胺的神經元之進行性變性的結果。這些神經元("多巴胺系神經元")的變性，導致大腦內叫做紋狀體的鄰近區域中多巴胺的減少。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁸³⁾)

序列一覽表

(1) 共同訊息

(i) 申請者：Hu. Sylvia

(ii) 發明標題：切截之神經膠質細胞株-衍生的神經營養因子

(iii) 序列數目：50

(iv) 通信地址：

(A) 收件人：AMGEN INC.

(B) 街道：1840 DeHavilland Drive

(C) 城市：Thousand Oaks

(D) 州：California

(E) 國家：United States of America

(F) 郵遞區號：91320

(v) 電腦可讀形式：

(A) 媒體型式：軟碟

(B) 電腦：IBM PC 可相容的

(C) 操作系統：PC-DOS / MS-DOS

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

(vi) 最近的申請資料：

(A) 申請號碼：

(B) 建檔日期：

(C) 分類：

(viii) 律師 / 代理人之資訊：

(A) 姓名：Curry, Daniel R.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁸⁴)

(B) 註冊號碼：32,727

(C) 參考資料 / 摘要號碼：A-357

(ix) 電信資料：

(A) 電話：805-447-8102

(B) 傳真：805-499-8011

(C) 電傳：

(2) 序列識別1號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：402個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：蛋白質

(ix) 特徵：

(A) 名稱 / 關鍵：CDS

(B) 位置：1...402

(xi) 序列說明：序列識別1號：

TCA	CCA	GAT	AAA	CAA	ATG	GCA	GTG	CTT	CCT	AGA	AGA	GAG	CGG	AAT	CGG	48
Ser	Pro	Asp	Lys	Gln	Met	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	
1				5					10					15		
CAG	GCT	GCA	GCT	GCC	AAC	CCA	GAG	AAT	TCC	AGA	GGA	AAA	GGT	CGG	AGA	96
Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	
			20					25					30			
GGC	CAG	AGG	GGC	AAA	AAC	CGG	GGT	TGT	GTC	TTA	ACT	GCA	ATA	CAT	TTA	144
Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly	Cys	Val	Leu	Thr	Ala	Ile	His	Leu	
		35					40					45				

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (85)

AAT GTC ACT GAC TTG GGT CTG GGC TAT GAA ACC AAG GAG GAA CTG ATT 192
 Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile
 50 55 60

TTT AGC TAC TGC AGC GGC TCT TGC GAT GCA GCT GAG ACA ACG TAC GAC 240
 Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp
 65 70 75 80

AAA ATA TTG AAA AAC TTA TCC AGA AAT AGA AGG CTG GTG AGT GAC AAA 288
 Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys
 85 90 95

GTA GGG CAG GCA TGT TGC AGA CCC ATC GCC TTT GAT GAT GAC CTG TCG 336
 Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Leu Ser
 100 105 110

TTT TTA GAT GAT AAC CTG GTT TAC CAT ATT CTA AGA AAG CAT TCC GCT 384
 Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala
 115 120 125

AAA AGG TGT GGA TGT ATC 402
 Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 130

(2) 序列識別 2 號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：134 個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：蛋白質

(xi) 序列說明：序列識別 2 號：

Ser Pro Asp Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg
 20 25 30

Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu
 35 40 45

Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile
 50 55 60

Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp
 65 70 75 80

Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys
 85 90 95

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁸⁶)

Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser
 100 105 110

Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala
 115 120 125

Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 130

(2) 序列識別3號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：4個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別3號：

Lys Asn Arg Gly
 1

(2) 序列識別4號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：5個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別4號：

Gly Lys Asn Arg Gly
 1 5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(88)

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：肽

(xi)序列說明：序列識別7號：

Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly
1 5

(2)序列識別8號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：9個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：肽

(xi)序列說明：序列識別8號：

Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly
1 5

(2)序列識別9號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：10個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：肽

(xi)序列說明：序列識別9號：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(91)

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別14號：

Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly
1 5 10 15

(2) 序列識別15號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：16個胺基酸
- (B) 類型：胺基酸
- (C) 股：單股
- (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別15號：

Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly
1 5 10 15

(2) 序列識別16號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：17個胺基酸
- (B) 類型：胺基酸
- (C) 股：單股
- (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別16號：

Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg
1 5 10 15
Gly

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁹²)

(2) 序列識別 17 號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：18 個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別 17 號：

Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn
1				5				10						15	
Arg Gly															

(2) 序列識別 18 號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：19 個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別 18 號：

Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys
1				5				10						15	
Asn Arg Gly															

(2) 序列識別 19 號的訊息：

(i) 序列特徵：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (⁹³)

