

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

歐洲	1998 年 7 月 22 日	PCT/EP98/04584	☒ 無主張優先權
歐洲	1997 年 7 月 23 日	97 112 640.4	☒ 無主張優先權
歐洲	1997 年 12 月 1 日	97 121 073.7	☒ 無主張優先權
美國	1998 年 7 月 10 日	09/113,692	☒ 無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 2)

胞數目至少倍增五次，及

(b) 使用具 (i) ， (i i) 及 (i i i) 特徵之細胞株作為起始細胞株，進行內生目標基因之激活作用

若測試許多細胞株中是否有適當的細胞株具有大量生產目標蛋白質之特徵，則會發現可在人類細胞株用基因標地的方法活化人類的目標基因，且足以產生依據本發明令人滿意的產量及形式之目標蛋白質之細胞。較佳者為不朽的細胞株，尤其是腫瘤細胞株，因其較之非不朽之細胞更具培養性。

依據特性 (i) ，測試人類細胞株之目標基因（即可被激活作用活化的內源基因），是否真的有須要的核酸序列（即天然目標基因之核酸序列）。因為腫瘤細胞株及其他細胞株在長期培養以後，其基因組往往會發生一系列之突變。因此選擇適當的細胞株時，依據的一個重要觀點是確定此細胞是否有須要產物之正確基因。因此必須用一般方法測定培養細胞之序列以及將目標基因定序。視情況可用 P C R 放大目標基因，或在定序前用其他方法放大基因。

選擇細胞株依據的另一重要特性是細胞在懸浮液中之培養性。懸浮細胞較易醱酵，此醱酵較易適應放大之生產（例如：10L至50,000L的大醱酵槽）。因此選擇的細胞應為懸浮細胞或能適應懸浮液培養之細胞。因此細胞要能在固定攪拌下培養14天。在此週期內，若細胞

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 §)

族群至少倍增五次，則此細胞為適於懸浮培養之細胞。週期性的進行細胞計數（例如：計算細胞或測定細胞懸浮液之光密度），可測定族群之倍增數目。

選擇人類細胞依據之另一重要的特徵是在無血清之培養液中之培養性。因為從無血清之培養液中純化蛋白質比較容易，且無動物病原體（例如病毒）污染的危險，因此選擇的細胞應能生長在無血清之培養液。因此將細胞在 1 至 10×10^5 細胞／毫升之密度下，於無血清之培養液（例如：含 ITS 之 RPMI 1650，來自 Boehringer Mannheim）的培養容器中培養 14 天。若細胞族群在培養期間至少倍增五倍（細胞計數後測定），則將該細胞視為能適應無血清培養液之培養。

根據本發明另一較佳的重要特徵是其世代時間（i v）。選擇之細胞在培養液（例如：DMEM 中含 10% 總重之小牛血清或 RPMI 1640 中含 10% 總重之小牛血清）中應能高度的增殖，即族群每週應能倍增 10 至 256 倍，較佳者能倍增 64 至 128 倍。因此培養盤中接種細胞之濃度為 0.1 至 10×10^5 細胞／毫升，較佳者為 0.5 至 2×10^5 細胞／毫升，而細胞計數是用細胞室裝置不用胰蛋白酶水解或以胰蛋白酶水解後計數。世代時間短的細胞尤其適於用來激活內生的基因，大量生產人類之蛋白質。

另一較佳的特徵是無任何可偵測之內生目標基因的表達（即轉錄與轉譯）（v）。在選擇細胞株進行活化內源

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 4)

基因時，較佳之細胞株基本上無內生目標基因的表達。因此將細胞以 0.01 至 2×10^6 細胞／毫升之密度接種 24 小時，較佳者為 0.5 至 1×10^6 細胞／毫升之培養液。於預定之期間後（例如：24 小時），將細胞上清液移除，丟棄細胞，細胞上清液之目標蛋白質含量用已知的測試方法（例如：E L I S A）測定。於測定 E P O 時，測定限度為例如 $10 \text{ pg} / \text{E P O} / \text{毫升}$ 。細胞接種 10^5 細胞／毫升，合成少於 10 pg 之蛋白質可視為無產量且為特別適當的細胞株。

另一較佳的重要特徵是選擇細胞目標基因之多體性（v i）。若細胞中目標基因多於兩套染色體之拷貝數，則能顯著的增加同源重組基因之產量。生產 E P O 之基因位於細胞內之染色體 7，Namalwas (Nadkarni et al., Cancer 23 (1969), 64-7 或 HeLa S3 (ATCC CCL-2.2) (Puck et al., J. Exp. Med. 103 (1956), 173-284) 有三重覆的染色體 7 尤佳。此外染色體 7 有多套拷貝數之細胞株為結腸腺癌細胞株 SW-480 (ATCC CCL-228; Leibovitz et al., Cancer Res. 36 (1976), 4562-4567)，黑色素肉瘤細胞株 S K - M E L - 3 (ATCC HTB 69; Fogh and Tremp, in: Human Tumor Cells in vitro, pp 115-159, J. Fogh (ed.), Plenum Press, New York 1975)，結腸腺癌細胞 Colo-320 (ATCC CCL-220; Quinn et al., Cancer Res. 39 (1979), 4914-4924)，黑色素瘤細胞株 MEL-HO (DSM ACC 62; Holzmann et al., Int. J. Cancer 41 (1988), 542-547) 及腎臟癌

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 5)

細胞株 A-498 (DSM ACC 55; Giard et al., J. Natl. Cancer Inst. 51 (1973), 1417-1423)。

檢查細胞株中染色體基因組數目可用專一於特定染色體及／或目標基因基因座之 DNA 探針進行。

用於激活內生基因之起始細胞株，另一較佳的特徵是正確的將須要的目標蛋白質進行糖化作用 (v i i)。較佳之人類細胞株是能合成具糖化作用型式之目標蛋白質，尤其是唾液酸殘基的數目與天然目標蛋白質相同。測試是否有糖化作用時，較佳者是在短暫轉染額外之染色體載體 (含須要的目標基因，在細胞啟動子活性的控制下) 的細胞中進行。短暫表達目標基因後，細胞上清液及／或細胞萃取液用等電聚焦分析。以 E P O 為例，明顯的有正確的糖化作用。因此用離體之實驗比較無糖化作用之 E P O (例如：來自大腸桿菌之重組的 E P O) 與糖化的 E P O 之活性。離體之實驗顯示未糖化的 E P O 效應明顯較差。為了測定起始細胞株是否能製造正確糖化的 E P O，比較尿液的 E P O 及來自 C H O 細胞之重組的 E P O (具人類活性的糖化形式)，其糖化作用大體上與尿液的 E P O 相同。比較糖化作用較佳者以等電聚焦之方法進行。

選擇人類細胞株依據之另一較佳的特徵是細胞株無感染性的污染 (v i i)，例如：感染性的病毒顆粒或類菌質體。測定病毒之污染可用細胞培養裝置進行、離體分析、及／或測定特定的病毒蛋白質。

本發明亦關於使用人類細胞株活化內源基因製備人類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(6)

蛋白質之方法，其特徵是使用具上述 (i)、(i i) 及 (i i i) 特徵，及 (i v)、(v)、(v i) 及 (v i i) 中至少一種特徵之細胞株。

本發明使用之方法尤適於製備人類因子，如：E P O、血栓生成素 (thrombopoietin) (T P O)、菌落刺激因子，例如：G - C S F 或 G M C S F、影響血液凝結之蛋白質，例如：t P A、干擾素，例如：I F N - α 、I F N - β 或 I F N - γ 、介白素，例如：I L - 1 至 I L - 1 8、化學激活素 (chemokines)，例如：M I P、親神經的因子，例如：N G F 或 B D N F、影響骨骼生長之蛋白質，例如：I F G - B P、刺蝟蛋白質、腫瘤生長因子，例如：T F G - Q、生長激素，例如：H G H、促腎皮素、腦素 (encephalins)、腦內啡、受體，例如：介白素或胰島素受體溶解及／或細胞膜結合的形式及其他蛋白質結合蛋白質。製備 E P O 可用特定之製程進行。

