



申請日期	90 年 3 月 9 日
案 號	90105616
類 別	C1-N 1/2, W7K 1/8, A61K 7/395

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 新型	中 文	誘發細胞凋亡的聚肽
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	(1) 福島直 (2) 土屋政幸 (3) 大枝匡義
	國 籍	(1) 日本 (2) 日本 (3) 日本
	住、居所	(1) 日本國靜岡縣御殿場市駒門一丁目一三五番地 中外製藥株式會社內 (2) 日本國靜岡縣御殿場市駒門一丁目一三五番地 中外製藥株式會社內 (3) 日本國靜岡縣御殿場市駒門一丁目一三五番地 中外製藥株式會社內
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 中外製藥股份有限公司 中外製藥株式會社
	國 籍	(1) 日本
	住、居所 (事務所)	(1) 日本國東京都北區浮間五丁目五番一號
	代 表 人 姓 名	(1) 永山治

裝

訂

線

申請日期	90 年 3 月 9 日
案 號	90105616
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

發 新 型

一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	(4) 宇野慎介 (5) 菊地康文
	國 籍	(4) 日本 (5) 日本
	住、居所	(4) 日本國靜岡縣御殿場市駒門一丁目一三五番地 中外製藥株式會社內 (5) 日本國靜岡縣御殿場市駒門一丁目一三五番地 中外製藥株式會社內
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC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

美國	2000年3月10日	09/523,095	<input checked="" type="checkbox"/> 有主張優先權
日本	2000年4月17日	2000-115246	<input checked="" type="checkbox"/> 有主張優先權
日本	2000年10月20日	2000-321822	<input checked="" type="checkbox"/> 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

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

技術領域

本發明係關於誘發具有 Integrin Associated Proten (整合組合蛋白質, I A P) 的有核血液細胞之凋亡, 且具有不引起紅血球凝集的特性之重建聚肽。更詳細而言, 係關於誘發具有 I A P 的有核血液細胞之凋亡, 含有 2 個以上的單株抗體之 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域之重建聚肽。該重建聚肽作為白血病等血液疾病之治療藥係有用的。

過去技術

特願平 9 - 6 7 4 9 9 號公報有記載, 以開發辨識脾臟間質細胞所得之特定抗體作為目標, 嘗試製作以該脾臟間質細胞株作為敏化抗原之單株抗體, 作為抗原以取得辨識老鼠 I A P 之新穎單株抗體。又, 特願平 9 - 6 7 4 9 9 號公報揭示, 單株抗體具有誘發骨髓系細胞凋亡之特性。

W O 9 9 / 1 2 9 7 3 係揭示, 人類 I A P (. Cell Biol., 123, 485-496, 1993 中記載胺基酸序列; Journal of Cell Science, 108, 3419-3425, 1995) 作為抗原之單株抗體, 具有誘發具該 I A P 的有核血液細胞 (骨髓細胞以及淋巴球) 凋亡之特性的單株抗體 M A B L - 1 抗體、M A B L - 2 抗體、產生這些的融合瘤、M A B L - 1 (F E R M B P - 6 1 0 0) 以及 M A B L - 2 (F E R M B P - 6 1 0 1) 。

特願平 1 1 - 6 3 5 5 7 號公報則揭示, 由人類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明（2）

I A P 作為抗原的單株抗體，取得具有誘發具人類 I A P 的有核血液細胞凋亡之特性的具單鎖 F v 區之單鎖 F v。

然而，I A P 作為抗原的單株抗體之投與，誘發具有 I A P 的有核血液細胞凋亡者，於體內會引起紅血球凝集作用。此為將 I A P 作為抗原的單株抗體大量投與於生物體內時，顯示會產生紅血球的凝集之缺點。

發明的揭示

本發明的課題為提供一種可提升誘發具有 I A P 的有核血液細胞凋亡之特性，且降低或完全不會引起紅血球的凝集之重建聚肽。又，本發明的另一課題，提供一種含有前述所得之誘發具有 I A P 的有核血液細胞凋亡之物質的血液疾病之治療藥。

因此，本發明係關於結合 I A P，誘發具有 I A P 的有核血液細胞凋亡，且不會引起紅血球的凝集之重建聚肽。

本發明又關於改質抗體之重建聚肽。

改質抗體係含有誘發具有 I A P（較佳為人類 I A P）的有核血液細胞凋亡之單株抗體（例如 M A B L - 1 抗體、M A B L - 2 抗體等）之 L 鏈 V 區域以及 H 鏈 V 區域，僅可誘發具有 I A P（較佳為人類 I A P）的有核血液細胞凋亡，且不會引起紅血球凝集的重建聚肽者即可。且本發明中，亦包含改變這些 V 區域的胺基酸序列之一部份的重建聚肽。

五、發明說明（3）

本發明又關於前述重建聚肽之人類型化者，人類型化重建聚肽包含人類型化 H 鏈 V 區域以及／或人類型化 L 鏈 V 區域。詳細而言，人類型化重建聚肽係由，人類單株抗體 L 鏈 V 區域的架構區域（F R），與含有老鼠單株抗體的 L 鏈 V 區域之 C D R 的人類型化 L 鏈 V 區域以及／或人類單株抗體 H 鏈 V 區域之 F R，與含有老鼠單株抗體的 H 鏈 V 區域之 C D R 的人類型化 H 鏈 V 區域所構成。此時 C D R 以及 F R 的胺基酸序列可作一部份的改變（例如，欠缺、取代或附加）亦可。

且本發明係關於，含有人類單株抗體 L 鏈 C 區域，與老鼠單株抗體的 L 鏈 V 區域以及／或人類單株抗體 H 鏈 C 區域，與老鼠單株抗體的 H 鏈 V 區域所成，可誘發具有 I A P（較佳為人類 I A P）的有核血液細胞凋亡之重建聚肽。

本發明係又關於，含有相當於上述老鼠 C D R，來自老鼠以外的哺乳動物（例如人類、小白鼠、牛、綿羊、猴子等）之單株抗體的 C D R、或含有該 C D R 的 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域所成，可誘發具有 I A P（較佳為人類 I A P）的有核血液細胞凋亡之重建聚肽。如此的 C D R、H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域亦包含，例如由基因轉移老鼠等所製造的來自人類單株抗體之 C D R、含有該 C D R 的來自人類單株抗體之 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域。

本發明又關於製造編碼前述種種重建聚肽之 D N A、含有該 D N A 所成之重組載體的基因工學方法。

五、發明說明(4)

本發明又關於藉由該重組載體所成之轉形宿主。宿主可例如為人類細胞、老鼠細胞等動物細胞、或大腸桿菌、枯草菌、酵母菌等微生物。

本發明的又關於培養上述宿主，由培養液中採出重建聚肽為特徵之重建聚肽之製造方法。

本發明又關於一種血液疾病治療藥，含有誘發具有前述所得 I A P 的有核血液細胞凋亡之重建聚肽作為有效成分者。本發明的血液疾病治療藥，例如有急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴性白血病、成人 T 細胞白血病、多發性骨髓瘤、Mixed Leukemia、Hairy cell Leukemia 等白血病、惡性淋巴腫瘤（Hodgkin 病、非-Hodgkin 淋巴腫瘤）、再生不良性貧血、骨髓異形症候群、真性多血性等等血液疾病的治療係有用的。

本發明的重建聚肽，較佳為含有來自單株抗體的 2 個 H 鏈 V 區域以及 2 個 L 鏈 V 區域。作為該重建聚肽的構成，較佳可含有 1 個 H 鏈 V 區域以及 1 個 L 鏈 V 區域之單鎖 F_v 之二聚物，或含有 2 個 H 鏈 V 區域以及 2 個 L 鏈 V 區域的聚肽。該重建聚肽中，H 鏈以及 L 鏈的 V 區域以介著 1 個以上的胺基酸所成的聚肽所連結者為佳。這些重建聚肽，含有單株抗體的可變區域，且保存互補性決定區域（complementarity determining region；以下稱 C D R），結合與具有原有的單株抗體相同專一性之抗原。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(5)

H 鏈 V 區域

關於本發明，來自單株抗體的 H 鏈 V 區域中，改變誘發具有 I A P 的有核血液細胞凋亡之單株抗體中的 H 鏈 V 區域或其 H 鏈 V 區域之一部份胺基酸序列的 H 鏈 V 區域，較佳為辨識人類 I A P，且包含誘發具有 I A P 的有核血液細胞凋亡之單株抗體中，改變其 H 鏈 V 區域或其 H 鏈 V 區域的部分胺基酸序列之 H 鏈 V 區域，但改變來自 M A B L - 1 抗體以及 M A B L - 2 抗體的 H 鏈 V 區域或其 H 鏈 V 區域的部分胺基酸之 H 練 V 區域較為佳。更佳為含有人類單株抗體 H 鏈 V 區域的 F R 與老鼠單株抗體的 H 鏈 V 區域的 C D R 之人類型化 H 鏈 V 區域。且，可使用重組技術獲得，可使用相當於前述老鼠單株抗體的 H 鏈 V 區域之來自人類單株抗體的 H 鏈 V 區域。又，本發明的 H 鏈 V 區域為前述 H 鏈 V 區域片段，亦包含保持抗原結合性之區域。

L 鏈 V 區域

本發明的 L 鏈 V 區域，誘發具有 I A P 的有核血液細胞凋亡之單株抗體中，改變其 L 鏈 V 區域或其 L 鏈 V 區域的部分胺基酸序列之 L 鏈 V 區域，較佳為辨識人類 I A P，且包含誘發具有 I A P 的有核血液細胞凋亡之單株抗體中，改變其 L 鏈 V 區域或其 L 鏈 V 區域的部分胺基酸序列之 L 鏈 V 區域，但以改變來自 M A B L - 1 抗體以及 M A B L - 2 抗體的 L 鏈 V 區域或其 L 鏈 V 區域的部分胺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (6)

基酸之 L 鏈 V 區域較為佳。更佳為含有人類單株抗體 L 鏈 V 區域的 F R 與老鼠單株抗體的 L 鏈 V 區域的 C D R 之人類型化 L 鏈 V 區域。且，可使用重組技術獲得，可使用相當於前述老鼠單株抗體的 L 鏈 V 區域之來自人類單株抗體的 L 鏈 V 區域。又，本發明的 L 鏈 V 區域為前述 L 鏈 V 區域片段，亦包含保持抗原結合性之區域。

互補性決定區域 (C D R)

L 鏈以及 H 鏈的各 L 區域形成抗原結合部位，保存 4 個與 L 鏈以及 H 鏈上可變區域具有共通性之架構區域與 3 個可變或互補性決定區域 (C D R) 連結 (Kabat, E. A., 「 Sequences of Proteins of Immunological Interest 」 US Dept. Health and Human Services, 1983) 。

前述 4 個 F R 區域的大部分為 β - sheet 構造，其結果 3 個 C D R 形成環，C D R 而言亦可形成 β - sheet 構造的一部份。3 個 C D R 藉由 F R 保持相互立體且非常近位置，於是與形成對比區域的 3 個 C D R 同時形成抗原結合部位。

這些 C D R 區域係由所得抗體之 V 區域之胺基酸序列，與已知抗體的 V 區域之已知胺基酸序列作對照，經 Kabat, E. A., 「 Sequences of Proteins of Immunological Interest 」 的經驗定律所獲得。

單鏈 F v

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明(7)

單鏈 F_v 來自單株抗體，其為含有所連結的 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域之聚肽單體，所得單鏈 F_v 欲含有原先的單株抗體之可變區域，保存互補性決定區域，結合與原先單株抗體相同專一性之抗原（特願平 11-63557 號公報）。且，對於本發明的單鏈 F_v，可改變前述可變區域以及／或 CDR 的一部份或其胺基酸的一部份（例如缺失、取代或附加）。構成本發明的單鏈 F_v 的 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域如上述者，H 鏈 V 區域與 L 鏈 V 區域以直接或連接體、較佳為介著聚肽連接體進行連結，其構造則為〔H 鏈 V 區域〕-〔L 鏈 V 區域〕、〔L 鏈 V 區域〕-〔H 鏈 V 區域〕之任一種皆可。關於本發明，這些單鏈 F_v 可形成二聚物、三聚物或四聚物作為本發明的重建聚肽。

單鏈重建聚肽

本發明的含有 2 個以上 H 鏈 L 區域以及 2 個以上的 L 鏈 V 區域之單鏈重建聚肽，如上述分別含有 2 個以上 H 鏈 L 區域以及 L 鏈 V 區域。對此聚肽而言，各區域中該單鏈重建聚肽以特定立體構造配置、具體而言必須仿效構成單鏈 F_v 的二聚物之立體構造進行配置。

以〔H 鏈 V 區域〕-〔L 鏈 V 區域〕-〔H 鏈 V 區域〕-〔L 鏈 V 區域〕

或

〔L 鏈 V 區域〕-〔H 鏈 V 區域〕、〔L 鏈 V 區域〕

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明(8)

— [H 鏈 V 區域]

的順序配置各區域，這些區域介著聚肽進行連結。

連結體

本發明中，作為 H 鏈 V 區域與 L 鏈 V 區域連接的連接體，可使用以基因工程方法導入所得之任意聚肽連接體，或合成化合物連接體，例如 Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996 所揭示的連接體。例如聚肽連接體的情況：可舉出

S e r

G l y · S e r

G l y · G l y · S e r

S e r · G l y · G l y

G l y · G l y · G l y · S e r

S e r · G l y · G l y · G l y

G l y · G l y · G l y · G l y · S e r

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y

G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y

G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y

(G l y · G l y · G l y · G l y · S e r) n

(S e r · G l y · G l y · G l y · G l y) n

[n 表示 1 以上的整數]。連接體的長度一般為 1 至 15 胺基酸，但較佳為 2 至 12 的胺基酸、更加為 3 至 10 胺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(9)

基酸。導入這些連接體的方法以編碼本發明的重建聚肽之 DNA 構築方法作說明。

本發明的合成化合物連接體(化學交聯劑), 肽的交聯一般所使用的交聯劑例如可舉出 N-羥基琥珀銑醇亞胺(NHS)雙琥珀銑醇亞胺環庚鹽(DSS)、雙(硫代琥珀銑醇亞胺基)環庚鹽(BS³)、二硫代雙(琥珀銑醇亞胺基丙酸酯)(DSP)、二硫代雙(硫代琥珀銑醇亞胺丙酸酯)(DTSSP)、乙二醇雙(琥珀銑醇亞胺琥珀酸鹽)(EGS)、乙二醇雙(硫代琥珀銑醇亞胺基琥珀酸鹽(硫代-EGS)、二琥珀銑醇亞胺基酒石酸鹽(DST)、二硫代琥珀銑醇亞胺基酒石酸鹽(硫代-DST)、雙[2-(琥珀銑醇亞胺氧基羰基氧基)乙基]碼(BSOCOES)、雙[2-(硫代琥珀銑醇亞胺基氧基羰基氧基)乙基]碼(硫代-BSOCOES)等, 這些交聯劑皆為販賣品。

特別於形成單鏈 F_v 之二聚物時, 以有效率地形成該二聚物之連接體為佳, 具體而言為 2 至 12 胺基酸、較佳為 3 至 10 胺基酸、或相當於此的其他連接體為佳。

重建聚肽的製作

結合具有人類 IAP 的細胞之重建聚肽, 與對於人類 IAP 的單株抗體之 H 鏈 V 區域, 與 L 鏈 V 區域介由前述連接體進行連接而得。作為單鏈 F_v 的例子, 具有來自 MABL-1 抗體的 H 鏈 V 區域, 與 L 鏈 V 區域者作為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (10)

M A B L 1 - s c F v、具有來自 M A B L - 2 抗體的 H 鏈 V 區域，與 L 鏈 V 區域者作為 M A B L 2 - s c F v。

製造這些重建聚肽中，希望該聚肽為具有性時，可於 N - 末端附加信號 (signal) 肽。又，欲高效率純化該聚肽時，對於聚肽純化係為有用的公知序列，例如可插入 F L A G 序列等。此時，使用抗 F L A G 抗體可高效率地純化聚肽。

欲製造本發明的重建聚肽時，必須獲得編碼重建聚肽的 D N A，即編碼單鏈 F v 的 D N A 或重建聚肽單體之 D N A。這些 D N A，使用已經詳細說明的編碼 M A B L 1 - s c F v 以及 / 或 M A B L 2 - s c F v 的 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域之 D N A，或這些 D N A 作為模版，編碼其序列內所望的胺基酸序列之 D N A 部分，可使用兩端已定的引子以 P C R 法增幅而得。

對於 V 區域，希望胺基酸序列的一部份作改變時，可使用 P C R 法等公知方法改變 1 個或數個胺基酸，即可獲得具有 1 個或數個胺基酸經缺失、取代或附加的胺基酸序列之 V 區域。製作對於特定抗原而言具有充分活性之重建聚肽時，使用 P C R 法等公知方法可望改變前述 V 區域的胺基酸序列一部份。

使用 P C R 決定引子時，必須先決定前述 M A B L - 1 抗體以及 / 或 M A B L - 2 抗體的 H 鏈以及 L 鏈的兩鏈的型，但已知 M A B L - 1 抗體具有 κ 型 L 鏈以及 γ 1 型的 H 鏈，M A B L - 2 抗體具有 κ 型 L 鏈以及 γ 2 a 型的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(11)

H 鏈 (特開平 1 1 - 6 3 5 5 7 號公報) 。編碼前述 M A B L - 1 抗體以及 / 或 M A B L - 2 抗體的 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域之 D N A , 使用聚合酶連鎖反應 (P C R) 法進行增幅, 可使用 Jones, S.T., Bio/Technology, 9, 88-89, 1991 所記載引起。

其次, 使用聚合酶連鎖反應 (P C R) 法增幅 M A B L - 1 抗體以及 M A B L - 2 抗體的 L 鏈 V 區域時, 5' - 末端寡核苷酸引子以及 3' - 末端寡核苷酸引子如上述決定。同樣地, 增幅 M A B L - 1 抗體的 H 鏈 V 區域以及 M A B L - 2 抗體的 H 鏈 V 區域時, 分別決定 5' - 末端引子以及 3' - 末端引子。

其例子於本發明中, 使用 5' - 末端引子含有於 5' - 末端附近提供限制酶 H i n f I 切斷部位之序列 G A N T C , 而 3' - 末端引子含有於其 5' - 末端附近提供限制酶 X m a I 切斷部位之核苷酸序列 C C C G G G 者。這些限制酶切斷部位除使用於將編碼可變區域為目的之 D N A 片段, 於純系化載體作再選殖 (subcloning) 時, 亦可使用其他限制酶切斷部位。

使用特別設計的 P C R 引子, 將編碼 M A B L - 1 、 M A B L - 2 抗體的各 V 區域之 c D N A , 對這些 5' - 以及 3' - 末端導入適當的鹼基序列, 欲使這些表現載體能容易插入, 故將這些於該表現載體中表現其適當功能 (例如, 本發明中經由 K o z a k 序列的導入上升轉錄效率) 。其次, 使用這些引子以 P C R 進行增幅所得之 M A B L -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (12)

1、M A B L - 2 抗體之各 V 區域中，插入已含有所望人類 C 區域的 H E F 表現載體（參照 W O 9 2 / 1 9 7 5 9）。經純系化 D N A 的序列決定以任意一般方法，例如，插入適當載體，使用自動 D N A 定序儀（Applied Biosystems 公司製）進行。

本發明的重建聚肽中，連接體，例如肽連接體可如下導入。即，具有上述關於 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域的引子，與一部份互補性序列，且設計編碼該連接體的 N - 末端或 C - 末端之引子，使用此進行 P C R 可做成編碼具有所望的胺基酸序列以及長度之肽連接體的 D N A。且，僅獲得 1 個編碼重建聚肽的 D N A，以上述 D N A 作為模板，設計出種種連接用引子，使用其實施 P C R，即可容易獲得所望的胺基酸序列以及編碼具有長度的肽連接體之 D N A。因此，僅介由該 D N A 連接編碼 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域之 D N A 即可，可得到編碼具有所望肽連接體的本發明重建聚肽之 D N A。且，僅得到編碼 1 個重建聚肽之 D N A，前述 D N 作為模板，設計種種連接用之引子，僅使用此實施 P C R，可容易得到編碼不具有所望聚肽之重建聚肽或連接體之重建聚肽 D N A。

又，本發明的重建聚肽之各鏈 V 區域中，因使用過去技術（例如參考 Sato, K., Cancer Res., 53, 851-856(1993)），可進行人類型化，又一旦製作成編碼人類型化 F v 區域的 D N A，依常法可容易製得人類型化單鏈 F v、人類型化單鏈 F v 片段、人類型化單株抗體或人類型化單株抗體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 (13)

片段。且，因應必須時，這些 V 區域的胺基酸序列的一部份可作部份改變。

且，使用基因工學的一般技術，可得到與編碼上述來自老鼠的 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域之 D N A 相同，相當於這些的來自其他哺乳類動之 D N A，例如來自人類的 D N A。使用所得之 D N A，可得到其他哺乳動物，特別為來自人類的 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域、來自人類的單鏈 F v 以及其片段，以及來自人類的單株抗體與其片段。

如上述，僅製得編碼作為目的的重建聚肽之各鏈 V 區域、人類型化重建聚肽的各鏈 V 區域之 D N A，依常法可得到含有這些的表現載體、以及經該表現載體的轉形宿主。又，依常法培養宿主，產生的重建單鏈 F v、重建人類型化單鏈 F v、人類型化單株抗體以及人類型化單株抗體片段，可純化至由細胞內或細胞外均一分離。此時，使用一般分離、純化蛋白質的方法，例如適宜選擇組合各種色譜法、極限過濾、鹽析、透析等，可進行分離、純化重建聚肽，但不限於此。

為製造與具有人類 I A P 的細胞結合之本發明重建聚肽，可使用任意表現系統，例如真核細胞、例如動物細胞、例如已建立的哺乳動物系統、真絲狀菌細胞、以及酵母細胞、以及原核細胞、例如細菌細胞、例如大腸桿菌細胞。較佳為本發明重建聚肽可於哺乳動物、例如於 C O S 7 細胞或 C H O 細胞中表現。

這些狀況，於哺乳類細胞中表現可使用有利用性之常

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (14)

用啓動子。例如，較佳爲使用人類・巨大細胞病毒：

H C M V) 前期 (immediate early) 啓動子。作爲含有 H C M V 啓動子的表現載體的例子，包含 H C M V - V M - H C γ 1、H C M V - V L - H C K 等、來自 P S V 2 n e o 的質體載體 (參照國際公開公報 W O 9 2 - 1 9 7 5 9) 。

又，其他使用於本發明的哺乳類動物細胞中，作爲基因表現的啓動子可使用逆轉錄病毒、多瘤病毒、腺病毒、猴病毒 4 0 (S V 4 0) 等病毒啓動子或人類聚肽鏈伸長因子 - 1 α (H E F - 1 α) 等來自哺乳動物細胞的啓動子。例如使用 S V 4 0 的啓動子時，Mulligen, R. C. 們的方法 (Nature, 277, 108-114, (1979))，又，使用 H E F - 1 α 啓動子時，依照 Mizushima, S. 們的方法 (Nucleic Acids Research, 18, 5322, (1990)) 容易實施。

作爲複製起源 (ori)，可使用來自 S V 4 0、多瘤病毒、腺病毒、牛乳頭狀瘤 (B P V) 等的 o r i，且宿主細胞系中的基因複製數增幅等，表現載體作爲選擇標記基因 (maker)，可含有磷酸轉化酶 A P H (3') II 或 I (neo) 基因、胸苷激酶基因、大腸菌黃票令 - 鳥票令磷酸核糖轉化酶 (Ecogpt) 基因，二氫葉酸還原酶 (D H F R) 基因等。

如上述做成之重建聚肽之抗原結合活性，對於人類 I A P 之老鼠 M A B L - 1、M A B L - 2 抗體的結合阻斷能可作爲指標進行評價。具體而言，對於老鼠 M A B L

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (15)

— 2 抗體的人類 I A P 抗原之濃度依賴性阻斷作用的有無可作為指標進行評定。

具體而言，使用包含編碼本發明重建聚肽之 D N A 的轉形動物細胞，例如培養 C O S 7 細胞或 C H O 細胞，上述培養的細胞以及／或其培養液，或由這些純化的重建聚肽，測定對抗員的結合。作為對照組，使用僅以表現載體作轉形的細胞之培養上清液等。表現人類 I A P 的老鼠白血病細胞株 L 1 2 1 0 細胞中，加入本發明重建聚肽等試驗試藥或加上對照之培養上清液，例如實施流體細胞測定儀對抗原結合性作評價。

體外的細胞凋亡誘發效果，基因導入人類 I A P 的細胞中，添加前述的重建聚肽之試驗試藥，對該細胞而言進行人類 I A P 抗原特異性是否導致細胞死亡而作評價。

於體內的細胞凋亡誘發效果之評價則如下進行。首先做成人類骨髓瘤的模板老鼠，該老鼠具有 I A P 之有核血液細胞中誘發細胞凋亡的單株抗體、本發明的重建聚肽作靜脈投與。對照組則僅投與 P B S。因此細胞凋亡的誘導，作為抗腫瘤效果，以老鼠血清中的人類 I g G 的量變化以及生存期間作評價。

紅血球的凝集作用，由採取健康人的血液調製出紅血球懸浮液，於此添加種種濃度的試驗試藥作恆溫培養，以判定紅血球的凝集而作檢測。

本發明的重建聚肽，係含有 2 個以上的 H 鏈 V 區域以及 2 個以上的 L 鏈 V 區域者，含有 1 個 H 鏈 V 區域以及 1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (16)

個的 L 鏈 V 區域之單鏈 F v 之二聚物、三聚物或四聚物，較佳為二聚物，或連結 2 個以上的 H 鏈 V 區域以及 2 個以上的 L 鏈 V 區域之聚肽。因有如此構成，可仿效原單株抗體的抗原結合部位之立體構造，保持優良的抗原結合性。

本發明的重建聚肽，與 whole IgG 作比較其對組織、腫瘤之移動性較為優，且紅血球凝集之副作用顯著減低或不產生，故被期待例如作為急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴性白血病、成人 T 細胞白血病、多發性骨髓瘤、Mixed Leukemia、Hairy cell Leukimia 等白血病、惡性淋巴腫瘤（Hodgkin 病、非 Hodgkin 淋巴腫瘤）、再生不良性貧血、骨髓異形形成症候群、真性多血症等血液疾病之治療藥。又，作為 R I 標識的造影劑可望可被利用，藉由結合 R I 化合物或毒素，可使效力更增強。

實施發明的最佳狀態

再以以下的實施例對本發明作具體的說明，但本發明的範圍不限定於此。

本發明的重建聚肽的製造方法，以下述單鏈 F v 的製作為例子作說明。使用於本發明的重建聚肽製造方法，產生對人類 I A P 的老鼠 M A B L - 1、M A B L - 2 抗體之融合瘤、M A B L - 1 以及 M A B L - 2 已於 1 9 9 7 年 9 月 1 1 日分別以寄存號碼 F E R M B P - 6 1 0 0、F E R M B P - 6 1 0 1 作國際寄存於公開微生物寄

五、發明說明（17）

存機關之通商產業省工業技術院生命工學工業技術研究所
（茨城縣筑波市東一丁目1-3號）。

實施例1（編碼對人類I A P老鼠單株抗體的V區域之DNA純系化）

編碼對人類I A P老鼠單株抗體M A B L - 1以及
M A B L - 2的可變區域之DNA如下進行純系化。

1 訊息RNA（mRNA）的製作

由融合瘤M A B L - 1以及M A B L - 2的mRNA，
使用mRNA純化Kit（Pharmacia Biotech公司製作）
調製。

1.2 雙股cDNA的合成

約1 μ g的mRNA使用Marathon cDNA Amplification
Kit（CLONTECH公司製）合成雙股cDNA，以
連結伸介子。

1.3 編碼抗體可變區域的基因以PCR法增幅

使用熱循環（Thermal Cycler, PERKIN ELMER公司製）
進行PCR法。

（1）編碼M A B L - 1 L鏈V區域之基因的增幅

使用於PCR的引子，使用表示與伸介子的部分序列
作雜交之序列號碼：1的伸介引子1（CLONTECH公司製

五、發明說明 (18)

) 、以及與老鼠卡巴粒型 L 鏈 C 區域序列作雜交的序列號碼： 2 所示的 M K C (Mouse Kappa Constant) 引子 (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) 。

P C R 溶液 5 0 μ l 中含有， 5 μ l 的 1 0 \times P C R 緩衝液 II 、 2 m M M g C l ₂ 、 0 . 1 6 m M d N T P s (d A T P , d G T P , d C T P , d T T P) 、 2 . 5 單位的 D N A 聚合酶 AmpliTaq Gold (以上為 PERKIN ELMER 公司製) 、 0 . 2 μ M 的序列號碼： 1 所示的仲介引子與 0 . 2 μ M 的序列號碼： 2 所示的 M K C 引子，以及來自 M A B L - 1 的雙股 c D N A 0 . 1 μ g 。以 9 4 $^{\circ}$ C 作為初期溫度經 9 分鐘後再以 9 4 $^{\circ}$ C 下 1 分鐘、 6 0 $^{\circ}$ C 下 1 分鐘以及 7 2 $^{\circ}$ C 下 1 分 2 0 秒，以此順序加熱。此溫度循環進行 3 5 次重複後，反應混合物再以 7 2 $^{\circ}$ C 加熱 1 0 分鐘。

(2) 編碼 M A B L - 1 H 鏈 V 區域的 c D N A 之增幅

作為 P C R 的引子，使用序列號碼： 1 所示的仲介引子 - 1 、以及序列號碼： 3 所示的 M H C - γ 1 (Mouse Heavy Constant) 引子 (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) 。

c D N A 的增幅，代替 0 . 2 μ M 的 M K C 引子使用 0 . 2 μ M 的 M H C - γ 1 引子，其他與上述 1 . 3 (1) 的 L 鏈 V 區域基因的增幅所記載的相同方法進行增幅。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (19)

(3) 編碼 M A B L - 2 L 鏈 V 區域的 c D N A 之增幅

作為 P C R 的引子，使用序列號碼：1 所示的仲介引子 1、以及序列號碼：2 所示的 M K C 引子。

c D N A 的增幅，代替來自 M A B L - 1 的雙股 c D N A 0 . 1 μ g 使用來自 M A B L - 2 的雙股 c D N A 0 . 1 μ g，其他與前述 1 . 3 (1) 的 M A B L - 1 L 鏈 V 區域基因之增幅所記載的相同方法進行增幅。

(4) 編碼 M A B L - 2 H 鏈 V 區域的 c D N A 之增幅

作為 P C R 的引子使用序列號碼：1 的仲介引子 - 1、以及序列號碼：4 所示 M H C - γ 2 a 引子 (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991)。

c D N A 的增幅，代替 0 . 2 μ M 的 M K C 引子使用 0 . 2 μ M 的 M H C - γ 2 a 引子之外，與前述 1 . 3 (3) 的 L 鏈 V 區域基因的增幅所記載的相同方法進行增幅。

1 . 4 P C R 生成物的純化

如前述的 P C R 法所增幅的 D N A 片段使用 QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN 公司製) 進行純化，溶解於含有 1 m M E D T A 的 1 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (20)

1 . 5 連結以及轉形作用

含有編碼如上述調製的來自 M A B L - 1 之老鼠卡巴粒型 L 鏈 V 區域的基因所成 D N A 片段約 1 4 0 n g , 以含有 5 0 n g 的 p G E N - T E a s y 載體 (Promega 公司製) , 與 3 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 8) 、 1 0 m M M g C l ₂ 、 1 0 m M 二硫蘇糖醇、 1 m M A T P 以及 3 單位 T 4 D N A 連接酶 (Promega 公司製) 的反應混合液中, 於 1 5 ° C 下進行 3 小時反應使其連接。

再以上述 1 μ l 的連結混合液加上 5 0 μ l 的大腸桿菌 D H 5 α 之勝任細胞 (東洋紡公司製) , 再將此細胞於冰上 3 0 分鐘後移至 4 2 ° C 下 1 分鐘再於冰上 2 分鐘靜置。再加上 1 0 0 μ l 的 S O C 培養基 (G I B C O B R L 公司製) , 於含有 1 0 0 μ g / m l 的氨苄青黴素 (S I G M A 公司製) L B (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook 們, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 洋菜培養基上塗佈此大腸桿菌, 於 3 7 ° C 下培養一晚得到大腸桿菌轉形體。