(A) 長度：20個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別19號：

Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly
1				5					10					15	
Lys	Asn	Arg	Gly												
			20												

(2) 序列識別20號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：21個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別20號：

Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg
1				5						10					15
Gly	Lys	Asn	Arg	Gly											
				20											

(2) 序列識別21號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：22個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁹⁴)

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：肽

(xi)序列說明：序列識別21號：

Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln
1			5					10						15	
Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly										
			20												

(2)序列識別22號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：23個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：肽

(xi)序列說明：序列識別22號：

Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly
1				5					10						15
Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly									
			20												

(2)序列識別23號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：24個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(⁹⁵)

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別 23 號：

Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg
1			5					10					15		
Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly								
			20												

(2) 序列識別 24 號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：25 個胺基酸
- (B) 類型：胺基酸
- (C) 股：單股
- (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別 24 號：

Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg
1				5					10					15	
Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly							
			20					25							

(2) 序列識別 25 號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：26 個胺基酸
- (B) 類型：胺基酸
- (C) 股：單股
- (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別 25 號：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (96)

Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly
1			5						10					15	
Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly						
			20					25							

(2) 序列識別 26 號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：27 個胺基酸
- (B) 類型：胺基酸
- (C) 股：單股
- (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別 26 號：

Arg	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys
1			5						10					15	
Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly					
			20					25							

(2) 序列識別 27 號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：28 個胺基酸
- (B) 類型：胺基酸
- (C) 股：單股
- (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別 27 號：

Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly
1				5						10				15	
Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly				
				20				25							

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(97)

(2) 序列識別 28 號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：29 個胺基酸
- (B) 類型：胺基酸
- (C) 股：單股
- (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別 28 號：

Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg
1			5						10					15	
Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly			
			20					25							

(2) 序列識別 29 號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：30 個胺基酸
- (B) 類型：胺基酸
- (C) 股：單股
- (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別 29 號：

Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser
1				5						10					15
Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly		
			20					25					30		

(2) 序列識別 30 號的訊息：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(98)

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：31個胺基酸
 (B) 類型：胺基酸
 (C) 股：單股
 (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別30號：

Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn
1			5				10						15		
Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly	
		20					25					30			

(2) 序列識別31號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：32個胺基酸
 (B) 類型：胺基酸
 (C) 股：單股
 (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別31號：

Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu
1				5				10						15	
Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly
			20					25					30		

(2) 序列識別32號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：33個胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(99)

(B)類型：胺基酸

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：肽

(xi)序列說明：序列識別32號：

Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro
1			5					10						15	
Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg
			20				25						30		
Gly															

(2)序列識別33號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：34個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：肽

(xi)序列說明：序列識別33號：

Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn
1				5					10					15	
Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn
			20				25						30		
Arg	Gly														

(2)序列識別34號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：35個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (100)

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：肽

(xi)序列說明：序列識別34號：

Met	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala
1				5					10					15	
Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys
			20					25					30		
Asn	Arg	Gly													
			35												

(2)序列識別35號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：36個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：肽

(xi)序列說明：序列識別35號：

Gln	Met	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala
1				5						10					15
Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly
				20					25					30	
Lys	Asn	Arg	Gly												
				35											

(2)序列識別36號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：37個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (101)

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：肽

(xi)序列說明：序列識別36號：

Lys	Gln	Met	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala
1				5					10					15	
Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg
			20					25						30	
Gly	Lys	Asn	Arg	Gly											
			35												

(2)序列識別37號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：38個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：肽

(xi)序列說明：序列識別37號：

Asp	Lys	Gln	Met	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Ala
1				5					10					15	
Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly	Gln
			20					25						30	
Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly										
			35												

(2)序列識別38號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：39個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (102)

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別 38 號：

Pro	Asp	Lys	Gln	Met	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln
1				5				10					15		
Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Gly
			20				25						30		
Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly									
			35												

(2) 序列識別 39 號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：417 個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別 39 號：

CATATGTCTC CGGATAAACA AATGGCTGTT CTTCCACGTC GTGAACGTAA CCGTCAGGCG 60
 GCCGCTGCTA ACCCGGAGAA TTCCCGTGGT AAAGGTCGTC GTGGTCAGCG TGGTAAAAAC 120
 CGCGGTTGCG TTCTGACCGC TATCCACCTG AACGTTACCG ACCTGGGTCT CGGTTACGAA 180
 ACCAAAGAAG AATTAATCTT CCGTTACTGC TCCGGTTCCT GCGACGC1GC TGAAACCACG 240
 TACGACAAAA TCCTGAAAAA CCTGTCCCGT AACCGTCGTC TGGTTCCGA CAAAGTTGGT 300
 CAAGCTTGCT GCCGTCCGAT CGCTTTCGAC GACGACCTGT CCTTCTGGA CGACAACCTG 360
 GTTTACCACA TCCTGCGTAA ACACTCCGCT AAGCGTTGCG GTTCCATCTA AGGATCC 417

