

年 月 日 修正
88. 6. 10 補充

418256

申請日期	84-7-6
案 號	84106968
類 別	C12P 21/2

(以上各欄由本局填註)

A4
C4
公 告 本

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	人類血清白蛋白之製法
	英 文	PROCESS FOR PRODUCING HUMAN SERUM ALBUMIN
二、發明 創作人	姓 名	(1)小林 薫 (2)友光 賢 治 (3)桑 江 忍 (4)大 屋 智 資 (5)應 田 豐 雄
	國 籍	日 本
	住、居所	(1) 日本國大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1號 株式會社ミドリ十字 中央研究所內 (2)(3)(4)(5)同(1)
三、申請人	姓 名 (名稱)	吉富製藥股份有限公司 (吉富製藥株式会社)
	國 籍	日 本
	住、居所 (事務所)	日本國大阪府中央區平野町二丁目6番9號
	代 表 人 姓 名	鎌倉昭雄

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

418256

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

日本 國(地區) 申請專利，申請日期 1993-11-26 案號：5-296260，☐有 ☒無主張優先權

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

有關微生物已寄存於：食品工業發展研究所，寄存日期：84.1.13

，寄存號碼：940067
920002

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

發明領域

本發明係關於經由培養利用基因處理技術轉形的寄主而改良人類血清白蛋白(後文稱為HSA)之生產之方法。

發明背景

HSA為組成血漿之主要成份並用於醫藥製劑供治療大出血、休克、燒傷、血中蛋白質過低或胎兒紅血球母細胞瘤病。

目前HSA主要係呈分送產物得自蒐集的血液。然而此種生產方法由於有經濟缺點及血液供應有限，故有問題，此外，血液本身可能有問題，因為血液可能含有不期望的物質，例如肝炎病者。

近來，開發重DNA且技術，可藉微生物及細胞生產多種有用的多肽，對於利用基因處理技術大規模生產HSA也正積極從事研究開發努力。然而，由於產率低，故有關確立高純度、低成本之工業生產HSA的技術建立上仍有無法解決的難題。

當寄主為酵母種株時，曾經於30℃於培養基培養藉基因處理技術製備的HSA生產技術(JP-A-3-83595及JP-A-4-299984相當於EP-A-506040；此處使用JP-A-辭表示日本特許公開案)。

發明概述

鑑於前述情況，本發明之目的係提高HSA之生產之生產力，特別經由改良培養條件提高生產力。

為達成前述目的，本發明之發明人徹底進行研究發現當

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(2)

藉基因處理技術製備的HSA生產寄主於21至29℃溫度培養時，可提高HSA生產力，改良HSA生產寄主之生長率及防止產物著。基於此項發現而完成本發明。

因此，本發明提供一種生產重組人類血清白蛋白之方法包括於21至29℃溫度培養藉基因處理技術備的人類血清白蛋白生產性寄主。

本發明之其他目的及優點由下文說明將顯然自明。

圖示之簡單說明

圖1：為說明供轉形巴斯德畢赤酵母菌用之HSA表現載體Ph0059之構築之圖。又圖中， μ AOX₂意指突變型AOX₂啟動基因，AOX₁意指AOX₁終端基因，preproHSA意指prepro（信號）HSA序列，HSA意指HSA cDNA，HIS4意指巴斯德畢赤酵母菌之HIS4密碼子以及pBR322意指由pBR322衍生而來之序列。

圖2：為說明供轉形啤酒釀母菌用之HSA表現載體pH0-011之構築之圖。

發明之詳細說明

本發明使用之藉基因處理技術製備的HSA生產寄主並無特殊限制，但係由基因處理技術製備，任何已公開報告揭示的寄主及未來將開發的寄主皆可使用。此等寄主之說明例包含曾經藉基因處理技術轉變成HSA生產細胞之微生物細胞，如大腸桿菌，酵母菌或枯草桿菌及動物細胞。根據本發明，希望使用酵母菌種株，特別屬於釀母菌屬，如啤酒釀母菌、畢赤酵母菌屬（*Pichia*）、如，巴斯德畢赤酵母菌（*Phichia pastoris*）或克魯活邁斯菌屬（*Kluyveromyces*）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明(3)

，如，乳克魯活邁斯菌 (*Kluyveromyces lactis*)。也可使用營養缺陷種株或抗生素敏感種株。較佳也使用G418敏感種株，如，啤酒釀母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22 (a, his4, leu2, can 1.) 巴斯德畢赤酵母菌 GTS115(his4) 及 乳克魯活邁斯菌 MW98-8C(α , UarA, arg, lysK⁺, pKD1°)。