此轉形體於含有 5 0 μ g / m l 的氨苄青黴素的 L B 培養基 3 m l 中於 3 7 ° C 徹夜培養, 此培養物使用 Q I A p r e p Spin Miniprep Kit (Q I A G E N 公司製) 製作質體 D N A 。

含有編碼如此所得的來自融合瘤 M A B L - 1 的老鼠卡巴粒型 L 鏈 V 區域的基因之引子, 命名為 p G E M - M 1 L 。

依照如上述的相同方法, 含有編碼來自融合瘤

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (21)

M A B L - 1 的老鼠 H 鏈 V 區域的基因之引子由純化 D N A 片段製得，命名為 p G E N - M 1 H 。

又，含有編碼來自融合瘤 M A B L - 2 的老鼠卡巴粒型 L 鏈 V 區域的基因之引子由純化 D N A 片段製得，命名為 p G E N - M 2 L 。

又，含有編碼來自融合瘤 M A B L - 2 的老鼠 H 鏈 V 區域的基因之引子由純化 D N A 片段製得，命名為 p G E N - M 2 H 。

實施例 2 (D N A 的鹼基序列之決定)

前述質體中之 c D N A 編碼區域的鹼基序列，使用自動 D N A 定序儀 (Applied Biosystem 公司製) 以及 ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem 公司製)，依照公司指定的步驟決定鹼基序列。

編碼含於質體 p G E M - M 1 L 的老鼠 M A B L - 1 抗體之 L 鏈 V 區域的基因之鹼基序列以序列號碼：5 表示。

又，編碼含於質體 p G E M - M 1 H 的老鼠 M A B L - 1 抗體之 H 鏈 V 區域的基因之鹼基序列以序列號碼：6 表示。

又，編碼含於質體 p G E M - M 2 L 的老鼠 M A B L - 2 抗體之 L 鏈 V 區域的基因之鹼基序列以序列號碼：7 表示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (22)

又，編碼含於質體 p G E M - M 2 H 的老鼠 M A B L - 2 抗體之 H 鏈 V 區域的基因之鹼基序列以序列號碼：8 表示。

實施例 3 (C D R 的決定)

L 鏈以及 H 鏈的 V 區域之全面構造互相具有相似性，4 個架構 (frame work) 部分分別以 3 個超可變化區域，即互補性決定區域 (C D R) 而連結。架構的胺基酸序列雖較能良好地保存，但另一方面，C D R 區域的胺基酸序列之突變性極為高 (Kabat, E. A. 們, 「 Sequences of Proteins of Immunological Interest 」 US Dept. Health and Human Services, 1983) 。

以如此事實為基礎，對人類 I A P 的老鼠單株抗體之可變化區域的胺基酸序列，適用於 Kabat 們所製作的抗體之胺基酸序列資料庫 (database)，藉調查相同性而決定 C D R 區域。其結果如表 1 所示。

表 1

質體	序列號碼	CDR(1)	CDR(2)	CDR(3)
pGEM-M1L	5	45-58	74-80	113-121
pGEM-M1H	6	50-54	69-85	118-125
pGEM-M2L	7	43-58	74-80	113-121
pGEM-M2H	8	50-54	69-85	118-125

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (23)

實施例 4 (純系化 c D N A 的表現之確定 (嵌合 M A B L - 1 抗體以及嵌合 M A B L - 2 抗體之製作)

4 . 1 嵌合 M A B L - 1 抗體表現載體之製作

為製作表現嵌合 M A B L - 1 抗體的載體，分別編碼老鼠 M A B L - 1 L 鏈以及 H 鏈 V 區域之 c D N A 純系 (clone) p G E M - M 1 L 以及 p G E M - M 1 H 以 P C R 法修飾，導入 H E F 表現載體 (參照國際公開申請案 W O 9 2 - 1 9 7 5 9) 。

為製得 L 鏈 V 區域的前方引子 M L S (序列號碼：9) 以及為製得 H 鏈 V 區域的前方引子 M H S (序列號碼：10)，與編碼各別的 V 區域之前導序列的最初之 D N A 進行雜交，且設計成含有 Kozak 一致 (consensus) 序列 (J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987) 以及 H i n d III 限制酶位置。為製得 L 鏈 V 區域之後方引子 M L A S (序列號碼：11) 以及為製得 H 鏈 V 區域之後方引子 M H A S (序列號碼：12)，與編碼 J 區域之末端的 D N A 序列進行雜交，且設計成剪接提供 (splice donor) 序列以及 B a m H I 限制酶位置。

P C R 溶液 1 0 0 μ l 為含有 1 0 μ l 的 1 0 \times P C R 緩衝液 II、2 m M M g C l ₂、0 . 1 6 m M d N T P s (d A T P, d G T P, d C T P, d T T P)、5 單位的 D N A 聚合酶 A m p l i T a q G o l d、各 0 . 4 μ M 的啓動子、以及 8 n g 的模板

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (24)

D N A (p G E M - M 1 L 以及 p G E M - M 1 H) , 於 9 4 ° C 作為初期溫度經 9 分鐘, 再以 9 4 ° C 下 1 分鐘, 6 0 ° C 下 1 分鐘以及 7 2 ° C 下 1 分 2 0 秒, 以此順序加熱。此溫度循環作 3 5 次重複後, 反應混合物再以 7 2 ° C 下 1 0 分鐘加熱。

P C R 生成物使用 Q I A quick PCR Purification Kit (Q I A G E N 公司製) 進行純化, 以 H i n d III 以及 B a m H I 分解, 對 L 鏈 V 區域以 H E F 表現載體 H E F - κ , 對 H 鏈 V 區域以 H E F 表現載體 H E F - γ 分別作純系化。決定 D N A 序列後, 含有具正確 D N A 序列之 D N A 片段的質體, 分別命名為 H E F - M 1 L 、 H E F - M 1 H 。

4 2 2 嵌合 M A B L - 2 抗體表現載體的製作

c D N A 的修飾以及純系化, 除取代 p G E M - M 1 L 以及 p G E M - M 1 H 以 p G E M - M 2 L 以及 p G E M - M 2 H 將增幅模板 D N A 外, 其他與前述 4 . 1 所記載的方法相同進行增幅以及純系化, D N A 序列決定後, 含有具正確 D N A 序列的 D N A 片段之質體, 分別命名為 H E F - M 2 L 、 H E F - M 2 H 。

4 3 3 C O S 7 細胞之基因導入

為觀察嵌合 M A B L - 1 抗體以及嵌合 M A B L - 2 抗體之過渡性表現, 對前述表現載體以 C O S 7 細胞作試驗。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (25)

(1) 嵌合 M A B L - 1 抗體之基因導入

H E F - M 1 L 與 H E F - M 1 F 載體，使用 Gene Pulser 裝置 (BioRad 公司製) 以電穿透作用於 C O S 7 細胞內同時進行轉形作用。各 D N A ($10 \mu g$) 與 P B S 中 1×10^7 細胞 / m l 之 0 . 8 m l 加入容器內，以 1 . 5 k V ， $25 \mu F$ 的容量進行脈衝 (pulse) 。

於室溫下 10 分鐘的回復時間後，電穿透作用處理的細胞，加入含有 10 % 的 γ - 球蛋白牛胎血清的 D M E M 培養液 (G I B C O B R L 公司製) 。 72 小時培養後，收集培養液上清液，以離心分離將細胞碎片除去，取得回收培養液上清液。

(2) 嵌合 M A B L - 2 抗體的基因導入

嵌合 M A B L - 2 抗體基因的導入，除取代 H E F - M 1 L 與 H E F - M 1 H 載體使用 H E F - M 2 L 與 H E F - M 2 H 載體之外，如前述 4 . 3 (1) 所記載的方法同時於 C O S 7 細胞進行轉形作用，得到回收培養液上清液。

4 . 4 流質細胞測定儀

為測定對抗原的結合，使用前述 C O S 7 細胞培養液上清液進行流質細胞測定儀。表現人類 I A P 的老鼠白血病細胞株 L 1 2 1 0 細胞 4×10^5 個中，加上使嵌合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (26)

M A B L - 1 抗體表現的 C O S 7 細胞之培養液上清液，或使嵌合 M A B L - 2 抗體表現的 C O S 7 細胞之培養液上清液，或作為對照組的人類 I g G 1 抗體 (S I G M A 公司製)，於冰上恆溫培養以及洗淨後，加上進行 F I T C 標識的抗人類 I g G 抗體 (Cappel 公司製)。恆溫培養以及洗淨後，以 FACScan 裝置 (BECTON DICKINSON 公司製) 螢光強度測定。

其結果，嵌合 M A B L - 1 抗體以及嵌合 M A B L - 2 抗體，因與表現人類 I A P 作特異性的結合，顯示這些嵌合抗體具有，老鼠單株抗體 M A B L - 1 以及 M A B L - 2 各別的 V 區域之正確構造 (圖 1 至 3)。

實施例 5 (重建 M A B L - 1 抗體以及重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v (s c F v) 區域的製作)

5 . 1 重建 M A B L - 1 抗體單鏈 F v 區域的製作

重建 M A B L - 1 抗體單鏈 F v 區域如以下述製得。重建 M A B L - 1 抗體 H 鏈 V 區域，以及連接體區域、以及重建 M A B L - 1 抗體 L 鏈 V 區域分別使用 P C R 法增幅，經由連接製得重建 M A B L - 1 抗體單鏈 F v 區域。此方法如圖 4 模式所示。為製得重建 M A B L - 1 抗體單鏈 F v 區域，使用 6 個 P C R 引子 (A - F)。引子 A、C 以及 E 為具有意義 (sense) 序列，引子 B、D 以及 F 具有無意義 (unsense) 序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (27)

為製得 H 鏈 V 區域的前方引子 V H S (引子 A 、 序列號碼 : 1 3) 與編碼 H 鏈 V 區域的 N 末端之 D N A 雜交 , 且設計成具有 N c o I 限制酶辨識位置。為製得 H 鏈 V 區域的後方引子 V H A S (引子 B , 序列號碼 : 1 4) 與編碼 H 鏈 V 區域的 C 末端之 D N A 雜交 , 且設計成於連接體成重疊 (overlap) 。

為製得連接體的前方引子 L S (引子 C , 序列號碼 : 1 5) , 與編碼連接體的 N 末端之 D N A 進行雜交 , 且設計成編碼 H 鏈 V 區域的 C 末端的 D N A 成重疊。為製得連接體的後方引子 L A S (引子 D , 序列號碼 : 1 6) 與編碼連接體的 C 末端之 D N A 進行雜交 , 且設計成編碼 L 鏈 V 區域的 N 末端之 D N A 成重疊。

為製得 L 鏈 V 區域的前方引子 V L S (引子 E , 序列號碼 : 1 7) 與編碼連接體的 C 末端之 D N A 進行雜交 , 且設計成編碼 L 鏈 V 區域的 N 末端之 D N A 成重疊。為製得 L 鏈 V 區域的後方引子 V L A S - F L A G (引子 F , 序列號碼 : 1 8) 與編碼 L 鏈 V 區域的 C 末端之 D N A 進行雜交 , 且設計成編碼 F L A G 太之序列 (Hopp, T. P. 們, Bio/Technology, 6, 1204-1210, 1988) , 2 個轉錄停止密碼子以及具有 E c o R I 限制酶辨識位置。

於第 1 P C R 階段進行 A - B 、 C - D 以及 E - F 的 3 個反應 , 純化各 P C R 產物。將第 1 P C R 所得的 3 個 P C R 產物以這些之互補性進行組合。再加上引子 A 以及 F , 增幅編碼重建 M A B L - 1 抗體單鏈 F v 區域之全長

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (28)

D N A (第 2 P C R) 。 且 , 對於第 1 P C R , 編碼重建 M A B L - 1 抗體 H 鏈 V 區域的質體 p G E M - M 1 H (參考實施例 2) , 含有編碼 G l y G l y G l y G l y S e r G l y G l y G l y G l y S e r (序列號碼 : 1 9) 所成的連接體區域之 D N A 序列 (Huston, J. S. 們, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988) 所成之質體 p G E M - M 1 L (參照實施例 2) , 以及編碼重建 M A B L - 1 抗體 L 鏈 V 區域的質體 p G E M - M 1 L (參照實施例 2) 分別作為模板使用。

第 1 P C R 階段的溶液 5 0 μ l 為含有 5 μ l 的 1 0 \times P C R 緩衝液 II 、 2 m M M g C l ₂ 、 0 . 1 6 m M d N T P s 、 2 . 5 單位的 D N A 聚合酶 AmpliTaq G o l d (以上為 PERKIN ELMER 公司製) 、 各個引子 0 . 4 μ M 以及 5 n g 的各模板 D N A , 9 4 $^{\circ}$ C 作為初期溫度 9 分鐘後 , 再於 9 4 $^{\circ}$ C 下 1 分鐘 , 6 5 $^{\circ}$ C 下 1 分鐘以及 7 2 $^{\circ}$ C 下 1 分 2 0 秒 , 以此順序加熱。此溫度循環進行 3 5 次重複後 , 將此反應混合物於 7 2 $^{\circ}$ C 下加熱 7 分鐘。

P C R 生成物 A - B (3 7 1 b p) 、 C - D (6 3 b p) 、 以及 E - F (3 8 4 b p) 使用 QIAquick P C R 純化套組 (QIAGEN 公司製) 進行純化 , 於第 2 P C R 進行組合。於第 2 P C R , 作為模板的 1 2 0 n g 之第 1 P C R 生成物 A - B 、 2 0 n g 的 P C R 生成物 C - D 以及 1 2 0 n g 的 P C R 生成物 E - F , 含有 1 0 μ

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (29)

1 的 1 0 × P C R 緩衝液 II 、 2 m M M g C l ₂ 、
 0 . 1 6 m M d N T P s 、 5 單位的 D N A 聚合酶
 AmpliTaq G o l d (以上為 PERKIN ELMER 公司製) 的
 9 8 μ l P C R 混合液 , 9 4 ° C 作為初期溫度 8 分鐘後
 , 再於 9 4 ° C 下 2 分鐘 , 6 5 ° C 下 2 分鐘以及 7 2 ° C 下 2
 分 , 以此順序加熱。此溫度循環進行 2 次重複後 , 分別加
 入 0 . 4 μ M 的引子 A 以及 F 。 9 4 ° C 作為初期溫度 1 分
 鐘後 , 再於 9 4 ° C 下 1 分鐘 , 6 5 ° C 下 1 分鐘以及 7 2 ° C
 下 1 分 2 0 秒 , 此溫度循環進行 3 5 次重複後 , 反應混合
 物於 7 2 ° C 下 7 分鐘加熱。

純化第 2 P C R 所生成的 8 4 3 b p 之 D N A 片段進
 行純化 , 經 N c o I 以及 E c o R I 消化所得之 D N A 片
 段以 p S C F V T 7 載體作純系化。且 , 本發明載體
 p S C F V T 7 含有適合大腸桿菌周邊漿液 (periplasma)
 分泌表現系的 p e l B 信號序列 (Lei, S. P. 們, J.

Bacteriology, 169, 4379-4383, 1987) 。 D N A 序列決定後
 , 含有編碼重建 M A B L - 1 抗體單鏈 F v 區域的正確胺
 基酸之 D N A 片段的質體 , 命名為 p s c M 1 (參考圖 5
 所示) 。含於本質體 p s c M 1 的重建 M A B L - 1 抗體
 單鏈 F v 區域之鹼基序列以及胺基酸序列以序列號碼 :
 2 0 所示。

其次 , 製作哺乳動物細胞中使表現重建 M A B L - 1
 抗體單鏈 F v 區域之載體 , p s c M 1 載體以 P C R 法修
 飾。所得的 D N A 片段導入 p C H O 1 表現載體內。且 ,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (30)

本發明載體 p C H O 1 係由 D H F R - Δ E - r v H - P M 1 - f (參考 W O 9 2 / 1 9 7 5 9) , 以 E c o R I 以及 S m a I 分解刪除抗體基因, 因連接 E c o R I - N o t I - B a m H I Adaptor (寶酒造公司製) 而構築載體。

使用於 P C R 的引子, 與編碼作為前方引子 H 鏈 V 區域的 N 末端之 D N A 進行雜交, 且使用具有 S a l I 限制酶辨識位置之序列號碼 2 1 所示的 S a l - V H S 引子, 以及作為後方引子與編碼第 1 架構序列的最後之 D N A 進行雜交的序列號碼: 2 2 所示的 F R H 1 a n t i 引子。

P C R 溶液 1 0 0 μ l , 含有 1 0 μ l 的 1 0 \times P C R 緩衝液 II 、 2 m M M g C l ₂ 、 0 . 1 6 m M d N T P s 、 5 單位的 D N A 聚合酶 AmpliTaq G o l d , 0 . 4 μ M 之各引子, 以及 8 n g 的模板 D N A (p s c M 1) , 9 5 $^{\circ}$ C 作為初期溫度 9 分鐘後, 再於 9 5 $^{\circ}$ C 下 1 分鐘, 6 0 $^{\circ}$ C 下 1 分鐘以及 7 2 $^{\circ}$ C 下 1 分 2 0 秒, 以此順序加熱。此溫度循環進行 3 5 次重複後, , 反應混合物於 7 2 $^{\circ}$ C 下 7 分鐘加熱。

P C R 生成物以 Q I A q u i c k P C R P u r i f i c a t i o n K i t (Q I A G E N 公司製) 進行純化, 以 S a l I 以及 M b o II 分解, 得到編碼 N 末端面重建 M A B L - 1 抗體單鏈 F v 區域之 D N A 片段。又, p s c M 1 載體以 M b o II 以及 E c o R I 分解, 得到編碼 C 末端面重建 M A B L - 1 抗體單鏈 F v 區域之 D N A 片段。因此, S a l I -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (31)

Mbo II DNA 片段以及 M b o II - EcoR I DNA 片段以 p C H O 1 - I g s 載體作純系化。D N A 序列決定後，含具有正確的 D N A 序列之 D N A 片段的質體命名為 p C H O M 1 。 (參照圖 6) 。且，本發明的載體 p C H O 1 - I g s 含有適合哺乳動物細胞分泌表現系之老鼠 I g G 1 信號序列 (Nature, 322, 323-327, 1988) 。含於本質體 p C H O M 1 的重建 M A B L - 1 抗體單鏈 F v 區域之鹼基序列以及胺基酸序列以序列號碼：23 表示。

5 . 2 重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域的製作

重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域如前述 5 . 1 製作。對第 1 P C R ，使用取代 p G E M - M 1 H 使用編碼重建 M A B L - 2 抗體 H 鏈 V 區域之質體 p G E M - M 2 H (參考實施例 2) 、以及取代 p G E M - M 1 L 使用編碼重建 M A B L - 2 抗體 L 鏈 V 區域之質體 p G E M - M 2 L (參考實施例 2) 、得到含有編碼重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域的正確胺基酸之 D N A 片段的質體 p s c M 2 。

含於本質體 p s c M 2 的重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域之鹼基序列以及胺基酸序列以序列號碼：24 表示。

又，藉 p s c M 2 載體的修飾，取得含有編碼重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域的正確胺基酸序列之 D N A 片段，的哺乳動物細胞表現用 p C H O M 2 載體。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (32)

含於本質體 p C H O M 2 的重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域之鹼基序列以及胺基酸序列以序列號碼：25 表示。

5.3 COS 7 細胞的基因導入

為觀察重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域的過渡性表現，以 p C H O M 2 載體對 C O S 7 細胞作試驗。

p C H O M 2 載體使用 Gene Pulser 裝置 (BioRad 公司製) 以電穿透作用於 C O S 7 細胞作轉形作用。D N A ($10 \mu\text{g}$) 與 P B S 中 1×10^7 細胞 / m l 的 0.8 m l 加入容器內，以 1.5 k V、25 μF 的容量進行脈衝。

於室溫下 10 分鐘的回復期間後，經電穿透作用處理的細胞，加入含有 10% 的牛胎血清之 I M D M 培養液 (GIBCO BRL 公司製) 中。72 小時培養後，收集培養上清液，進行離心使細胞碎片除去得到回收培養液上清液。

5.4 COS 7 細胞培養液上清液中重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域之檢測

對以 p C H O M 2 載體導入基因的 C O S 7 細胞培養液上清液之重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 以蛋白質印跡法作確認，以 p C H O M 2 載體導入基因的 C O S 7 細胞培養液上清液以及作為對照組的以 p C H O 1 載體導入基因之 C O S 7 細胞培養液上清液作 S D S 電泳，以 REINFORCED NC 膜 (Schleicher & Schuell 製) 轉印。5%

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (33)

乳清 (森永乳業公司製) 中進行覆蓋、以 0 . 0 5 % Tween 2 0 - P B S 洗淨後，加上抗 F L A G 抗體 (SIGMA 公司製) 。於室溫下恆溫培養以及洗淨後，加上鹼性磷酸化酶結合抗老鼠 I g G 抗體 (Zymed 公司製) ，於室溫下恆溫培養以及洗淨後，添加基質溶液 (Kirkegaard Perry Laboratories 公司製) ，使其顯色 (圖 7) 。

其結果，僅於 p C H O M 2 載體導入的 C O S 7 細胞培養液上清液中，檢測出 F L A G 肽特異性蛋白質。顯示此培養液上清液中有重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域分泌出。

5 . 5 流質細胞測定儀

為測定對抗原的結合，使用前述 C O S 7 細胞培養液上清液進行流質細胞測定儀。表現人類 I A P 之老鼠白血病細胞株 L 1 2 1 0 細胞，或作為對照組以 p C O S 1 載體轉形作用的 L 1 2 1 0 細胞 2×10^5 個中，添加表現重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域的 C O S 7 細胞培養液上清液或，添加作為對照組以 p C H O 1 載體轉形作用的 C O S 7 細胞培養液上清液，於冰上進行恆溫培養以及洗淨後，加入老鼠抗 F L A G 抗體 (S I G M A 公司製) 。恆溫培養以及洗淨後，加上以 F I T C 標識的抗老鼠 I g G 抗體 (B E C T O N D I C K I N S O N 公司製) ，再次恆溫培養以及洗淨後，於 F A C S c a n 裝置 (B E C T O N D I C K I N S O N 公司製) 測定螢光強度。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (34)

其結果，重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域，因與表現人類 I A P 的 L 1 2 1 0 細胞行特異結合，故顯示此重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域對人類 I A P 具有親和性。

5. 競爭型 (Competitive) E L I S A

以對老鼠單株抗體的抗原結合之阻斷活性作為指標，測定重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域的抗原結合性活性。

調整成 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的抗 F L A G 抗體加入 9 6 穴培養皿中各穴中，於 37°C 下進行 2 小時的恆溫培養。洗淨後，進行於 1 % B S A - P B S 中的覆蓋。室溫下恆溫培養以及洗淨後，導入分泌型人類 I A P 抗原基因 (序列號碼：26) 之 C O S 7 細胞培養液上清液，以 P B S 稀釋成 2 倍者加入各穴中。室溫下恆溫培養以及洗淨後，將調整成 $100 \text{ ng} / \text{ml}$ 生物素 (biotin) 化 M A B L - 2 抗體 $50 \mu\text{l}$ 以及順序稀釋重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域表現 C O S 7 細胞培養液上清液 $50 \mu\text{l}$ 混合而成者加入各穴中。室溫下恆溫培養以及洗淨後，加入鹼性磷酸化酶結合鏈黴素蛋白 (streptavidin) (Zymed 公司製)。室溫下恆溫培養以及洗淨後，加入基質溶液 (SIGMA 公司製)，再以 405 nm 測定吸光度。

其結果，重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域 (M A B L 2 - s c F v)，與對照組的 p C H O 1 導入

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (35)

C O S 7 細胞培養液上清液作比較，顯示隨著濃度高低老鼠 M A B L - 2 抗體對人類 I A P 抗原的結合具有阻斷性，（圖 1 2）。由此可知，重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域，顯示其具有老鼠單株抗體 M A B L - 2 各個 V 區域的正確構造。

5 . 7 體外 (In vitro) 中細胞凋亡的誘發效果

使用人類 I A P 以基因導入的 L 1 2 1 0 細胞，以及作為對照組 p C O S 1 載體以基因導入的 L 1 2 1 0 細胞，以及 C C R F - C E M 細胞，對重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域的細胞凋亡誘發作用以 Annexin - V (velingermanhaim 公司製) 染色作檢討。

1×10^5 個的各細胞中，添加重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域表現 C O S 7 細胞培養液上清液或，作為對照組 p C H O 1 載體導入 C O S 7 細胞培養液上清液最終濃度為 5 0 % ，培養 2 4 小時。其後進行 Annexin - V 染色，以 FACScan 裝置 (BECTON DICKINSON 公司製) 測定螢光強度。

藉 Annexin - V 染色的解析結果分別以圖 1 3 至 1 8 表示。於此，圖左下區域的點為生細胞、右下的區域為細胞凋亡的細胞、右上區域為細胞凋亡的後期細胞。其結果重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 區域 (M A B L 2 - s c F v) 係對 L 1 2 1 0 細胞而言，人類 I A P 抗原特異性地顯著誘導細胞死亡 (圖 1 3 至 1 6)。又，對

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (36)

C C R F - C E M 細胞而言亦比對照組有著顯著的誘導細胞死亡現象 (圖 1 7 至 1 8) 。

5 . 8 對來自 C H O 細胞產生的 M A B L - 2 抗體之單鏈 F v 聚肽

欲建立來自 M A B L - 2 抗體的單鏈 F v (聚肽) 的恆定表現 C H O 細胞株，導入基因 p C H O M 2 載體於 C H O 細胞中。

將 p C H O M 2 載體使用 Gene Pulser 裝置 (BioRad 公司製) 以電穿透作用將 C H O 作進行轉形。混合 D N A (1 0 μ g) 與懸濁於 0 . 7 m l 之 P B S 的 C H O 細胞 (1×10^7 細胞 / m l) 者放入培養器中，以 1 . 5 k V 、 2 5 μ F 的容量進行脈衝。於室溫下作 1 0 分鐘的回復時間後，經電穿透作用處理的細胞，加入 1 0 % 的含有牛胚胎血清之不含核酸 α - M E M 培養基 (G I B C O B R L 公司製) 進行培養。對於所得的純系，以 S D S - P A G E 確認目的蛋白質的表現，選擇出較高表現量的純系為產生來自 M A B L - 2 抗體的單鏈 F v 細胞株。於含有 1 0 n M methotrexate (S I G M A 公司製) 的無血清培養基 C H O - S - S F M II (G I B C O B R L 公司製) 進行培養後，收集上清液，以離心法分離除去細胞破片獲得回收培養上清液。

5 . 9 純化來自 C H O 細胞產生的 M A B L - 2 抗體之單鏈 F v

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (37)

5 . 8 所得之產生單鏈 F v 表現 C H O 株的培養上清液，使用人工透析用筒 (P A N 1 3 0 S F 、旭 medical) 濃縮至 2 0 倍。濃縮液保存於 -20°C 下，純化再進行解凍。

由 C H O 細胞培養上清液純化單鏈 F v ，進行 Blue-sepharose 、羥基磷灰石以及膠體過濾等三種柱色譜分析。

(1) Blue-sepharose 柱色譜

以培養上清液的濃縮液以 2 0 m M 醋酸緩衝液 (p H 6 . 0) 稀釋 1 0 倍，以離心分離 (1 0 0 0 0 r p m \times 3 0 分鐘) 除去不溶物。添加與上清液相同緩衝液作平衡化之 Blue-sepharose 柱 (2 0 m l) ，以相同緩衝液洗淨後，同緩衝液中 N a C l 濃度以 0 . 1 、 0 . 2 、 0 . 3 、 0 . 5 以及 1 . 0 M 做階段式上升，溶離出吸著於柱子的蛋白質。通過 S D S - P A G E 以及分析各溶離部分，取出確認單鏈 F v 部分 (0 . 1 至 0 . 3 M N a C l 溶離部分) ，使用 CentriPrep - 1 0 (Amicon) 濃縮至約 2 0 倍。

(2) 羥基磷灰石

(1) 的濃縮液以 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 稀釋 1 0 倍，添加於羥基磷灰石柱 (2 0 m l 、 B i o R a d) 。以 6 0 m l 的 1 0 m M 磷酸緩衝液 (p H 7 . 0) 洗淨柱子後，磷酸緩衝液濃度直接上升至

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (38)

2 0 0 m M , 溶離出吸著於柱子的蛋白質 (圖 1 9) 。 以 S D S - P A G E 分析各部分的結果、確認部分 A 以及部分 B 的單鏈 F v 。

(3) 膠體過濾

(2) 的部分 A 以及 B 分別使用 CentriPrep - 1 0 作濃縮, 添加於以含有 0 . 1 5 M N a C l 的 2 0 m M 醋酸緩衝液 (p H 6 . 0) 作平衡化之 T S K g e l G 3 0 0 0 S W G 柱 (2 1 . 5 × 6 0 0 m m) 。 色譜如圖 2 0 所示。所得之部分以 S D S - P A G E 分析的結果, 任一的主要波峰 (A I 、 B I) 皆為目的單鏈 F v , 以膠體過濾分析的結果, 溶離出部分 A 分子量約為 3 6 k D 、部分 B 則約 7 6 k D 。 經純化單鏈 F v (A I 、 B I) 使用 1 5 % - S D S - 聚丙稀醯胺膠體進行分析。於試樣品中添加還原劑、與非添加處理, 以 L a e m m l i 的方法為準進行電泳, 電泳後的蛋白質以科麥曲豔藍染色。如圖 2 1 所示, A I 、 B I 與是否添加還原劑無關皆表現於分子量約 3 5 k D 的單一帶上。由以上的結果, 判斷 A I 為單鏈 F v 的單體, B I 為單鏈 F v 的非共鍵結二聚物。部分 A I 以及 B I 使用 T S K g e l G 3 0 0 0 S W 柱 (7 . 5 × 6 0 m m) 以膠體過濾所分析的結果, 檢測出部分 A I 僅為單體的波峰、部分 B I 則僅為二聚物的波峰 (參考圖 2 2) 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (39)

5 . 1 0 構築來自大腸桿菌細胞的 M A B L - 2 抗體之單鏈 F v 聚肽表現載體

欲製作來自 M A B L - 2 抗體的單鏈 F v 能有效率表現於大腸桿菌體內之載體，將 p s c M 2 載體以 P C R 法作修飾，所得之 D N A 片段導入 p S C F V T 7 表現載體中。

使用於 P C R 的引子，作為前方引子使用，編碼 H 鏈 V 區域的 N 末端之 D N A 經雜交，且具有起始密碼以及 N d e I 限制酶辨識位置的序列號碼：27 所示之 N d e - V H S m 0 2 引子；作為後方引子使用，編碼 L 鏈 V 區域的 C 末端之 D N A 經雜交，且具有停止密碼以及 E c o R I 限制酶辨識位置的序列號碼：28 所示之 V L A S 引子。且因前方引子的 N d e - V H S m 0 2 於大腸桿菌體內可有效率地表現，故編碼 H 鏈 V 區域的 N 末端之 D N A 經雜交部分含有 5 個點突變。

1 0 0 μ l 的 P C R 溶液中含有 1 0 μ l 的 1 0 \times P C R B u f f e r # 1、1 m M M g C l ₂、0 . 2 m M d N T P s、5 單位的 K O D D N A 聚合酶（以上東洋紡公司製）、各引子為 1 μ M、以及 1 0 0 n g 的模板 D N A（p s c M 2）、於 9 8 $^{\circ}$ C 下 1 5 秒、6 5 $^{\circ}$ C 下 2 秒以及 7 4 $^{\circ}$ C 下 3 0 秒，依此順序加熱。此溫度循環進行 2 5 次重複。

P C R 生成物使用 QIAquick P C R P u r i f i c a t i o n K i t（QIAGEN 公司製）進行純化，以 N d e I 以及

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 (40)

E c o R I 分解，所得之 D N A 片段以 p S C F V T 7 載體進行純系化。且，本表現載體 p S C F V T 7 經 N d e I 以及 E c o R I 分解而消除 p e l B 訊息序列。決定 D N A 序列後，含有具有正確 D N A 序列的 D N A 片段之質體命名 p s c M 2 D E m 0 2 (參考圖 2 3)。含於質體 p s c M 2 D E m 0 2 的來自 M A B L - 2 抗體的單鏈 F v 之鹼基序列以及胺基酸序列如序列號碼：29 所示。