五、發明說明⁽¹⁰³⁾

(2) 序列識別40號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：417個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：DNA

(xi) 序列說明：序列識別40號：

CATATGAGCC CGGACAAACA GATGGCAGTA CTTCCACGTC GTGAACGTAA TCGCCAGGCA 60
 GCAGCTGCAA ACCCGGAAAA CTCCCGTGGT AAAGGTCGCC GTGGCCAGCG CGGCAAAAAC 120
 CGTGGTTGTG TTCTGACTGC AATCCACCTG AACGTTACTG ACCTGGGTCT GGGCTACGAA 180
 ACCAAAGAAG AACTGATCTT CCGCTACTGC AGCGGCTCTT GCGACGCAGC TGAAACCACT 240
 TACGACAAAA TCCTGAAAAA CCTGTCCCGT AACCGCCGTC TGGTAAAGCGA CAAAGTAGGT 300
 CAGGCATGCT GCCGTCCGAT CGCATTGAC GATGACCTGA GCTTCCTGGA TGACAACCTG 360
 GTTTACCACA TCCTGCGTAA ACACGCCGCT AAACGCTGCG GTTGATCTA AGGATCC 417

(2) 序列識別41號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：345個鹼基對

(B) 類型：核酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：蛋白質

(ix) 特徵：

(A) 名稱／關鍵：CDS

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (104)

(B)位置：1..342

(xi)序列說明：序列識別41號：

ATG TCC CCA GAA AAT TCT CGT GGT AAA GGT CGT CGT GGT CAG CGT GGT	48			
Met Ser Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly				
135	140	145	150	
AAT AAC CGC GGT TGC GTT CTG ACC GCT ATC CAC CTG AAC GTT ACC GAC	96			
Asn Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp				
	155	160	165	
CTG GGT CTC GGT TAC GAA ACC AAA GAA GAA TTA ATC TTC CGT TAC TCC	144			
Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys				
	170	175	180	
TCC GGT TCC TGC GAC GCT GCT GAA ACC ACG TAC GAC AAA ATC CTG AAA	192			
Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys				
	185	190	195	
AAC CTG TCC CGT AAC CGT CGT CTG GTT TCC GAC AAA GTT GGT CAA GCT	240			
Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala				
	200	205	210	
TGC TGC CGT CCG ATC GCT TTC GAC GAC GAC CTG TCC TTC CTG GAC GAC	288			
Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp				
	215	220	225	230
AAC CTG GTT TAC CAC ATC CTG CGT AAA CAC TCC GCT AAG CGT TGC GGT	336			
Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly				
	235	240	245	
TGC ATC TAA	345			
Cys Ile				

(2)序列識別42號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：114個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：蛋白質

(xi)序列說明：序列識別42號：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (105)

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

(2) 序列識別 43 號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：315 個鹼基對
- (B) 類型：核酸
- (C) 股：單股
- (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：蛋白質

(ix) 特徵：

- (A) 名稱／關鍵：CDS
- (B) 位置：1..312

(xi) 序列說明：序列識別 43 號：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (106)

ATG CGT GGT CAA CGT GGT AAA AAC CGC GGT TGC GTT CTG ACT GCA ATC	48		
Met Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile			
115	120	125	130
CAC CTG AAC GTT ACT GAC CTG GGT CTG GGC TAC GAA ACC AAA GAA GAA	96		
His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu			
135	140	145	
CTG ATC TTC CGC TAC TGC AGC GGC TCT TGC GAC GCA GCT GAA ACC ACT	144		
Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr			
150	155	160	
TAC GAC AAA ATC CTG AAA AAC CTG TCC CGT AAC CGC CGT CTG GTA AGC	192		
Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser			
165	170	175	
GAC AAA GTA GGT CAG GCA TGC TGC CGT CCG ATC GCA TTC GAC GAT GAC	240		
Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp			
180	185	190	
CTG AGC TTC CTG GAT GAC AAC CTG GTT TAC CAC ATC CTG CGT AAA CAC	288		
Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His			
195	200	205	210
TCC GCT AAA CGC TGC GGT TGC ATC TAA	315		
Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile			
215			

(2) 序列識別44號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：104個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：蛋白質