HSA生產寄主之生產，藉培養寄主生產HSA，及由培養液分離及蒐集HSA，全部皆據已知方法進行，但可略為修改。例如，HSA生產寄主(或HSA生產種株)之製備可使用下列方法進行：使用天然人類血清白蛋白基因之方法[JP-A-58-66684(對應於EP-A-73646)JP-A-58-90515(對應於EP-A-79739)及JP-A-58-150517(對應於EP-A-91527)]，使用新穎人類血清白蛋白基因之方法[JP-A-62-29985及JP-A-1-98486(對應於EP-A-206733)]，使用合成信號序列之方法(JP-A-1-240191，對應於EP-A-329127)，使用血清白蛋白信號序列之方法(JP-A-2-167095，對應於EP-A-319641)，重組質體引進染色體之方法(JP-A-3-72889，對應於EP-A-399455)，寄主融合之方法(JP-A-3-53877，對應於EP-A-409156)，於含甲醇培養基產生突變之方法，使用突變株AOX₂啟動基因之方法(JP-A-4-299984，對應於EP-A-506040)，於枯草桿菌表現HSA之方法(JP-A-62-215393，對應於EP-A-229712)，於酵母菌表現HSA之方法[JP-A-60-41487(對應於EP-A-123544)，JP-A-63-39576(對應於EP-A-251744)及美國專利4,937,193及JP-A-63-74493(對應於EP-A-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(4)

28637)]，及於畢赤酵母菌表現HSA之方法(JP-A-2-104290，對應於EP-A-344459)。

於含甲醇培養基產生突變之方法係以下述方式進行。首先，由含轉錄單位之質體pHSA113移HSA出基因之5'非編碼區，該質體之構成係可於AOX₁，啟動基因控制下表現HSA[有關質體pHSA113請參見JP-A-2-104290(對應於EP-A-344459)及有關AOX₁啟動基因請參見JP-A-63-39584(對應於EP-A-244598)]而製備HSA表現質體pPGP1。然後，質體pPGP1根據JP-A-2-104290對應於EP-A-344459揭示之方法整合入適當寄主，較佳畢赤酵母菌，更佳畢赤酵母菌種株GTS115(NRRL寄存編號Y-15851)之AOX₁基因區獲得轉形株。(當使用畢赤酵母菌種株GTS115時獲得PC4130)。因為如此所得轉形株於含甲醇培養基無法良好生長(Mut-種株)，故根據JP-A-4-299984(對應於EP-A-506040)揭示之方法，經由於含甲醇培養基培養轉形分離可於培養基內生長的突變種株而進行轉形株之突變。培養基之甲醇濃度可於約0.0001至5%(較佳約1至5%)之範圍。培養基可為合成或天然，培養可於15至40℃(較佳約30℃)進行1至1000小時(較佳約20至120小時)。天然培養基之例包含YP培養基(1%酵母萃取物及2%多蛋白朊)。

HSA生產寄主之培養(HSA生產方法)可使用前述參考文獻之已知方法或根據JP-A-3-83595揭示之方法進行，其中利用進料批次發酵，逐漸加入高濃度葡萄糖溶液主培養基可避免高濃度基質抑制HSA生產細胞，因此可以高濃度生產

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(5)

HSA生產者細胞及產物；或根據JP-A-4-293495(對應於EP-A-504823及美國專利5,334,512)揭示之另一種方法，其中藉加入脂肪酸至培養基而改良HSA生產力。

HSA之分離及回收可使用前述參考文獻揭示之已知方法或根據JP-A-3-103188(對應於EP-A-420007及美國專利5,132,404)揭示之方法進行，其中蛋白解酶係藉加熱處理失活化；或藉JP-A-4-54198(對應於美國專利5,294,699或EP-A-464590)揭示之著色抑制方法進行，其中使用至少一種送自陰離子交換劑、疏水載劑及活性碳之吸附劑由著色物質分離HSA。

業界一般使用之培養基可用作培養轉形寄主之培養基，而轉形株之培養可於已知條件下進行。培養基可為合成或天然，但較佳為液態培養基。例如適當合成培養基之組成為：碳源，如各種醣類；氮源，如尿素、銨鹽、硝酸鹽；微量營養素如多種維生素、核苷酸；及無機鹽，如Mg、Ca、Fe、Na、K、Mn、Co及Cu。此種培養基之說明例有YNB液態培養基，係由0.7%酵母氮鹼基(Difco)及2%葡萄糖組成。有用的天然培養基之說明例為YPD液態培養基，係由1%酵母萃取物(Difco)，2%巴克多蛋白胨(Bacto peptone)(Difco)及2%葡萄糖組成。培養基pH可為中性，弱鹼性或弱酸性，且較佳於5.7至6.5之範圍。於嗜甲基寄主之例中，培養基又可補充約0.01至5%數量之甲醇。

若僅考慮HSA之生產力，則寄主之培養可於21至29℃，較佳1至28℃，更佳21至25℃，最佳21至23℃進行。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明(6)

