



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I332991B1

(43)公告日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：098132019

(22)申請日：中華民國 92 (2003) 年 03 月 26 日

(51)Int. Cl. : C12N15/63 (2006.01) C12N15/09 (2006.01)

(30)優先權：2002/03/28 歐洲專利局 02007144.5

(71)申請人：百靈佳殷格翰製藥公司 (德國) BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA GMBH & CO.
KG (DE)

德國

(72)發明人：伊恩卡 巴巴拉 ENENKEL, BARBARA (DE)；蒙茲 喜可 MEENTS, HEIKO
(DE)；福辛尼葛 馬汀 FUSSENEGGER, MARTIN (CH)

(74)代理人：陳長文

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：8 共 78 頁

(54)名稱

具有改良存活性質之宿主細胞及該細胞之產生方法

HOST CELLS HAVING IMPROVED CELL SURVIVAL PROPERTIES AND METHODS TO
GENERATE SUCH CELLS

(57)摘要

本發明係有關包括增加量之活性抗-細胞凋零基因之遺傳工程處理的哺乳類宿主細胞與產生此類細胞之方法。更特別地，本發明係關於調節宿主細胞內抗-細胞凋零活性基因的量之方法；以及關於利用延遲/抑制此類細胞之自然發生的計畫性細胞死亡而顯示增加之細胞存活力的宿主細胞。

The present invention relates to genetically engineered mammalian host cells comprising an enhanced level of active anti-apoptosis genes and methods to generate such host cells. More particularly, the invention pertains to methods which modulate the level of anti-apoptosis active genes within host cells and to host cells showing an enhanced cell viability by delaying/inhibiting programmed cell death naturally occurring in such cells.

(無元件符號說明)

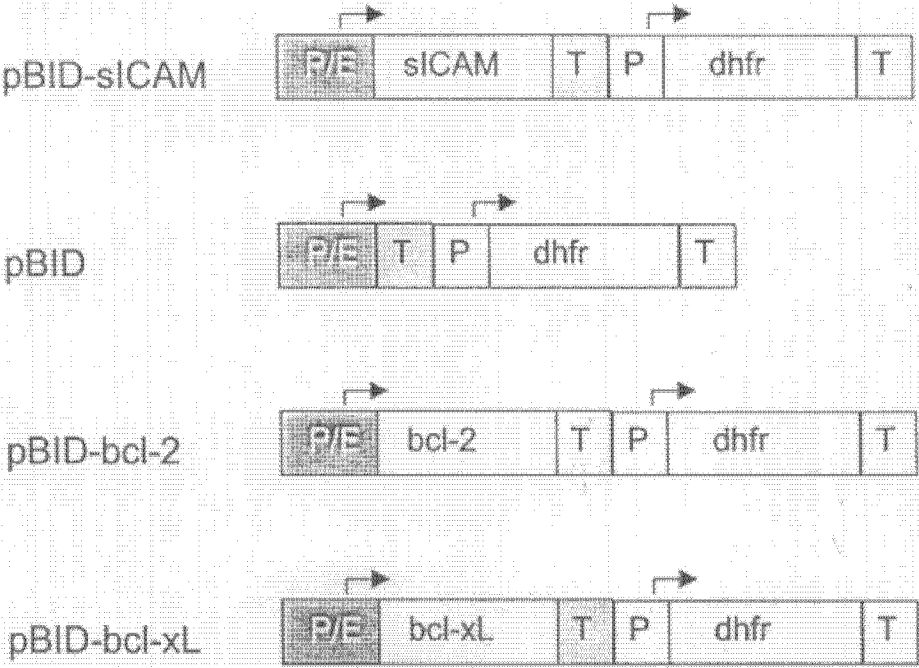


圖 1

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關包括增加量之活性抗-細胞凋零基因之遺傳工程處理的哺乳類宿主細胞與產生此類細胞之方法。更特別地，本發明係關於調節宿主細胞內抗-細胞凋零活性基因的量的方法；以及關於利用延遲/抑制此類細胞之自然發生的計畫性細胞死亡而顯示增加之細胞存活力的宿主細胞。

【先前技術】

因為功能上與藥物動力學上相關之後轉譯修飾係與人類高度相容，故哺乳類細胞係生產大部分之複雜的蛋白質治療藥物之較佳宿主。商業上相關之細胞型態包括融合瘤、骨髓瘤、中華倉鼠卵巢(CHO)細胞與幼倉鼠腎臟(BHK)細胞。因為CHO之生長直接地適應無血清/無蛋白質之培養液，且考慮其為重要管制機構之安全之生產宿主，故產業上使用愈來愈多之CHO衍生物。

在標準之生物醫藥生產方法中-生物反應器操作，有相當百分比之生產細胞族群會在稱為細胞凋零之遺傳決定的程式中死亡(Al-Rubeai等人，1998；Goswami等人，1999；Laken等人，2001)。已知細胞凋零係因諸如血清缺乏、營養限制、氧氣限制與機械應力之外源或內生性信號之結果而活化的主動細胞自殺程式。細胞凋零之特徵為漿膜起泡、細胞體積喪失、細胞核縮合與在核體間隔之核酸內切酶降解DNA(Wyllie等人，1980)。