5 . 1 1 對來自大腸桿菌細胞的 M A B L - 2 抗體之單鏈 F v 聚肽表現

欲得到表現來自 M A B L - 2 抗體的單鏈 F v 聚肽之大腸桿菌，以 p s c M 2 D E m 0 2 載體於大腸桿菌 B L 2 1 (D E 3) p L y s S (S T R A T A G E N E 公司製) 作轉形。所得的純系，以 S D S - P A G E 檢討作為目的蛋白質之表現，選擇表現量較高的純系作為來自 M A B L - 2 抗體的單鏈 F v 聚肽之細胞株。

5 . 1 2 純化來自大腸桿菌細胞產生的 M A B L - 2 抗體之單鏈 F v 聚肽

經轉形所得之大腸桿菌之單一菌落於 3 m l L B 培養基於 2 8 ° C 下培養 7 小時，將此傳代培養於 7 0 m l 的 L B 培養基中，於 2 8 ° C 下作一夜培養。此預培養再傳代培養至 7 L 的 L B 培養基中，使用發酵罐於 2 8 ° C 下攪拌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (41)

速度 3 0 0 r p m 進行培養。O . D . = 1 . 5 時以 1 m M I P T G 進行誘導，之後再進行 3 小時培養。

培養液經離心分離 (1 0 0 0 0 × g , 1 0 分鐘) , 回收沈澱菌體，加入含有 5 m M E D T A 、 0 . 1 M N a C l 、 1 % T r i t o n X - 1 0 0 的 5 0 m M T r i s 鹽酸緩衝液 (p H 8 . 0) , 以超音波 (o u t p u t : 4 、 d u t y c y c l e : 7 0 % 、 1 分鐘 × 1 0 次) 將菌體破碎，此懸濁液以離心分離 (1 2 0 0 0 × g , 1 0 分鐘) 沈澱回收內含體加入含有 5 0 m M E D T A 、 0 . 1 M N a C l 、 4 % T r i t o n X - 1 0 0 之 5 0 m M T r i s 鹽酸緩衝液 (p H 8 . 0) , 再度作超音波處理 (o u t p u t : 4 、 d u t y c y c l e : 5 0 % 、 3 0 秒 × 2 次) , 經離心分離 (1 2 0 0 0 × g , 1 0 分鐘) 目的蛋白質以沈澱回收，除去存在於上清液所夾雜的蛋白質。

含有目的蛋白質的內含體溶解於含有 6 M U r e a 、 5 m M E D T A 、 0 . 1 M N a C l 之 5 0 m M T r i s 鹽酸緩衝液 (p H 8 . 0) , 以流速 5 m l / 分添加於經含有 4 M U r e a 、 5 m M E D T A 、 0 . 1 M N a C l 、 1 0 m M 氫硫乙醇之 5 0 m M T r i s 鹽酸緩衝液 (p H 8 . 0) 平衡化的 SephacrylS - 3 0 0 (5 × 9 0 c m 、 amasham · falmasia) 膠體過濾柱，除去締合的高分子量之單鏈 F v 。各部分以 S D S - P A G E 作分析，對於純度較高的部分，以使用於膠體過

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (42)

濾之溶媒稀釋至 $O.D._{280} = 0.25$ 後，對 5 mM EDTA、 0.1 M NaCl、 0.5 M Arg、 2 mM 還原型谷胱甘肽、 0.2 mM 氧化型谷胱甘肽的 50 mM Tris 鹽酸緩衝液 ($pH 8.0$) 進行 3 次透析，並進行解鏈操作。且對含有 0.15 M NaCl 的 20 mM 醋酸緩衝液 ($pH 6.0$) 進行 3 次透析，進行溶媒交換。

欲分離除去極少的含於分子間以 S - S 鍵結之交聯的高分子，添加於經含有 0.15 M NaCl 的 20 mM 醋酸緩衝液 ($pH 6.0$) 平衡之 Superdex 200 pg ($2.6 \times 60\text{ cm}$ 、amasham · falmacia 公司製) 膠體過濾柱。如圖 2 4 所示，於被判定為高分子量的締合體之寬波峰後，檢測出主要波峰與次波峰之 2 個波峰。由以 SDS - PAGE 作分析 (參考圖 2 1) 以及膠體過濾之溶離位置，判定主要波峰為單鏈 Fv 聚肽之單體、次波峰為非共鍵結性之二聚物。

5.13 來自 MABL - 2 抗體的純化單鏈 Fv 聚肽於體外之細胞凋亡誘發效果

使用經基因導入人類 IAP 的 L1210 細胞 (hIAP / L1210)，來自 CHO 細胞以及大腸桿菌細胞產生之 MABL - 2 抗體的單鏈 Fv 聚肽 (MABL2 - scFv) 的細胞凋亡誘發作用，以以下 2 種步驟作 Annexin - V (BOEHRINGER MANNHEIM 公司製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (43)

) 染色後作檢討。

第一種實驗步驟為，於 5×10^4 個之 h I A P / L 1 2 1 0 細胞中，添加抗體試料至最終濃度為 $3 \mu g / ml$ ，經 2 4 小時培養。作為抗體試料，對於 5 . 9 所得之來自 C H O 細胞的 M A B L 2 單鏈 F v 之單體以及二聚物、且由 5 . 1 所得之來自大腸桿菌細胞的同單體以及二聚物，而對照組則使用老鼠 I g G 抗體進行檢討。培養後，進行 Annexin - V 染色，以 FACScan 裝置 (BECTON DICKINSON 公司製) 進行螢光強度的測定。

又，第 2 種實驗步驟為，於 5×10^4 個之 h I A P / L 1 2 1 0 細胞中，添加抗體試料至最終濃度為 $3 \mu g / ml$ ，經 2 小時培養後添加抗 F L A G 抗體 (SIGMA 公司製) 至最終濃度為 $15 \mu g / ml$ ，再培養 2 2 小時。作為抗體試料，對於 5 . 9 所得之來自 C H O 細胞的 M A B L 2 單鏈 F v 之單體，以及作為對照組則使用老鼠 I g G 抗體進行檢討。培養後，進行 Annexin - V 染色，以 FACScan 裝置進行螢光強度的測定。

以 Annexin - V 染色作解析的結果分別如圖 2 5 至 3 1 所示。其結果，C H O 細胞以及大腸桿菌細胞產生之 M A B L - 2 抗體的單鏈 F v 聚肽之單體與對照組 (圖 2 5) 作比較，顯示明顯的細胞死亡誘發現象 (圖 2 6 、 2 7)，但對於 C H O 細胞以及大腸桿菌細胞產生之單鏈 F v 聚肽的單體則無被認定有細胞凋亡誘發作用 (圖 2 8 、 2 9)。又，因添加抗 F L A G 抗體，C H O 細胞以及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (44)

大腸桿菌細胞產生之單鏈 F v 聚肽的單體與對照組 (圖 3 0) 作比較顯示顯著的細胞死亡誘發現象 (圖 3 1) 。

5 . 1 4 對 s c F v / C H O 聚肽的單體以及二聚物之人類骨髓瘤老鼠模型之抗腫瘤效果

(1) 老鼠血清人類 I g G 定量法

對於老鼠血清中，產生人類骨髓瘤細胞的人類 I g G (M 蛋白質) 的定量，以下述 E L I S A 進行。以 0 . 1 % 碳酸氫鹽緩衝液 (p H 9 . 6) 稀釋至 1 μ g / m l 的羊抗人類 I g G 抗體 (B I O S O U R C E 公司製，L o t # 7 9 0 2) 其 1 0 0 μ l 加入 9 6 格的培養皿中 (N u n c 公司製) ， 4 $^{\circ}$ C 下經一晚的恆溫培養，將抗體固相化。經封閉步驟後，經階段式稀釋的老鼠血清或作為標本，添加 1 0 0 μ l 的人類 I g G (C a p p e l 公司製，L o t # 0 0 9 1 5) ，於室溫下作 2 小時的恆溫培養。洗淨後，加入 1 0 0 μ l 經 5 0 0 0 倍稀釋的鹼磷酸酶標識抗人類 I g G 抗體 (B I O S O U R C E 公司製，L o t # 6 2 0 2) ，室溫下恆溫培養 1 小時。洗淨後，加入基質溶液進行恆溫培養後，使用 MICROPLATE READER Model 3550 (B i o R a d 公司製) 測定 4 0 5 n m 的吸光度，由標本的人類 I g G 之吸光度所得之校正曲線，算出老鼠血清中人類 I g G (M 蛋白質) 濃度。

(2) 投與抗體的調製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (45)

s c F v / C H O 聚肽的單體以及二聚物，於投與當日使用過濾滅菌的 P B S (-)，調製如 0 . 4 m g / m l、0 . 2 5 m g / m l 作為投與試藥。

(3) 人類骨髓瘤老鼠模型的製作

人類骨髓瘤模型如以下製作。使用含有 S C I D 老鼠 (日本 clear) 作體內傳代培養的 K P M M 2 細胞 (特開平 7 - 2 3 6 4 7 5 號公報) 之 R P M I 1 6 4 0 培養基 (G I B C O B R L 公司製) 調製至 3×10^7 個 / m l。另外以 1 0 0 μ l 的抗 asialoGMI 抗體 (和光純藥公司製，1 管中溶解 5 m l) 作皮下投與的 S C I D 老鼠 (雄，6 週) (日本 clear) 注入上述 K P M M 2 細胞懸濁液 2 0 0 μ l (6×10^6 個 / 老鼠) 於尾靜脈上。

(4) 抗體投與

對 (3) 所製作的人類骨髓瘤老鼠模型，移植 K P M M 2 細胞後 3 天、1 天 2 次、進行 3 天、上述 (2) 所調製的投與試藥、單體為 2 5 0 μ l、二聚物為 4 0 0 μ l 作尾靜脈的投與。作為對照組，過濾滅菌的 P B S (-) 同樣地 1 天 2 次、進行 3 天，2 0 0 μ l 作尾靜脈投與。兩群皆為 7 隻老鼠。

(5) 對 s c F v / C H O 聚肽的單體以及二聚物之人類骨髓瘤移植老鼠模型之抗腫瘤效果作評價

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (46)

對 s c F v / C H O 聚肽的單體或二聚物之人類骨髓瘤老鼠模型之抗腫瘤效果，產生該骨髓瘤細胞的人類

I g G (M 蛋白質) 之老鼠血清中量的變化、以及生存時間作評價。對於老鼠血清中人類 I g G 量的變化，採出移植 K P M M 2 細胞後第 2 4 天的血清，如上述 (1) 使用 E L I S A 測定人類 I g G 量。其結果，P B S (-) 投與群中，對血清人類 I g G (M 蛋白質) 量上升至約 8 5 0 0 μ g / m l 而言，s c F v / C H O 二聚物投與群其為對照組的 1 / 1 0 以下顯示相當低值，由此可知 s c F v / C H O 二聚物對於 K P M M 2 細胞的增殖具有非常強的抑制 (圖 3 2) 。另一方面，對於生存時間亦如圖 3 3 所示，可知 s c F v / C H O 二聚物投與群中與 P B S (-) 投與群作比較顯示明顯的生存時間的延長。

由上述可知，s c F v / C H O 二聚物對於人類骨髓瘤老鼠模型，顯示具有抗腫瘤效果。本發明的重建聚肽之 s c F v / C H O 二聚物之抗腫瘤效果，被考慮為以該重建聚肽所具有的細胞凋亡誘發作用為基準。

5 . 1 5 紅血球凝集試驗

紅血球凝集試驗以及紅血球凝集的判定法，可以續生化學試驗講座的免疫生化學研究法 (日本生化學會編、東京化學同人) 為準實施。

健康人的血以肝素處理的注射筒採血，以 P B S (-) 作 3 次洗淨後，以 P B S (-) 調製至最終濃度為 2 %

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (47)

之紅血球浮游液。檢測用樣品則使用作為對照組的老鼠 I g G (Z y m e d 公司製) , 使用 M A B L - 2 抗體、 C H O 細胞產生的單鏈 F v 聚肽單體、二聚物、大腸桿菌產生的單鏈 F v 聚肽之單體與二聚物 L 。欲檢討紅血球的凝集作用, 使用 falcon 公司製的 U 底 9 6 格皿, 添加 5 0 μ l / 格的上述抗體樣品, 再添加 5 0 μ l 的 2 % 紅血球浮游液, 經混合, 於 3 7 $^{\circ}$ C 下恆溫培養 2 小時後於 4 $^{\circ}$ C 下保存一晚, 判斷其凝集。又, 作為對照組, 添加 P B S (-) 5 0 μ l / 格, 與抗體樣品相同進行凝集試驗。抗體的最終濃度為老鼠 I g G 、 M A B L - 1 抗體為 0 . 0 1 、 0 . 1 、 1 、 1 0 、 1 0 0 μ g / m l 、 單鏈 F v 為 0 . 0 0 4 、 0 . 0 4 、 0 . 4 、 4 、 4 0 、 8 0 μ g / m l , 而僅大腸桿菌產生的單鏈 F v 聚肽之二聚物則設定 1 6 0 μ g / m l 的用量。其結果, 如下述表 2 所示, M A B L - 2 抗體中 0 . 1 μ g / m l 以上發現有紅血球凝集現象, 而單鏈 F v 聚肽中單體、二聚物則無發現紅血球凝集現象。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (48)

表 2
紅血球凝集試驗

	對照	0.01	0.1	1	10	100	80	160
							(μ /mL)	(μ /mL)
mIgG	-	-	-	-	-	-	-	-
MABL - 2(intact)	-	-	+	+++	+++	++	40	80
scFv/CHO 單體	對照	0.004	0.04	0.4	4	40	80	(μ /mL)
scFv/CHO 二聚物	-	-	-	-	-	-	-	-
scFv/E.coli 單體	-	-	-	-	-	-	-	-
scFv/E.coli	-	-	-	-	-	-	-	-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (49)

實施例 6 含有 2 個 H 鏈 V 區域以及 2 個 L 鏈 V 區域的重建聚肽 $s c (F v)_2$ 以及具有種種長度肽連接體之 M A B L - 2 抗體 $s c F v$

6 . 1 M A B L - 2 抗體 $s c (F v)_2$ 表現質體之構築

欲製作表現含有來自 M A B L - 2 抗體的 2 個 H 鏈 V 區域以及 2 個 L 鏈 V 區域之重建聚肽 $[s c (F v)_2]$ 的質體，前述 p C H O M 2 (含有編碼來自 M A B L - 2 抗體的 $s c F v$ 之 D N A) 如下述以 P C R 法修飾，所得之 D N A 片段導入 p C H O M 2 中。

使用於 P C R 的引子，作為有意引子，使用與編碼 E F 1 α 的 D N A 雜交之 E F 1 引子 (序列號碼：30)，作為無意引子，使用與編碼 L 鏈 V 區域的 C 末端之 D N A 雜交且編碼連接區域之 D N A 序列 (序列號碼：19) 以及具有 S a l I 限制酶辨識位置的 V L L A S 引子 (序列號碼：31)。

P C R 溶液 100 μ l 中含有，10 μ l 的 10 \times P C R 緩衝液 II、1 m M M g C l ₂、0 . 2 m M d N T P s (d A T P, d G T P, d C T P, d T T P)、5 單位的 K O D D N A 聚合酶 (以上為東洋紡公司製)、1 μ M 的各引子，以及 100 n g 的模板 D N A (p C H O M 2)。P C R 溶液以 94 $^{\circ}$ C 下 30 秒、50 $^{\circ}$ C 下 30 秒以及 74 $^{\circ}$ C 下 1 分鐘，以此順序加熱。此溫度循環進行 30 次重複。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (50)

P C R 生成物使用 QIAquik PCR Purification Kit (QIAGEN 公司製) 純化，以 S a l I 消化，所得的 D N A 片段以 pBluescript K S⁺ 載體 (東洋紡公司製) 純系化。D N A 序列決定後，含有正確 D N A 序列的 D N A 片段之質體以 S a l I 消化，所得之 D N A 片段與經 S a l I 消化的 p C H O M 2 使用 Rapid DNA Ligation Kit (BOEHRINGER MANNHEIM 公司製) 作連結。D N A 序列決定後，含有正確 D N A 序列的 D N A 片段命名為 p C H O M 2 (F v)₂ (參考圖 3 4)。含於質體 p C H O M 2 (F v)₂ 區域的鹼基序列以及胺基酸序列以序列號碼：3 2 表示。

6 . 2 具有種種長度肽連接體的 M A B L - 2 抗體 s c F v 表現質體的製作

具有種種長度的肽連接體，以 [H 鏈] - [L 鏈] (以下為 H L)、[L 鏈] - [H 鏈] (以下為 L H) 方式與 V 區域連接的 s c F v，來自 M A B L - 2 的 H 鏈以及 L 鏈 c D N A 作為模板如下述製作。

製作 H L 型的 s c F v 時，首先以 p C H O M 2 (F v)₂ 作為模板以 C F H L - F 1 (序列號碼：3 3) 以及 C F H L - R 2 (序列號碼：3 4) 引子、C F H L - F 2 (序列號碼：3 5) 以及 C F H L - R 1 引子 (序列號碼：3 6)，使用 K O D 聚合酶進行 9 4 °C 下 3 0 秒、6 0 °C 下 3 0 秒以及 7 2 °C 下 1 分鐘的反應作 5 次重複

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (51)

P C R 反應， C F H L - F 1 以及 C F H L - R 1 引子則再做 3 0 次循環反應至做出不含連接體的 H L - 0 型之 c D N A 。

製作 L H 型的 s c F v 時，首先以含有 M A B L - 2 的 L 鏈以及 H 鏈 V 區域之 c D N A 的質體 p G E M - M 2 L 以及 p G E M - M 2 H (參考特願平 1 1 - 6 3 5 5 7) 作為模板，分別使用 T 7 (序列號碼： 3 7) 以及 C F L H - R 2 (序列號碼： 3 8) 引子、 C F L H - F 2 (序列號碼： 3 9) 以及 C F L H - R 1 (序列號碼： 4 0) 引子，以 K O D 聚合酶 (東洋紡) 進行 9 4 ° C 下 3 0 秒、 6 0 ° C 下 3 0 秒以及 7 2 ° C 下 1 分鐘的反應作 3 0 次重複 P C R 反應。此反應產物作為模板，使用 C F L H - F 4 (序列號碼： 4 1) 以及 C F L H - R 1 引子進行 9 4 ° C 下 3 0 秒、 6 0 ° C 下 3 0 秒以及 7 2 ° C 下 1 分鐘的反應作 3 0 次重複 P C R 反應，製造未含連接體的 L H - 0 型之 c D N A 。

如此製作出的 L H - 0 、 H L - 0 型的 c D N A 以限制酶 E c o R I 、 B a m H I (寶酒造) 處理，將不含 X h o I 限制酶切斷部位之哺乳動物表現質體

I N P E P 4 使用 Ligatin High (東洋紡) 導入，轉形勝任細胞大腸桿菌 J M 1 0 9 (Nippongene) 。經轉形的大腸桿菌使用 QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) 純化質體。如此製得質體 p C F 2 L H - 0 以及 p C F 2 H L - 0

。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (52)

在欲製得相異連接體尺寸的表現質體，H L 型以 p C F 2 H L - 0 作為模板，作為 C F H L - X 3 (序列號碼：4 2)、C F H L - X 4 (序列號碼：4 3)、C F H L - X 5 (序列號碼：4 4)、C F H L - X 6 (序列號碼：4 5)、或 C F H L - X 7 (序列號碼：4 6) 的有意引子以及無意引子，使用與載體序列互補的 B G H - 1 (序列號碼：4 7) 引子，以 K O D 聚合酶 (東洋紡) 進行 9 4 ° C 下 3 0 秒、6 0 ° C 下 3 0 秒以及 7 2 ° C 下 1 分鐘的反應作 3 0 次重複 P C R 反應，所得的反應產物以限制酶 X h o I、B a m H I (寶酒造) 處理。所得之片段於 p C F 2 H L - 0 的 X h o I、B a m H I 位置使用 Ligation High (東洋紡) 作導入，轉形勝任細胞大腸桿菌 J M 1 0 9。經轉形的大腸桿菌使用 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 純化質體。如此製得質體 p C F 2 H L - 3、p C F 2 H L - 4、p C F 2 H L - 5、p C F 2 H L - 6 以及 p C F 2 H L - 7。且欲製造使用於 C O S 7 細胞的過渡性表現之表現質體，p C F 2 H L - 0、p C F 2 H L - 3、p C F 2 H L - 4、p C F 2 H L - 5、p C F 2 H L - 6 以及 p C F 2 H L - 7 以限制酶 E c o R I 以及 B a m H I (寶酒造) 處理，由約 8 0 0 b p 的片段以瓊膠電泳法由膠體中回收而純化。所得的片段以哺乳動物細胞表現質體 p C O S 1 的 E c o R I 以及 B a m H I 位置使用 Ligation High 導入，轉形勝任細胞大腸桿菌 D H 5 α (東洋紡)。如製作得表

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (53)

現質體 C F 2 H L - 0 / p C O S 1、C F 2 H L - 3 / p C O S 1、C F 2 H L - 4 / p C O S 1、C F 2 H L - 5 / p C O S 1、C F 2 H L - 6 / p C O S 1 以及 C F 2 H L - 7 / p C O S 1。做為代表例子，質體 C F 2 H L - 0 / p C O S 1 的構造如圖 3 5 所示，含於此的 M A B L 2 - s c F v < H L - 0 > 的鹼基序列以及胺基酸序列如序列號碼：4 8 所示。又，各質體的連接體部分之鹼基序列以及胺基酸序列如圖 3 6 所示。

又，在欲製得相異連接體尺寸的 L H 型的表現質體，以 p C F 2 L H - 0 作為模板，作為 C F L H - X 3 (序列號碼：4 9)、C F L H - X 4 (序列號碼：5 0)、C F L H - X 5 (序列號碼：5 1)、C F L H - X 6 (序列號碼：5 2)、或 C F L H - X 7 (序列號碼：5 3) 的有意引子以及無意引子，使用與載體序列互補的 B G H - 1 (序列號碼：4 7) 引子，以 K O D 聚合酶進行 9 4 ° C 下 3 0 秒、6 0 ° C 下 3 0 秒以及 7 2 ° C 下 1 分鐘的反應作 3 0 次重複 P C R 反應，所得的反應產物以限制酶 X h o I、B a m H I 處理。所得之片段於 p C F 2 L H - 0 的 X h o I、B a m H I 位置使用 Ligation High 作導入，轉形勝任細胞大腸桿菌 D H 5 α (東洋紡)。經轉形的大腸桿菌使用 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 純化質體。如此製得質體 p C F 2 L H - 3、p C F 2 L H - 4、p C F 2 L H - 5、p C F 2 L H - 6 以及 p C F 2 L H - 7。且欲製造使用於 C O S 7 細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (54)

的過渡性表現之表現質體， p C F 2 L H - 0 、
 p C F 2 L H - 3 、 p C F 2 L H - 4 、 p C F 2 L H -
 5 、 p C F 2 L H - 6 以及 p C F 2 L H - 7 以限制酶
 E c o R I 以及 B a m H I (寶酒造) 處理，由約 8 0 0
 b p 的片段以瓊膠電泳法由膠體中回收而純化。所得的片
 段以哺乳動物細胞表現質體 p C O S 1 的 E c o R I 以及
 B a m H I 位置使用 Ligation High 導入，轉形勝任細胞大
 腸桿菌 D H 5 α (東洋紡) 。如製作得表現質體
 C F 2 L H - 0 / p C O S 1 、 C F 2 L H - 3 /
 p C O S 1 、 C F 2 L H - 4 / p C O S 1 、 C F 2 L H
 - 5 / p C O S 1 、 C F 2 L H - 6 / p C O S 1 以及
 C F 2 L H - 7 / p C O S 1 。做爲代表例子，質體
 C F 2 L H - 0 / p C O S 1 的構造如圖 3 7 所示，含於
 此的 M A B L 2 - s c F v (L H - 0) 的鹼基序列以及
 胺基酸序列如序列號碼：5 4 所示。又，各質體的連接體
 部分之鹼基序列以及胺基酸序列如圖 3 8 所示。

6 . 3 對 C O S 7 細胞的 s c F v 以及 s c (F v) ₂ 之表 現

(1) 含血清培養基之培養上清液的調製

欲使 H L 型、L H 型 s c F v 以及 s c (F v) ₂ 之表
 現，進行 C O S 7 細胞 (JCRB9127、human science 振興財
 團) 的過渡性表現。C O S 7 細胞於含有 1 0 % 牛胚胎血
 清 (HyClone) 的 D M E M 培養基 (GIBCO BRL 公司製)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (55)

中進行 37 °C 的碳酸氣恆溫槽之傳代培養。

6.2 所構築的 CF2HL-0, 3~7 / pCOS1, 或 CF2LH-0, 3~7 / pCOS1 或 pCHOM2 (Fv)₂ 載體, 使用 Gene Pulser 裝置 (BioRad 公司製) 以電穿透作用於 COS7 細胞中作轉移感染。

DNA (10 μg) 與 DMEM (10% FBS, 5 mM BES (SIGMA 公司)) 培養基中 2 × 10⁷ 細胞 / mL 的 0.25 mL 加入培養槽中。經 10 分鐘靜置後, 將經電穿透作用的細胞與 DMEM (10% FBS) 培養基混合, 加入 75 cm³ 錐形瓶中。經 72 小時培養後收集培養上清液, 經離心分離除去細胞破片, 且以 0.22 μm 瓶頂過濾器 (FALCON) 過濾, 將此做為培養上清液 (CM)。

(2) 無血清培養基下的培養上清液之調製

與上述 (1) 相同方法經電穿透作用的細胞加入 DMEM (10% FBS) 培養基於 75 cm³ 錐形瓶中, 經一夜培養後捨去培養上清液, 以 PBS 洗淨後, 添加 CHO-S-SFM1I 培養基 (GIBCO BRL 公司製)。經 72 小時培養後收集培養上清液, 經離心分離除去細胞破片, 且以 0.22 μm 瓶頂過濾器過濾, 得到 CM。

6.4 COS7 CM 中的 scFv 以及 sc (Fv)₂ 的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (56)

檢 測

前述 6 . 3 (2) 中調製出的 C O S 7 之 C M 中，種
種 M A B L 2 - s c F v 以及 s c (F v) ₂ 之聚肽如下述
以蛋白質印跡術進行檢測。

對各 C O S 7 C M 進行 S D S - P A G E ，轉印至
REINFORCED NC 膜 (Schleicher & Schuell 公司製) 。進行
5 % 脫脂牛奶 (森永乳業公司製) 的封鎖步驟，以 T B S
洗淨後加入抗 F L A G 抗體 (SIGMA 公司製) 。於室溫下
恆溫培養以及洗淨後，加入過氧化酶標識抗老鼠 I g G 抗
體 (Jackson Immuno Reserch 公司製) ，室溫下恆溫培養以
及洗淨後，添加基質溶液，使其發色 (圖 3 9) 。

6 . 5 流體細胞測定儀

欲測定對 M A B L 2 - s e F v 以及 s c (F v) ₂ 之
人類 I A P 抗原的測定，使用前述 6 . 3 (1) 所調製出
的 C O S 7 細胞培養上清液進行流體細胞測定。表現人類
I A P 的老鼠白血病細胞株 L 1 2 1 0 細胞 2×10^5 個中
，由實施例 6 . 3 (1) 所得之培養上清液作為對照組，
加入 C O S 7 細胞的培養上清液，於冰上作恆溫培養以及
洗淨後，加入 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 的老鼠抗 F L A G 抗體 (
SIGMA 公司製) ，經恆溫培養以及洗淨後，加入 F I T C
標識抗老鼠 I g G 抗體 (BECTON DICKINSON 公司製) 。
再次恆溫培養以及洗淨後，以 FACScan 裝置 (BECTON
DICKINSON 公司製) 測定螢光強度。其結果，顯示具有各

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (57)

C O S 7 培養上清液的種種長度肽連接體之 M A B L 2 - s c F v 以及 s c (F v)₂ 顯示對人類 I A P 的較高親和性 (圖 4 0 a 以及 b) 。

6 . 6 體外的細胞凋亡誘發效果

前述 1 . 3 (1) 所調製出的 C O S 7 細胞培養上清液，對人類 I A P 經基因導入的 L 1 2 1 0 細胞 (h I A P / L 1 2 1 0) 之細胞凋亡誘發作用經 Annexin - V (BOEHRINGER MANNHEIM 公司製) 染色而檢討。

h I A P / L 1 2 1 0 細胞 5×10^4 個中，添加各載體作轉形之 C O S 7 細胞培養上清液，或作為對照組添加 C O S 7 細胞培養上清液至最終濃度為 1 0 % ，經 2 4 小時培養。其後進行 Annexin - V / P I 染色，以 FACScan 裝置 (BECTON DICKINSON 公司製) 測定螢光強度。其結果，C O S 7 C M 中的 s c F v (H L 3 , 4 , 6 , 7 、 L H 3 , 4 , 6 , 7) 以及 s c (F v)₂ 對 h I A P / L 1 2 1 0 細胞顯示明顯的細胞死亡誘發現象。所得結果分別如圖 4 1 所示。

6 . 7 C O S 7 C M 中的 s c F v 以及 s c (F v)₂ 的 C H O 細胞用表現載體之構築

以培養上清液純化前述 M A B L 2 - s c F v 以及 s c (F v)₂ 為目的，欲表現於這些 C H O 細胞中之表現載體如下述構築。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (58)

將如前述 1 . 2 所調製出的 p C F 2 H L - 0 , 3 - 7 以及 p C F 2 L H - 0 , 3 ~ 7 的 E c o R I - B a m H I 片斷，C H O 細胞用表現載體 p C H O 1 之 E c o R I 以及 B a m H I 部位使用 Ligation high 導入，轉形勝任細胞大腸桿菌 D H 5 α 。轉形後的大腸桿菌以 QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) 純化質體。如上述製得表現質體 p C H O M 2 H L - 0 , 3 ~ 7 以及 p C H O M 2 L H - 0 , 3 ~ 7。

6 . 8 M A B L 2 - s c F v < H L - 0 , 3 ~ 7 > 、 M A B L 2 - s c F v < L H - 0 , 3 ~ 7 > 以及 s c (F v)₂ 表現 C H O 細胞之製作與其培養上清液的調製

前述 1 . 7 構築的表現質體 p C H O M 2 H L - 0 , 3 ~ 7 以及 p C H O M 2 L H - 0 , 3 ~ 7 與 P C H O M 2 (F v)₂ 載體如下述於 C H O 細胞中進行轉形，製作可恆定表現各重建聚肽之 C H O 細胞。作為其代表例子的 M A B L 2 - s c F v < H L - 5 >、使 s c (F v)₂ 能恆定表現之 C H O 細胞的製作如下述。

表現質體 p C H O M 2 H L - 5 以及 p C H O M 2 (F v)₂ 以限制酶 P v u I 消化成直鏈狀，將這些使用 Gene Pulser 裝置 (BioRed 公司製) 作電穿透作用使 C H O 細胞作轉移感染。D N A (1 0 μ g) 與 P B S 中 1 \times 1 0⁷ 細胞 / m l 的 0 . 7 5 m l 加入培養槽中，於 1 . 5 k V 、 2 5 μ F 的容量中施於脈衝。室溫下經 1 0 分鐘的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (59)

回復時間後，將經電穿透作用處理的細胞，加入含有 10 % 的牛胚胎血清之不含核酸的 α - M E M 培養基 (GIBCO BRL 公司製) 進行培養。約 2 星期的培養後，以含有最終濃度為 10 n M 的 methotrexate (SIGMA 公司製) 之培養基中進一步培養，其後繼續以 50 n M、100 n M 的濃度依序上升而培養。此所得之細胞於旋轉瓶中以無血清培養基 C H O - S - S F M I I (GIBCO BRL 公司製) 培養後，收集培養上清液，經離心分離除去細胞破片，且以 20 μ m 過濾器過濾，分別得到 C M。

同樣地，得到可恆定表現 M A B L 2 - s c F v \langle H L - 0, 3, 4, 6, 7 \rangle 以及 \langle L H - 0, 3, 4, 5, 6, 7 \rangle 的 C H O 細胞以及其 C M。