內源基因之活化可用已知的方法進行，而較佳者包括議下步驟：

(a) 製備人類起始細胞株，該細胞株至少具有一個拷貝之內生的目標基因，該基因含須要的核酸序列，該序列並經本發明之測試選擇標準確認能適當表達的目標基因。

(b) 轉染之細胞 D N A 構建體包括：

(i) 兩個周邊之 D N A 序列，該序列與目標基因之基因座區域同源，因而可進行同源的重組，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明()

(i i) 一個陽性的選擇標記基因，

(i i i) 視須要，一個陰性的選擇標記基因，

(i v) 視須要，一個放大基因，

(v) 一個在人類細胞中具活性的非同源表達控制序列。

(c) 在陽性的選擇標記基因存在時，可發生選擇的條件下，培養轉染的細胞，並且視須要使用陰性的標記基因。

(d) 依據步驟分析細胞之選擇性，

(e) 確認細胞能製造須要的目標蛋白質，及

(f) 視須要，放大選擇的細胞之目標基因。

用於製備細胞製造須要之人類蛋白質之 D N A 構建體，該構建體含兩個周邊的 D N A 序列，該序列與目標基因基因座區域同源的。選擇適當的周邊序列之原則，例如描述於 W O 9 0 / 1 1 3 5 4 及 W O 9 1 / 0 9 9 5 5 之方法。較佳之周邊序列各別之長度至少為 1 5 0 b p 。

特較佳的同源 D N A 序列是選自目標基因之 5 ' 區域，例如：5 ' - 不轉譯序列、信號序列編碼的表現序列及位於此區域之內子。

陽性的選擇標記基因可為任何適當的真核生物細胞的選擇標記基因，表達時會導至選擇的表現型，例如：抗生

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 8)

素抗性、自營性等。一個特佳的陽性選擇標記基因是新黴素磷酸轉移酶基因。

可選擇陰性的選擇標記基因，例如：H S V 腦腺核磷激酶基因將表達細胞在選擇因子的存在下摧毀。

若須要在人類細胞放大活化的內生目標基因，則 D N A 構建體包括放大基因。適當之放大基因的實施例為二氫葉酸去氫酶基因、腺嘌呤核苷去氨酶基因、及鳥胺酸去羧酶基因等。特佳的放大基因是二氫葉酸去氫酶基因，尤其是基因編碼二氫葉酸去氫酶－精胺酸之突變蛋白質，與野生型基因相較之下對選擇因素（胺基甲基葉酸）具最高之敏感性（Simonsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80 (1983), 2495）。

此外，用於活化內源基因之 D N A 構建體含非同源的表達控制序列，能在人類細胞中活化。此表達控制序列含啟動子，較佳者外加表達改進序列，例如：增強子。啟動子可為可控制的或連續表達之啟動子。較佳之啟動子為病毒的強啟動子，例如：S V 40 或 C M V 啟動子。特佳者為 C M V 啟動子／增強子。

本發明更進一步的關於使用上述方法確認的人類細胞株，激活細胞中內生的目標基因，活化目標基因得到編碼的多胜肽，大量得到多胜肽較佳之製程包括，例如：大醱酵器。

本發明之另一特點是一種人類細胞，該細胞含內源基因之拷貝，於人類細胞中其活性與非同源的表達控制序列

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 6)

連結，能在不放大基因的情況下，在 10^6 細胞 / 24 h 下產生至少 200 ng 之編碼內源基因之多胜肽。依據本發明較佳之人類細胞在 10^6 細胞 / 24 h 下產生 200 至 3000 ng 之多胜肽，而最佳者在 10^6 細胞 / 24 h 下產生 1000 至 3000 ng 之多胜肽。

最後本發明之之另一特點是一種人類細胞，該細胞得自從上述細胞基因放大之細胞，並含許多內源基因之拷貝，於人類細胞中各拷貝的活性與非同源的表達控制序列連結，並能在 10^6 細胞 / 24 h 下產生至少 1000 ng 之編碼內生基因的多胜肽。尤佳的基因放大之人類細胞株在 10^6 細胞 / 24 h 下能產生 1000 至 5000 ng 之多胜肽，而最佳者在 10^6 細胞 / 24 h 下產生 5000 至 25000 ng 之多胜肽。

本發明將更進一步的用以下實施例、圖示及表列之序列加以解釋及說明。

圖 1：為從 5' - 未轉譯的序列、表現序列 1 及內子 1 區域放大 EPO 基因之同源地區，

圖 2：為含來自 5' - 未轉譯的序列、表現序列 1 及內子 1 區域同源地區之質體，

圖 3：為因激活作用序列，含路氏肉瘤病毒啓動子 (RSV)、新黴素磷酸轉移酶基因 (NEO)、SV40 早期聚腺苷酸化作用區域 (SVI pA)、早期 SV40 啓動子 (SVI) 之二氫葉酸去氫酶基因 (DHFR) 及細胞巨大型病毒立即早期啓動子及增強子 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (10)

M C M V) ,

圖 4 a : 產生 E P O 基因標地的載體 p 1 7 6 ,

圖 4 b : 產生 E P O 基因標地的載體 p 1 7 9 及
p 1 8 7 ,

圖 4 c : 產生 E P O 基因標地的載體 p 1 8 9 ,

圖 4 d : 產生 E P O 基因標地的載體 p 1 9 0 ,

圖 4 e : 產生 E P O 基因標地的載體 p 1 9 2 ,

序列確認號碼 N O . 1 及 N O . 2 : 用於製作 P R 產品

1 之核酸序列引子 (圖 1) ,

序列確認號碼 N O . 3 及 N O . 4 : 用於製作 P C R 產品

2 之核酸序列引子 (圖 1) 。

實施例

實施例 1 選擇之方法

1 . 1 測定細胞倍增之時間

將測試的細胞株以 $0.1 - 5 \times 10^5$ 細胞 / 毫升之濃度接種，較佳者於每一培養盤中接種 $0.5 - 2 \times 10^5$ 細胞 / 毫升，內含 D M E M 和 10 % F C S 以及 R P M I 1640 和 10 % F C S，特定的細胞則用薦議（例如 A T C C）之培養液在適當的條件下培養，每二至三天用計數室（例如：紐氏（Neubauer）計數室）在（及不在）胰蛋白酶水解的狀況下測定細胞數目。細胞培養一周後，若族群增加 16 至 256 倍，較佳者為族群增加 64 至 128 倍，則評估為陽性（+、++ 或 +++）。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(11)

1. 2 懸浮液中之培養性

爲了測定懸浮液中之培養性，將細胞在培養液中，參見 1. 1，外加（及不加）血清（例如胎牛血清）於含副件之貝氏旋轉器（Bellico Spinner）中在 37℃ 及 7% CO₂ 下攪拌培養 14 天。若此相中細胞族群至少倍增 5 倍，則評估爲適於在（+）懸浮液中培養。

1. 3 不含血清培養液中之培養性

爲了測定細胞在不含血清培養液中之培養性，將細胞（ATCC 推薦之特定細胞與 ITS, Boehringer Mannheim, Cat. NO. 1074547），以 $1 - 10 \times 10^5$ 細胞／毫升之密度在含基本培養液（即不含血清）之培養容器中，以 1. 1 之條件培養 14 天。在此期間，若細胞數至少倍增五次（用細胞計數測定），則評估爲適於在不含血清的培養液中培養。

1. 4 測定內生目標基因的表達

爲了測定選擇的細胞株是否生產內生的目標蛋白質，將細胞以 0. 01 至 2×10^6 細胞／毫升之細胞密度接種，較佳者爲 0. 5 至 1×10^6 細胞／毫升之培養基，生長 24 小時。24 小時後移除細胞上清液，丟棄細胞，用已知的方法（例如：對特定蛋白質專一的免疫測定）測定細胞上清液中的細胞蛋白質。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(2)

E P O 之含量用 E L I S A 測定。將包覆抗生蛋白鏈菌素之微量測定盤用生物素化的抗 E P O 抗體 (Boehringer Mannheim) 包覆並與含蛋白質 (1% w/v) 之溶液反應，抑制非專一的化學結合。加入 0.1 ml 之培養上清液後反應過夜。清洗後，加入過氧化酶聯結之單株抗 E P O 抗體 (Boehringer Mannheim)，反應二小時。過氧化酶反應用 A B T S® 為受質進行反應，在 405 nm 下用 Perkin-Elmer 光密度計監測。