(xi) 序列說明：序列識別44號：

Met	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly	Cys	Val	Leu	Thr	Ala	Ile
1				5					10					15	

His	Leu	Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Glu	Thr	Lys	Glu	Glu
			20				25						30		

五、發明說明 (108)

AAA GTA GGT CAG GCA TGC TGC CGT CCG ATC GCA TTC GAC CAT GAC CTG 240
Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu
170 175 180

AGC TTC CTG GAT GAC AAC CTG GTT TAC CAC ATC CTG CGT AAA CAC TCC 288
Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser
185 190 195 200

GCT AAA CGC TGC GGT TGC ATC TAA 312
Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
205

(2) 序列識別46號的訊息：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：103個胺基酸
- (B) 類型：胺基酸
- (C) 股：單股
- (D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：蛋白質

(xi) 序列說明：序列識別46號：

Met Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His
1 5 10 15
Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu
20 25 30
Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr
35 40 45
Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp
50 55 60
Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu
65 70 75 80
Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser
85 90 95
Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
100

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (109)

(2) 序列識別 47 號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：135 個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：蛋白質

(xi) 序列說明：序列識別 47 號：

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

(2) 序列識別 48 號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：104 個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (110)

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：蛋白質

(xi)序列說明：序列識別48號：

```

Met Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile
 1           5           10           15
His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu
           20           25           30
Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr
           35           40           45
Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser
 50           55           60
Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp
 65           70           75           80
Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His
           85           90           95
Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
           100

```

(2)序列識別49號的訊息：

(i)序列特徵：

(A)長度：103個胺基酸

(B)類型：胺基酸

(C)股：單股

(D)局部解剖學：直線狀

(ii)分子類型：蛋白質

(xi)序列說明：序列識別49號：

```

Met Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His
 1           5           10           15

```

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(111)

Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu
 20 25 30
 Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr
 35 40 45
 Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp
 50 55 60
 Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu
 65 70 75 80
 Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser
 85 90 95
 Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 100

(2) 序列識別50號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：114個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：蛋白質

(xi) 序列說明：序列識別50號：

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱:切截之神經膠質細胞株衍生神經營養因子)

本發明係揭示新穎的蛋白質,叫做切截之神經膠質細胞株衍生神經營養因子(切截之GDNF)蛋白質,它助長了多巴胺能細胞攝入多巴胺,並促進神經細胞的存活。亦揭示藉著重組的遺傳工程技術,獲得該切截之GDNF蛋白質的方法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要(發明之名稱: "TRUNCATED GLIAL CELL LINE-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR")

Disclosed are novel proteins, referred to as truncated glial cell line-derived neurotrophic factor (truncated GDNF) proteins, that promote dopamine uptake by dopaminergic cells and promote the survival of nerve cells. Also disclosed are processes for obtaining the truncated GDNF proteins by recombinant genetic engineering techniques.

訂

線

570926;
85 11 1819

圖 1

TCA	CCA	GAT	AAA	CAA	ATG	GCA	GTG	CTT	CCT	AGA	AGA	GAG	CGG	AAT
Ser	Pro	Asp	Lys	Gln	Met	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn
				5					10					15
CGG	CAG	GCT	GCA	GCT	GCC	AAC	CCA	GAG	AAT	TCC	AGA	GGA	AAA	GGT
Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly
				20					25					30
CGG	AGA	GGC	CAG	AGG	GGC	AAA	AAC	CGG	GGT	TGT	GTC	TTA	ACT	GCA
Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly	Cys	Val	Leu	Thr	Ala
				35					40					45
ATA	CAT	TTA	AAT	GTC	ACT	GAC	TTG	GGT	CTG	GGC	TAT	GAA	ACC	AAG
Ile	His	Leu	Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Glu	Thr	Lys
				50					55					60
GAG	GAA	CTG	ATT	TTT	AGG	TAC	TGC	AGC	GGC	TCT	TGC	GAT	GCA	GCT
Glu	Glu	Leu	Ile	Phe	Arg	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Asp	Ala	Ala
				65					70					75
GAG	ACA	ACG	TAC	GAC	AAA	ATA	TTG	AAA	AAC	TTA	TCC	AGA	AAT	AGA
Glu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Lys	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Ser	Arg	Asn	Arg
				80					85					90
AGG	CTG	GTG	AGT	GAC	AAA	GTA	GGG	CAG	GCA	TGT	TGC	AGA	CCC	ATC
Arg	Leu	Val	Ser	Asp	Lys	Val	Gly	Gln	Ala	Cys	Cys	Arg	Pro	Ile
				95					100					105
GCC	TTT	GAT	GAT	GAC	CTG	TCG	TTT	TTA	GAT	GAT	AAC	CTG	GTT	TAC
Ala	Phe	Asp	Asp	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Leu	Val	Tyr
				110					115					120
CAT	ATT	CTA	AGA	AAG	CAT	TCC	GCT	AAA	AGG	TGT	GGA	TGT	ATC	
His	Ile	Leu	Arg	Lys	His	Ser	Ala	Lys	Arg	Cys	Gly	Cys	Ile	
				125					130					