6 . 9 M A B L 2 - s c F v \langle H L - 5 \rangle 的二聚物以及 s c (F v) ₂ 的純化

依據實施例 5 . 9，濃縮前述 6 . 8 所得之 C M，以 Blue-sepharose、羥基磷灰石以及膠體過濾的三種色譜分析法進行 M A B L 2 - s c F v \langle H L - 5 \rangle 以及 s c (F v) ₂ 的純化。

6 . 10 純化 s c F v \langle H L - 5 \rangle 的二聚物以及 s c (F v) ₂ 的抗原結合活性評價

測定純化的 M A B L 2 - s c F v \langle H L - 5 \rangle 的二聚物以及 s c (F v) ₂ 對人類 I A P 抗原之結合，進行流

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (60)

體細胞測定。表現人類 I A P 的老鼠白血病細胞株 L 1 2 1 0 細胞 (h I A P / L 1 2 1 0) , 或做為對照組, 以 p C O S 1 載體轉移感染後的 L 1 2 1 0 細胞 (p C O S 1 / L 1 2 1 0) 2×10^5 個中, 加入 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 的純化 M A B L 2 - s c F v < H L 5 > 之二聚物、M A B L 2 - s c (F v) ₂、作為陽性對照組為單株抗體 M A B L - 2、作為陰性對照組為老鼠 I g G (Zymed 公司製), 於冰上作恆溫培養以及洗淨後加入 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 的老鼠抗 F L A G 抗體 (S I G M A 公司製)。

經恆溫培養以及洗淨後加入 F I T C 標識抗老鼠 I g G 抗體 (B E C T O N D I C K I N S O N 公司製)。再次恆溫培養以及洗淨後, 以 F A C S c a n 裝置 (B E C T O N D I C K I N S O N 公司製) 測定螢光強度。

其結果, 因純化的 M A B L 2 - s c F v < H L - 5 > 的二聚物以及 M A B L 2 - s c (F v) ₂ 與 h I A P / L 1 2 1 0 細胞作專一性結合, s c F v < H L - 5 > 的二聚物以及 s c (F v) ₂ 對人類 I A P 抗原顯示較高的親和性 (圖 4 2)。

6 . 1 1 純化 M A B L 2 - s c F v < H L - 5 > 的二聚物以及 s c (F v) ₂ 的體外細胞凋亡誘發效果

純化 M A B L 2 - s c F v < H L - 5 > 的二聚物以及 s c (F v) ₂, 對基因導入之人類 I A P 的 L 1 2 1 0 細胞 (h I A P / L 1 2 1 0) 以及人類白血病細胞株

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (61)

C C R F - C E M 之細胞凋亡誘發作用以 Annexin - V (BOEHRINGER MANNHEIM 公司製) 染色作檢討。

h I A P / L 1 2 1 0 細胞 5×10^4 個或 C C R F - C E M 細胞 1×10^5 個中，添加種種濃度的純化 M A B L 2 - s c F v (H L 5) 之二聚物、M A B L 2 - s c (F v) ₂、作為陽性對照組為單株抗體 M A B L - 2、作為陰性對照組為老鼠 I g G，經 24 小時培養。其後以 Annexin-V 染色，以 FACScan 裝置 (BECTON DICKINSON 公司製) 測定螢光強度，其結果 M A B L 2 - s c F v (H L - 5) 的二聚物以及 s c (F v) ₂，對 h I A P / L 1 2 1 0、C C R F - C E M 的兩細胞隨濃度誘導細胞死亡 (圖 4 3)。

6 . 1 2 純化 s c F v (H L - 5) 的二聚物以及 s c (F v) ₂ 的紅血球凝集試驗

依據實施例 5 . 1 5 施行種種濃度的 s c F v (H L - 5) 的二聚物以及 s c (F v) ₂ 之血液凝集試驗。

對單株抗體 M A B L - 2 (陽性對照) 中引起血液凝固現象，而單鏈抗體 M A B L 2 - s c (F v) ₂ 以及 M A B L 2 - s c (F v) (H L 5) 並無凝集現象。又，使用 M A B L - 2 抗體的緩衝液亦幾乎無差異。其結果如下述表 3 所示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (62)

表 3

人類紅血球凝集試驗

稀釋液:PBS												($\mu\text{g/ml}$)			
cont	28.9	14.45	7.225	3.6125	1.8063	0.9031	0.4516	0.2258	0.1129	0.0564	0.0282	0.0141	0.0071	0.0035	0.0018
MABL2-sc(Fv)2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cont	28.0	14.0	7.0	3.5	1.75	0.875	0.4375	0.2188	0.1094	0.0547	0.0273	0.0137	0.0068	0.0034	0.0017
MABL2-sc(Fv)<HL5>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cont	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	0.0391	0.0195	0.0098	0.0049
MABL2(intact)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
mIgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
稀釋液:Acetate Buffer												($\mu\text{g/ml}$)			
cont	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	0.0391	0.0195	0.0098	0.0049
MABL2(intact)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (63)

6 . 1 3 純化 s c F v 〈 H L - 5 〉 的 二 聚 物 以 及 s c (F v)₂ 對 人 類 骨 髓 瘤 老 鼠 模 型 之 抗 腫 瘤 效 果

經實施例 6 . 8 以及 6 . 9 製作、純化之 s c F v 〈 H L - 5 〉 的二聚物以及 s c (F v)₂，施行抗腫瘤效果試驗。具體而言使用實施例 5 . 1 4 (3) 所製作的人類骨髓瘤老鼠模型，對老鼠血清中以 E L I S A 定量產生人類骨髓腫瘤細胞之 M 蛋白質，且記錄老鼠生存日數。因此以血清中 M 蛋白質質量的變化以及生存日數評價純化之 s c F v 〈 H L - 5 〉 的二聚物以及 s c (F v)₂ 的抗腫瘤效果。

且，對於本試驗 H L - 5 以及 s c (F v)₂ 係以 vehicle (1 5 0 m M N a C l , 0 . 0 2 % Tween 以及 2 0 m M 醋酸緩衝液，p H 6 . 0) 中 0 . 0 1 、 0 . 1 或 1 m g / m L 的溶液，投與量為 0 . 1 、 1 或 1 0 m g / k g 投與於老鼠。又，對照組為僅投與 vehicle 。

採取人類骨髓腫瘤移植後第 2 6 天的血清，血清中的 M 蛋白質以 E L I S A 依據實施例 5 . 1 4 進行測定。其結果，H L - 5 投與群、二聚物以及 s c (F v)₂ 投與群同時出現血清中的 M 蛋白質質量隨者投與量而減少 (參照圖 4 4) 。又，對於其生存期間，H L - 5 投與群 (圖 4 5) 以及 s c (F v)₂ 投與群 (圖 4 6) 同時與對照組 (vehicle 投與群) 作比較觀察到生存期間延長。其結果表示對於本發明的 H L - 5 以及 s c (F v)₂ 於體內亦具有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (64)

優良的抗腫瘤作用。

產業上可利用性

本發明的重建聚肽，由彼具有誘發具有人類 I A P 的有核血液細胞之細胞凋亡，且不會引起紅血球凝集的特性得知，可作為急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性淋巴性白血病、成人 T 細胞白血病、多發性骨髓瘤、Mixed Leukemia、Hairy cell Leukemia 等白血病、惡性淋巴腫瘤（Hodgkin 病、非 Hodgkin 淋巴腫瘤）、再生不良性貧血、骨髓異形形成症候群、真性多血症等血液疾病之治療藥係為有用的。

圖面簡單說明

圖 1 . 表示人類 I g G 抗體未與表現人類 I A P 之 L 1 2 1 0 細胞 (h I A P / L 1 2 1 0) 結合之流體細胞測定結果圖。

圖 2 . 表示嵌合 M A B L - 1 抗體與表現人類 I A P 之 L 1 2 1 0 細胞 (h I A P / L 1 2 1 0) 作專一性結合之流體細胞測定結果圖。

圖 3 . 表示嵌合 M A B L - 2 抗體與表現人類 I A P 之 L 1 2 1 0 細胞 (h I A P / L 1 2 1 0) 作專一性結合之流體細胞測定結果圖。

圖 4 . 表示本發明的單鏈 F v 製作方法以模型方式表示之圖。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (65)

圖 5 . 表示編碼本發明的單鏈 F v 之 D N A 可表現於大腸桿菌中而使用的表現質體之一例子構造圖。

圖 6 . 表示編碼本發明的單鏈 F v 之 D N A 可表現於哺乳類動物細胞中而使用的表現質體之一例子構造圖。

圖 7 . 表示實施例 5 . 4 所得之蛋白質印跡術所得之結果照片。由左邊為分子量標識 (由上表示 9 7 . 4 、 6 6 . 4 5 、 3 1 . 2 1 . 5 、 1 4 . 5 k D a) 、 p C H O 1 導入 C O S 7 細胞培養上清液、 p C H O M 2 導入細胞培養上清液。顯示 p C H O M 2 導入細胞培養上清液含有重建 M A B L - 2 抗體單鏈 F v (箭頭) 。

圖 8 . 表示作為對照組的 p C H O 1 / C O S 7 細胞培養上清液之抗體，不與作為對照組的 p C O S 1 / L 1 2 1 0 細胞結合之流體細胞測定儀結果圖。

圖 9 . 表示 M A B L 2 - s c F v / C O S 7 細胞培養上清液之抗體，表示不與作為對照組的 p C O S 1 / L 1 2 1 0 細胞結合之流體細胞測定儀結果圖。

圖 1 0 . 表示作為對照組的 p C O S 1 / C O S 7 細胞培養上清液之抗體，表示不與作為對照組的 h I A P / L 1 2 1 0 細胞結合之流體細胞測定儀結果圖。

圖 1 1 . 表示 M A B L 2 - s c F v / C O S 7 細胞培養上清液之抗體與 h I A P / L 1 2 1 0 細胞作專一性結合之流體細胞測定儀結果圖。

圖 1 2 . 表示實施例 5 . 6 所示競爭 (competitive) E L I S A 的結果圖，本發明的單鏈 F v (M A B L 2 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(66)

s c F v) 的抗原結合活性，與作為對照組的 p C H O 1 / C O S 7 細胞培養上清液作比較，以對老鼠單株抗體 M A B L - 2 的抗原結合阻斷作為指標所示圖。

圖 1 3 . 表示實施例 5 . 7 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，作為對照組的 p C O S 1 / L 1 2 1 0 細胞中，作為對照組的 p C H O 1 / C O S 7 細胞培養上清液抗體並未誘發細胞凋亡現象。

圖 1 4 . 表示實施例 5 . 7 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，作為對照組的 p C O S 1 / L 1 2 1 0 細胞中，M A B L 2 - s c F v / C O S 7 細胞培養上清液抗體並未誘發細胞凋亡現象。

圖 1 5 . 表示實施例 5 . 7 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，h I A P / L 1 2 1 0 細胞中，作為對照組 p C H O 1 / C O S 7 細胞培養上清液抗體並未誘發細胞凋亡現象。

圖 1 6 . 表示實施例 5 . 7 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，對於 h I A P / L 1 2 1 0 細胞，M A B L 2 - s c F v / C O S 7 細胞培養上清液抗體誘發專一性細胞凋亡現象。

圖 1 7 . 表示實施例 5 . 7 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，C C R F - C E M 細胞中，作為對照組 p C H O 1 / C O S 7 細胞培養上清液抗體未誘發細胞凋亡現象。

圖 1 8 . 表示實施例 5 . 7 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，對於 C C R F - C E M 細胞，M A B L 2 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (67)

s c F v / C O S 7 細胞培養上清液抗體誘發專一性細胞凋亡現象。

圖 1 9 . 表示實施例 5 . 9 的來自 C H O 細胞產生之 M A B L - 2 抗體單鏈 F v 純化步驟中, Blue-sepharose 柱子所得部分使用羧基磷灰石進行純化時之色譜分析圖, 得到主要波峰部分 A、部分 B。

圖 2 0 . 表示對於實施例 5 . 9 (2) 所得之部分 A、部分 B 經膠體過濾而純化的結果圖, 部分 A 由外觀看之分子量約 3 6 k D、部分 B 則為 7 6 k D 的位置可溶出主要波峰 (分別為 A I 以及 B I) 。

圖 2 1 . 表示對於實施例 5 . 9 的來自 C H O 細胞產生之 M A B L - 2 抗體的單鏈 F v 純化步驟, 其所得部分以 S D S - P A G E 分析圖, 皆為分子量約為 3 5 k D 的單一帶。

圖 2 2 . 表示對於來自 C H O 細胞產生的 M A B L - 2 抗體之單鏈 F v 純化, 其所得之部分 A I 以及 B I 以膠體過濾法分析結果圖, 部分 A I 為單體所成, 部分 B I 為二聚物所成。

圖 2 3 . 表示將編碼本發明的單鏈 F v 之 D N A , 欲於大腸桿菌的菌體內表現可使用的表現質體的一例子構造圖。

圖 2 4 . 表示實施例 5 . 1 2 的來自大腸桿菌產生的 M A B L - 2 抗體之單鏈 F v 聚肽的純化中, 所得粗製物使用膠體過濾柱子之純化結果圖。各波峰分別為大腸桿菌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (68)

細胞產生的單鏈 F v 之單體、二聚物。

圖 2 5 . 表示實施例 5 . 1 3 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，其中 h I A P / L 1 2 1 0 細胞中，作為對照組的老鼠 I g G 抗體未誘發細胞凋亡現象（最終濃度為 3 μ g / m l ）。

圖 2 6 . 表示實施例 5 . 1 3 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，其中對 h I A P / L 1 2 1 0 細胞中，C H O 細胞產生的 M A B L 2 - s c F v 二聚物顯示顯著的誘發細胞凋亡現象（最終濃度為 3 μ g / m l ）。

圖 2 7 . 表示實施例 5 . 1 3 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，其中對 h I A P / L 1 2 1 0 細胞中，大腸桿菌細胞產生的 M A B L 2 - s c F v 二聚物顯示顯著的誘發細胞凋亡現象（最終濃度為 3 μ g / m l ）。

圖 2 8 . 表示實施例 5 . 1 3 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，其中 h I A P / L 1 2 1 0 細胞中，C H O 細胞產生的 M A B L 2 - s c F v 單體之細胞凋亡誘發作用與對照組同程度（最終濃度為 3 μ g / m l ）。

圖 2 9 . 表示實施例 5 . 1 3 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，其中對 h I A P / L 1 2 1 0 細胞中，大腸桿菌細胞產生的 M A B L 2 - s c F v 單體之細胞凋亡誘發作用與對照組同程度（最終濃度為 3 μ g / m l ）。

圖 3 0 . 表示實施例 5 . 1 3 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，其中對 h I A P / L 1 2 1 0 細胞中，作為對照組的老鼠 I g G 抗體，即使添加抗 F L A G 抗體亦無顯示

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 (69)

細胞凋亡誘發現象 (最終濃度為 $3 \mu\text{g} / \text{ml}$) 。

圖 3 1 . 表示實施例 5 . 1 3 的細胞凋亡誘發效果之結果圖，其中對 h I A P / L 1 2 1 0 細胞中，C H O 細胞產生的 M A B L 2 - s c F v 單體，因添加抗 F L A G 抗體而顯示顯著的細胞凋亡誘發現象 (最終濃度為 $3 \mu\text{g} / \text{ml}$) 。

圖 3 2 . 表示定量移植人類骨髓瘤細胞株 K P M M 2 的老鼠血清中之人類 I g G 量者，測定對老鼠的人類骨髓瘤所產生之人類 I g G 量的結果圖，s c F v / C H O 二聚物顯示非常強的 K P M M 2 細胞增殖之抑制作用。

圖 3 3 . 表示腫瘤移植後老鼠之生存日數，對於 s c F v / C H O 二聚物投與群其生存時間顯著延長。

圖 3 4 . 表示表現含有來自 M A B L - 2 抗體的 2 個 H 鏈 V 區域以及 2 個 L 鏈 V 區域之重建聚肽 [s c (F v) ₂] 的質體例子構造圖。

圖 3 5 . 表示欲表現如 [H 鏈] - [L 鏈] 方式連結 V 區域，且不含聚肽連接體之 s c F v (H L 型) 的質體例子構造圖。

圖 3 6 . 表示 H L 型的聚肽構造以及聚肽連接體之胺基酸序列。

圖 3 7 . 表示欲表現如 [L 鏈] - [H 鏈] 方式連結 V 區域，且不含聚肽連接體之 s c F v (L H 型) 的質體例子構造圖。

圖 3 8 . 表示 L H 型的聚肽構造以及聚肽連接體之胺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (70)

基酸序列。

圖 3 9 . 表示實施例 6 . 4 的蛋白質印跡術之結果圖，顯示表現含有 2 個 H 鏈 V 區域以及 2 個 L 鏈 V 區域之重建聚肽 $s c (F v)_2$ 以及具有種種長度的聚肽連接體之 M A B L - 2 抗體 $s c F v$ 。

圖 4 0 a 以及 b 表示使用實施例 6 . 3 (1) 所調製出的 C O S 7 細胞培養上清液之流體細胞測定儀結果圖，其中具有種種長度的聚肽連接體之 M A B L 2 - $s c F v$ 以及 $s c (F v)_2$ ，顯示具有對人類 I A P 較高之親和性。

圖 4 1 . 表示實施例 6 . 6 的細胞凋亡誘發效果結果圖，其中 $s c F v \langle H L 3, 4, 6, 7 \rangle$ 、 $L H 3, 4, 6, 7 \rangle$ 以及 $s c (F v)_2$ 對於 h I A P / L 1 2 1 0 細胞顯示顯著的細胞死亡誘發作用。

圖 4 2 . 表示實施例 6 . 1 0 的抗原結合評價之結果圖，其中 $s c F v \langle H L 5 \rangle$ 的二聚物以及 $s c (F v)_2$ 對於人類 I A P 具有較高親和性。

圖 4 3 . 表示實施例 6 . 1 1 的體外細胞凋亡誘發效果之結果圖，其中 M A B L 2 - $s c F \langle H L 5 \rangle$ 的二聚物以及 M A B L 2 - $s c (F v)_2$ 對於 h I A P / L 1 2 1 0、C C R F - C E M 的兩細胞顯示隨濃度之細胞死亡誘發作用。

圖 4 4 . 表示對移植人類骨髓瘤細胞株 K P M M 2 之老鼠，其人類骨髓瘤所產生的血清中之 M 蛋白質量的測定

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (71)

結果圖，其中顯示 $s c F v \langle H L - 5 \rangle$ 以及 $s c (F v)_2$ 對於 K P M M 2 細胞的增殖具有非常強的抑制作用。

圖 4 5 . 表示經腫瘤移植後的老鼠生存日數，對於 $s c F v \langle H L - 5 \rangle$ 投與群顯示顯著的生存時間之延長。

圖 4 6 . 表示經腫瘤移植後的老鼠生存日數，對於 $s c (F v)_2$ 投與群顯示顯著的生存時間之延長。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (72)

序列表

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> 誘發細胞凋亡的聚肽

<130> FOP-415

<141> 2001-3-

<150> US 09/523,095

<151> 2000-3-10

<150> JP2000-115246

<151> 2000-04-17

<150> JP2000-321822

<151> 2000-10-20

<160> 54

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 1

ccatcctaatacgcactcact atagggc 27

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 人造序列

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (73)

<220>

<223> PCR 引子

<400> 2

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg 27

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 3

ggatcccggg ccagtggata gacagatg 28

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 4

ggatcccggg agtggataga ccgatg 26

<210> 5

<211> 394

<212> DNA

<213> Mus

<220>

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (74)

<221> CDS

<222> (1)... (393)

<223> pGEM-M1L. 1-57;signal peptide, 58-394;mature peptide

<400> 5

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro

5

10

15

gcg tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 90

Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu

20

25

30

cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 135

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

35

40

45

cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 180

Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr

50

55

60

cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 225

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

65

70

75

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

80

85

90

tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 315

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

95

100

105

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

110

115

120

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (75

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

125 130

<210> 6

<211> 409

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (408)

<223> pGEM-M1H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5 10 15

ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu

10 25 30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50 55 60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65 70 75

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (7)

Gly Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 20 25 30
 cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 135
 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 35 40 45
 cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 180
 Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr
 50 55 60
 ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 225
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 65 70 75
 tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 80 85 90
 tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 315
 Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 95 100 105
 gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360
 Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr
 110 115 120
 acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 125 130

<210> 8

<211> 409

<212> DNA

<213> Mus

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (78)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (408)

<223> pGEM-M2H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 8

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5

10

15

ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20

25

30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50

55

60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65

70

75

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

80

85

90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315

Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu

95

100

105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (79)

110	115	120	
tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc			405
Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser			
125	130	135	
tca g			409
Ser			

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 9

cccaagcttc caccatgaag ttgcctgtta gg 32

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

cccaagcttc caccatggaa tggagctgga ta 32

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (80)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cgcggatcca ctcacgtttt atttccagct tggt 34

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 12

cgcggatcca ctcacctgag gagactgtga gagt 34

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 13

catgccatgg cgcaggtcca gctgcagcag 30

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> 人造序列

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (3)

<220>

<223> PCR 引子

<400> 14

accaccacct gaggagactg tgagagt 27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 15

gtctcctcag gtggtggtgg ttcgggt 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 16

cacaacatcc gatccgccac cacccga 27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (32)

<223> PCR 引子

<400> 17

ggcggatcgg atgttgtgat gacccaa 27

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 18

ccggaattct cattatttat cgtcatcgtc ttgtagtct ttatttcca gcttgg 57

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 連接體胺基酸序列與核苷酸

<400> 19

ggt ggt ggt ggt tgc ggt ggt ggt ggt tgc ggt ggt ggc gga tgc 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

5

10

15

<210> 20

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (88)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (826)

<223> pscM1. MABL1-scFv

<400> 20

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5 10 15

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

20 25 30

cct gac ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35 40 45

gct tct gga tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys

50 55 60

cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225

Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro

65 70 75

tac aat gat ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc 270

Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala

80 85 90

aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc 315

Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu

95 100 105

agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga 360

Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (84

110	115	120
ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405		
Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu		
125	130	135
aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tgc ggt ggt ggt tgc ggt 450		
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
140	145	150
ggt ggc gga tgc gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 495		
Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu		
155	160	165
cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 540		
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser		
170	175	180
cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 585		
Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr		
185	190	195
cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 630		
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val		
200	205	210
tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 675		
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly		
215	220	225
tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 720		
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu		
230	235	240
gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 765		
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr		
245	250	255

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (85

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac 810

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp

260

265

270

gat gac gat aaa taa tga 828

Asp Asp Asp Lys

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 21

acgcgtcgac tcccaggtcc agctgcagca g 31

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 22

gaaggtgtat ccagaagc 18

<210> 23

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (8b)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (813)

<223> pCHOM1. MABL1-scFv

<400> 23

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

5

10

15

ggc gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90

Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu

20

25

30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50

55

60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65

70

75

ggc act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr

80

85

90

tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315

Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

95

100

105

gcc tct gag gac tct gcg gta tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (8)

110	115	120
tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405		
Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser		
125	130	135
tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450		
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
140	145	150
tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495		
Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser		
155	160	165
ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 540		
Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu		
170	175	180
cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac cta cag aag 585		
Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys		
185	190	195
cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630		
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg		
200	205	210
TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA 675		
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
215	220	225
gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720		
Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly		
230	235	240
gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga 765		
Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly		
245	250	255

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 (88)

ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

260 265 270

aaa taa tga 819

Lys

<210> 24

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (822)

<223> pscM2. MABL2-scFv

<400> 24

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5 10 15

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

20 25 30

cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35 40 45

gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys

50 55 60

cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (89)

Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro
65 70 75
tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc 270
Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala
80 85 90
act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 315
Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu
95 100 105
agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga 360
Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
110 115 120
ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405
Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
125 130 135
aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt 450
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
140 145 150
ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 495
Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
155 160 165
cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 540
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
170 175 180
cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 585
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr
185 190 195
ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 630
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 (90)

200	205	210
tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga		675
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly		
215	220	225
tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag		720
Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu		
230	235	240
gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac		765
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr		
245	250	255
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac		810
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp		
260	265	270
gat gac gat aaa taa tga		828
Asp Asp Asp Lys		

- <210> 25
- <211> 819
- <212> DNA
- <213> Mus
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)... (813)
- <223> pCHOM2. MABL2-scFv
- <400> 25

5	10	15
atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca		45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (9)

ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90
 Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
 20 25 30
 gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
 Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45
 tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180
 Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro
 50 55 60
 ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
 65 70 75
 ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
 80 85 90
 tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315
 Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu
 95 100 105
 gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 110 115 120
 tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
 Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135
 tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 140 145 150
 tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (92)

Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
155 160 165
ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt 540
Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
170 175 180
gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag 585
Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
185 190 195
cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
200 205 210
ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca 675
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr
215 220 225
gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720
Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
230 235 240
gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga 765
Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly
245 250 255
ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
260 265 270
aaa taa tga 819
Lys
<210> 26
<211> 456

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (93)

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (450)

<223> pCHO-shIAP. 可溶人類 IAP

<400> 26

atg tgg ccc ctg gta gcg gcg ctg ttg ctg ggc tgc gcg tgc tgc 45
Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys
5 10 15
gga tca gct cag cta cta ttt aat aaa aca aaa tct gta gaa ttc 90
Gly Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe
20 25 30
acg ttt tgt aat gac act gtc gtc att cca tgc ttt gtt act aat 135
Thr Phe Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn
35 40 45
atg gag gca caa aac act act gaa gta tac gta aag tgg aaa ttt 180
Met Glu Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe
50 55 60
aaa gga aga gat att tac acc ttt gat gga gct cta aac aag tcc 225
Lys Gly Arg Asp Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser
65 70 75
act gtc ccc act gac ttt agt agt gca aaa att gaa gtc tca caa 270
Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln
80 85 90
tta cta aaa gga gat gcc tct ttg aag atg gat aag agt gat gct 315
Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala
95 100 105

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (94)

gtc tca cac aca gga aac tac act tgt gaa gta aca gaa tta acc 360
 Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr
 110 115 120
 aga gaa ggt gaa acg atc atc gag cta aaa tat cgt gtt gtt tca 405
 Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser
 125 130 135
 tgg ttt tct cca aat gaa aat gac tac aag gac gac gat gac aag 450
 Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
 140 145 150
 tga tag 456

<210> 27

<211> 46

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 27

ggaattccat atgcaagtgc aacttcaaca gtctggacct gaactg 46

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 28

ggaattctca ttatatttatt tccagcttgg t 31

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (98)

<210> 29

<211> 741

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(735)

<223> pscM2DEm02. MABL2-scFv

<400> 29

atg caa gtg caa ctt caa cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct 45

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro

5

10

15

ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 90

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

20

25

30

gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc 135

Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly

35

40

45

ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag 180

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys

50

55

60

tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa 225

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys

65

70

75

tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag 270

Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu

80

85

90

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (9)

Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
230 235 240

aag ctg gaa ata aaa taa tga 741

Lys Leu Glu Ile Lys

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 30

cagacagtgg ttcaaagt 18

<210> 31

<211> 72

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 31

cgcgctgacc gatccgccac cacccgaacc accaccacc gaaccaccac caccttttat 60
ttccagcttg gt 72

<210> 32

<211> 1605

<212> DNA

<213> Mus

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (98)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (1599)

<223> pCHOM2 (Fv) 2. MABL2-sc (Fv) 2

<400> 32

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

5 10 15

ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90

Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50 55 60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65 70 75

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

80 85 90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315

Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu

95 100 105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (99)

110	115	120	
tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc			405
Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser			
125	130	135	
tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga			450
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
140	145	150	
tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt			495
Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser			
155	160	165	
ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt			540
Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu			
170	175	180	
gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag			585
Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys			
185	190	195	
cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga			630
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg			
200	205	210	
ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca			675
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr			
215	220	225	
gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga			720
Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly			
230	235	240	
gtt tat ttc tgc tct caa agt ^{nt} aca cat gtt ccg tac acg ttc gga			765
Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly			
245	250	255	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (100

ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt 810
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 260 265 270

ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gtc gac tcc cag gtc cag ctg 855
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Ser Gln Val Gln Leu
 275 280 285

cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag 900
 Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 290 295 300

atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att 945
 Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile
 305 310 315

cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 990
 His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 320 325 330

tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc 1035
 Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 335 340 345

aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc 1080
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala
 350 355 360

tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat 1125
 Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 365 370 375

tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa 1170
 Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln
 380 385 390

ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt 1215

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (101

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 395 400 405

ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt 1260

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
 410 415 420

cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct 1305

Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser
 425 430 435

tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat 1350

Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr
 440 445 450

tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg 1395

Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu
 455 460 465

atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc 1440

Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 470 475 480

agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga 1485

Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg
 485 490 495

gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca 1530

Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr
 500 505 510

cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 1575

His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 515 520 525

gac tac aaa gac gat gac gat aaa taa tga 1605

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (102

530

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 33

tgaggaattc ccacatggg atg 33

<210> 34

<211> 40

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 34

cacgacgtca ctcgagactg tgagagtggg gccttgccc 40

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 35

agtctcgagt gacgtcgtga tgacccaaag tccactctcc 40

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (103

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 36

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt c 31

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 37

cgcgtaatac gactcactat ag 22

<210> 38

<211> 46

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 38

gcaattggac ctgtttttatc tcgagcttgg tccccctcc gaacgt 46

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (104

<210> 39

<211> 45

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 39

gctcgagata aaacaggtcc aattgcagca gtctggacct gaact 45

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 40

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt cttgtagtc tgaggagact gtgagagtgg 60

<210> 41

<211> 32

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 41

gactgaattc ccaccatgaa gttgcctggt ag 32

<210> 42

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (105

<211> 40

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 42

cagtctcgag tgggtggttcc gacgtcgtga tgacccaaag 40

<210> 43

<211> 43

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 43

cagtctcgag tgggtggtggt tccgacgtcg tgatgacca aag 43

<210> 44

<211> 46

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 44

cagtctcgag tgggtggtggt ggttccgacg tcgtgatgac ccaaag 46

<210> 45

<211> 49

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (106

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 45

cagtctcgag tgggtggtggt ggtggttccg acgtcgtgat gacccaaag 49

<210> 46

<211> 52

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 46

cagtctcgag tgggtggtggt ggtggtggtt ccgacgtcgt gatgacccaa ag 52

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 47

ggccgcatgt tgtcacgaat 20

<210> 48

<211> 780

<212> DNA

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (109)

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 49

caagctcgag ataaaatccg gaggccaggt ccaattgcag cagtc 45

<210> 50

<211> 48

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 50

caagctcgag ataaaatccg gaggggcca ggtccaattg cagcagtc 48

<210> 51

<211> 51

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 51

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg ccaggtccaa ttgcagcagt c 51

<210> 52

<211> 54

<212> DNA

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (1)0

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 52

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggccaggtc caattgcagc agtc 54

<210> 53

<211> 57

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> PCR 引子

<400> 53

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggaggccag gtccaattgc agcagtc 57

<210> 54

<211> 780

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (768)

<223> CF2LH-0/pCOS1. MABL2-scFv<LH-0>

<400> 54

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt tcc 51

MET Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu MET Phe Trp Ile Pro Gly Ser

5

10

15

agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

Ser Ser Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
20 25 30

gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 153

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
35 40 45 50

aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca 204

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
55 60 65

aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg 255

Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
70 75 80 85

ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg 306

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val
90 95 100

gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg 357

Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro
105 110 115

tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctc gag ata aaa cag gtc caa ttg cag 408

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Val Gln Leu Gln
120 125 130 135

cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc 459

Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys MET Ser Cys
140 145 150

aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag 510

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln
155 160 165 170

aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 561

Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (112

	175	180	185	
	ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac 612			
	Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp			
	190	195	200	
	aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 663			
	Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp			
	205	210	215	220
	tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg 714			
	Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp			
	225	230	235	
	ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gac tac aaa gac gat gac gat 765			
	Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp			
	240	245	250	255
	aaa taa tga gga tcc 780			
	Lys			

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

四、中文發明摘要(發明之名稱:誘發細胞凋亡的聚肽)

本發明係關於誘發具有 Integrin Associated Proten (整合組合蛋白質, I A P) 的有核血液細胞之凋亡, 且具有不引起紅血球凝集的特性之重建聚肽。此重建聚肽係為具有誘發具有 I A P 的有核血液細胞凋亡之單株抗體的 2 個以上 H 鏈 V 區域以及 2 個以上 L 鏈 V 區域。該重建聚肽作為白血病等血液疾病之治療藥係有用的。