此測試之 E P O 偵測限度為 10 pg E P O / 毫升。接種 10^6 細胞 / 毫升的細胞，若產量少於 10 pg E P O / 毫升，則評估為非製造及適當的 (+) 細胞株。

1.5 測定目標基因之拷貝數

為了測定細胞株中目標基因之拷貝數，從大約 10^8 個細胞中分離及定量人類染色體 DNA (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press)。DNA 用限制酶 (例如: Agel 及 Ascl 或 BamHI、HindIII 及 Sall) 切割後，各 DNA 片段用瓊脂糖凝膠電泳依據其大小分離，最後並移轉至 nylon 膜並加以固定。

固定之 DNA 用毛地黃毒苷配基標記之 DNA 探針雜交，該探針對目標基因基因座或目標基因之染色體所在之位置具專一性並能在嚴格的條件下洗去。專一的雜交信號可使用化學冷光法在輻射線感光膜下偵測。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (13)

1 . 6 測定目標基因之核酸序列

從大約 10^7 細胞用 D N A 分離工具組 (例如 :
QIAGEN Blood & Cell Culture D N A 工具組) 分離染色體
。

用一對 P C R 引子放大目標基因。引子之序列與目標
基因編碼區域周邊之序列互補。應此能放大目標基因之整
個編碼區域。

P C R 產品直接進行序列分析或選殖入載體然後進行
序列。序列分之引子與序列目標基因之插入區域序列互補
，故目標基因表現序列區域之序列能完全分析。序列分析
用 P E / A B I 自動定序儀分析，以例如： " Prism™ Ready
Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing" 工具組 (PE/ABI,
Forest City, U.S.A.)，依據廠商之指示進行。

1 . 7 測定糖化作用型式

爲了測定細胞株 E P O 之糖化作用型式，將細胞轉染
含 4 k b HindIII/EcoRI 片斷之人類 S V 4 0 啓動子控制
下之 E P O 基因序列 (Jacobs et al., Nature 313 (1985),
806; Lee-Huang et al., Gene 128 (1993), 272) 之質體
p E P O 2 7。細胞在脂胺 (lipofectamin) 存在下用商
購之試劑工具組，依製造商之指示進行轉染。2 至 5 天後
用 E L I S A 測定細胞上清液之 E P O 含量。

將細胞上清液濃縮並與已知的 E P O 產品用等電聚焦

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (4)

法比較 (Righetti, P.G., in: Work, T.S., Burdon, R.H. (ed.) Isoelectric Focusing: Theory, Methology and Applications, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1 9 8 3))。人類細胞表達之糖化作用型式與已知 E P O 產品相似 (例如尿液的 E P O 則評估為適當的 (+))。

1 . 8 病毒污染之測定

為了偵測人類細胞株感染病毒污染之可能性，將細胞溶解液與細胞株偵測器共同培養以偵測細胞病理之效應。此外，亦進行血紅素吸收分析。

製備溶解液時將 10^6 細胞之 1 m l 緩衝液懸浮液快速的冷凍退凍。細胞的殘餘物用離心沉澱法分離，上清液進行細胞株之病毒測定。使用之偵測細胞為 HepG2 (ATCC HB- 8065; Nature 282 (1979), 615-616)、MRC-5 (ATCC-1587) 及 Vero (ATCC CCL-171; Jacobs, Nature 227 (1970), 1 6 8 - 1 7 0)。用 Polio SV 及流行性感冒類型病毒作為正控制組。偵測細胞株之負控制則不含培養的溶解液。為了偵測細胞之病理效應，將偵測細胞株至少在 1 4 天之週期進行規則之研究。

進行血紅素吸收分析時，將 vero 細胞與細胞溶解液及控制組反應，處理 7 天後與雞、豬或人類之紅血球反應。若紅血球附著至單層的培養細胞，則表示培養液中有病毒的污染。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(5)

1 . 8 . 2 活體分析

將用 1 . 8 . 1 之方法製備的細胞株溶解液注入新生老鼠的腹腔或腦部，其注射量為 0 . 1 m l 。 1 4 天之週期後觀察老鼠之發病率及死亡率。

1 . 8 . 3 專一的偵測病毒的蛋白質

特定之蛋白質，例如：Epstein-Barr 病毒蛋白質（核蛋白質或莢膜抗原）之測試，是將細胞株用 E B V 陽性環帶之人類血清固定細胞。偵測病毒抗原是使用補體及對應之聯接螢光素之抗人類補體 C 3（測定核抗原）以及用聯接螢光素之抗人類球蛋白（測定莢膜抗原）。

實施例 2 選擇結果

將人類細胞株，HepG2、HT1080 (ATCC CCL-121)、Namalwa (ATCC CRL-1432)、HeLa 及 HeLaS3 用實施例 1 陳述之方法進行測試。結果列於下列之表 1。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (6)

表 1

	HepG2	HT1080	Namalwa	HeLa	HeLaS3
生長					
倍增時間	+	++	++	+++	+++
懸浮培養	-	+	+	+/-	+
不含血清 之可能性	+/-	+	+	+	+
EPO 之產 生					
內生的	+	-	-	-	-
短暫的表 達 / 毫 升	53 ng	65 ng	70 ng	100 ng	480 ng
EPO 糖基 化 (短 暫 的 表 達)	-	+	+	+	+
病 毒 感 染 污 染 測 試	未 測 試	無 污 染	無 污 染	未 測 試	無 污 染

從表 1 得知細胞株 HT1080、 Namalwa 及 HeLa S3 是適合於
E P O 內源基因之活化。 Namalwa 及 HeLa S3 尤為適當。

實施例 3 E P O 同源地區之選殖

E P O 基因之同源地區是使用胎盤染色體 D N A (
Boehringer Mannheim) 經 P C R 放大後得之。從同源區域

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

6.3 k B 長之 E P O 基因 5' - 不轉譯序列區域、表現序列 1 及內子 1，製備兩個 P C R 產品（參見圖 1）。

放大 P C R 產品 1 使用之引子其序列如下：

5' - C G C G G C G G A T C C C A G G G A G C T G
G G T T G A C C G G - 3'（序列確認號碼 N O . 1）

及

5' - G G C C G C G A A T T C T C C
G C G C C T G G C C G G G G T C C C
T C A G C - 3'（序列確認號碼 N O . 2）。放大

P C R 產品 2 使用之引子其序列如下：

5' - C G C G G C G G A T C C T C T C C T C C C T
C C C A A G C T G C A A T C - 3'（序列確認號碼
N O . 3）及

5' - G G C C G C G A A T T C T A G A A C A G A T
A G C C A G G C T G A G A G - 3'（序列確認號碼
N O . 4）。

從用限制酶水解（P C R 產品 1：HindIII，P C R 產品 2：HindIII 及 E c o R V）將 P C R 產品 1 及 2 切出適當的片斷，並選殖入用 HindIII 及 E c o R V 水解之載體 P c r i i（Invitrogen）。此方法得到之重組載體稱為

5 e p o p c r 1 0 0 0（參見圖 2）。

實施例 4 構建 E P O 基因標地的載體

4.1

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(18)

將含 N E O 基因、D H F R 基因及 C M V 啓動子／增強子（參見圖 3）之基因激活作用序列插入含 E P O 同源區域之質體 5 e p o c r 1 0 0 0 的 A g e I 部位，得到質體 p 1 7 6（參見圖 4 a）。爲了使 C M V 啓動子僅可能的接近 E P O 基因的轉譯啓始部位，將限制酶 A s c I 及 A g e I 切點間之 9 6 3 b p 長之片段去除（部分水解），得到質體 p 1 7 9（圖 4 b）。