圖 5

[Pro²³-Lys³⁷ΔAsn³⁷-Ile¹³⁴]

ATGTCCCAGAAAATTCTCGTGGTAAAGGTCGTCGTGGTCAGCGTGGTAATAACCGCGGT
 21 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 80
 M S P E N S R G K G R R G Q R G N N R G*

TCGTCTGACCGCTATCCACCTGAACGTTACCGACCTGGGTCTCGGTTACGAAACCAAA
 81 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 140
 C V L T A I H L N V T D L G L G Y E T K

GAAGAATTAATCTTCCGTTACTGCTCCGGTTCCTGCGACGCTGCTGAAACCACGTACGAC
 141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 200
 E E L I F R Y C S G S C D A A E T T Y D

AAAATCCTGAAAAACCTGTCCCGTAACCGTCGTCCTGGTTTCCGACAAAGTTGGTCAAGCT
 201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 260
 K I L K N L S R N R R L V S D K V G Q A

TGCTGCCGTCCGATCGCTTTCGACGACGACCTGTCCCTCCTGGACGACAACCTGGTTTAC
 261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 320
 C C R P I A F D D D L S F L D D N L V Y

CACATCCTGCGTAAACACTCCGCTAAGCGTTGCGGTTGCATCTAA
 321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 H I L R K H S A K R C G C I *

圖 6

[Arg³²-Ile¹³⁴]

ATGCGTGGTCAACGTGGTAAAAACCGCGGTTGCGTTCTGACTGCAATCCACCTGAACGTT
 41 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 100
 M R G Q R G K N R G C V L T A I H L N V

ACTGACCTGGGTCTGGGCTACGAAACCAAAGAAGAACTGATCTTCCGCTACTGCAGCGGC
 101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 160
 T D L G L G Y E T K E E L I F R Y C S G

TCTTGCACGACGCTGAAACCACTTACGACAAAATCCTGAAAAACCTGTCCCGTAACCGC
 161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 220
 S C D A A E T T Y D K I L K N L S R N R

CGTCTGGTAAGCGACAAAGTAGGTCAGGCATGCTGCCGTCCGATCGCATTCGACGATGAC
 221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 280
 R L V S D K V G Q A C C R P I A F D D D

CTGAGCTTCCTGGATGACAACCTGGTTTACCACATCCTGCGTAAACACTCCGCTAAACGC
 281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 340
 L S F L D D N L V Y H I L R K H S A K R

TGCGGTTGCATCTAA
 341 -----+----- 355
 C G C I *

[Gly³³-Ile¹³⁴]

ATGGGTCAACGTGGTAAAAACCGTGGTTGTGTTCTGACTGCAATCCACCTGAACGTTACT
 41 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 100
 M G Q R G K N R G C V L T A I H L N V T

 GACCTGGGTCTGGGCTACGAAACCAAAGAAGAACTGATCTTCCGCTACTGCAGCGGCTCT
 101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 160
 D L G L G Y E T K E E L I F R Y C S G S

 TGCGACGCAGCTGAAACCACTTACGACAAAATCCTGAAAAACCTGTCCCGTAACCGCCGT
 161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 220
 C D A A E T T Y D K I L K N L S R N R R

 CTGGTAAGCGACAAAGTAGGTCAGGCATGCTGCCGTCCGATCGCATTTCGACGATGACCTG
 221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 280
 L V S D K V G Q A C C R P I A F D D D L

 AGCTTCCTGGATGACAACCTGGTTTACCACATCCTGCGTAAACACTCCGCTAAACGCTGC
 281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 340
 S F L D D N L V Y H I L R K H S A K R C

 GGTTGCATCTAA
 341 -----+--- 352
 G C I *

50

GDNF MSPDKQMAVL PRRERNRQAA AANPENSERGK GRRGQRGKNR GCVLTAIHLN
 -31 GDNFMRGQRGKNR GCVLTAIHLN
 -32 GDNFMGQRGKNR GCVLTAIHLN
 -22 GDNFMSPENSERGK GRRGQRGNNR GCVLTAIHLN