英文發明摘要(發明之名稱:)

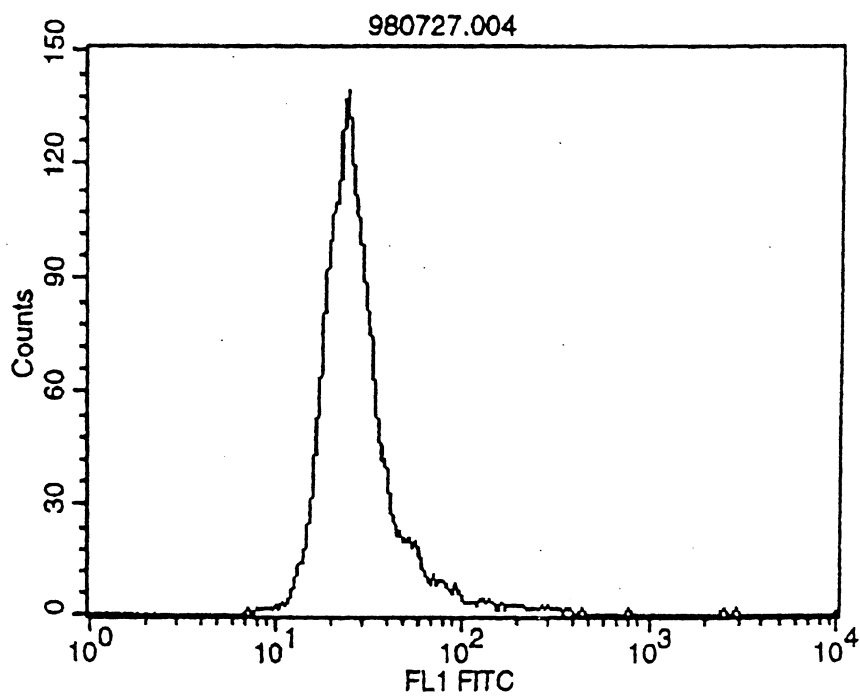
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