4 . 2

爲了達成最適化之表達，將表現序列 1 之核酸（E P O 前導序列 M e t - G l y - V a l - H i s 之編碼起點）用合成之序列 M e t - S e r - A l a - H i s 替代。此序列是經放大 E P O 染色體 D N A 序列後得之，例如用質體 p E P O 1 4 8 作爲模板（含 3 . 5 k b / B B s t E I I / E c o R I 片段，包括表現序列 1 - 5，在 S V 4 0 啓動子控制下之人類 E P O 基因序列，參見 Jacobs et al., Nature 313 (1985), 806, 及 Lee-Huang et al., Gene 1 2 8 (1 9 9 3) , 2 2 7)) 與對應之引子進行放大。因而得到質體 p 1 8 7（圖 4 b）。

4 . 3

從質體 p 1 8 7 插入單純疹病毒腦腺核磷激酶基因（H S V - T K）製備質體 p 1 8 9，H S V - T K 來自 P s v t k - 1 (P v u l l / N a r I 片段)（圖 4 c）。H S V - T K 基因

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 20)

N h e l 片段。產生的質體稱為 p 1 9 2 (圖 4 e)。

實施例 5 細胞之轉染

選擇各種產生 E P O 之細胞株並用標地的載體轉染。

5 . 1 Namalwa 細胞

將細胞生長在 T 1 5 0 組織培養瓶並用電穿透作用轉染 (1×10^7 細胞 / 800μ l 電穿透作用緩衝溶液 , 20 mM Hepes 、 138 mM 、 NaCl 、 5 mM KCl 、 0.7 mM Na_2HPO_4 、 6 mM D - 葡萄糖單水合物 , 酸鹼值 7 . 0 , $10 \mu\text{g}$ 線性的 D N A , $960 \mu\text{F}$, 260 V B i o R a d 基因脈衝器) 。電穿透作用後將細胞培養於 R P M I 1 6 4 0 , 內含 1 0 % (v / v) 之胎牛血清 (F C S) 、 2 mM L 麩胺醯胺酸 、 1 mM 丙酮酸鈉之四十個 9 6 孔的培養盤。兩天後 , 將細胞培養在含 $1 \text{ mg} / \text{毫升}$ G - 4 1 8 之培養液中 1 0 至 2 0 天。上清液用固相 E L I S A 測試 E P O 之產生 (參見實施例 1 . 4) 。將 E P O 製造菌落擴大培養於 2 4 孔之培養盤及 T 2 5 組織培養瓶。冷凍部分細胞後 , 將細胞用 F A C S (Ventage, Becton Dickinson) 進行次選殖。將次選殖的菌落重覆進行 E P O 產生之測試。

5 . 2 H T 1 0 8 0 細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 21)

除 H T 1 0 8 0 細胞是培養在 D M E M 、 1 0 % (v / v) F C S 、 2 m M L - 麩胺醯胺酸、 1 m M 丙酮酸鈉之外，用描述於培養 Namalwa 細胞之條件進行細胞培養。將培養容器壁上之細胞用胰蛋白酶溶解後，用電穿透作用轉染細胞。將電穿透作用之 1×10^7 細胞培養於 D M E M 、 1 0 % (v / v) F C S 、 1 m M L - 麩胺醯胺酸、 1 m M 丙酮酸鈉之五個 9 6 孔培養盤。

5 . 3 H e L a S 3 細胞

除了將 H e L a S 3 細胞培養於 R P M I 1 6 4 0 ， 內含 1 0 % (v / v) F C S 、 2 m M L - 麩胺醯胺酸、 1 % (v / v) N E M 非必需胺基酸 (Sigma) 、 及 1 m M 丙酮酸鈉之外，用描述於培養 Namalwa 細胞之條件進行細胞培養。將培養容器壁上之細胞用胰蛋白酶溶解後，用電穿透作用轉染細胞。電穿透作用之條件為 9 6 0 p F / 2 5 0 V 。電穿透作用後將細胞培養在 R P M I 1 6 4 0 ， 內含 1 0 % (v / v) F C S 、 2 m M L - 麩胺醯胺酸、 1 % (v / v) N E M 、 1 m M 丙酮酸鈉之 T 7 5 組織培養瓶。電穿透作用 2 4 小時後將細胞用胰蛋白酶水解並在含 $600 \mu g / 毫升$ G - 4 1 8 之培養液之十個 9 6 孔培養盤中培養 1 0 至 1 5 天。

實施例 6 E P O 基因之放大

爲了增加 E P O 之表達，將 E P O 製造菌落培養在增

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 22)

加胺基甲基葉酸 (M T X) 濃度 (1 0 0 p M - 1 0 0 0 n M) 之培養液中。各 M T X 濃度中，菌落用 E L I S A (參見實施例 1 . 4) 測試 E P O 之產生。強力之生產菌落經有限稀釋後進行次選殖。

實施例 7 特性化 E P O 之製造細胞株

選擇三種不同之細胞株 (Namalwa 、 HeLa S 3 及 H T 1 0 8 0) 進行 E P O 基因之激活作用。轉染質體 p 1 7 9 、 p 1 8 7 、 p 1 8 9 、 p 1 9 0 或 p 1 9 2 (參見實施例 2 及 3) 得到 E P O 製造菌落。

大約測試 1 6 0 , 0 0 0 個新的抗性菌落其 E P O 之產生，其中 1 2 至 1 5 個菌落之細胞上清液分泌重現性、大量之 E P O 。

其中 7 個 E P O 菌落不須經 M T X 放大基因即能確認，並能生產足量之 E P O 供工業之大量之產生。此類菌落產生之 E P O 介於 2 0 0 n g / 毫升至 1 0 0 0 n g / 毫升 / 1 0 ⁶ 細胞 / 2 4 h 。

用 5 0 0 n M 之 M T X 放大基因後，確認之 E P O 菌落產生之 E P O 增加至 3 0 0 0 n g / 毫升 / 1 0 ⁶ 細胞 / 2 4 h 。進一步的將 M T X 濃度增至 1 0 0 0 n M 能將產量增至 7 0 0 0 n g / 毫升 / 1 0 ⁶ 細胞 / 2 4 h 。

產生 E P O 之菌落亦可在無血清、M T X 之培養液中生產 E P O 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 23)

序 列 記 錄

(1) 一般的資料：

(i) 申請者：

(A) 姓名：Boehringer Mannheim GmbH

(B) 住址：Sandhofer Str. 112-132

(C) 地區：慕尼黑

(E) 國家：德國

(F) 郵遞區號：6 8 3 0 5

(i i) 發明名稱：確認 o f 人類細胞株 for the 產生
o f 人類蛋白質 b y 內源基因激活作用。

(i i i) 序列之數目：4

(i v) 電腦可讀的版本：

(A) 資料介質：軟碟

(B) 電腦：I B M 相容之 P C

(C) 作業系統：P C - D O S / M S - D O S

(D) 軟體：Patent In Release # 1 . 0 , 版本 #
1 . 3 0 (E P A)

(2) 序列確認號碼 N O . 1 之數據：

(i) 序列之特徵：

(A) 長度：3 2 個鹼基對

(B) 種類：核酸

(C) 股型：單股

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 24)

(D) 拓撲學構形：線性的

(x i) 序列之描述：序列確認號碼 N O . 1 :

CGCGGCGGAT CCCAGGGAGC TGGGTTGACC GG

32

(2) 序列確認號碼 N O . 2 之數據：

(i) 序列之特徵：

(A) 長度：38 個鹼基對

(B) 種類：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓撲學構形：線性的

(x i) 序列之描述：序列確認號碼 N O . 2 :

GGCCGCGAAT TCTCCGCGCC TGGCCGGGGT CCCTCAGC

38

(2) 序列確認號碼 N O . 3 之數據：

(i) 序列之特徵：

(A) 長度：36 個鹼基對

(B) 種類：核酸

(C) 股型：單股

(D) 拓撲學構形：線性的

(x i) 序列之描述：序列確認號碼 N O . 3 :

CGCGGCGGAT CCTCTCCTCC CTCCCAAGCT GCAATC

36

(2) 序列確認號碼 N O . 4 之數據：

(i) 序列之特徵：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 25)

(A) 長度 : 3 6 個 鹼 基 對

(B) 種類 : 核 酸

(C) 股 型 : 單 股

(D) 拓撲學構形 : 線 性 的

(x i) 序 列 之 描 述 : 序 列 確 認 號 碼 N O . 4 :