51

100

GDNF VTDLGLGYET KEELIFRYCS GSCDAAETTY DKILKNLSRN RRLVSDKVGQ
 -31 GDNF VTDLGLGYET KEELIFRYCS GSCDAAETTY DKILKNLSRN RRLVSDKVGQ
 -32 GDNF VTDLGLGYET KEELIFRYCS GSCDAAETTY DKILKNLSRN RRLVSDKVGQ
 -22 GDNF VTDLGLGYET KEELIFRYCS GSCDAAETTY DKILKNLSRN RRLVSDKVGQ

101

135

GDNF ACCRPIAFDD DLSFLDDNLV YHILRKHS AK RCGCI
 -31 GDNF ACCRPIAFDD DLSFLDDNLV YHILRKHS AK RCGCI
 -32 GDNF ACCRPIAFDD DLSFLDDNLV YHILRKHS AK RCGCI
 -22 GDNF ACCRPIAFDD DLSFLDDNLV YHILRKHS AK RCGCI

五、發明說明 (2)

亡(Rich等人, J. Neurocytol. 16:261, 1987; Otto等人, J. Neurosci. 83:156, 1987), 免於在胚胎發育期間個體發生的死亡(Hamburger等人, J. Neurosci. 4:767, 1984), 並免於因為投予紅豆杉醇(Taxol)和氯氮鉑(cisplatin)而引起的損傷(Apfel等人, Ann. Neurol. 29:87, 1991)。顯然大部份的保護已經將觀念帶領到: 如果神經營養因子保護易感受的神經元, 使其免於實驗性損傷, 則它們在患者身上治療涉及損傷那些神經元的疾病方面也可能是有用的, 即使可能還不知道病因。

特定的神經營養因子, 除了具有適當的神經元專一性以外, 在用於藥學治療時必須具有足夠的有效含量。因為神經營養因子通常以少量出現在組織中(例如, Hofer和Barde Nature 331:261, 1988; Lin等人, Science 246:1023, 1989), 因此直接從動物組織中製備藥學含量之神經營養因子, 將會是不便利的。另一種選擇, 是希望使用重組表現系統來產製想要的蛋白質。

Lin等人, 以前曾描述一種在黑質多巴胺系之神經元的胚胎前驅物上, 針對神經營養活性來篩選生物試樣的方法(參見1994年5月23日提出申請的美國專利申請案第08/182,183, 及它的母申請案; 1992年9月17日提出申請的PCT/US92/07888 (WO 93/06116); 以及歐洲專利申請案第92921022.7號(公告號碼, 歐洲專利610 254號); 其揭示內容均合併於此以作為參考)。可利用此種生物分析來確認能夠用來治療帕金森氏症的神經營養因子(Friedman等人,

六、申請專利範圍

92.11.11
 * 月 日
 修正
 補充

公告本

1. 一種具有 X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y 的胺基酸序列之切截神經膠質細胞株-衍生神經營養因子(GDNF)蛋白質產物，

其中

[Cys⁴¹-Cys¹³³] 由序列識別 2 號從 Cys⁴¹ 到 Cys¹³³ 所組成；

Y 代表 Cys¹³³ 之羧基終端基團，或 Ile¹³⁴ 之羧基終端的胺基酸殘基；且

X 代表 Cys⁴¹ 之甲硫胺醯基化或非甲硫胺醯基化的胺基，或選自下列基團之胺基終端的胺基酸殘基：

G

RG

NRG

KNRG (SEQ ID NO : 3)

GKNRG (SEQ ID NO : 4)

RGKNRG (SEQ ID NO : 5)

QRGKNRG (SEQ ID NO : 6)

GQRGKNRG (SEQ ID NO : 7)

RGQRGKNRG (SEQ ID NO : 8)

RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 9)

G RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 10)

KG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 11)

GKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 12)

六、申請專利範圍

RGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 13)

SRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 14)

NSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 15)

ENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 16)

PENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 17); 及

SPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 51)

或一 X 之保守性取代變體，其中該變體相較於上述 X 之胺基酸序列時，有超過 90% 之同一性(其中可於 100 個胺基酸長度時，導入 4 個缺口以協助排列)，且

其中該神經膠質細胞株-衍生神經營養因子蛋白質物質可提供多巴胺能細胞之神經營養性作用。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之切截之 GDNF 蛋白質產物，其中 X=RQAAA ANPENSRGKG RRGQRGKNRG(序列識別 24 號)。
3. 根據申請專利範圍第 1 項之切截之 GDNF 蛋白質產物，其中 X=NPENSRGKG RRGQRGKNRG(序列識別 18 號)。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之切截之 GDNF 蛋白質產物，其中 X=PENSRGKG RRGQRGKNRG(序列識別 17 號)。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之切截之 GDNF 蛋白質產物，其中 X=SRGKG RRGQRGKNRG(序列識別