若培養溫度高於前述範圍，則寄主的生長及HSA之生產受抑制而HSA之著色增加。

當寄主於低於前述範圍之溫度培養時，需要較高成本及複雜的作業來控制溫度，其原因為培養過程放熱。因此，為使用理由故，培養可於21至29℃，較佳21至28℃，更佳23至28℃，最佳25至27℃之溫度進行。

HSA生產寄主，例如酵母種株於前述溫度範圍培養，不僅可提高HSA產率1.3至1.5%倍，同時也可比較習知於30℃培養降低HSA著色達10至30%。

利用靜態或振搖培養或批次、半批次或連續培養於攪動及通氣條件下培養時間係於1至1000小時，較佳20至360小時之範圍，希望於批次培養前利用靜態或振搖培養或批次、半批次或連續培養於攪動及通氣條件下製備種子培養。種子培養可使用前述YNB液態培養基或YPD液態培養基，較佳於30℃(對於酵母菌寄主)或37℃(對細菌寄主)進行10至100小時。

培養完成後，HSA根據已知分離及純化方法由所得培養基、微生物殘骸或細胞回收。

提出下列實例供進一步舉例說明本發明。但需了解，此等實例僅供舉例說明之用，而非意圖圍限本發明之範圍。

實例1

(1) HSA生產寄主種株之製備。

由JP-A-2-104290(對應於EP-A-344459)所述之質體pHSA113移出HSA基因之5'非編碼區，該質體pHSA113含有一轉

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(7)

錄單元，其被構築成可於AOX₁啟動基因控制下表現HSA而製備HSA表現質體pPGP1。然後根據JP-A-2-104290(對應於EP-A-344459)揭示之方法，將HSA表現質體pPGP1以NotI消化，及用所得NotI消化片段替代巴斯德畢赤酵母菌種株GTS115(his4)之AOX₁基因區而製備轉形株PC4130。此種株由於刪失AOX₁基因，故於以甲醇作為碳源之培養基內無法良好生長(Mut⁻種株)。

將種株PC4130接種於3mlYPD培養基(1%酵母萃取物，2%巴克多蛋白胨及2%葡萄糖)。培養24小時後，將細胞接種於50mlYPD培養基並使細胞密度為能使對應於OD₅₄₀之初濁度為0.1者。於30℃培養3日後，所得細胞再度以使OD₅₄₀之初濁度為0.1之量接種於50mlYPD培養基。隨後每隔3日以相同方式重覆次培養，各次培養後，細胞以無菌水稀釋並以10⁷細胞/平皿之接種量倒至2%MeOH-YNBw/oa.a平皿(0.7%酵母氮鹼基不含胺基酸2%甲醇及1.5%瓊脂粉)中，接著於30℃培養5日判定是否出現群落。連續次培養12日後，於2%MeOH-YNBw/oa.a平皿上發現20個群落。Mut⁻種株幾乎無法於2%MeOH-YNBw/oa.a培養基上生長，而Mut⁺種株可生長良好。換言之，出現群落表示該種株為Mut⁺，獲得甲醇同化能力增高。如此所得群落之一以無菌水適當稀釋並展佈於2%MeOH-YNBw/oa.a平皿上，分離單一群落。所得單一群落之一定名為SHG4105-4。巴斯德畢赤酵母菌SHG4105-4於1995年1月13日以存取編號920002寄存於台灣食品工業研究所。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8)

所得突變株 SHG4105-4 之 AOX₂ 啟動基因利用 PCR 方法送殖。亦即，PCR 係使用突變株 SHG4105-4 之染色體 DNA 進行，使用於 5' 端含 BamHI 位置之 DNA 片段 (5'-CCGGATCCACTAACGA G-TCATCATC-3') 作為正股引子，及使用於 5' 端含 EcoRI 位置之 DNA 片段 (5'-CCGAATTGACAAATATTCTTTGATGC-3') 作為反股引子。

如所述，擴大的 AOX₂ 啟動基因片段被送殖入 pUC13 之 BamHI/EcoRI 位置。

然後測定選殖載體上 AOX₂ 啟動子片段的核苷酸序列。由種株 HSG4105-4 分離的 AOX₂ 啟動基因中，距離天然 AOX₂ 啟動基因開始密碼子上游第 255 個氮鹼基 (YEAST, 5, 167-177, 1988; Mal Call, Biol., 9, 1316-1323, 1989) 由 T 改成 C。

構築可於經選殖的突變株 AOX₂ 啟動基因控制下表現 HSA 之載體。首先於突變株 AOX₂ 啟動基因 5' 端之 BamHI 位置轉成 EcoRI 位置，及使用 EcoRI-SspI 分離突變株 AOX₂ 啟動基因片段。然後，將於 HSA 表現載體 pMM041 (EP-A-506040) 中之天然 AOX₂ 啟動基因，以突變株 AOX₂ 啟動基因替代獲得載體 pH0059 (點突變) 其可於突變株 AOX₂ 啟動基因控制下表現 HSA (圖 1)。質體 pMM041 於 1995 年 1 月 13 日被寄存於台灣食品工業研究所，寄存號碼為 940067。