GGCCGCGAAT TCTAGAACAG ATAGCCAGGC TGAGAG

36

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱：

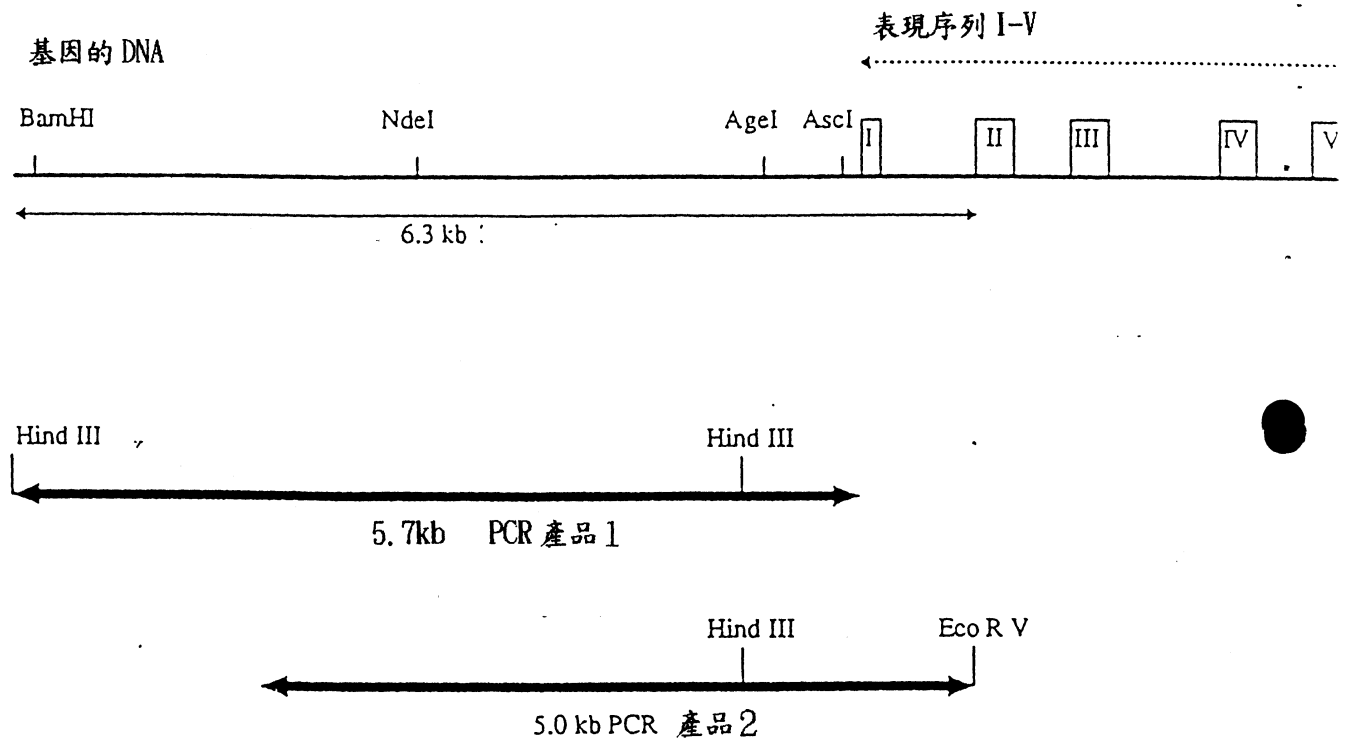
用於選擇可產製人類紅血球生成素
(EPO)之人類細胞系之方法

本發明係關於選擇人類細胞之方法，並活化該細胞之內源基因以大量製備人類之該蛋白質，以及生產適於製作藥學製品之產品形式。本發明更進一步的關於鑑定產生人類蛋白質之細胞株的方法。

英文發明摘要(發明之名稱：

Method for the Selection of Human Cell
Lines for the Preparation of Human
Erythropoietin (EPO)

The invention relates to methods for the selection of human cells for the preparation of human proteins by endogenic gene activation in order to produce human proteins in economical yields and in a form which is suitable for the production of a pharmaceutical preparation. The invention furthermore relates to a method for the production of human proteins in a cell line identified in this manner.



PCR 產品 1 之引子:

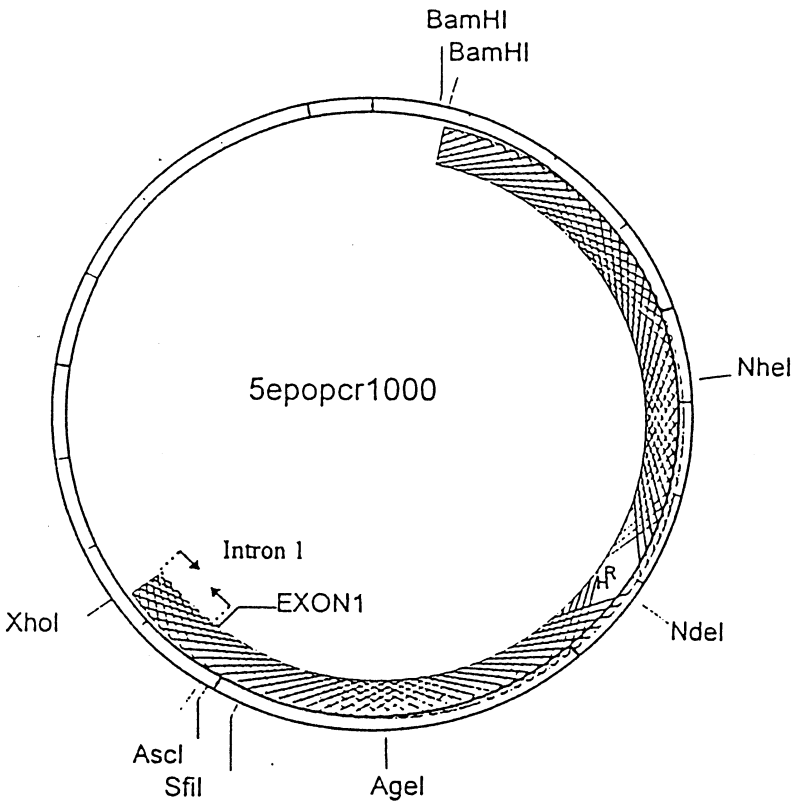
5' CGC GGC GGA TCC CAG GGA GCT GGG TTG ACC GG 3'

5' GGC CGC GAA TTC TCC GCG CCT GGC CGG GGT CCC TCA GC 3'

PCR 產品 2 之引子:

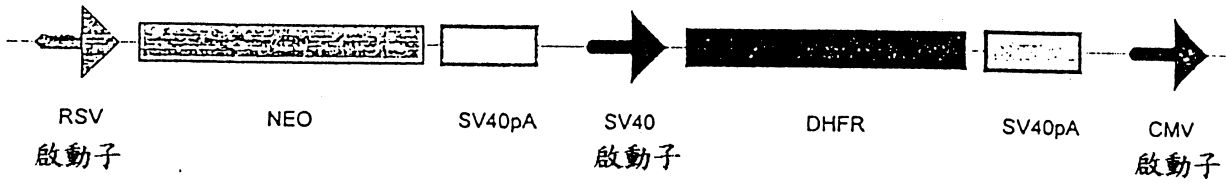
5' CGC GGC GGA TCC TCT CCT CCC TCC CAA GCT GCA ATC 3'

5' GGC CGC GAA TTC TAG AAC AGA TAG CCA GGC TGA GAG 3'