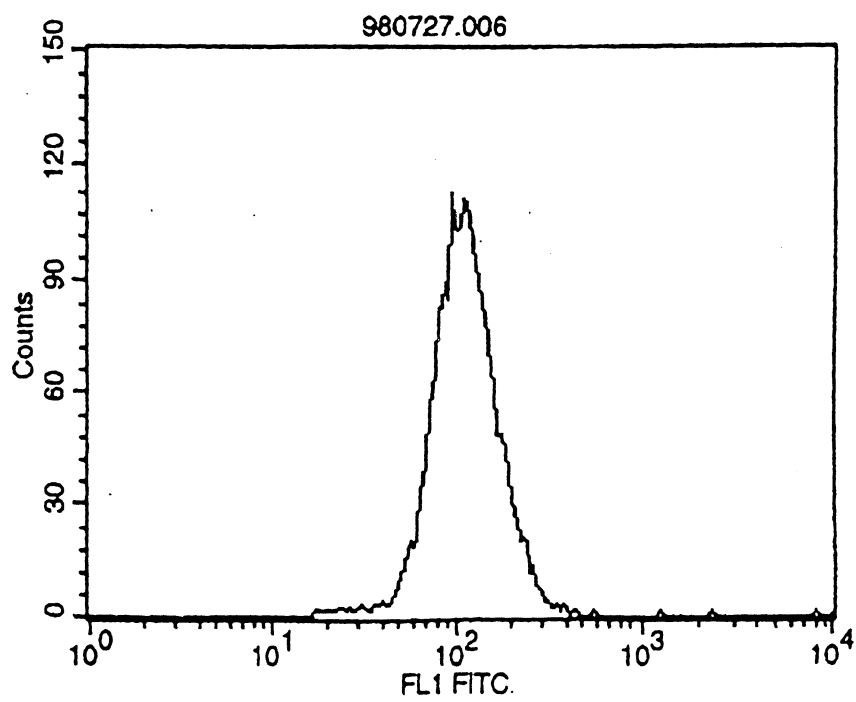
訂

線

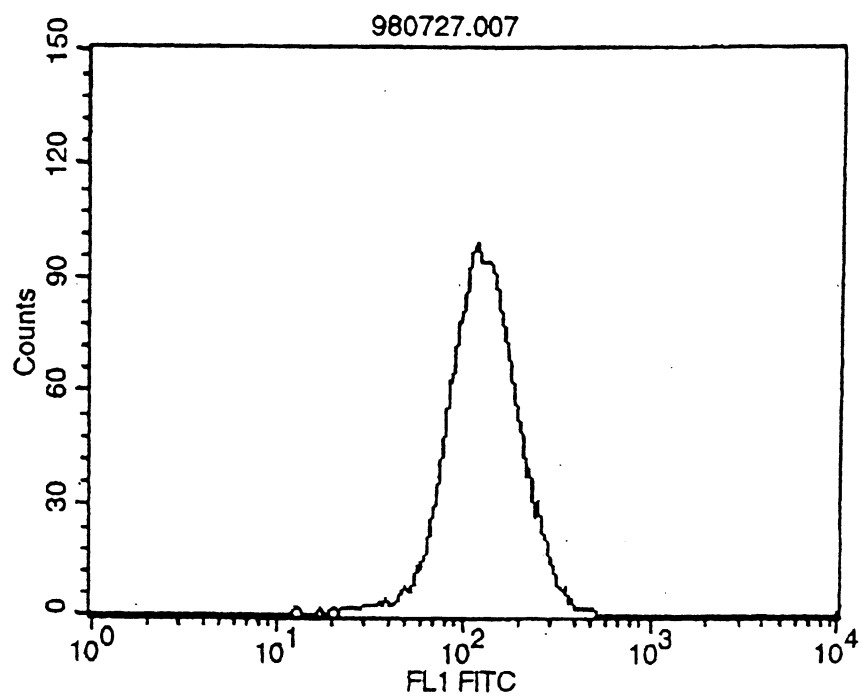
第 1 圖



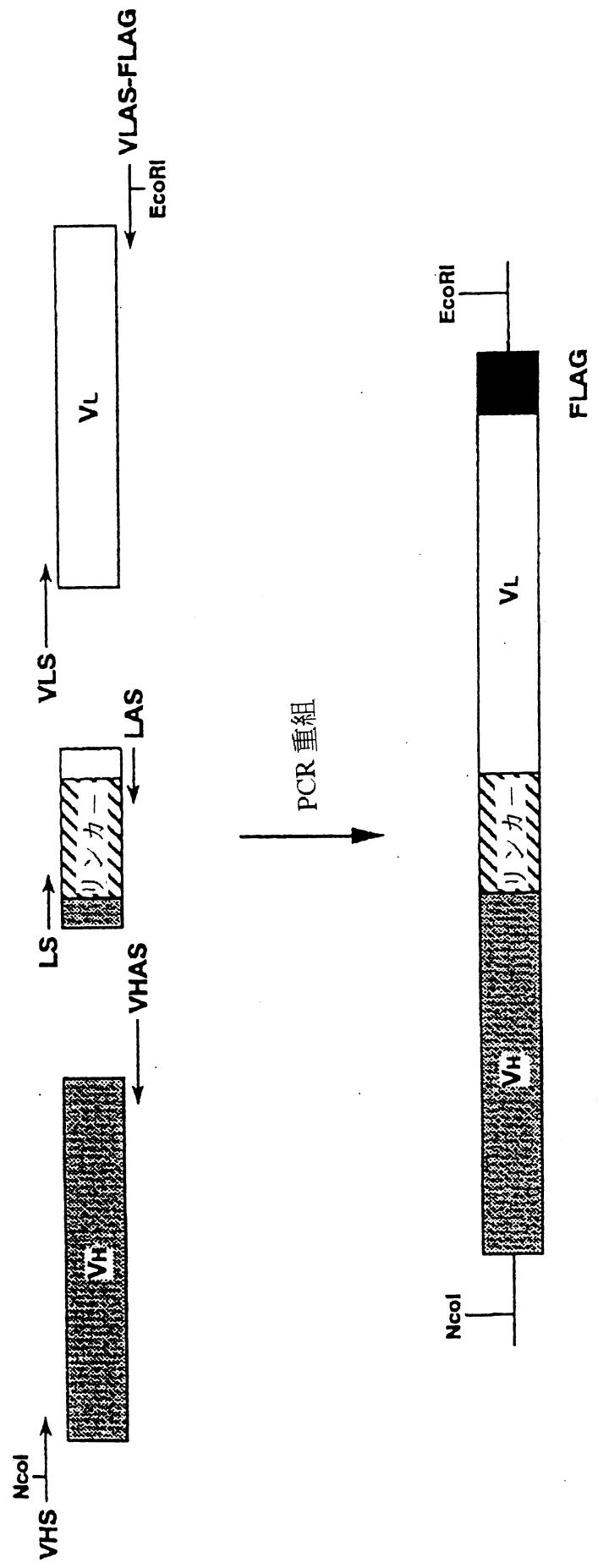
第 2 圖



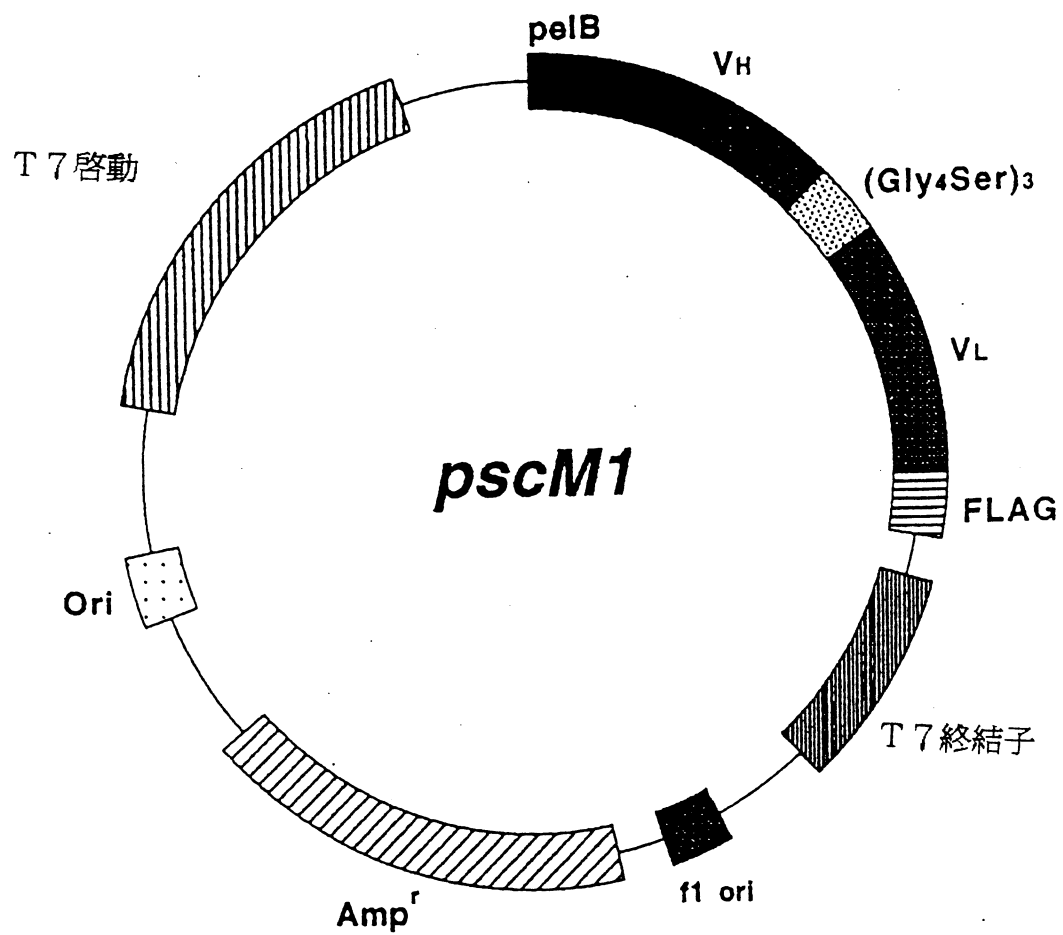
第 3 圖



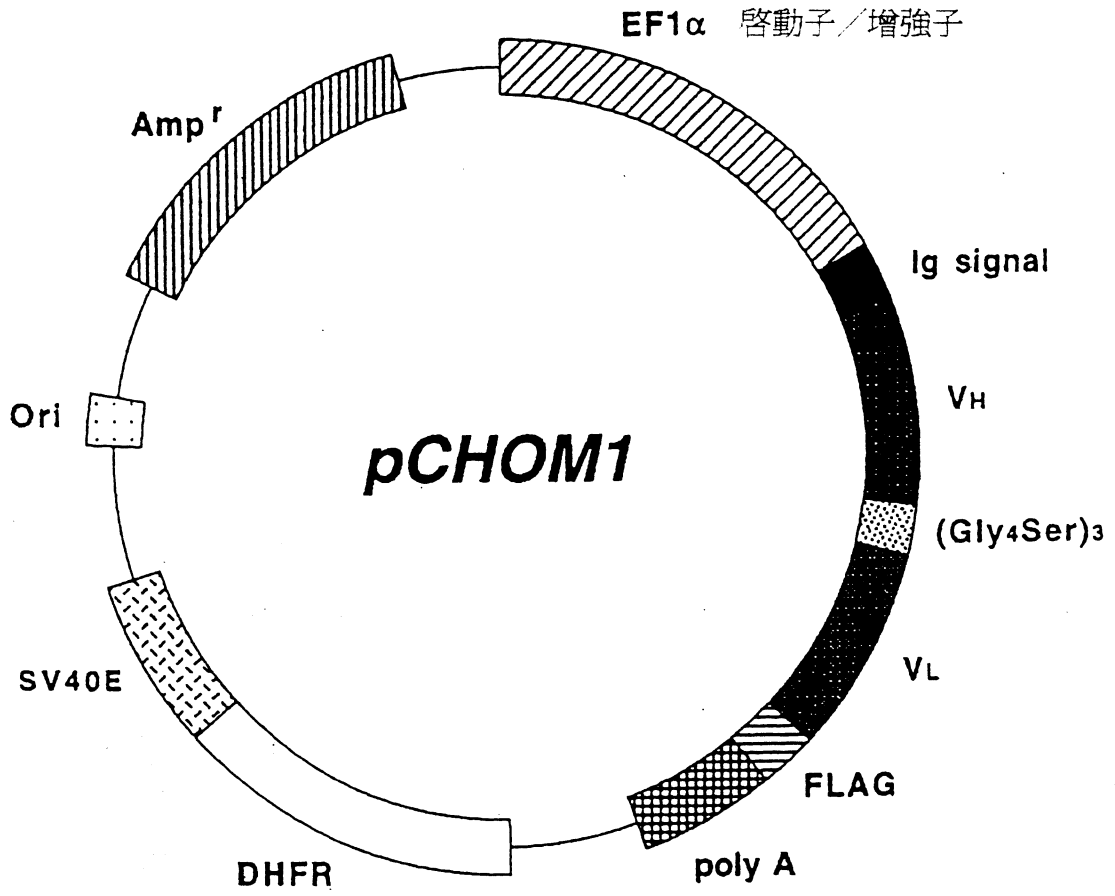
第 4 圖



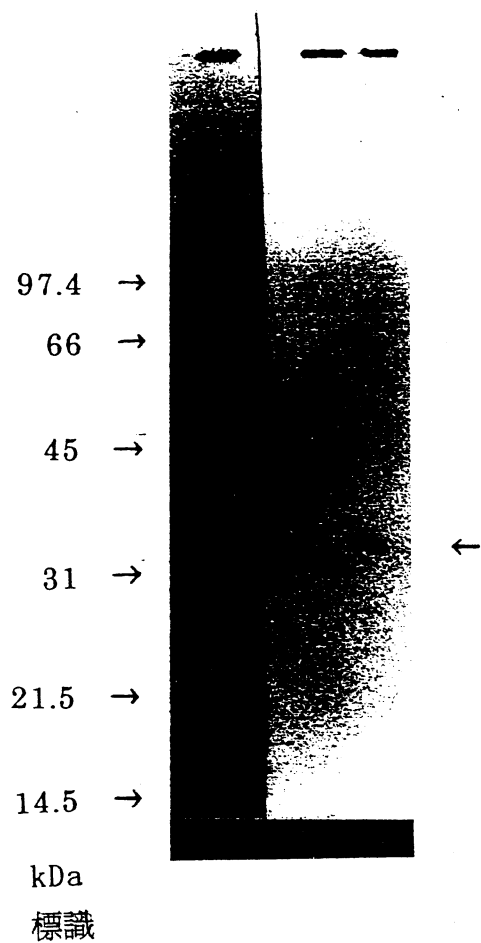
第 5 圖



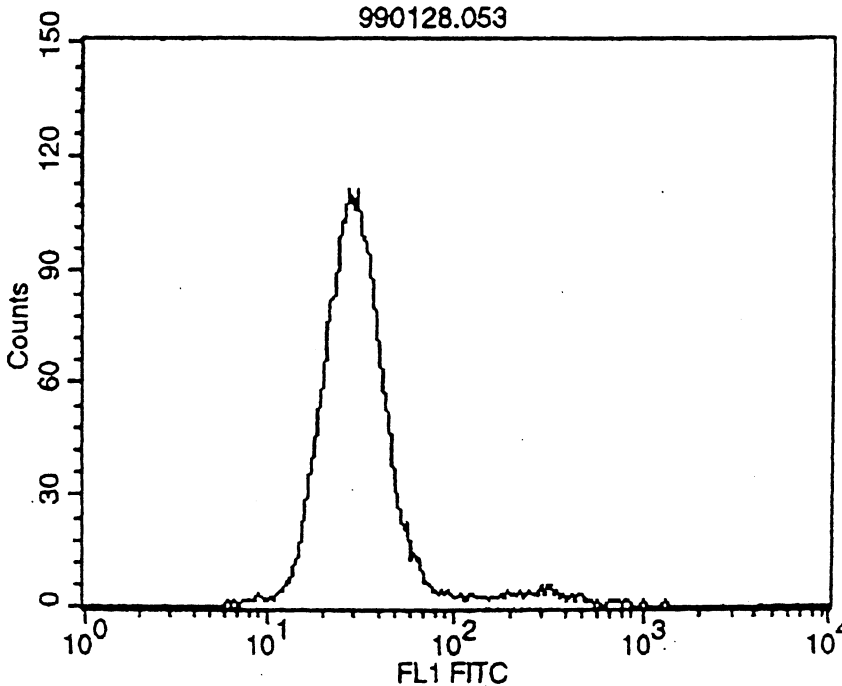
第 6 圖



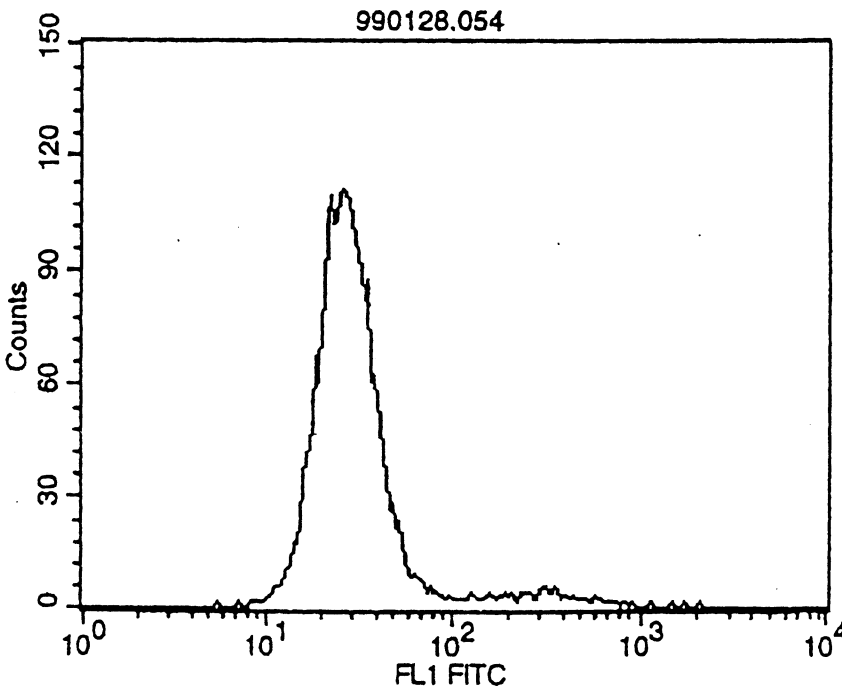
第 7 圖



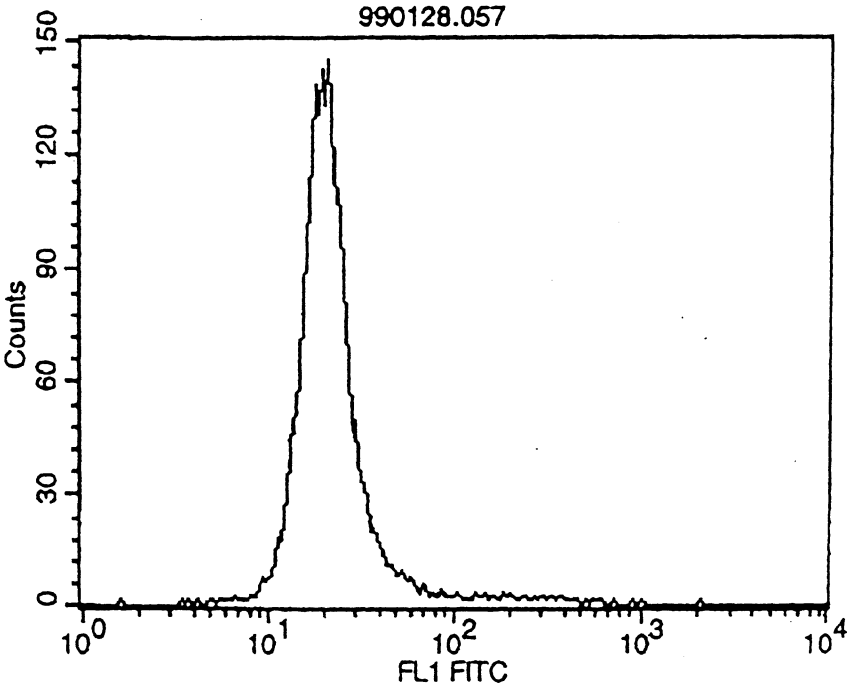
第 8 圖



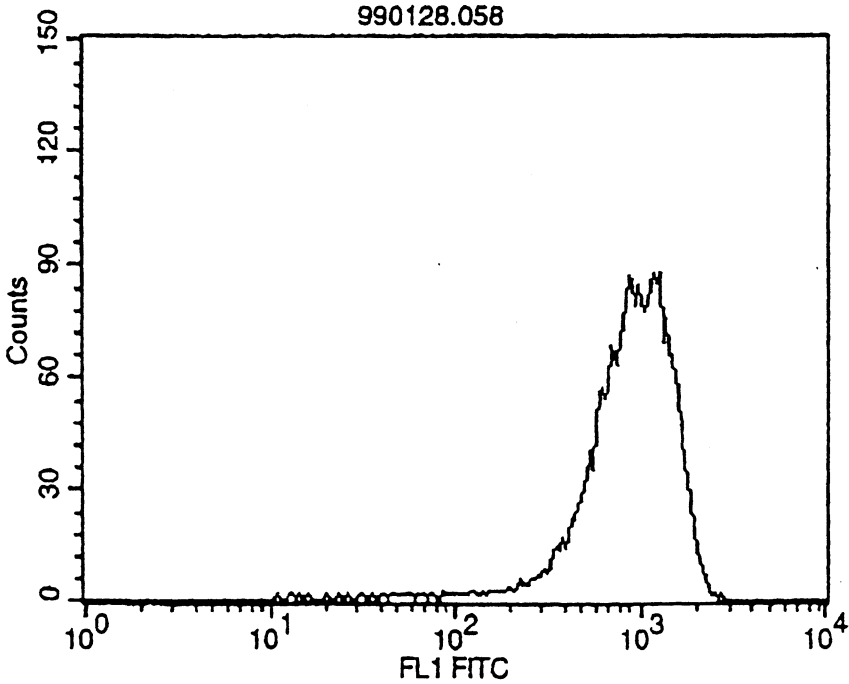
第 9 圖



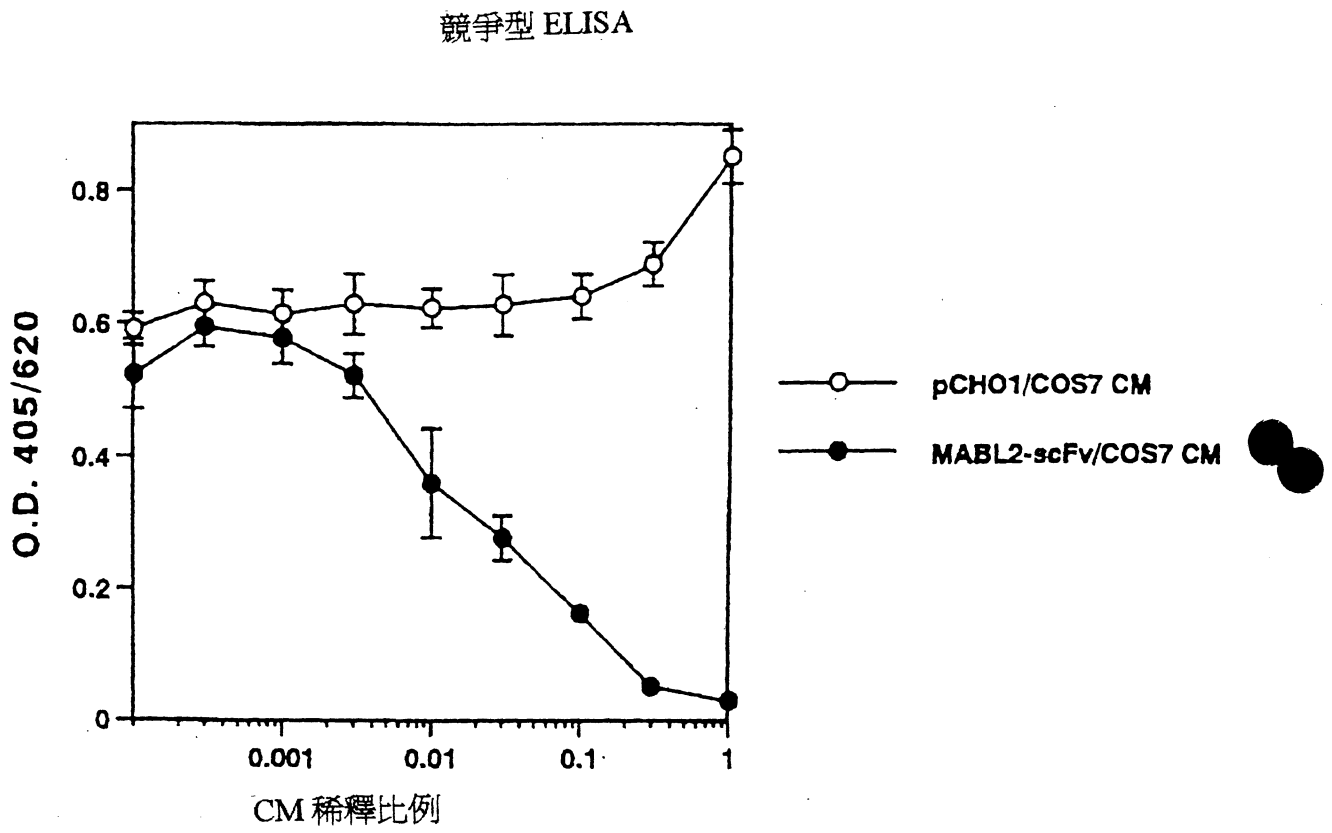
第 10 圖



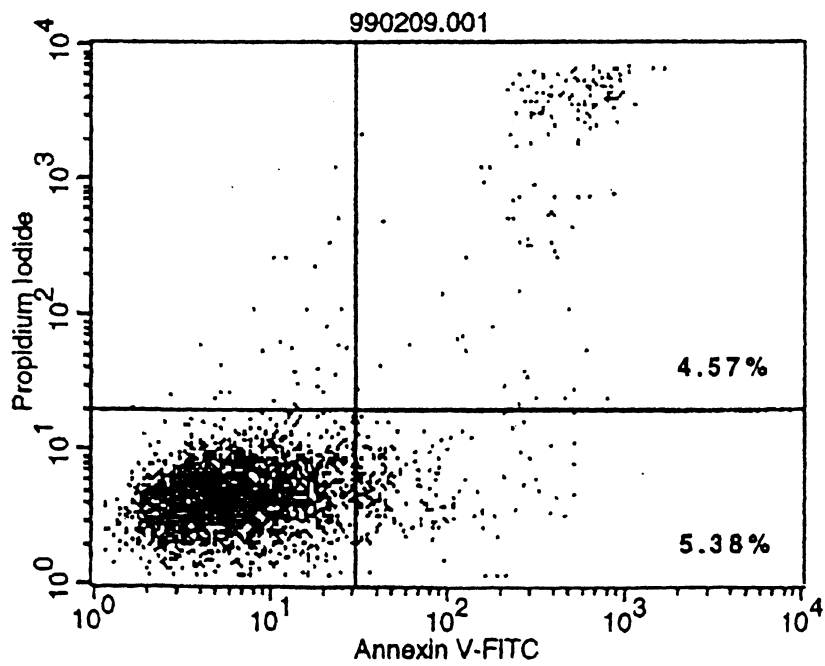
第 11 圖



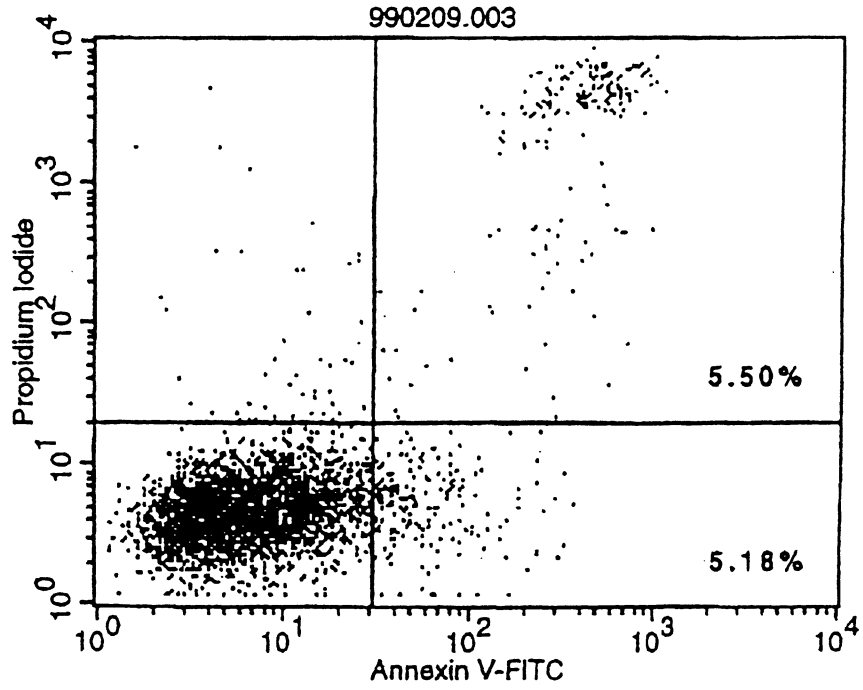
第 12 圖



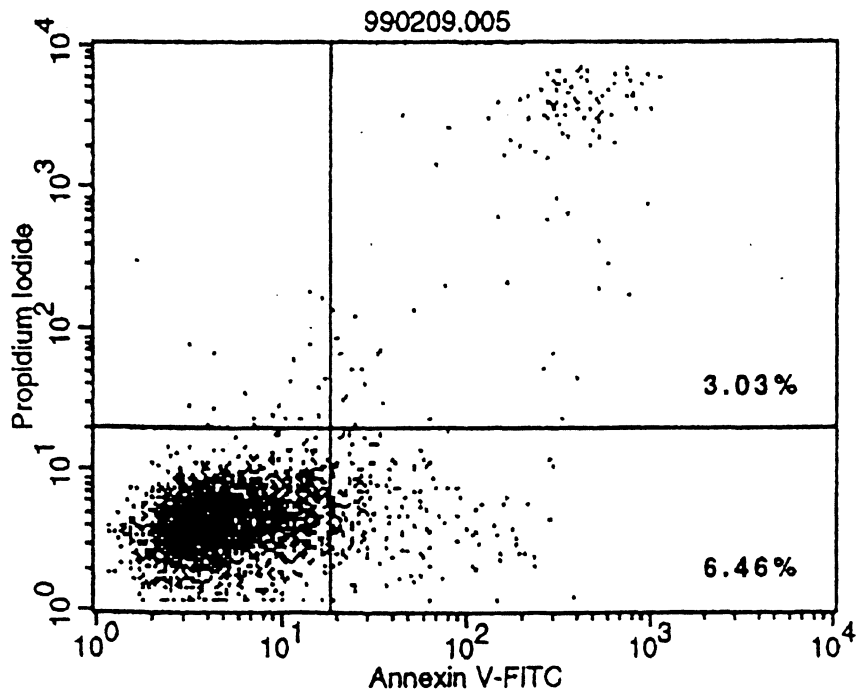
第 13 圖



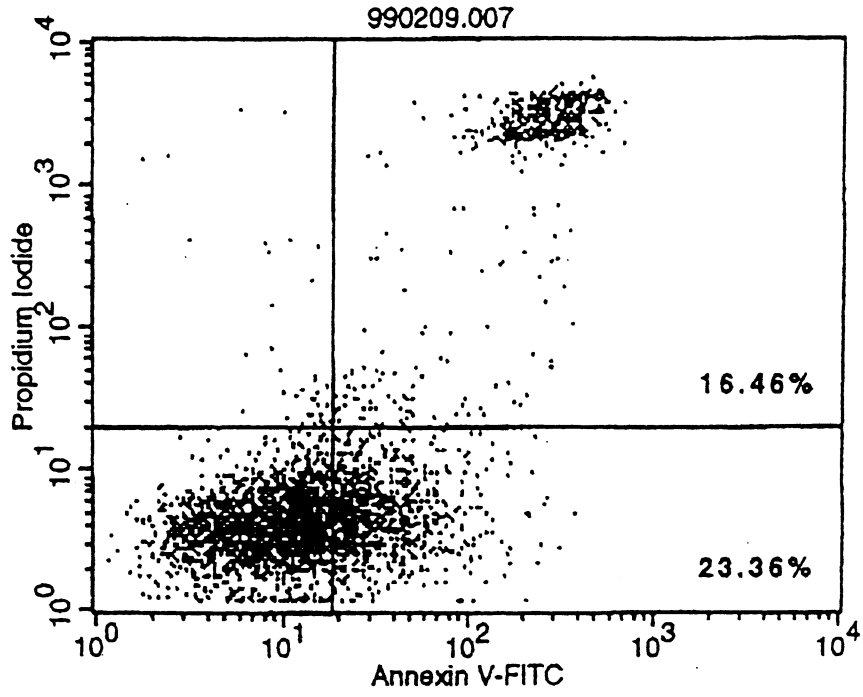
第 14 圖



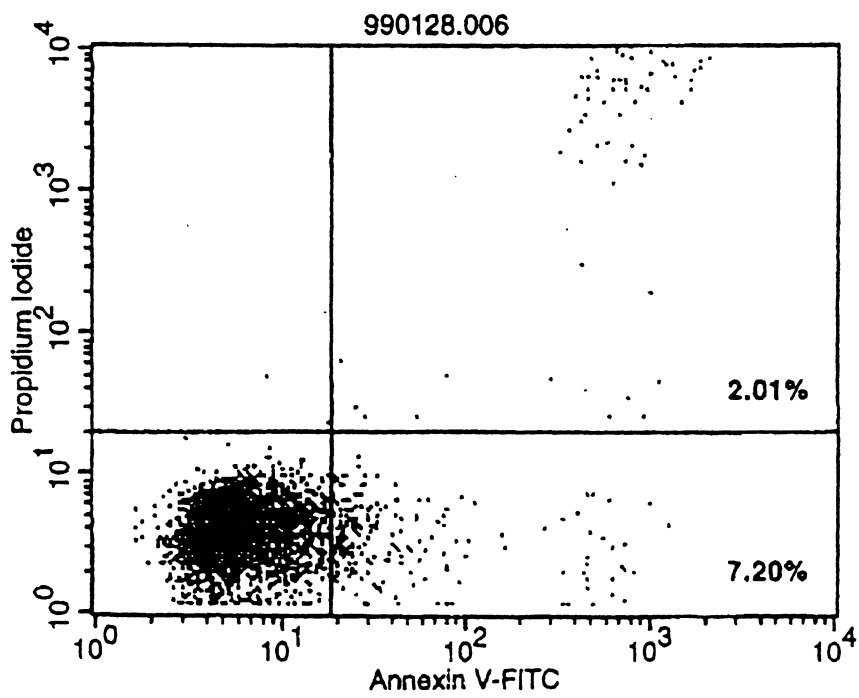
第 15 圖



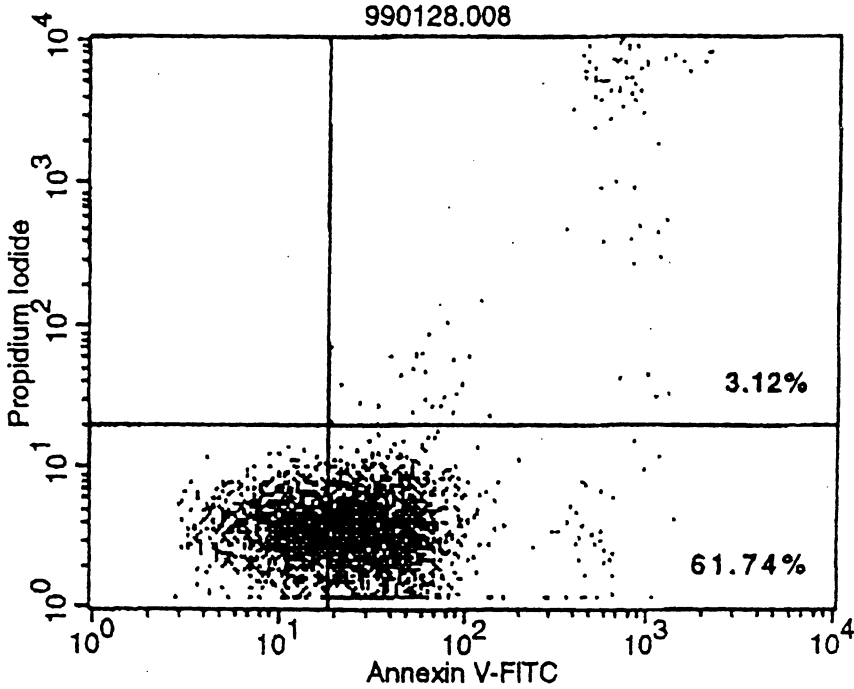
第 16 圖



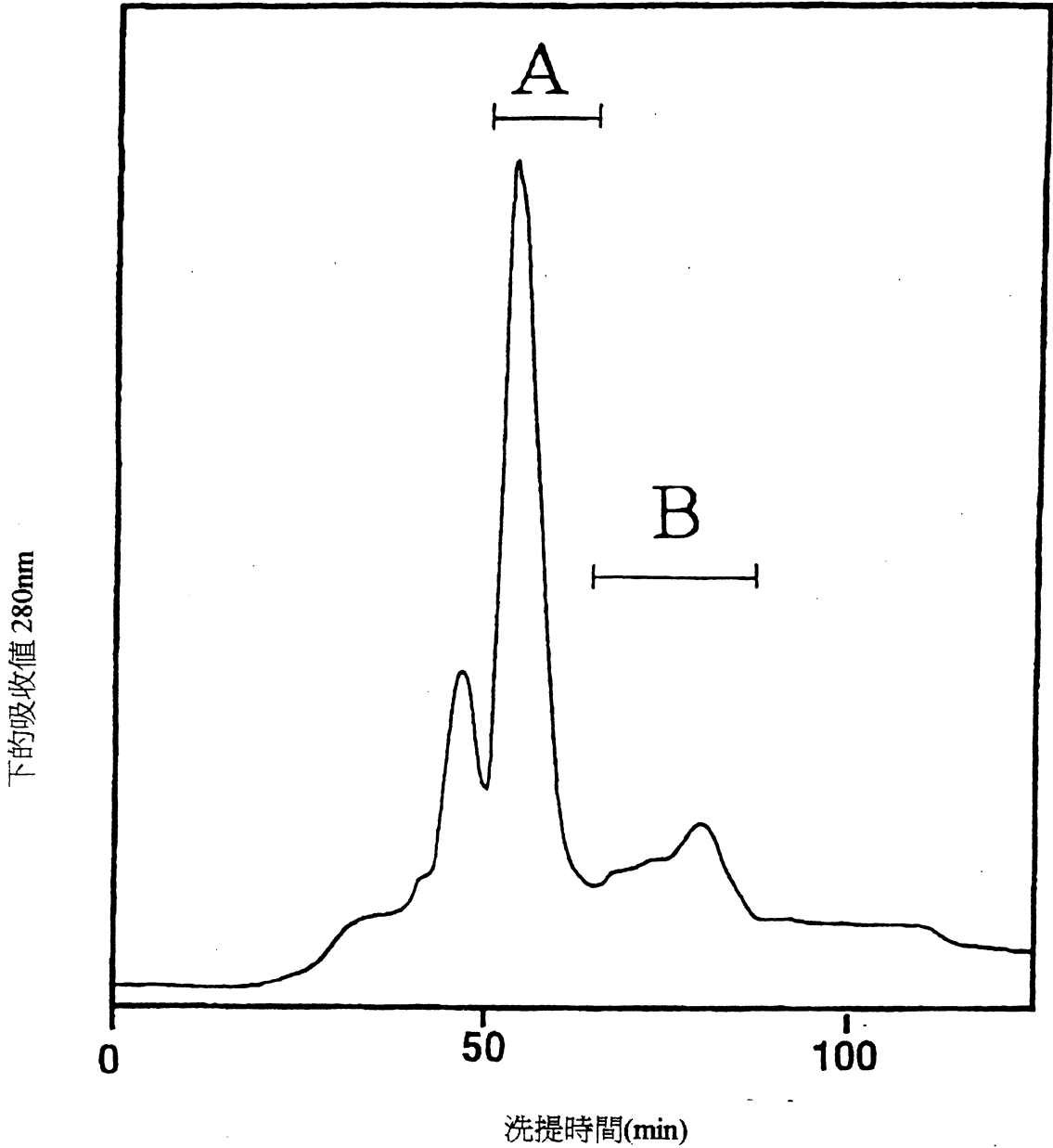
第 17 圖



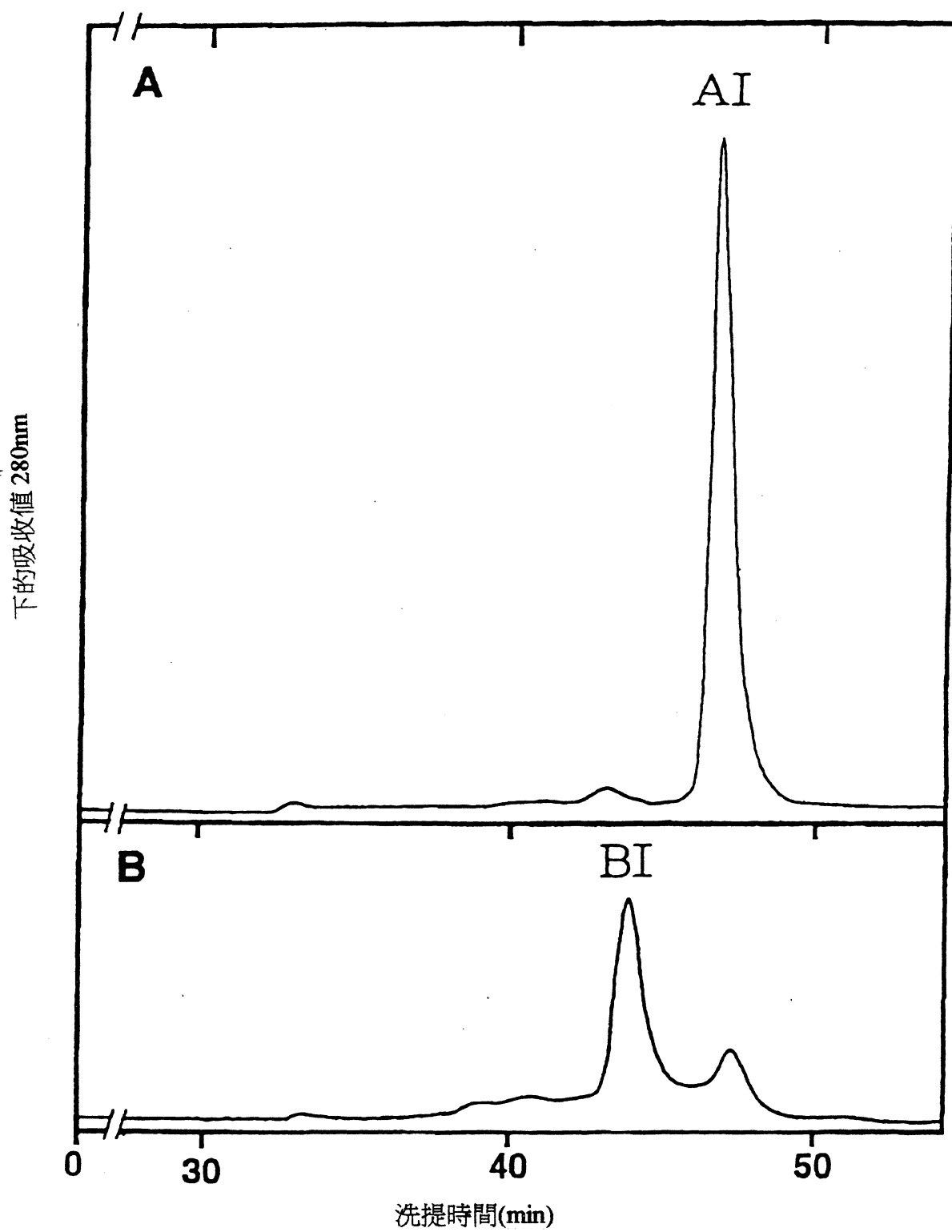
第 18 圖



第 19 圖



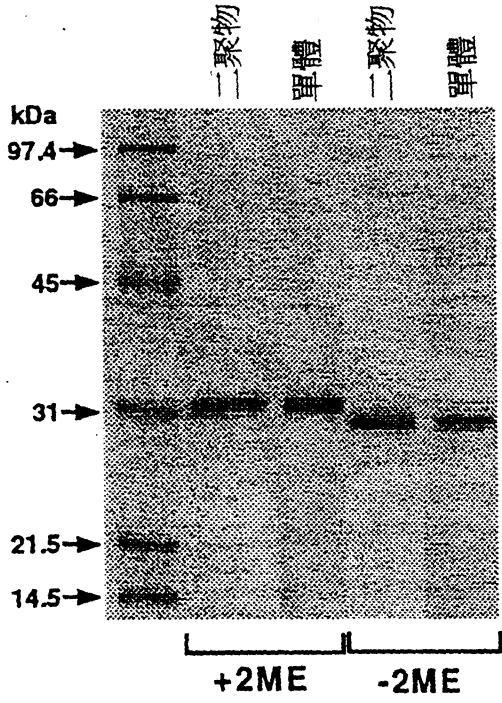
第 20 圖



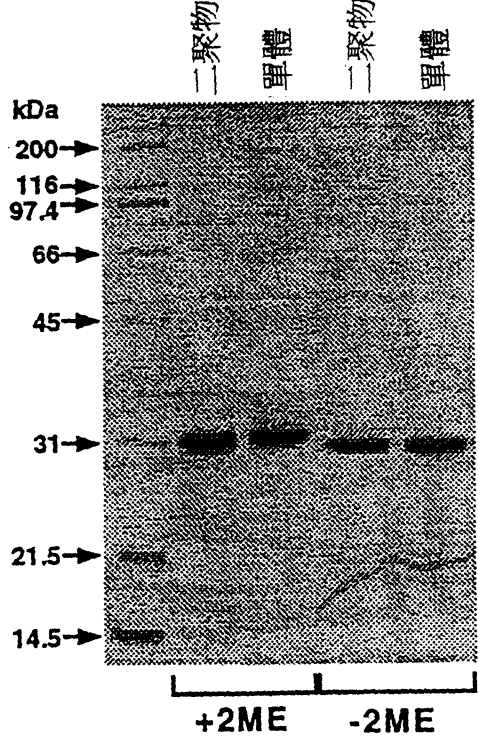
第 21 圖

MABL2-scFv 的 SDS-PAGE 分析

<CHO>



<E. coli>

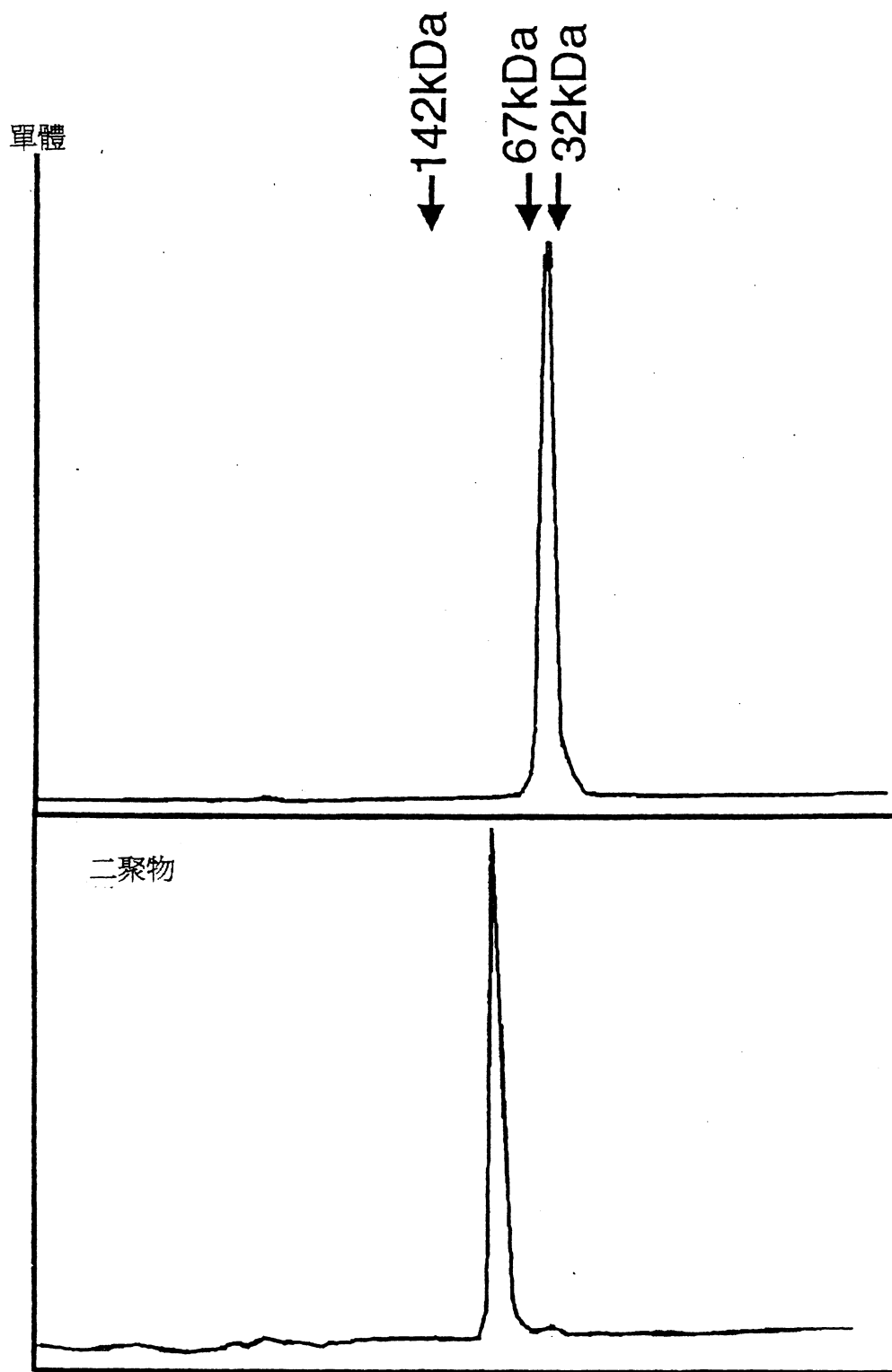


I241345

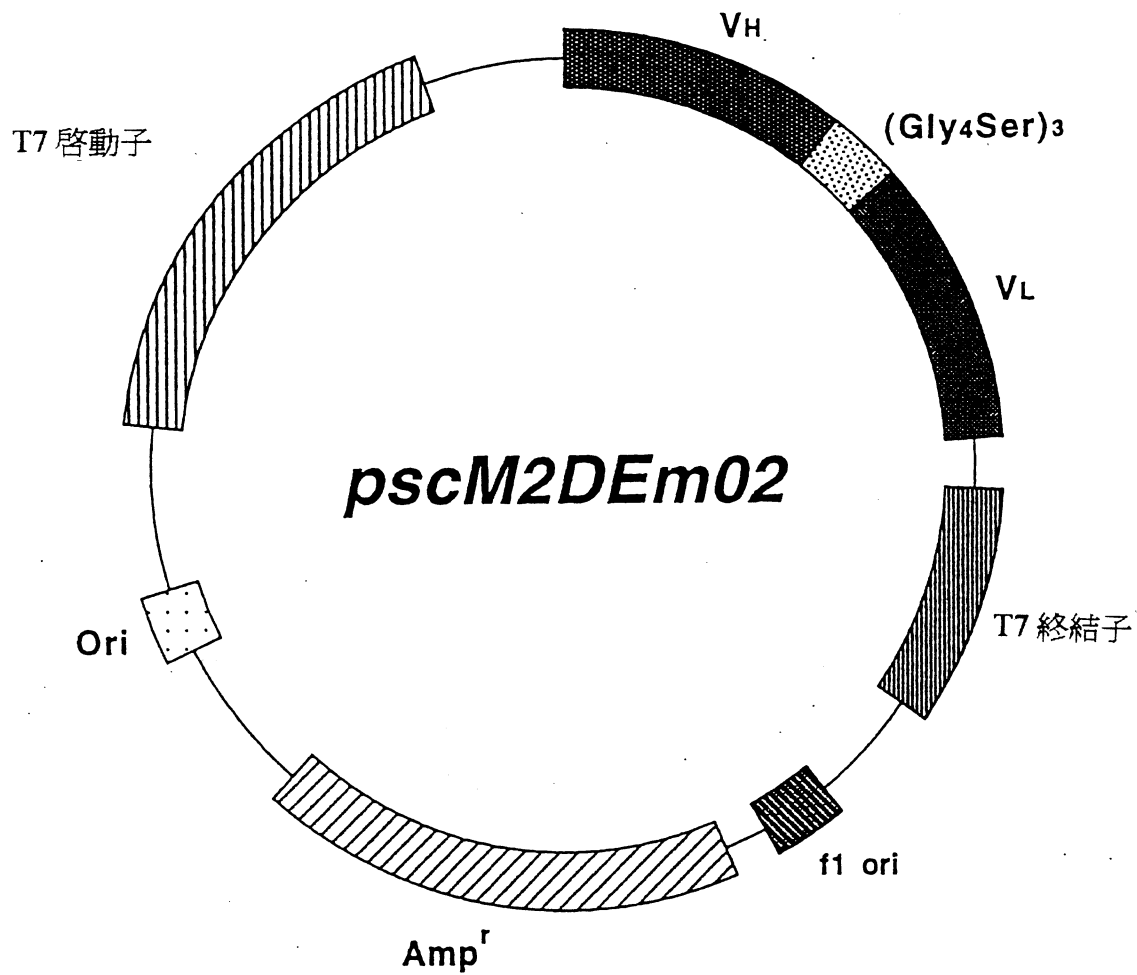
第 22 圖

TSK gel G3000SW

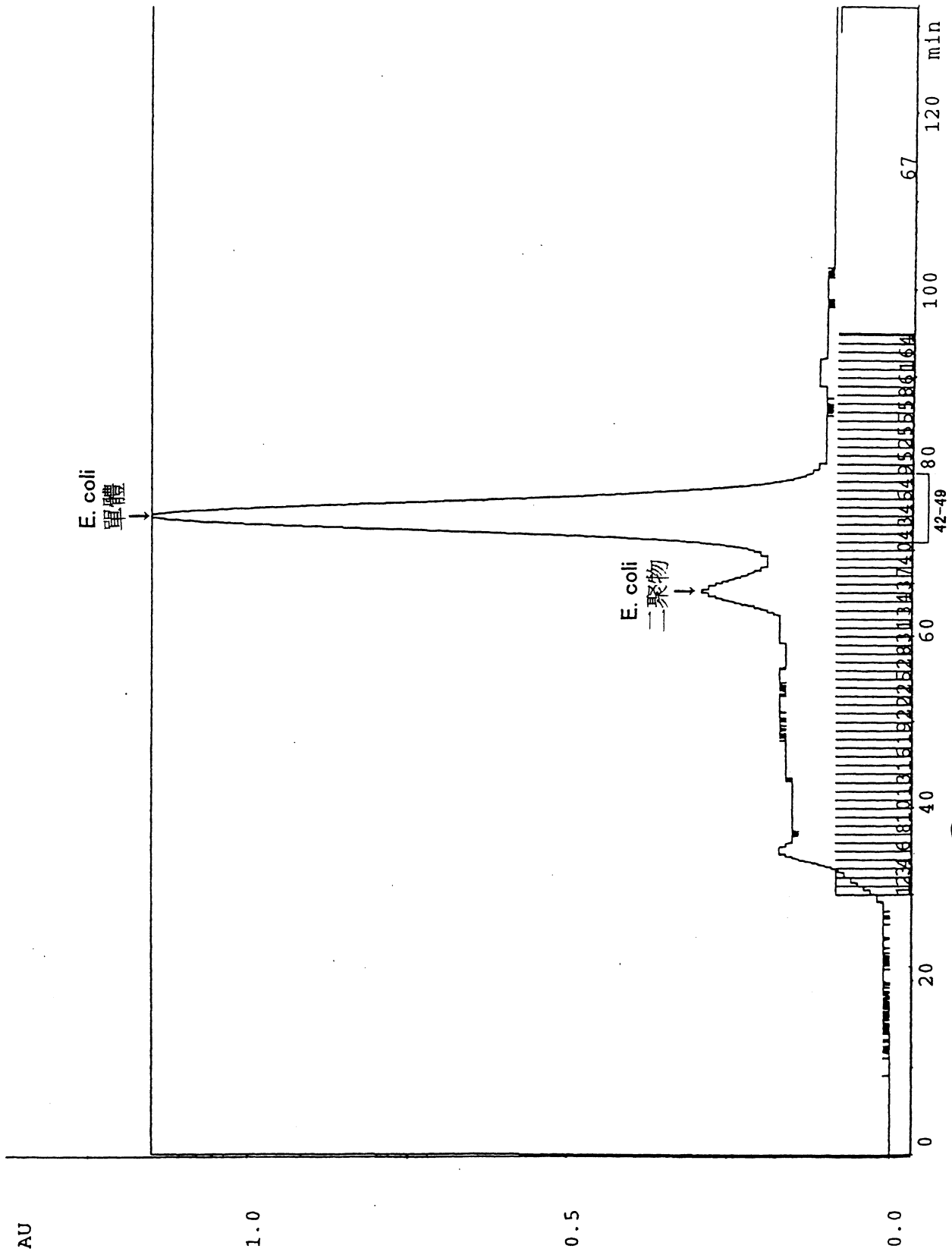
20mM 醋酸緩衝液, 0.15M NaCl, Ph 6.0



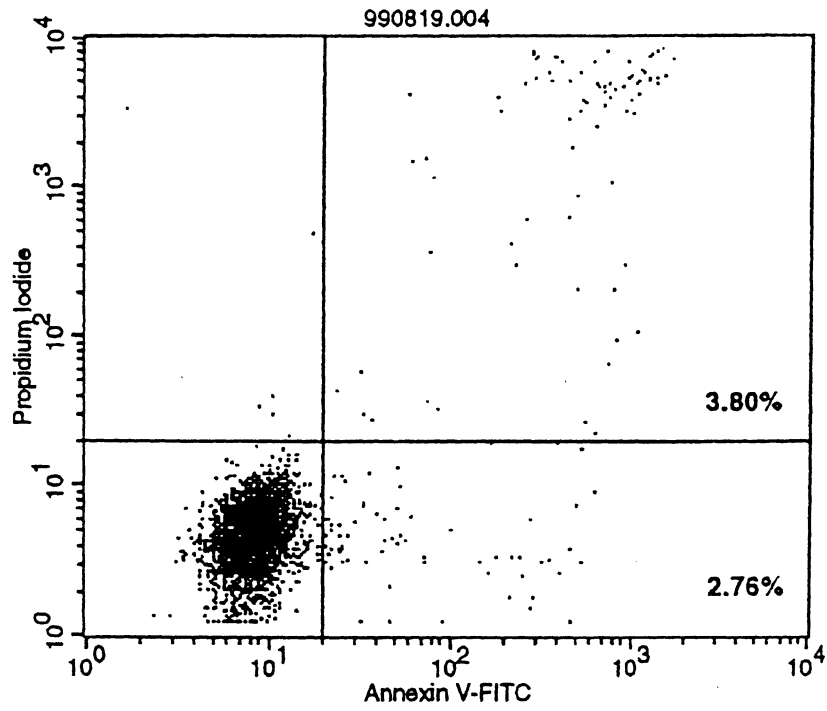
第 23 圖



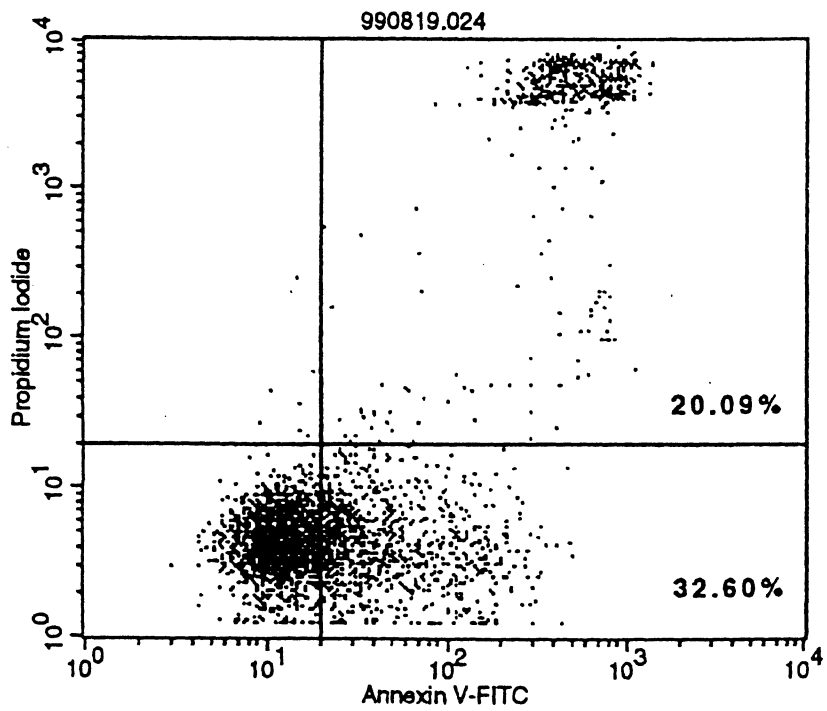
第 24 圖



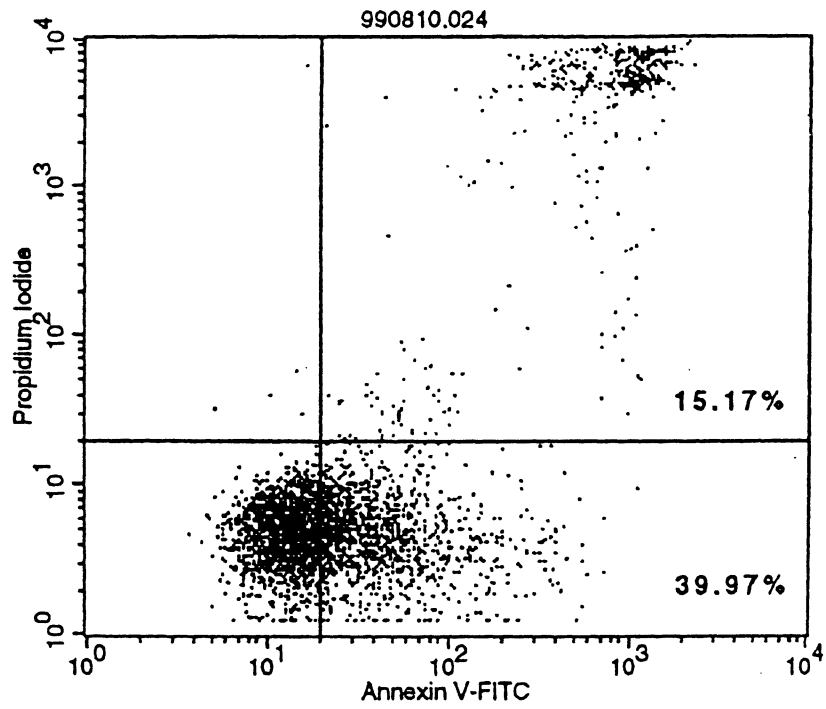