構成的 HSA 表現載體 pH0059 以 *Sta*I 消化調整至 1 μ g/ μ l，然後整合入寄主 巴斯德畢赤酵母菌 GTS115 種株之 HIS4 區；及使用簡化酵母轉形套件組 (Bio101) 及乙酸鋰方法，由以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(9)

製備轉形株 GTS115 / pH0059。

(2) 培養基組成

YPD培養基(2%巴克多蛋白胨，1%酵母萃取物及2%葡萄糖)用於種子培養。批次培養基及進料培養基組成分別示於表1及表2。

表1：批次培養基組成

成 分	每 升 數 量
甘 油	50.0 g
H ₃ PO ₄ (85%)	14.0 ml
CaSO ₄ · 2H ₂ O	0.6 g
K ₂ SO ₄	9.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.8 g
KOH	2.6 g
生物素溶液 #1	1.6 ml
YTM溶液 #2	4.4 ml

*1 生物素溶液：0.2 g/l

*2 YTM溶液具如下組成

成 分	每 升 數 量
FeSO ₄ · 7H ₂ O	65.0 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	6.0 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	20.0 g
MnSO ₄ · 4-5H ₂ O	3.0 g
H ₂ SO ₄	5.0 ml

表2：進料培養基組成

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(10)

成 分	每 升 數 量
YTM溶 液	2 ml
甲 醇	1,000 ml

(3) 使用 3 升發酵槽之培養方法

① 種子培養

含於冷凍備料小瓶之一份 1ml 種株 GTS115 / pH0059 接種於含 50ml YPD 培養基之 300ml 有擋板錐形瓶，並於振搖下於 30℃ 培養 24 小時。培養 24 小時後，1 份 14ml 培養醪接種於 700ml 批次培養基。

② 主培養

一份 14ml 種子培養醪接種於含 700ml 批次培養基之 3 升迷你瓶發酵槽，並接受通氣攪動培養。於 21、23、25、27、28 及 30℃ 培養溫度個別進行主培養。攪動速度下限及上限分別設定於 200rpm 及 1,000RPM。經由將培養基內之溶氧量控制於占飽和溶氧濃度約 50% 進行主培養。當批次培養基之甘油被消耗時，開始加入進料培養基。培養基 pH 控制於 6.2 穩定水平。需要時，藉將消泡劑加主培養基進行消泡。培養進行 360 小時。

(4) 使用 1200 升發酵槽之培養方法

① 第 1 種子培養

一份 1ml 於甘油冷凍之種株 GTS115 / pH0059 接種於含 200ml YPD 培養基之 1000 毫升有擋板錐形瓶，並於 30℃ 振搖培養 24 小時。

② 第 2 種子培養

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(11)

第1種子培養液接種於含5升YPD培養基之10升發酵瓶，及於30℃藉攪動進行第2種子培養24小時。經由將培養基內溶氧量控制於約50%飽和溶氧濃度進行培養。種子培養中培養基pH未經控制。

③ 主培養

第2種子培養液移殖含250升批次培養基之1200升發酵槽並接受通氣式攪動培養。於23、25、27、29及30℃培養溫度分別進行主培養。攪動速率控制為培養基內溶氧濃度維持於飽和溶氧濃度之約50至30%。當批次培養基內甘油被消耗時，開始添加進料培養基。培養基pH控制於5.85固定程度。欲將培養基消泡，於需要時添加消泡劑。培養進行360小時。

試驗例 1細胞密度之測量

於實例1進行之各培養溫度，定期採樣培養液。如此收集之樣品各自以蒸餾水稀釋主測量時 OD_{540} 值，調整至0.3或以下，然後使用分光光度計(UV200, Shimadzu Corp. 製造)測量稀釋樣品於540nm之吸光率。試驗中，各樣品之乾細胞量係由吸光率基於算式 $OD_{540} / 5.2$ 求得。各培養溫度之最大細胞濃度示於表3及表4。

試驗例 2HSA產率及著色度之評估

於實例1進行之各培養溫度定期採樣培養液，由如此收集之樣品各自於15000rpm離心5分鐘。所得上清液經Ultra

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(12)

Free C3HV(Millipore產品公司製造之滅菌用 $0.5\mu\text{m}$ 過濾膜)過濾，並於下列條件下接受HPLC凝膠過濾分析。

柱：TOSOH TSK凝膠G3000SW $\times$ 1

動相：0.3M NaCl, 50mM 磷酸鈉

0.1%NaN₃, pH6.5

流速：0.7ml/min

注入：50ml

檢測： A_{280} 、 A_{350} (雙波長)