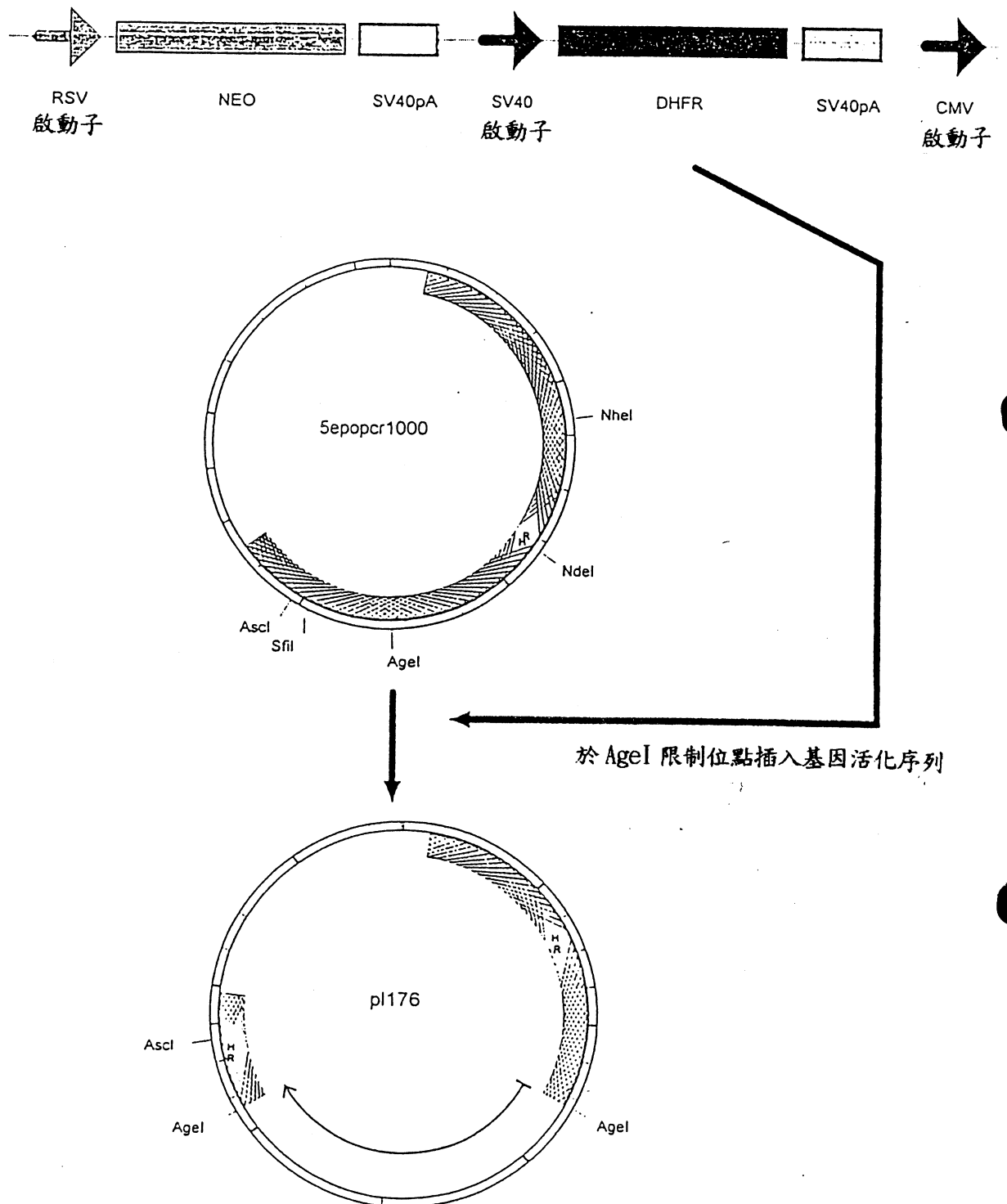
將 6kb EPO 基因之基因的 DNA 選殖入殖體

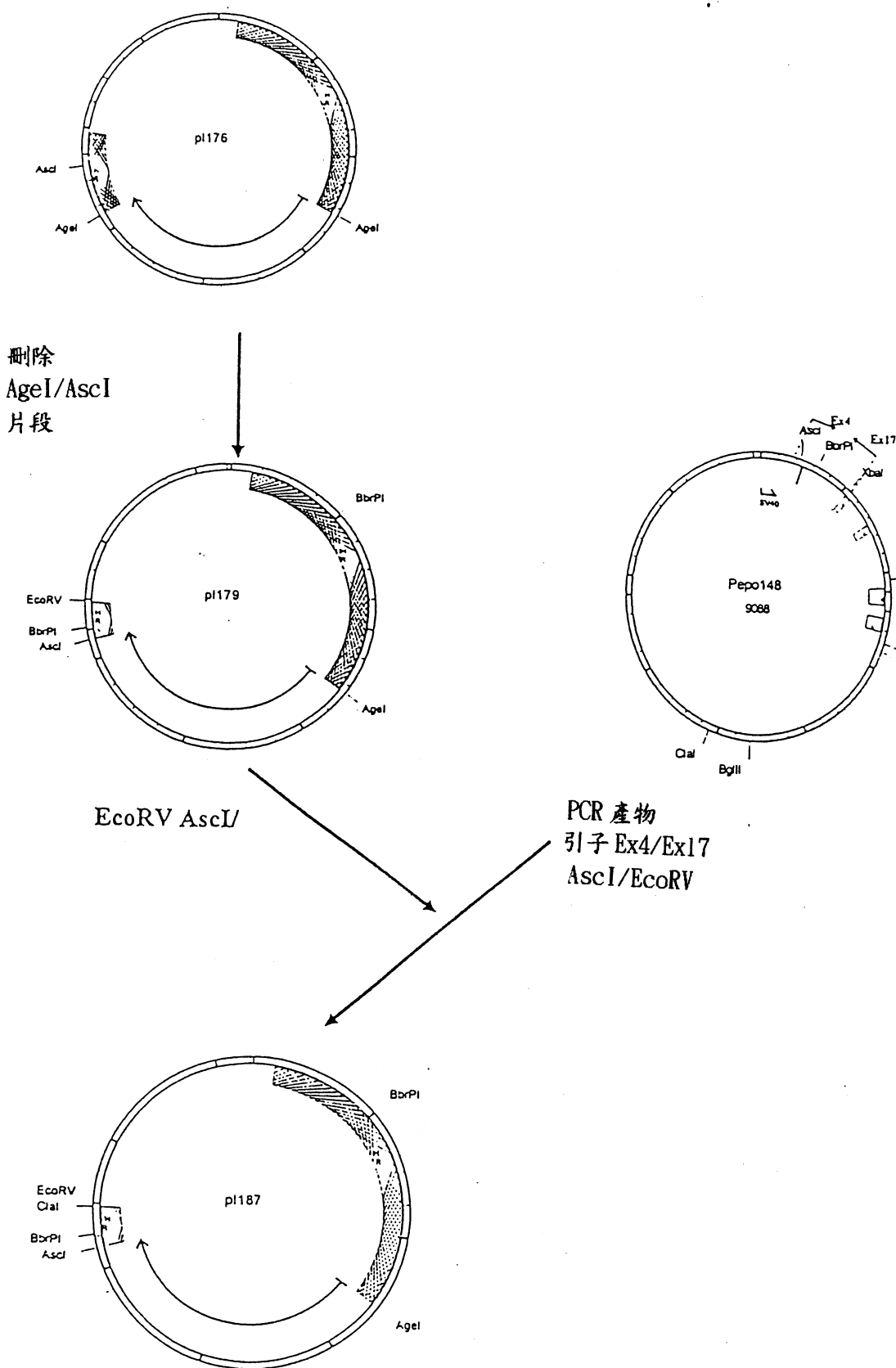
基因活化序列

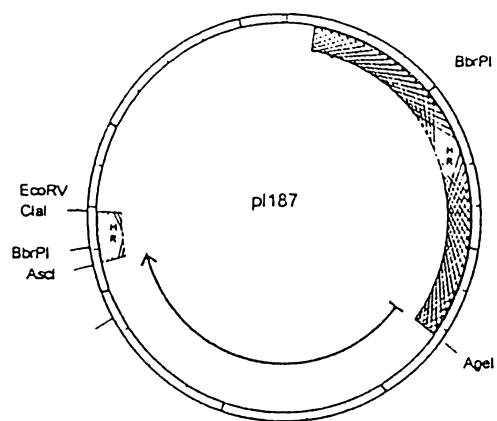


構建 EPO 基因標定之載體

基因活化序列

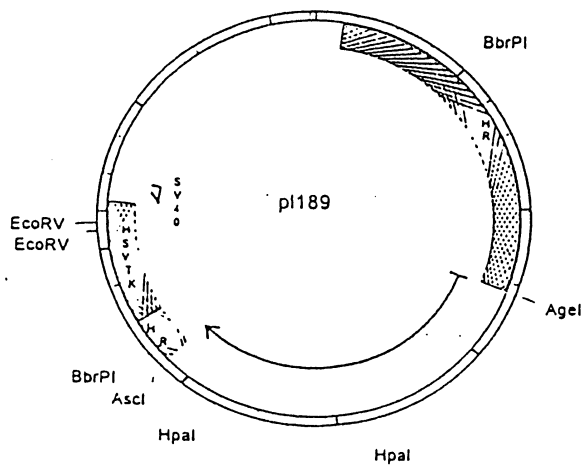
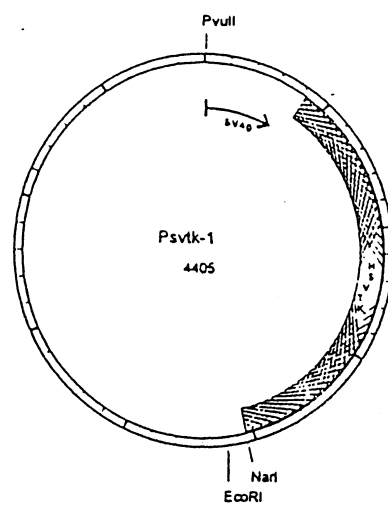