第 25 圖



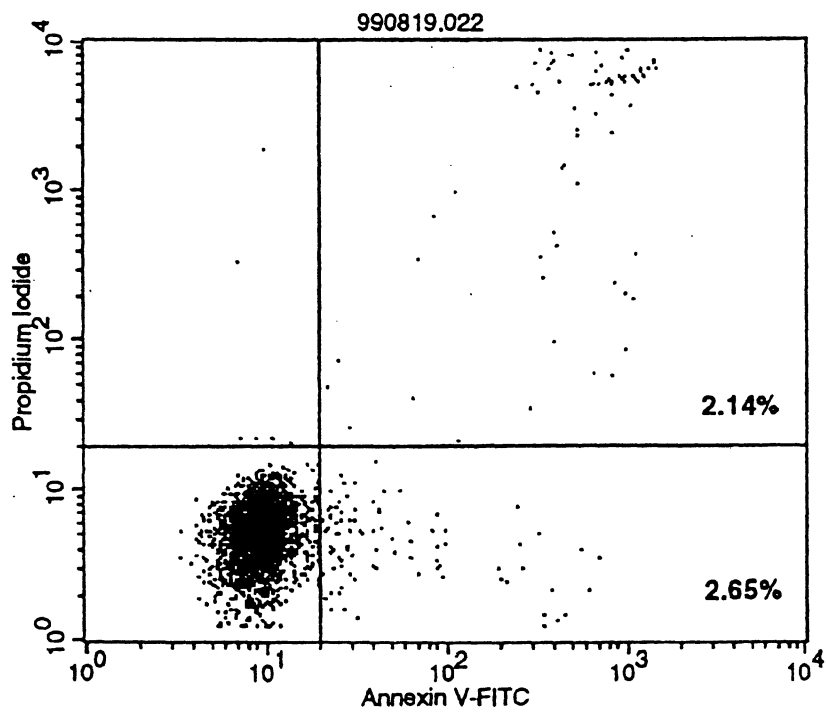
第 26 圖



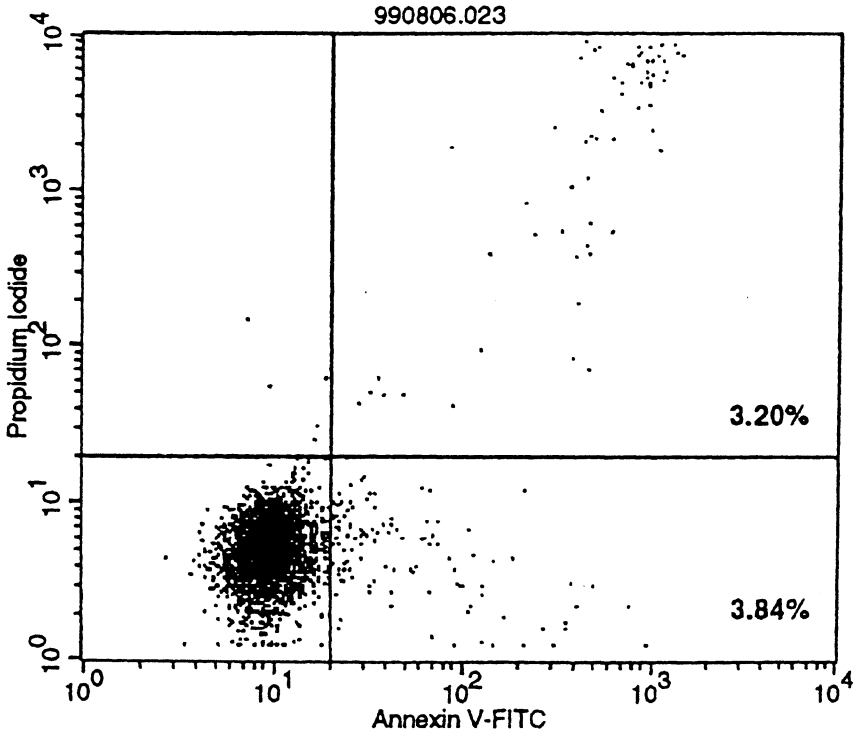
第 27 圖



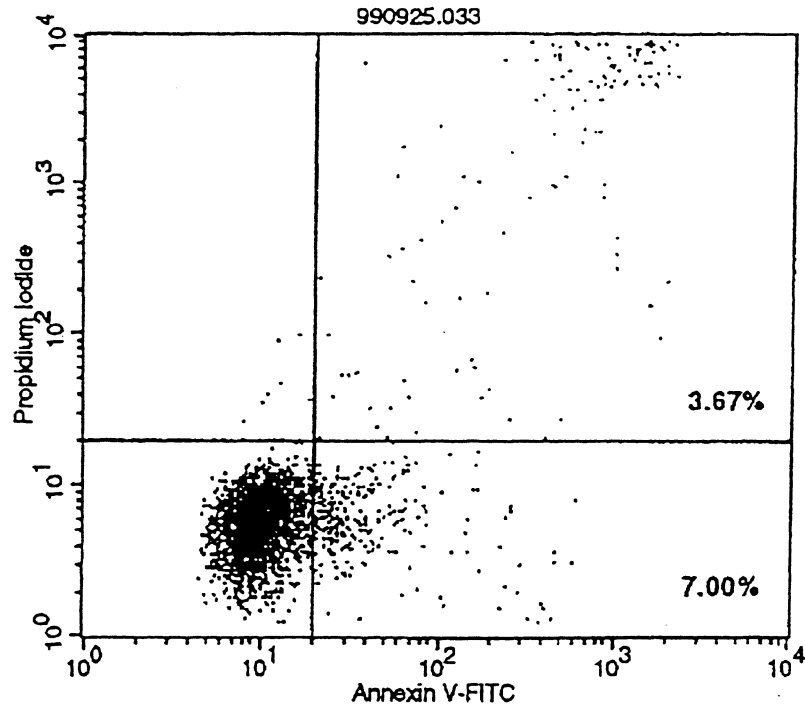
第 28 圖



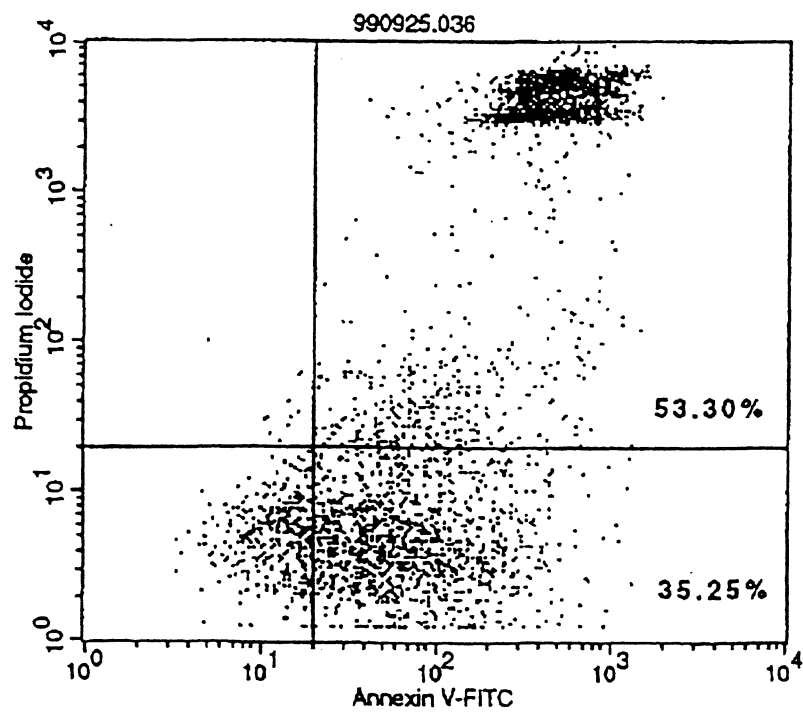
第 29 圖



第 30 圖

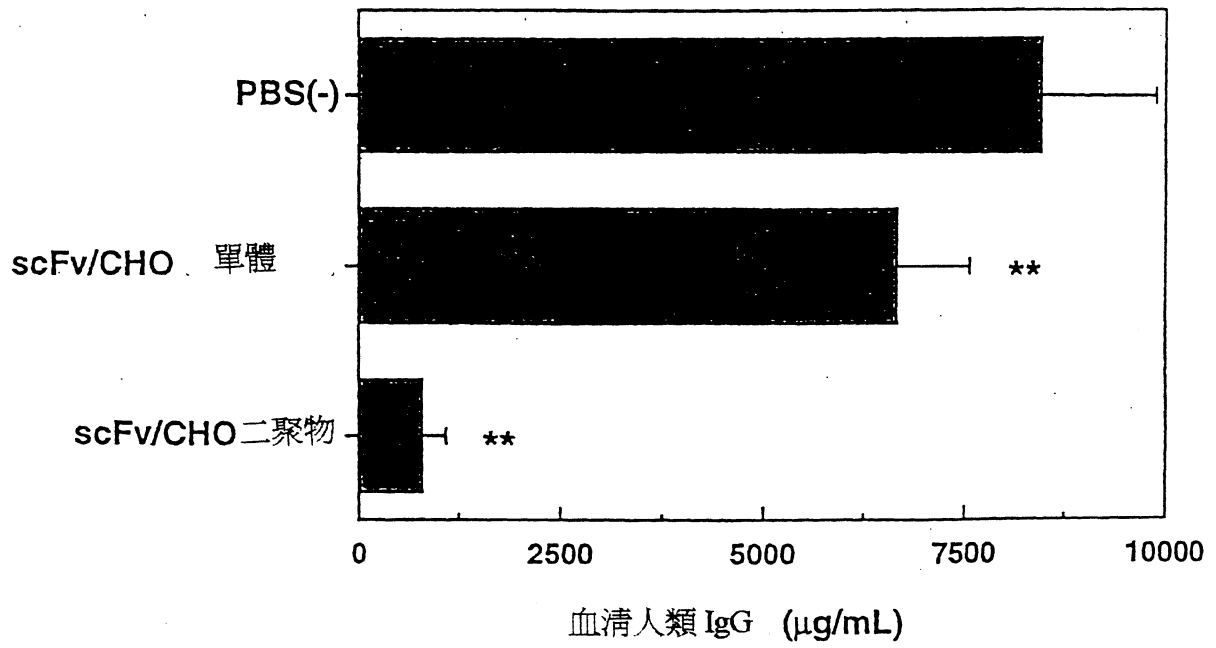


第 31 圖



第 32 圖

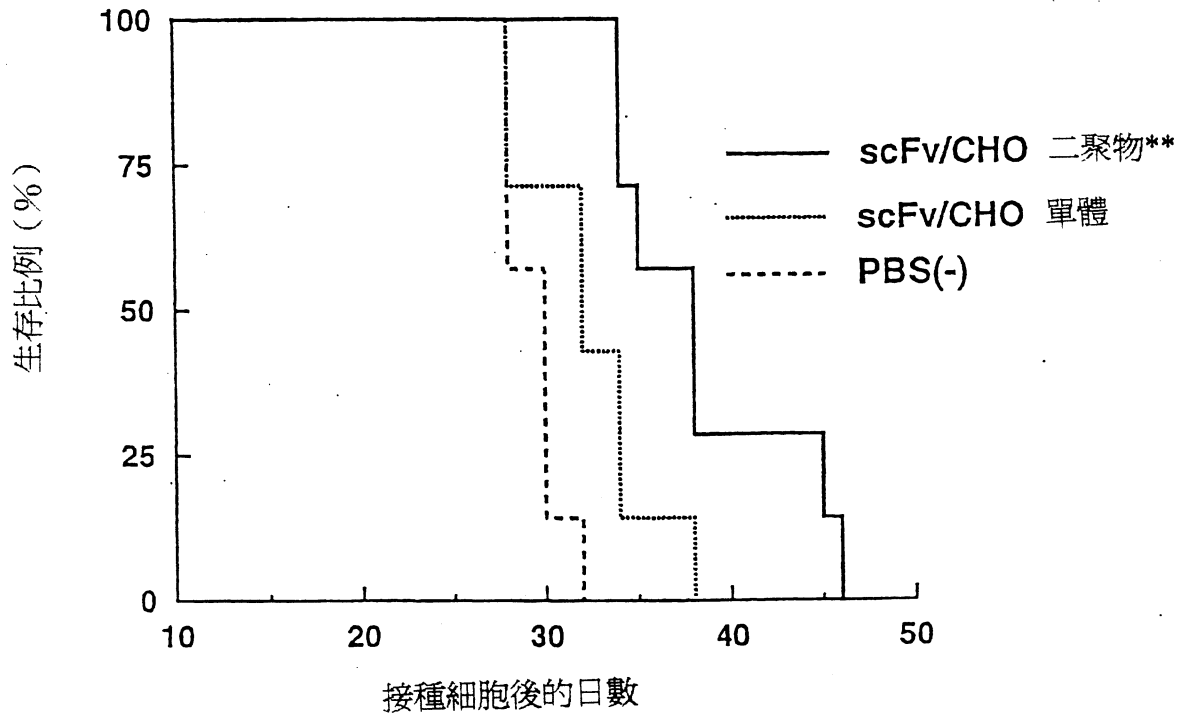
MABL-2(scFv)對移植人類骨髓瘤細胞株 KPMM2 的老鼠血清中之人類 IgG 之效果



** : p<0.01

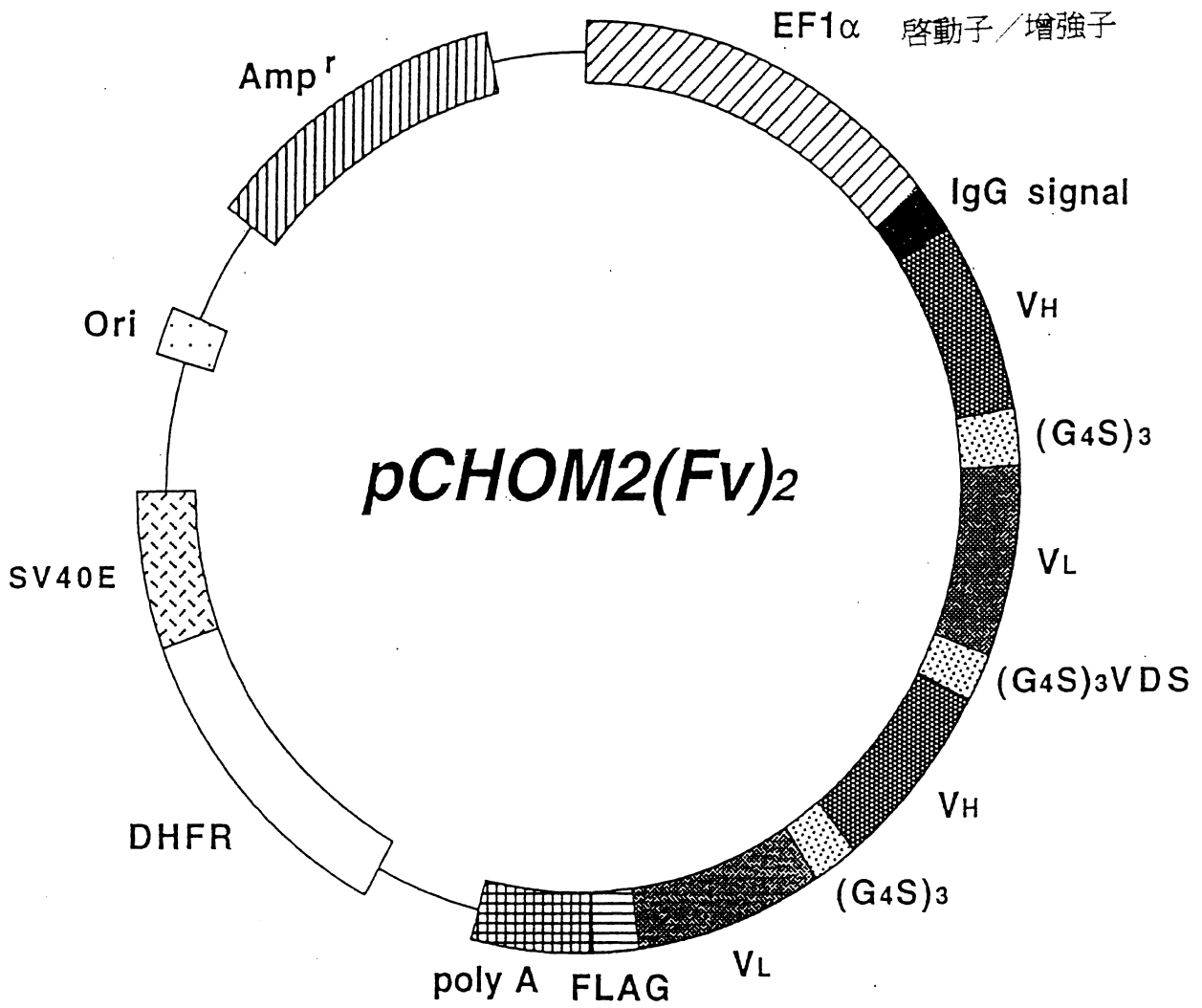
第 33 圖

MABL-2(scFv)對於腫瘤移植後老鼠 KPMM2i.v.SCID mice 的生存日數之效果

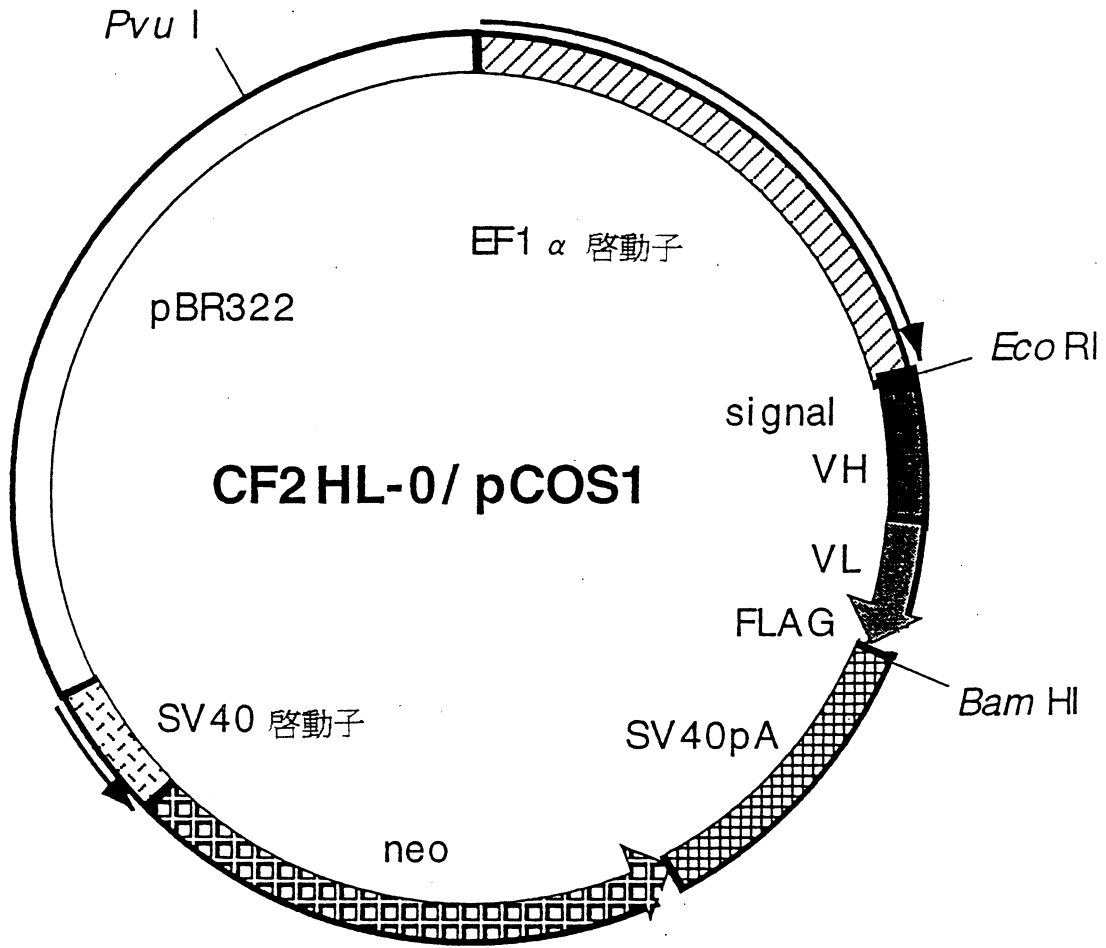


** ; P<0.01 by t-test

第 34 圖

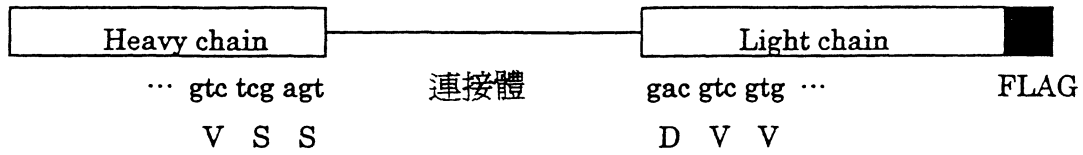


第 35 圖



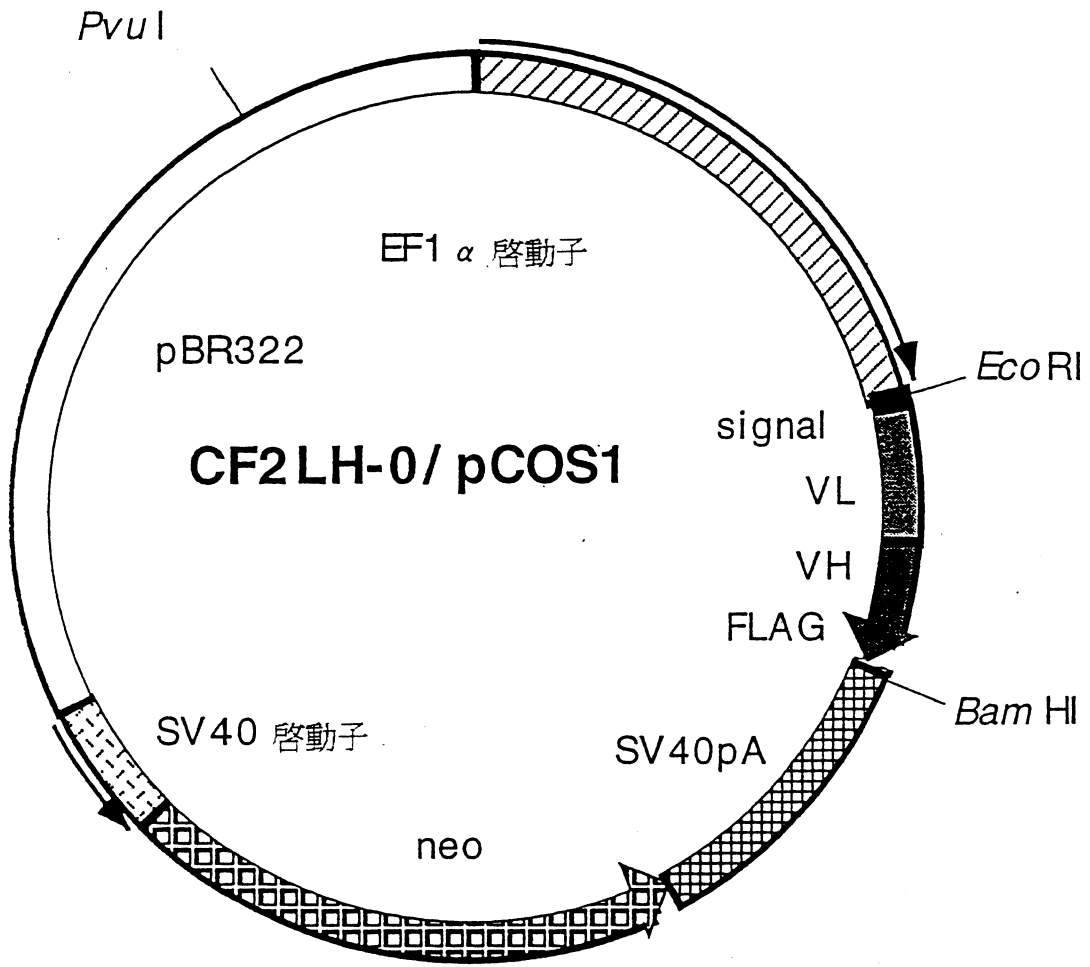
第 36 圖

<HL型的連接體鹼基序列與胺基酸序列>

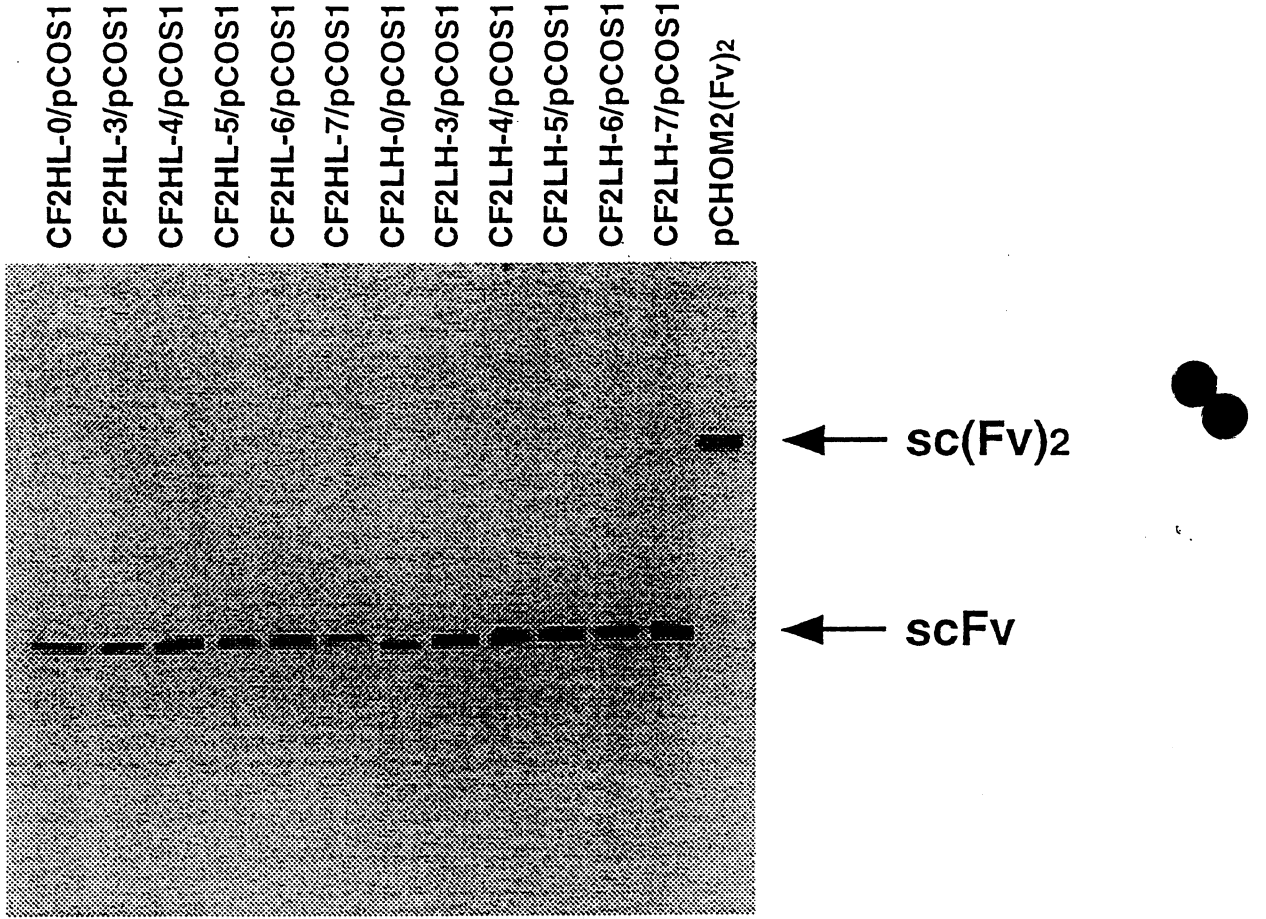


質體	連接體胺基	
	酸數目	連接體
CF2HL-0/pCOS1	0	gtc tcg agt V S S
CF2HL-3/pCOS1	3	gtc tcg agt ggt ggt tcc V S S G G S
CF2HL-4/pCOS1	4	gtc tcg agt ggt ggt ggt tcc V S S G G G S
CF2HL-5/pCOS1	5	gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt tcc V S S G G G G S
CF2HL-6/pCOS1	6	gtc tcg agt gt ggt ggt ggt ggt tcc V S S G G G G G S
CF2HL-7/pCOS1	7	gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt ggt tcc V S S G G G G G G S

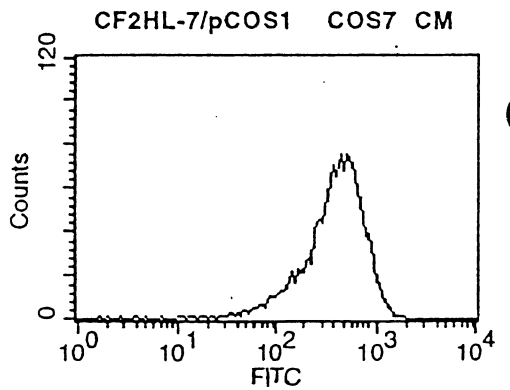
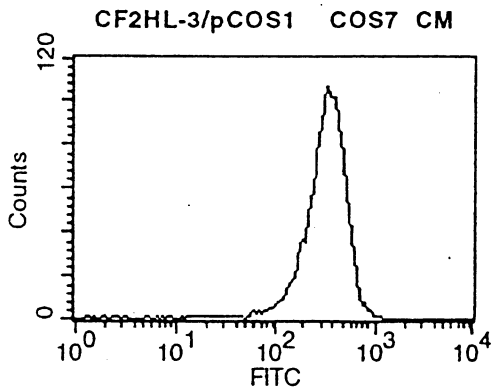
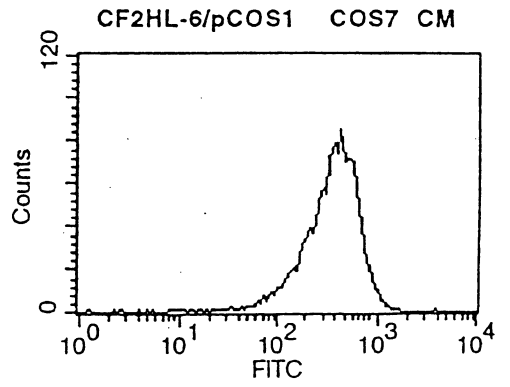
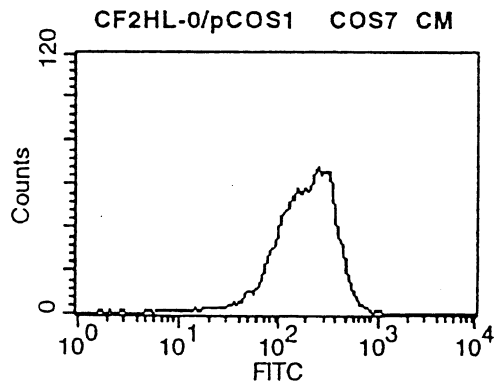
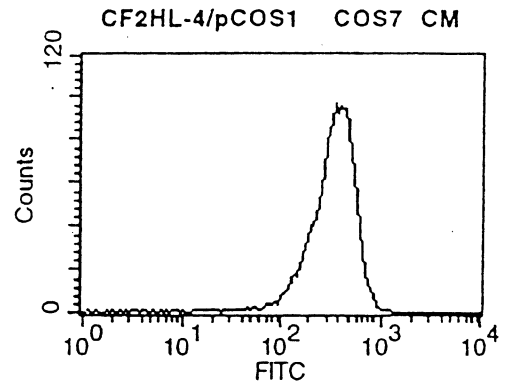
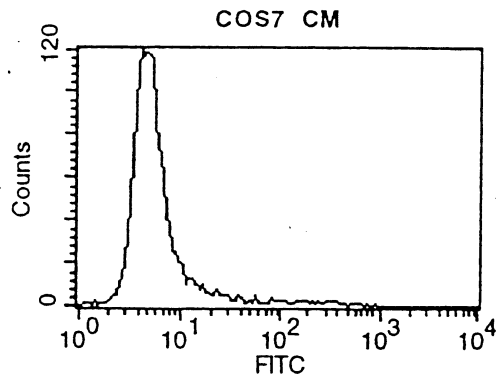
第 37 圖