HSA產率及著色度評估結果示於表3及表4。HSA產率係以當於30℃培養之HSA總產量(g)設定為100%時，於各培養溫度之HSA總產量(g)之百分率表示。

恰在培養完成前(經359小時後)對各次培養測量於350nm及280nm之吸光率俾以 A_{350}/A_{280} 評估著色度。

表 3

溫 度 (℃)	最大細胞密度 (g DCW/L)	HSA 產率 (%)	著 色 度 (A_{350}/A_{280})
30	133.7	(100)	0.105
28	141.7	130	0.086
27	148.7	129	0.083
25	159.4	132	0.076
23	171.5	132	0.088
21	177.6	148	0.084

表 4

溫 度	最大細胞密度	HSA 產率	著 色 度
-----	--------	--------	-------

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(13)

(°C)	(g DCW/L)	(%)	(A ₃₅₀ / A ₂₈₀)
30	123.7	(100)	0.100
29	125.9	124	0.089
27	119.0	139	0.090
25	128.8	154	0.081
23	144.3	156	0.082

實例 2

(1) 產 HSA 之 啤酒釀母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 之製備

1. GAPDH 啟動基因區域，SUC₂ 信號區域，TRP1 區域，PH05 終端基因區域之選殖，以及 HSA 密碼子及 G418 抗性密碼子之製備

彼等分別依照下列文獻記載之方法製備，或者使用市售之成品。

GAPDH 啟動基因：Holland, H.J. 及 Holland, J.P., J. Biol. Chem., 254, 12, 5466 (1979), Holland, H.J. 及 Holland, J.P., J. Biol. Chem., 254, 19, 9839 (1979), 特開昭 63-84498 號說明書；

SUC₂ 信號序列：特開昭 6041488 號說明書及特開昭 6384498 號說明書；

HSA 密碼子：特開昭 62-29985 號說明書；

PH05 終端基因：特開昭 62-151183 號說明書；

G418 抗性密碼子：Oka, A., Sugisaki, H. 及 Takanami, M., J. Mol. Biol., 147, 217 (1981), Jimener, A. 及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(14)

Davies, J., Nature, 287869 (1980), 特開昭 61-40793
號說明書;

TRP1: 由質體 pBII-10而來(購自柏林格曼海姆公司);

大腸桿菌複製起始區域及安比西林(ampicillin)抗性密碼子: pUC19(從寶酒造取得)。

2. 質體之構築

質體 pH0-011的構築係以[分子選殖](冷泉港實驗室, (1982))記載之方法為準, 按照一般方法從 pUC19製造(參照圖 2)。

質體 pH0-011為含有做為與寄主細胞之染色體序列相同之序列之色胺酸合成系密碼子(TRP1), 含有 SUC₂信號序列, HSA構造密碼子及 PH05終端基因在 GAPDH啟動基因支配下連結而成之連結物, 以及含有做為酵母菌選擇標記密碼子之 G418抗性密碼子之質體。

質體 pH0-011於 1989年 4月 28日被國際寄存於通產省工業技術院微生物工業技術研究所。

微生物學名: pH0-011/大腸桿菌 HB 101

寄存號碼: FERM BP-2405

3. 用質體 pH0-011轉換啤酒釀母菌 AH22株之形質

用啤酒釀母菌 AH22株做為寄主。

啤酒釀母菌 AH22株為 a型接合型, 且在組胺酸合成系密碼子(his4)及白胺酸合成系密碼子上具有突變。因而在培養液中如果不添加組胺酸及白胺酸, 就無法繁殖。

按照下述方法, 將 HSA分泌表現用之質體 pH0-011導入啤

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(15)

酒釀母菌 AH22株之染色體中。

將在50ml YPD培養基(10g 酵母菌萃取液及20g巴克多蛋白胰溶解於水而得到900ml後，予以加熱高壓滅菌，然後與被另外加熱高壓滅菌之20%葡萄糖100ml混合)中及於37℃下振盪培養整夜之啤酒釀母菌 AH22株離心，將得到之細胞懸浮於20ml水中，然後再度離心而得到細胞。將此等細胞懸浮於10ml含50mM二硫赤藻糖醇，1.2M山梨醇及25mMEDTA之溶液(pH8.5)中，於30℃溫和振盪10分鐘。收集被離心之細胞，將其懸浮於10ml之1.2M山梨醇中，然後收集被再離心之細胞。將該細胞再次懸浮於10ml之1.2M山梨醇中，然後收集被離心之細胞。將細胞懸浮於10ml含有0.2mg/ml酵素100T(Zymolyase 100T)，1.2M山梨醇，10mMEDTA及0.1M檸檬酸鈉之溶液(pH5.8)中，並於30℃下溫和振盪1小時。收集被離心的細胞，用1.2M山梨醇，10mM氯化鈣及1.2M山梨醇接續洗淨，然後收集被離心之細胞。將細胞懸浮於1ml含10mM氯化鈣及1.2M山梨醇之溶液中。取100 μ l懸浮液置於滅菌試驗管中，然後與5 μ l之DNA溶液(含有在TRP1密碼子上之獨特部位EcoRV消化而成為鏈形之質體pH0-011 5 μ g)混合，並靜置於室溫15分鐘。又，加入1.2ml含20%聚乙二醇4000，10mM氯化鈣及10mMTris鹽酸之溶液(pH7.5)並溫和混合後，靜置於室溫20分鐘。收集被離心之細胞，將其懸浮於含有0.1ml具1.2M山梨醇，10mM氯化鈣之YPD培養基中，然後於30℃溫和振盪30分鐘。將1.5，10，20及50 μ l懸浮液分別與瓊脂培養基(在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(16)