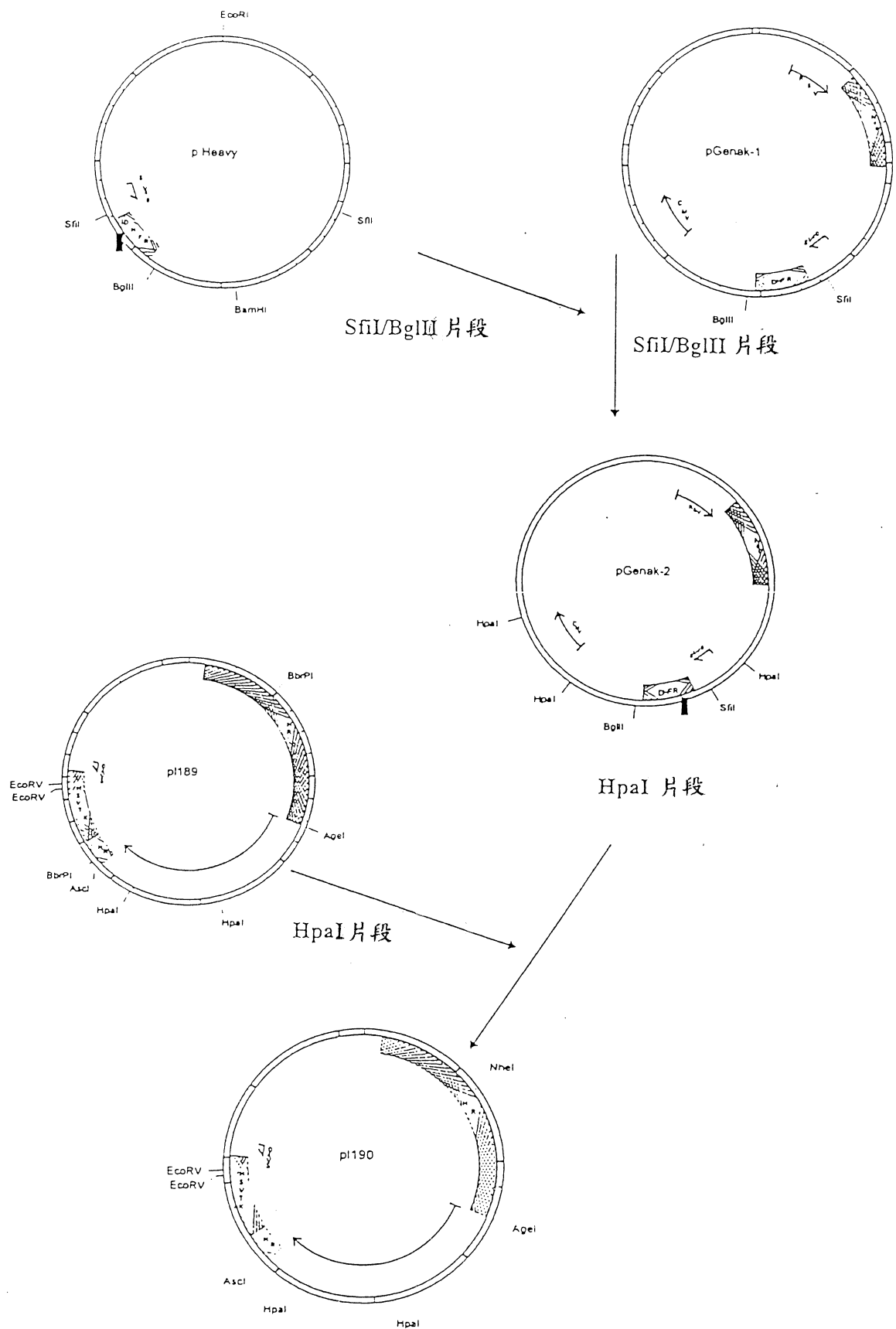


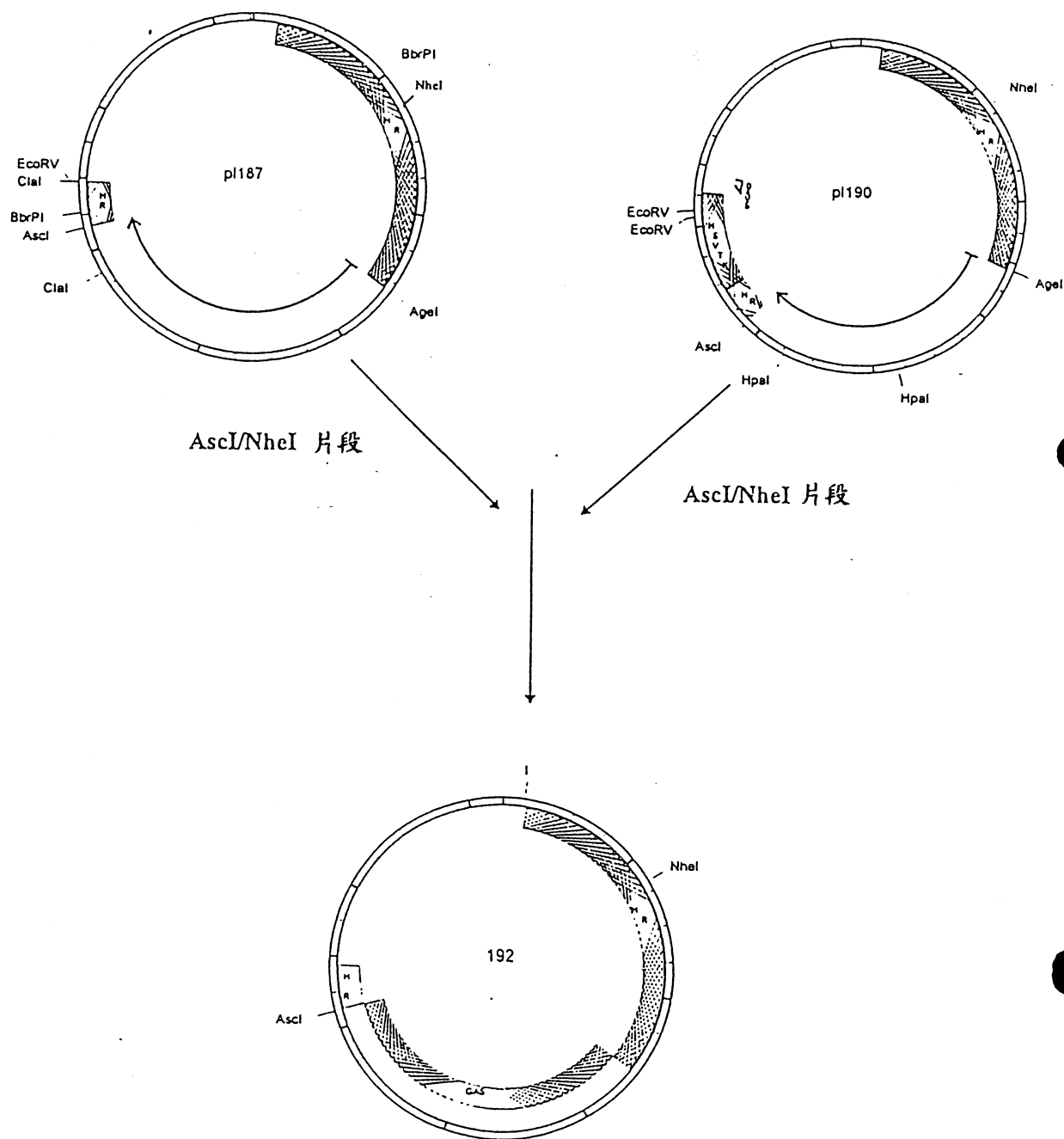


EcoRV/ClaI

PvuII/NarI







附件 2 (A): 第 87115902 號專利申請案
中文說明書修正頁 民國 90 年 3 月呈

申請日期	87 年 9 月 24 日
案 號	87115902
類 別	C12P ²¹ / ₀₂ . C12N ⁵ / ₀₈ . C07K ¹⁴ / ₅₀₅

90.3.06 補充

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書 I224140		
一、發明 名稱	中 文	用於選擇可產製人類紅血球生成素 (EPO) 之人類細胞系之方法
	英 文	Method for the selection of human cell lines for the preparation of human erythropoietin (EPO)
二、發明 創作人	姓 名	(1) 麥克·布蘭特 Brandt, Michael (2) 萊恩哈特·佛朗茲 Franze, Reinhard (3) 鄔瑞克·佩沙拉 Pessara, Ulrich
	國 籍	(1) 德國 (2) 德國 (3) 德國
	住、居所	(1) 德國艾菲德夫市佛特加特路 29 號 Faltergatter 29 D-82393 Iffeldorf, Germany (2) 德國潘茲山須瓦德格阿本旁十一號 Am Schwadergraben 11, D-82377 Penzberg, Germany (3) 德國外爾亥熊磨坊一號 Barenmuhle 1, D-82362 Weilheim, Germany
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 羅氏診斷法有限公司 Roche Diagnostics GmbH
	國 籍	(1) 德國
	住、居所 (事務所)	(1) 德國曼罕市善厚佛街一一六號 Sandhofer StraBe 116, D-68305 Mannheim, Germany
	代 表 人 姓 名	(1) 曼福德·韋伯 Weber, Manfred 麥可·榮格 Jung, Michael

93. 5. 14 修正
年 月 日 補充

附件二 A：第 87115902 號專利申請案修正後無劃線之
中文說明書替換頁

民國 93 年 5 月 14 日修正

五、發明說明(1)

本發明係關於選擇人類細胞之方法，活化該細胞之內源基因大量製備人類之該蛋白質，以及生產適於製作藥學製品之產品形式。本發明更進一步的關於鑑定產生人類蛋白質之細胞株的方法。

活化人類細胞株之內源基因以製備人類之蛋白質是已知的技藝。例如：W O 9 3 / 0 9 2 2 2、W O 9 4 / 1 2 6 5 0 及 W O 9 5 / 3 1 5 6 0 中描述活化人類細胞株之內源基因，以生產人類之紅血球生成素及其他人類之蛋白質。

於該類文件中並未提供選擇細胞株之標準，以製備人類之蛋白質。因此無法保證選擇之細胞株所生產的人類蛋白質之產量、形式以及無任何污染。據此，上述文件一般而言，僅能生產少量之人類蛋白質。

本發明排除現今技藝上之缺點，尤其是提供選擇人類起始細胞株之標準，該標準能適當的預測目標基因之內生的激活作用。

選擇人類細胞株，活化細胞株內內生的目標基因，以製備人類蛋白質時所面臨的問題，其解決方法之特徵是

(a) 測試類細胞株以下之特徵：

(i) 具有所欲之核酸序列的目標基因，

(i i) 在培養的懸浮液中，於 1 4 天之內細胞數目至少倍增五次，

(i i i) 在不含血清之培養基中，於 1 4 天之內細

五、發明說明 (19)

受 S V 4 0 啓動子控制，位於內子 1 (E c o R V / C l a l) 之 3 ' 端，與 C M V 啓動子反方向並作為同源重組的負選擇。

4 . 4