六、申請專利範圍

14號)。

6. 根據申請專利範圍第1項之切截之GDNF蛋白質產物，其中X=RGQRGKNRG(序列識別8號)。
7. 根據申請專利範圍第1項之切截之GDNF蛋白質產物，其中X=GQRGKNRG(序列識別7號)。
8. 根據申請專利範圍第1項之切截之GDNF蛋白質產物，其中X=KNRG(序列識別3號)。
9. 根據申請專利範圍第1項之切截之GDNF蛋白質產物，其中X=NRG。
10. 根據申請專利範圍第1至9項中任一項之切截之GDNF蛋白質產物，其中該胺基酸序列為糖基化。
11. 根據申請專利範圍第1至9項中任一項之切截之GDNF蛋白質產物，其中該胺基酸序列為非糖基化。
12. 根據申請專利範圍第1項之切截之GDNF蛋白質產物，其中X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y與水溶性聚合物共軛。
13. 一種編碼根據申請專利範圍第1項之切截之GDNF蛋白質的聚核苷酸。
14. 根據申請專利範圍第13項之聚核苷酸，其由以下序列所組成：

六、申請專利範圍

TCA	CCA	GAT	AAA	CAA	ATG	GCA	GTG	CTT	CCT	AGA	AGA	GAG	CGG	AAT
Ser	Pro	Asp	Lys	Gln	Met	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn
				5					10					15
CGG	CAG	GCT	GCA	GCT	GCC	AAC	CCA	GAG	AAT	TCC	AGA	GGA	AAA	GGT
Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly
				20					25					30
CGG	AGA	GGC	CAG	AGG	GGC	AAA	AAC	CGG	GGT	TGT	GTC	TTA	ACT	GCA
Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly	Cys	Val	Leu	Thr	Ala
				35					40					45
ATA	CAT	TTA	AAT	GTC	ACT	GAC	TTG	GGT	CTG	GGC	TAT	GAA	ACC	AAG
Ile	His	Leu	Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Glu	Thr	Lys
				50					55					60
GAG	GAA	CTG	ATT	TTT	AGG	TAC	TGC	AGC	GGC	TCT	TGC	GAT	GCA	GCT
Glu	Glu	Leu	Ile	Phe	Arg	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Asp	Ala	Ala
				65					70					75
GAG	ACA	ACG	TAC	GAC	AAA	ATA	TTG	AAA	AAC	TTA	TCC	AGA	AAT	AGA
Glu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Lys	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Ser	Arg	Asn	Arg
				80					85					90
AGG	CTG	GTG	AGT	GAC	AAA	GTA	GGG	CAG	GCA	TGT	TGC	AGA	CCC	ATC
Arg	Leu	Val	Ser	Asp	Lys	Val	Gly	Gln	Ala	Cys	Cys	Arg	Pro	Ile
				95					100					105
GCC	TTT	GAT	GAT	GAC	CTG	TCG	TTT	TTA	GAT	GAT	AAC	CTG	GTT	TAC
Ala	Phe	Asp	Asp	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Leu	Val	Tyr
				110					115					120
CAT	ATT	CTA	AGA	AAG	CAT	TCC	GCT	AAA	AGG	TGT	GGA	TCT	ATC	
His	Ile	Leu	Arg	Lys	His	Ser	Ala	Lys	Arg	Cys	Gly	Cys	Ile	
				125					130					

六、申請專利範圍

20. 一種載體，其包括可操縱性連結到表現控制序列上的根據申請專利範圍第13項之聚核苷酸。
21. 一種以根據申請專利範圍第13項之聚核苷酸轉化或轉移感染的原核生物或真核生物宿主細胞。
22. 一種產製如申請專利範圍第1項之切截之GDNF蛋白質的方法，其包括使根據申請專利範圍第21項之大腸桿菌(E. Coil)或中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell)做為宿主細胞，在適當的營養培養基中生長，且可視需要從該細胞或該營養培養基中分離出該切截之GDNF。
23. 一種產製如申請專利範圍第1項之切截之神經膠質細胞株-衍生神經營養因子(GDNF)蛋白質的方法，其包括下列步驟：
- (a) 培養以根據申請專利範圍第20項之載體轉化或轉移感染的大腸桿菌或中國倉鼠卵巢細胞做為宿主細胞；
 - (b) 在容許由該宿主細胞表現切截之GDNF蛋白質的條件下，維持該宿主細胞；並
 - (c) 可視需要分離出由該宿主細胞表現的切截之GDNF蛋白質。
24. 一種切截之GDNF蛋白質產物，其係含有編碼如申請專利範圍第1項之蛋白質產物之外源性聚核苷酸的原核生物或真核生物宿主細胞的重組