YPD基質中添加1.2M山梨醇，3%瓊脂及磷酸二氫鉀而成)混合，於溫度保持在45℃之10ML平皿(將1.2M山梨醇，3%瓊脂及100 μ g/ml G418添加至YPD基質)中進行擴增。平皿固化後，在30℃靜置培養3日。用牙籤採取形成的純株，並將其懸浮於3ml含0.7%酵母菌氮鹼基及2%葡萄糖之溶液中，然後於30℃振盪培養2日。將其中之1.5ml離心，收集細胞並懸浮於3ml之YPD培養基(10g酵母菌萃取物及20g巴克多蛋白胨溶解於水，使其成為900ml後，予以高熱加壓滅菌，然後與被另外高熱加壓滅菌之100ml 20%右旋葡萄糖混合)，然後於30℃振盪培養。如此得到之轉形體被命名為TMS-26-10。

(2) 培養基之組成

1. 前培養用之培養基(YNB培養液)

6.7巴克多-酵母菌氮鹼基(DIFCO製)溶解於100ml蒸餾水中，經過濾除菌者與20g葡萄糖溶解於蒸餾水而成為900ml之後，混合入經加熱滅菌者。

2. 批次培養用之天然培養基

成分	濃度 (mg/l)
葡萄糖	20,000
酵母菌萃取物	7,500
巴克多蛋白胨	6,500
酪蛋白胺基酸	9,000
KH ₂ PO ₄	10,000
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,000

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(17)

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	100
CuSO ₄ · 5H ₂ O	5
生物素	0.1
維他命 B ₁	10
維他命 B ₆	1
泛酸鈉	10
肌醇	50

pH 6.5

(3) 培養方法

1. 前培養

將適當量的 TMS-26-10 之保存菌株植菌於 2 個各含 100ml YNB 培養液且設有擋板之 300ml 三角錐瓶中，於 30℃ 振盪培養 24 小時，並離心及收集細菌後，將其懸浮於 10ml 滅菌水中並植菌於 1 公升培養用培養基中。

2. 主培養

將菌體接種於 1 公升分批培養用培養基中，使用容量為 3 公升之迷你廣口瓶式瓶發酵器予以通氣攪拌培養。將通氣量設定為 1vvm，而攪拌速度則被控制成使溶氧濃度在 10ppm 以上。攪拌速度達到上限後，就固定於該上限值。培養中，pH 值藉著添加 3N NaOH 而被控制在定值 (pH 6.5)。需要時可添加少量消泡劑 (Adecanol，旭電化工業)。

(4) HSA 產量與著色度之評價被示於下表：

溫度	最大菌體濃度	HSA 產量	著色度
(℃)	(g-DCW/L)	(%)	(A350/A280)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(18)

30	10.5	100	0.200
29	11.0	120	0.160
27	11.4	132	0.154
25	12.1	140	0.153
23	13.0	142	0.155
15	9.8	95	0.158

根據本發明，藉基因處理技術所得寄主之HSA生產力可經由於21至29℃培養寄主增高。於此種條件下，培養也可改良HSA生產寄主之生長率，以及降低HSA製劑之著色度。

雖然已經詳細並參照特定具體例描述本發明，但業界人士將了解於其中可作成多種變化及修改而未背離其精髓及範圍。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱：人類血清白蛋白之製法)

一種生產重組人類血清白蛋白(HSA)之方法，包括於21至29℃溫度培養藉基因處理技術製備的HSA生產寄主。於此種規定溫度條件下培養HSA生產寄主可提高HSA生產力，改良HSA生產寄主之生長率及減少HSA製劑的著色程度。

英文發明摘要(發明之名稱：PROCESS FOR PRODUCING HUMAN SERUM ALBUMIN)

A process for producing recombinant human serum albumin (HSA) which comprises culturing an HSA producing host prepared by gene manipulation techniques at a temperature of from 21 to 29°C. Culturing the HSA producing host under such a specified temperature condition makes it possible to increase productivity of HSA production, improve the growth yield of an HSA producing host, and reduce the degree of coloring in the HSA preparation.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種生產重組人類血清白蛋白之方法，包括於21至29℃溫度培養人類血清白蛋白生產酵母菌，該人類血清白蛋白生產酵母菌選自衍生自巴斯德畢赤酵母菌 (*Pichia pastoris*) 或 啤酒釀母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 之菌株。