為了構建質體 p 1 9 0，將 p H E A V Y 之 S f i l / B g l I I I 片段，與含精胺酸突變之 D H F R c D N A 質體 (描述於 Simonsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8 0 (1 9 8 3) 2 4 9 5) 次選殖入質體 p G e n a k - 1 之 S f i l 及 B g l I I I 之切口，質體 p G e n a k - 1 含 R S V 啓動子控制之 N E O 基因及晚期 S V 4 0 聚腺苷酸化作用部位作為終止子、早期 S V 4 0 啓動子控制之鼠 D H F R 基因及早期 S V 4 0 聚腺苷酸化作用部位作為終止子 (Kaufmann et al., Mol. Cell Biol. 2 (1982), 1304; Okayama et al., Mol. Cell Biol. 3 (1983), 280, 及 Schimke, J. Biol. Chem. 263 (1988), 5989) 及 CMV 啓動子 (Boshart et al., Cell 41 (1995), 521) 。然後將含編碼精胺酸突變 D H F R c D N A 之 H p a l 片段聯結至質體 p 1 8 9 之 H p a l 切口，得到質體 p 1 9 0 (圖 4 d) 。

4 . 5

為了得到不含 H S V - T K 基因之轉染載體，將質體 p 1 9 0 之 A s c I / N h e I 片段 (含基因激活作用序列) 聯結至含表現序列 1 之質體 p 1 8 7 的 A s c I /

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

修正
93. 8. 12 補充

公告

六、申請專利範圍

附件 2 A

第 87115902 號專利申請案

中文申請專利範圍替換本

民國 93 年 8 月 12 日修正

1 . 一種藉由活化內生性存在於細胞內之人類紅血球生成素 (E P O) 基因以選擇可產製人類 E P O 之人類細胞株之方法，其特徵在於

(a) 測試人類細胞株是否存有下列之特徵：

(i) 具有所欲的核酸序列之人類 E P O 基因，

(i i) 於懸浮液培養基中，14 天內族群至少倍增 5 倍，且

(i i i) 於不含血清之培養基中，14 天內族群至少倍增 5 倍，及

(b) 選擇滿足特徵 (i) 、 (i i) 、 (i i i) 及

(v) 本質上無人類 E P O 基因之內生性表現、

(v i) 存有超過 2 份人類 E P O 之染色體基因、

(v i i) 所合成之人類 E P O 具有相當於天然存在之人類 E P O 的糖基化型式、及

(v i i i) 無可偵測到之感染性污染物之細胞株作為起始細胞株以內生性活化人類 E P O 基因。

2 . 如申請專利範圍第 1 項之方法，其特徵在於人類細胞株 (i v) 於培養基中族群倍增 16 至 256 倍之產製時間為 1 週內。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

六、申請專利範圍

3 . 如申請專利範圍第 2 項之方法，其特徵在於人類細胞株於培養基中一週內族群倍增 6 4 至 1 2 8 倍。

4 . 如申請專利範圍第 1 項之方法，其特徵在於該人類細胞株含有 1 份內生性人類 E P O 基因，其係操作性連接至於人類細胞中具活性之非同源啟動子，並能於 10^6 細胞 / 2 4 小時下產生至少 2 0 0 n g 之由該內生性基因所編碼之 E P O 。

5 . 如申請專利範圍第 4 項之方法，其特徵在於可藉由基因放大之方法得到該人類細胞株，該人類細胞株含有多份內生性人類 E P O 基因，其係各自操作性連接至於人類細胞中具活性之非同源啟動子，並能於 10^6 細胞 / 2 4 小時下產生至少 1 0 0 0 n g 之由該內生性基因所編碼之 E P O 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