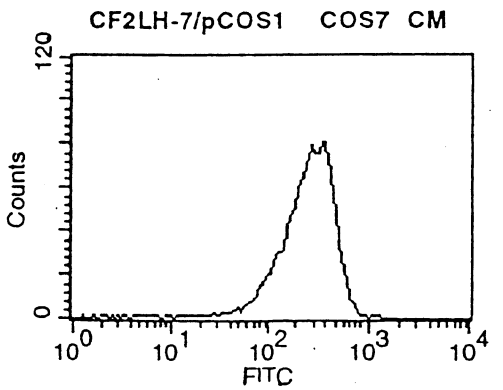
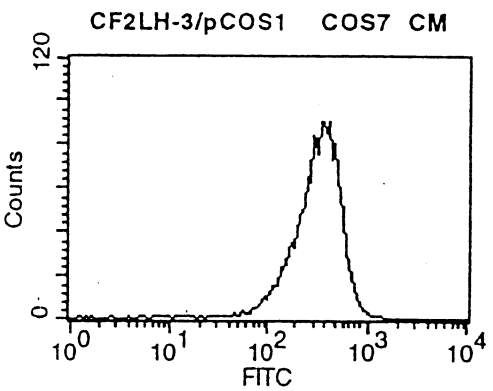
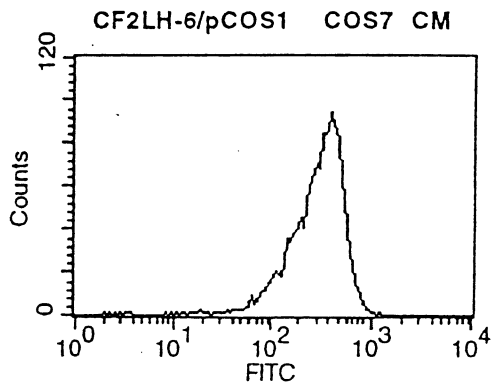
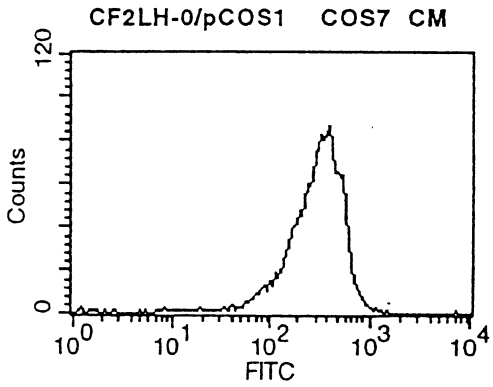
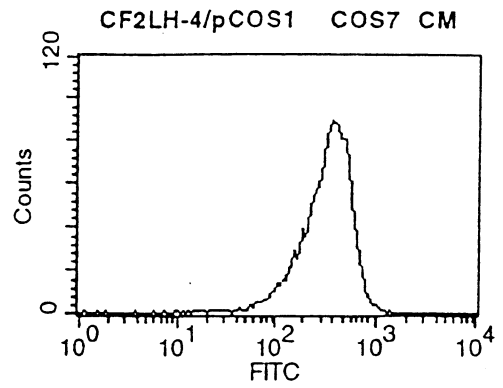
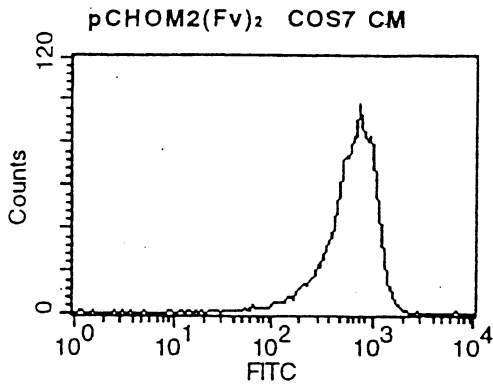
第 39 圖



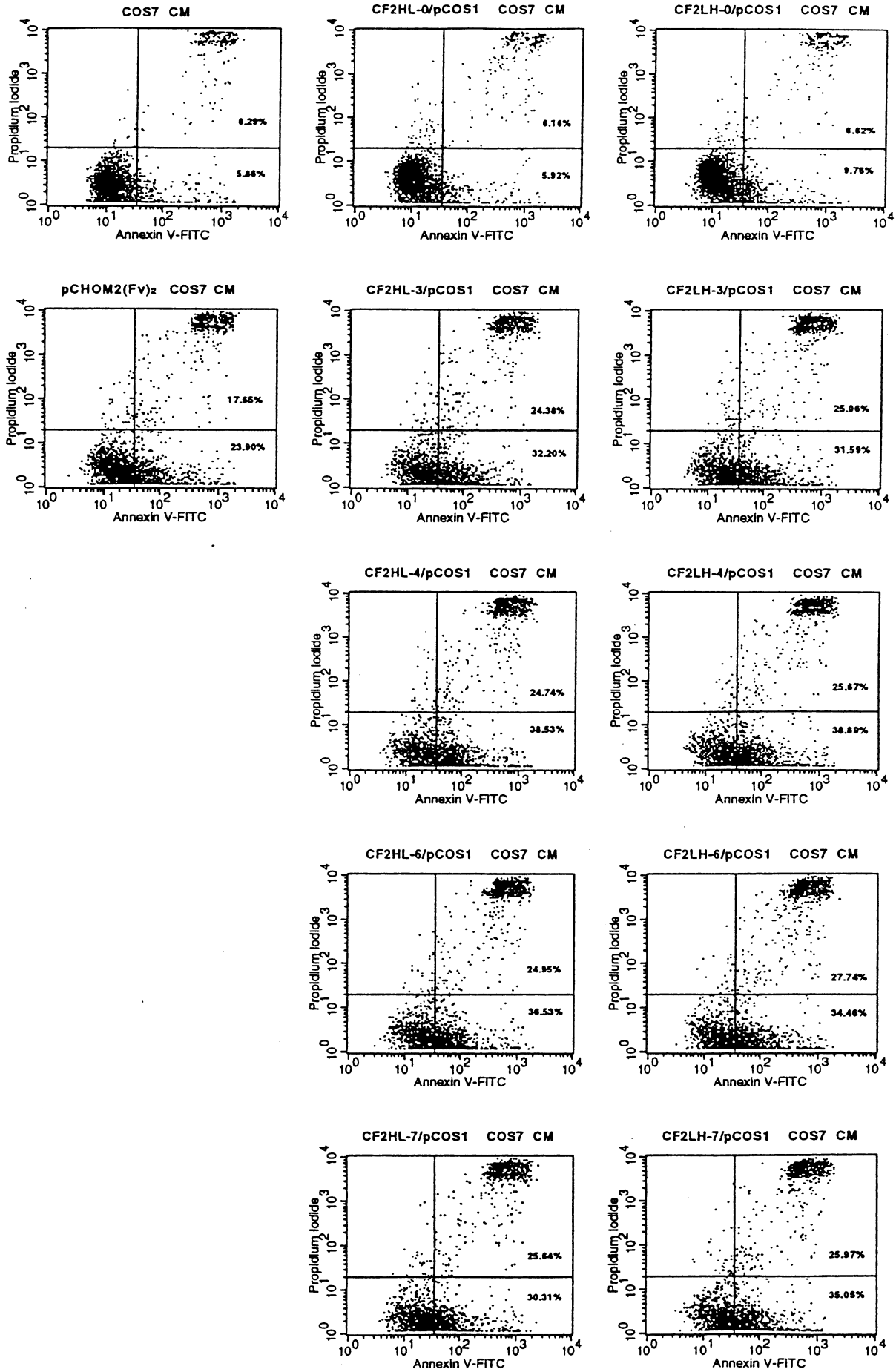
第 40a 圖



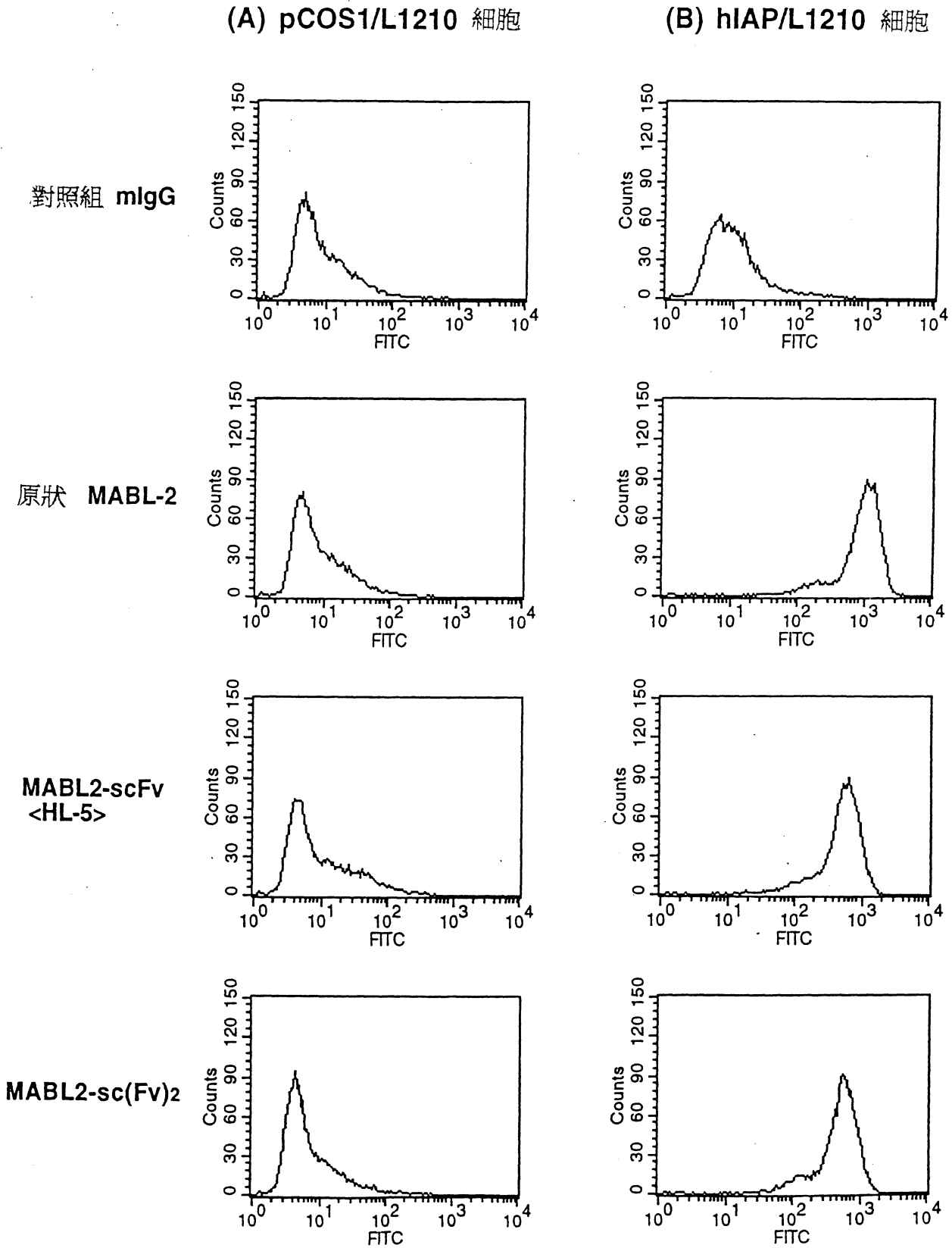
第 40b 圖



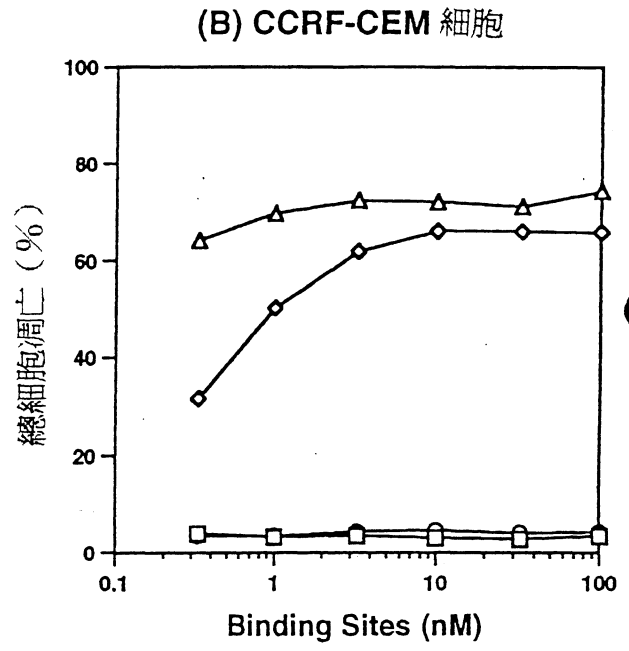
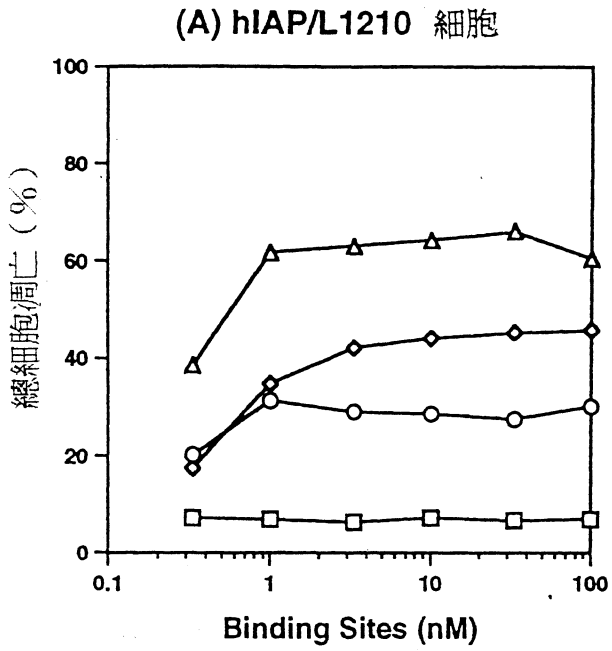
第 41 圖



第 42 圖

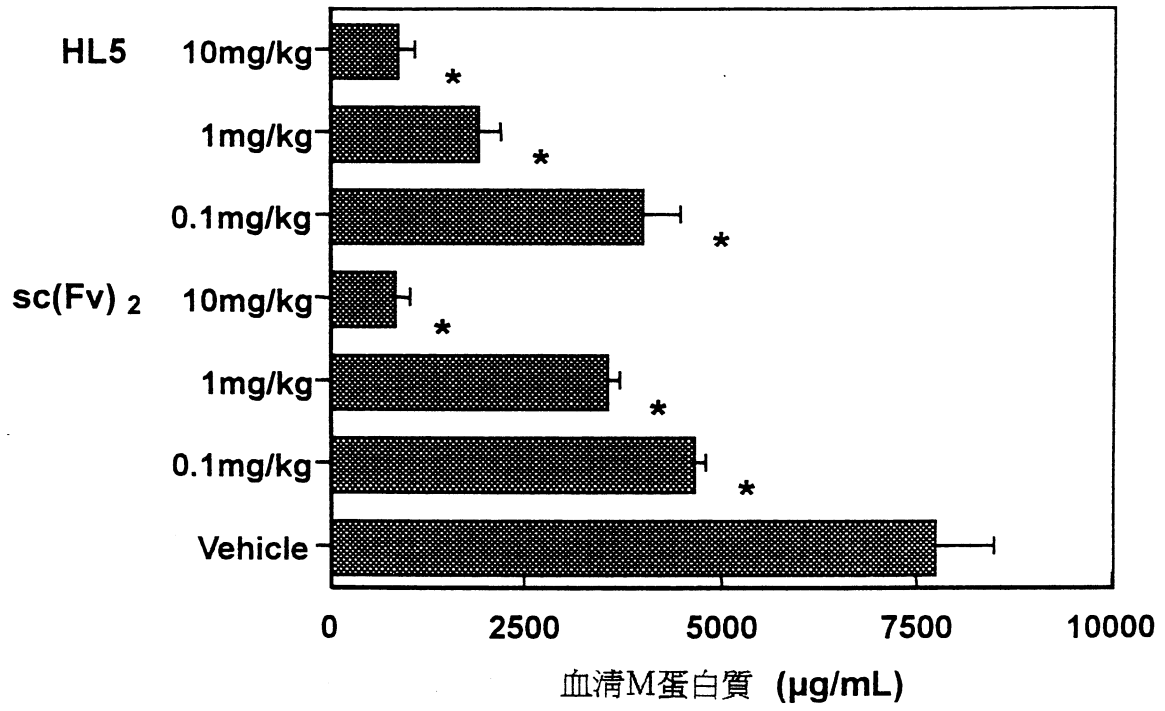


第 43 圖

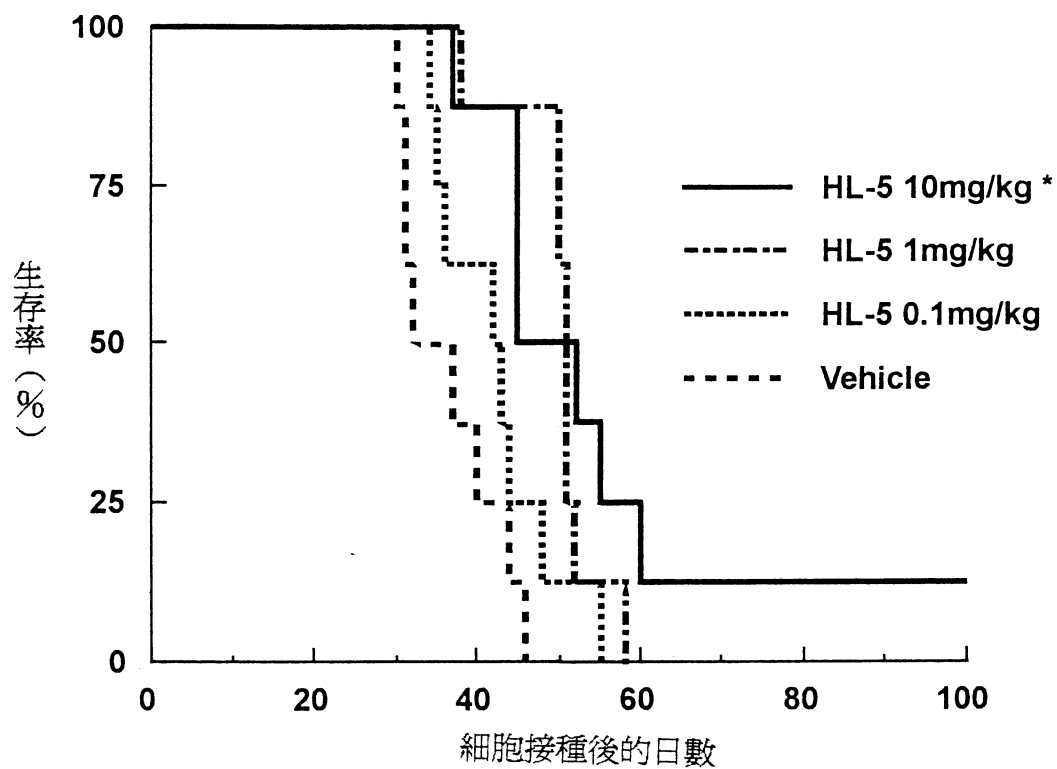


- 對照組 mIgG
- 原狀 MABL-2
- △— MABL2-scFv <HL-5>
- ◇— MABL2-sc(Fv) 2

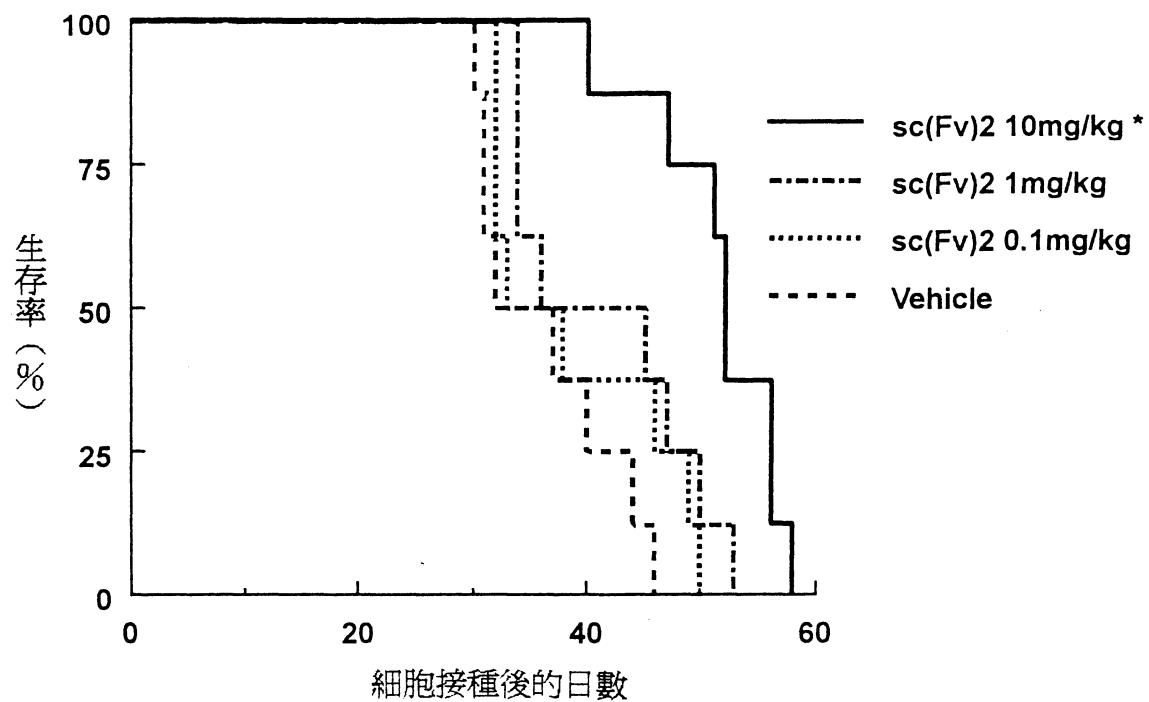
第 44 圖



第 45 圖



第 46 圖



六、申請專利範圍

第 90105616 號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國 93 年 11 月 10 日修正

1. 一種重建聚肽，其為結合於整合組合蛋白質（IAP，Integrin Associated Protein），誘發具有 IAP 的有核血液細胞之細胞凋亡，且不會引起紅血球凝集現象者，其特徵為含有含序列號碼 5 中 43-58 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR1、含序列號碼 5 中 74-80 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR2、含序列號碼 5 中 113-121 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR3 的 L 鏈 V 區域、含序列號碼 6 中 50-54 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR1、含序列號碼 6 中 69-85 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR2、含序列號碼 6 中 118-125 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR3 的 H 鏈 V 區域。

序列號碼 5

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro

5 10 15

gcg tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 90

Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu

20 25 30

cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 135

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

35 40 45

cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 180

Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr

50 55 60

（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

cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 225

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

65 70 75

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

80 85 90

tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 315

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

95 100 105

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

110 115 120

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

125 130

序列號碼 6

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5 10 15

ggc gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu

10 25 30

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

CDR2、含序列號碼 7 中 113-121 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR3 的 L 鏈 V 區域、含序列號碼 8 中 50-54 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR1、含序列號碼 8 中 69-85 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR2、含序列號碼 8 中 118-125 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR3 的 H 鏈 V 區域。

序列號碼 7

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro

5 10 15

ggt tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 90

Gly Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu

20 25 30

cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 135

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

35 40 45

cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 180

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr

50 55 60

ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 225

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

65 70 75

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

80 85 90

tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 315

Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

95 100 105

(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

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

110 115 120

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

125 130

序列號碼 8

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5 10 15

ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50 55 60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65 70 75

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

80 85 90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315

Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu

95 100 105

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

110 115 120

tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405

Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

125 130 135

tca g 409

Ser

3.如申請專利範圍第 1 項或第 2 項的重建聚肽，其中該重建聚肽為含有 2 個以上的 H 鏈 V 區域以及 2 個以上的 L 鏈 V 區域者。

4.如申請專利範圍第 3 項的重建聚肽，其中該重建聚肽為含有 1 個的 H 鏈 V 區域以及 1 個的 L 鏈 V 區域之單鏈 Fv 二聚物。

5.如申請專利範圍第 1 項或第 2 項的重建聚肽，其中該重建聚肽為經純化的單鏈 Fv 二聚物。

6.如申請專利範圍第 1 項或第 2 項的重建聚肽，其中該重建聚肽為含有 1 個 H 鏈 V 區域以及 1 個 L 鏈 V 區域之單鏈 Fv。

7.如申請專利範圍第 1 項或第 2 項的重建聚肽，其中 H 鏈 V 區域以及 L 鏈 V 區域係介著至少 1 個以上的胺基酸所成之聚肽連接體所連結者。

8.如申請專利範圍第 1 項或第 2 項的重建聚肽，其中 H 鏈 V 區域以及 / 或 L 鏈 V 區域為人類型化 H 鏈 V 區域以及 / 或 L 鏈 V 區域。

9.一種重建聚肽的 L 鏈 V 區域，其為結合於整合組合

(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

蛋白質 (IAP , Integrin Associated Protein) , 誘發具有 IAP 的有核血液細胞之細胞凋亡 , 且不會引起紅血球凝集現象者 , 其特徵為含有含如申請專利範圍第 1 項之序列號碼 5 中 43-58 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR1、含該序列號碼 5 中 74-80 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR2、含該序列號碼 5 中 113-121 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR3。

10. 一種重建聚肽的 H 鏈 V 區域 , 其為結合於整合組合蛋白質 (IAP , Integrin Associated Protein) , 誘發具有 IAP 的有核血液細胞之細胞凋亡 , 且不會引起紅血球凝集現象者 , 其特徵為含有含如申請專利範圍第 1 項之序列號碼 6 中 50-54 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR1、含該序列號碼 6 中 69-85 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR2、含該序列號碼 6 中 118-125 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR3。

11. 一種重建聚肽的 L 鏈 V 區域 , 其為結合於整合組合蛋白質 (IAP , Integrin Associated Protein) , 誘發具有 IAP 的有核血液細胞之細胞凋亡 , 且不會引起紅血球凝集現象者 , 其特徵為含有含如申請專利範圍第 2 項之序列號碼 7 中 43-58 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR1、含該序列號碼 7 中 74-80 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR2、含該序列號碼 7 中 113-121 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR3。

12. 一種重建聚肽的 H 鏈 V 區域 , 其為結合於整合組合蛋白質 (IAP , Integrin Associated Protein) , 誘發具有 IAP 的有核血液細胞之細胞凋亡 , 且不會引起紅血球凝集現象者 , 其特徵為含有含如申請專利範圍第 2 項之序列號碼 8

(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

中 50-54 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR1、含該序列號碼 8 中 69-85 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR2、含該序列號碼 8 中 118-125 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR3。

13. 一種編碼重建聚肽的 L 鏈 V 區域之 DNA，其為結合於整合組合蛋白質（IAP，Integrin Associated Protein），誘發具有 IAP 的有核血液細胞之細胞凋亡，且不會引起紅血球凝集現象者，其特徵為含有含如申請專利範圍第 1 項之序列號碼 5 中 43-58 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR1、含該序列號碼 5 中 74-80 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR2、含該序列號碼 5 中 113-121 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR3。

14. 如申請專利範圍第 13 項之 DNA，其中含有編碼含該序列號碼 5 中 127-174 所記載的鹼基序列之 L 鏈 CDR1 的 DNA、編碼含該序列號碼 5 中 220-240 所記載的鹼基序列之 L 鏈 CDR2 的 DNA、編碼含該序列號碼 5 中 337-363 所記載的鹼基序列之 L 鏈 CDR3 的 DNA。

15. 一種編碼重建聚肽的 H 鏈 V 區域之 DNA，其為結合於整合組合蛋白質（IAP，Integrin Associated Protein），誘發具有 IAP 的有核血液細胞之細胞凋亡，且不會引起紅血球凝集現象者，其特徵為含有含如申請專利範圍第 1 項之序列號碼 6 中 50-54 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR1、含該序列號碼 6 中 69-85 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR2、含該序列號碼 6 中 118-125 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR3。

（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

16. 如申請專利範圍第 15 項之 DNA，其中含有編碼含該序列號碼 6 中 148-162 所記載的鹼基序列之 H 鏈 CDR1 的 DNA、編碼含該序列號碼 6 中 205-255 所記載的鹼基序列之 H 鏈 CDR2 的 DNA、編碼含該序列號碼 6 中 352-375 所記載的鹼基序列之 H 鏈 CDR3 的 DNA。

17. 一種編碼重建聚肽的 L 鏈 V 區域之 DNA，其為結合於整合組合蛋白質（IAP，Integrin Associated Protein），誘發具有 IAP 的有核血液細胞之細胞凋亡，且不會引起紅血球凝集現象者，其特徵為如申請專利範圍第 2 項之序列號碼 7 中 43-58 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR1、含該序列號碼 7 中 74-80 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR2、含該序列號碼 7 中 113-121 所記載的胺基酸序列之 L 鏈 CDR3。

18. 如申請專利範圍第 17 項之 DNA，其中含有編碼含該序列號碼 7 中 127-174 所記載的鹼基序列之 L 鏈 CDR1 的 DNA、編碼含該序列號碼 7 中 220-240 所記載的鹼基序列之 L 鏈 CDR2 的 DNA、編碼含該序列號碼 7 中 337-363 所記載的鹼基序列之 L 鏈 CDR3 的 DNA。

19. 一種編碼重建聚肽的 H 鏈 V 區域之 DNA，其為結合於整合組合蛋白質（IAP，Integrin Associated Protein），誘發具有 IAP 的有核血液細胞之細胞凋亡，且不會引起紅血球凝集現象者，其特徵為如申請專利範圍第 2 項之序列號碼 8 中 50-54 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR1、含該序列號碼 8 中 69-85 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR2、含該序列號碼 8 中 118-125 所記載的胺基酸序列之 H 鏈 CDR3

（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

20. 如申請專利範圍第 19 項之 DNA，其中含有編碼含該序列號碼 8 中 148-162 所記載的鹼基序列之 H 鏈 CDR1 的 DNA、編碼含該序列號碼 8 中 205-255 所記載的鹼基序列之 H 鏈 CDR2 的 DNA、編碼含該序列號碼 8 中 352-375 所記載的鹼基序列之 H 鏈 CDR3 的 DNA。

21. 一種使用於治療血液疾病之醫藥組成物，其特徵為含有如申請專利範圍第 1 項至第 8 項中任一項之重建聚肽作為有效成分者。

22. 一種使用於治療白血病之醫藥組成物，其特徵為含有如申請專利範圍第 1 項至第 8 項中任一項之重建聚肽作為有效成分者。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線