2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係於21至28℃溫度培養。

3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係於21至25℃溫度培養。

4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係於21至23℃溫度培養。

5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係於23至28℃溫度培養。

6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係於25至27℃溫度培養。

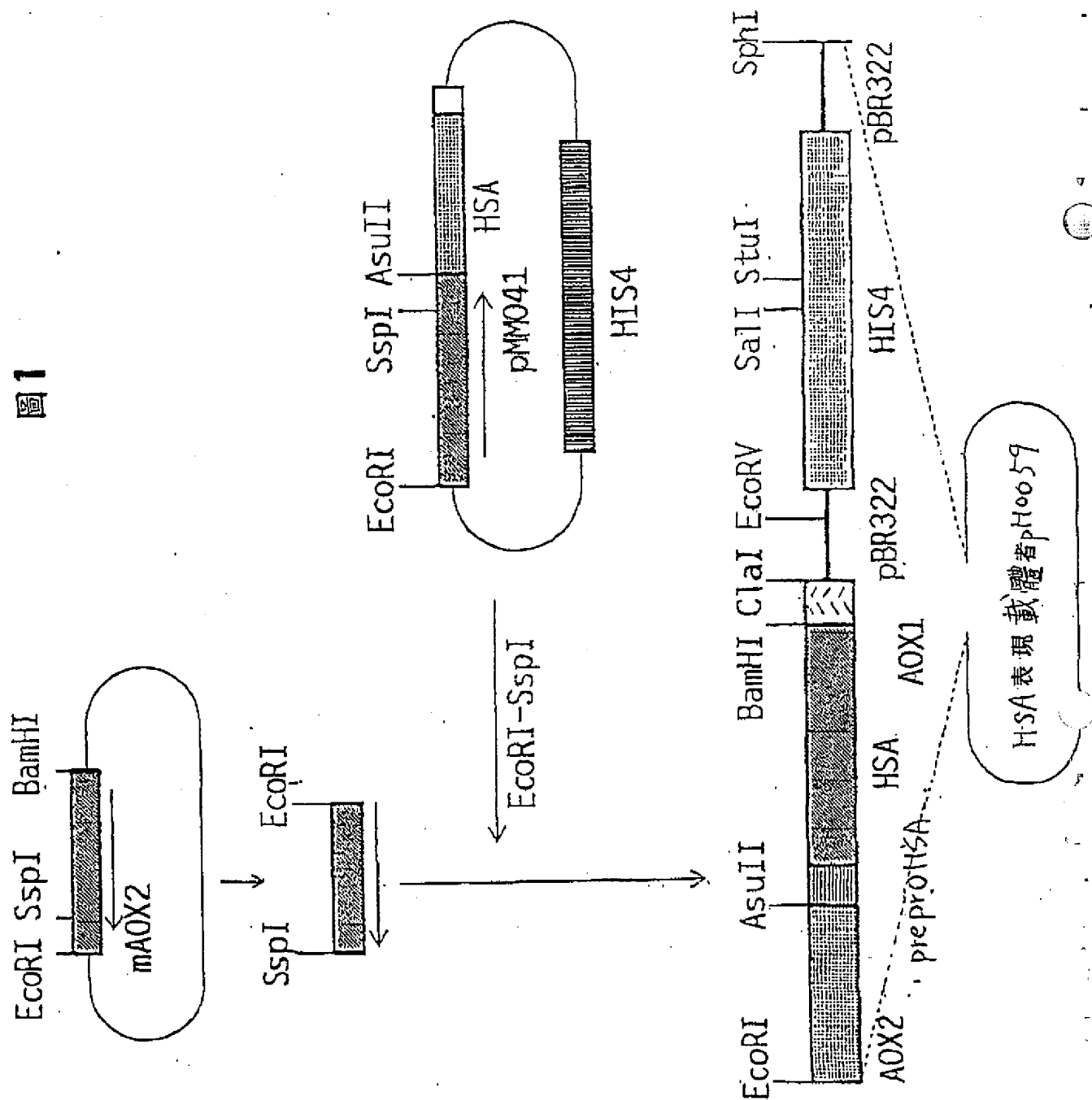
7. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係衍生自啤酒釀母菌 AH22。

8. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係衍生自巴斯德畢赤酵母菌 GTS115。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