六、申請專利範圍

表現產物。

25. 一種可增加多巴胺能細胞之多巴胺能活性之醫藥組合物，其含有根據申請專利範圍第1項之切截之GDNF蛋白質產物與藥學上可接受之載劑。
26. 一種可增加多巴胺能細胞之多巴胺能活性之醫藥組合物，其含有根據申請專利範圍第22項之方法產製的切截之GDNF蛋白質產物與藥學上可接受之載劑。
27. 一種可增加多巴胺能細胞之多巴胺能活性之醫藥組合物，其含有根據申請專利範圍第23項之方法產製的切截之GDNF蛋白質產物與藥學上可接受之載劑。
28. 根據申請專利範圍第25項之醫藥組合物，其用於治療帕金森氏症。
29. 一種可增加多巴胺能細胞之多巴胺能活性之醫藥組合物，其包含根據申請專利範圍第13項之聚核苷酸序列，以便在活體內產製該切截之GDNF蛋白質產物與藥學上可接受之載劑。
30. 一種可增加多巴胺能細胞之多巴胺能活性之醫藥組合物，其包含以根據申請專利範圍第13項之聚核苷酸序列轉化的細胞，以便在活體內產製該切截之GDNF蛋白質產物與藥學上可接受之載劑。
31. 一種切截之GDNF蛋白質產物，係衍生自由以重

六、申請專利範圍

組方式修改的細菌或哺乳動物細胞所表現之成熟 GDNF 蛋白質，該切截之 GDNF 蛋白質係由 X-[Cys⁴¹-Cys¹³³]-Y 的胺基酸序列所組成，

其中

[Cys⁴¹-Cys¹³³] 由序列識別 2 號從 Cys⁴¹ 到 Cys¹³³ 所組成；

Y 代表 Cys¹³³ 之羧基終端基，或 Ile¹³⁴ 之羧基終端的胺基酸殘基；且

X 代表 Cys⁴¹ 之胺基，或選自下列基團之胺基終端的胺基酸殘基：

G

RG

NRG

KNRG (SEQ ID NO : 3)

GKNRG (SEQ ID NO : 4)

RGKNRG (SEQ ID NO : 5)

QRGKNRG (SEQ ID NO : 6)

GQRGKNRG (SEQ ID NO : 7)

RGQRGKNRG (SEQ ID NO : 8)

RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 9)

G RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 10)

KG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 11)

GKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 12)

RGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 13)

六、申請專利範圍

SRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 14)

NSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 15)

ENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 16)

PENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 17); 及

SPENSRGKG RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 51)

或一 X 之保守性取代變體，其中該變體相較於上述 X 之胺基酸序列時，有超過 90% 之同一性（其中可於 100 個胺基酸長度時，導入 4 個缺口以協助排列），且

其中該神膠質細胞株-衍生神經營養因子蛋白質物質可提供多巴胺能細胞之神經營養性作用。

32. 根據申請專利範圍第 31 項之切截之 GDNF 蛋白質，其中 X 係選自包括

G

RG

NRG

KNRG (SEQ ID NO : 3)

GKNRG (SEQ ID NO : 4)

RGKNRG (SEQ ID NO : 5)

QRGKNRG (SEQ ID NO : 6)

GQRGKNRG (SEQ ID NO : 7)

RGQRGKNRG (SEQ ID NO : 8) 和

RRGQRGKNRG (SEQ ID NO : 9)。

33. 根據申請專利範圍第 31 項之切截之 GDNF 蛋白質

六、申請專利範圍

質，其中該成熟的GDNF蛋白質係由以重組方式修改的細菌細胞來表現，且該切截之GDNF蛋白質係在活體外或活體內產製。

34. 一種用於治療因為疾病或傷害而引起之神經系統損傷之醫藥組合物，其含有根據申請專利範圍第1項之切截之GDNF蛋白質產物與藥學上可接受之載劑。
35. 根據申請專利範圍第34項之醫藥組合物，其係用於治療帕金森氏症。

570926

31 修正
年 月 日
補充

第085111819號專利申請案
中文補充說明書(92年7月)

(2) 序列識別 51 號的訊息：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：19 個胺基酸

(B) 類型：胺基酸

(C) 股：單股

(D) 局部解剖學：直線狀

(ii) 分子類型：肽

(xi) 序列說明：序列識別 51 號：

Ser Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly

1

5

10

15