圖 1



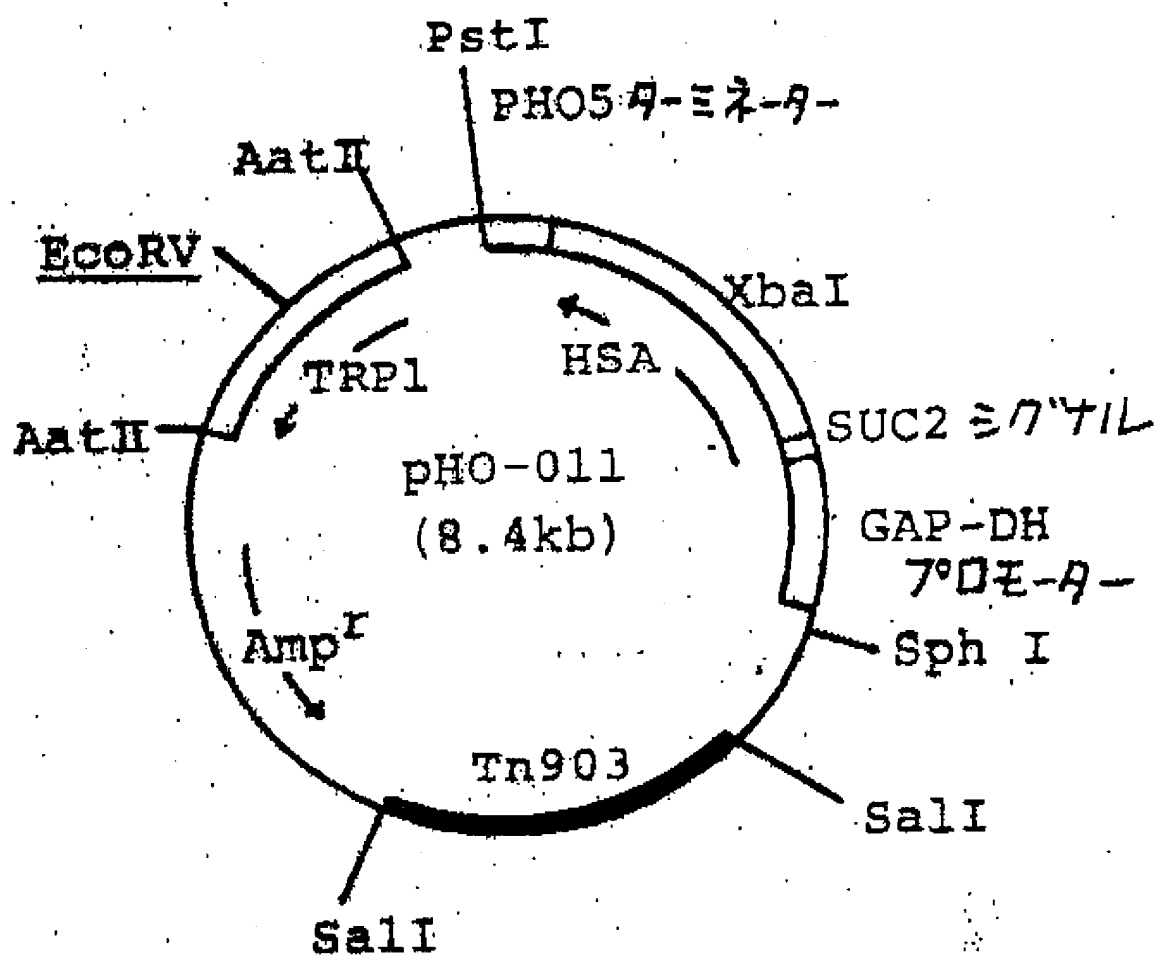


圖 2

年 月 日 修正
88. 6. 10 補充

418256

申請日期	84-7-6
案 號	84106968
類 別	C12P 21/2

(以上各欄由本局填註)

A4
C4
公 告 本

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	人類血清白蛋白之製法
	英 文	PROCESS FOR PRODUCING HUMAN SERUM ALBUMIN
二、發明 創作人	姓 名	(1)小林 薫 (2)友光 賢 治 (3)桑 江 忍 (4)大 屋 智 資 (5)應 田 豐 雄
	國 籍	日 本
	住、居所	(1) 日本國大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1號 株式會社ミドリ十字 中央研究所內 (2)(3)(4)(5)同(1)
三、申請人	姓 名 (名稱)	吉富製藥股份有限公司 (吉富製藥株式会社)
	國 籍	日 本
	住、居所 (事務所)	日本國大阪市中心區平野町二丁目6番9號
	代 表 人 姓 名	鎌倉昭雄

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

1. 一種生產重組人類血清白蛋白之方法，包括於21至29℃溫度培養人類血清白蛋白生產酵母菌，該人類血清白蛋白生產酵母菌選自衍生自巴斯德畢赤酵母菌 (*Pichia pastoris*) 或 啤酒釀母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 之菌株。

2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係於21至28℃溫度培養。

3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係於21至25℃溫度培養。

4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係於21至23℃溫度培養。

5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係於23至28℃溫度培養。

6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係於25至27℃溫度培養。

7. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係衍生自啤酒釀母菌 AH22。

8. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該人類血清白蛋白生產寄主係衍生自巴斯德畢赤酵母菌 GTS115。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線