經辨識血清成分係主要有效之細胞凋零保護劑。然而，不僅在生技產業內，甚且，亦因藥物註冊之重要之管制機構之推動，一直有強烈驅力來發展無血清與無蛋白質之製造過程。主要原因在解省成本、蛋白純化時較少之干擾、並減少導入諸如蛋白感染素或病毒等病原之潛在性。然而，省略血清通常造成生產的細胞株對計畫性細胞死亡敏感度增加，使細胞更易受培養之侵犯的傷害(Franek等人，1991；Goswami等人，1999；Moore等人，1995；Zanghi等人，1999)。因為蛋白產量主要為活的生產細胞族群之函數，故早熟之細胞死亡，例如藉細胞凋零者，即表示有價值的來源之高度損失。愈能長久維持高密度之活的與生產性細胞之培養時，因為每個生產過程之產率亦較高，其生產過程愈有效亦愈能獲利。在無血清時，細胞在到達最高細胞密度之固定生長期時會更快死，因此縮短生產期。因產物受凋零細胞釋出之蛋白酶降解與收取時受多量之細胞碎片干擾，產率會進一步減低。

為解決生產細胞株增加之細胞凋零敏感度的困境，目前已開始多種生理之工程處理策略，特別是那些經改變並完全培養於無血清條件之細胞株。其中的某些策略之焦點為，在擬似產生的細胞培養條件下，減少/消滅誘發內生性之細胞凋零-反應程式。有一種方法係減輕經由餵食之抽離營養(deZengotita等人，2000；Franek等人，1996；Mercille等人，1994；Sanfeliu等人，1999)。另一種方法之焦點為，使用細胞凋零之壓制化合物添加劑以阻斷細胞

凋零反應機制之主要效應物(Mastrangelo等人，1999；Sanfeliu等人，2000；Simpson等人，1998；Zanghi等人，2000)。替代的策略之一代表遺傳方法。包括利用抗-細胞凋零存活基因，或遺傳工程處理之衍生自存活維持的調控網路或病毒之抗細胞凋零決定者，以處理細胞本身(Cotter等人，1995；Chung等人，1998；Fussenegger等人，2000；Mastrangelo等人，1998，2000a與2000b；Mercille等人，1999a與1999b；Pan等人，1998；Simpson等人，1999；Terada等人，1997；Tey等人，2000a與2000b)。

關於後者之策略，經假設bcl-2與bcl-xL這兩種細胞凋零壓制者，且是高度保存之親-(例如bad、bak、bax、bok、bcl-xS、bik、bid、hrk、bim、blk、bcl-y)與抗-細胞凋零(例如bcl-2、bcl-xL、bcl-w、bfl-1、al、mcl-1、boo、brag-1、nr-13、bhrf-1、ced 9、cdn-1、cdn-2、cdn-3)反應調控基因之主要成員，係生技社群中抗-細胞凋零的工程操作之強力中選者。

經顯示，Bcl-2可在回應由同源-與異源-雙體化之親-與抗-細胞凋零BCL-2型蛋白質所組成之位於粒線體外膜之分子變阻器情形下，調節位於粒線體外膜之硫胺酸蛋白酶-9-依賴型的細胞凋零路徑之誘發。利用培養限制之對親-細胞凋零亞家族成員之偏見表現與內生信號，造成Apaf-1-硫胺酸蛋白酶-9複合物之釋出與此含半胱氨酸之天冬氨酸專一性蛋白酶自動活化之情形，與細胞色素c由粒線體劇烈流至細胞質相關。細胞凋零控制機制在粒線

體外膜組合其主要的部分，在抗細胞凋零之工程操作的焦點上，可使這些細胞發電廠成為壓力感應器，並且是維持細胞凋零過程之執行者(Follstad等人，2000；Green等人，1998；Tsujimoto, 1998)。

有些報告指出異源抗-細胞凋零bcl-2基因之表現對適應並培養於含胎牛血清之遺傳工程細胞株之存活/存活力與強健具正向效果。那些細胞包括骨髓瘤、融合瘤、幼倉鼠腎臟細胞(BHK)與中華倉鼠卵巢細胞(CHO)。有人說明BCL-2表現之正效果與諸如血清與葡萄糖缺乏、生長因子抽離或病毒感染之不同環境壓迫相關(Fassnacht等人，1998；Figueroa等人，2001；Fussenegger等人，2000；Itoh等人，1995；Mastrangelo等人，2000a與2000b；Reynolds等人，1996；Simpson等人，1997，1998與1999；Tey等人，2000a與2000b)。

分別已有人說明以BCL-xL為基礎之代謝遺傳工程處理T細胞與CD34⁺血球生成細胞(美國專利號碼6,143,291，WO 00/75291)。Fussenegger等人，1998還有Mastrangelo等人，2000a與2000b皆說明BCL-xL表現對倉鼠細胞存活之正效果。

然而，全部這些報告若非使用諸如人類T細胞與CD34⁺血球生成細胞之非生產性細胞株，即是使用已調適過並例行地培養在含血清條件之例如，倉鼠或小鼠細胞株之生產性細胞株；而且，甚至多數是附著細胞。研究血清抽離效果對表現異源BCL-2或BCL-xL的重組細胞之存活，並不包

括數次繼代培養於無血清之培養液。反而，血清培養之細胞若非接種於完全無血清之培養液，即是血清含量減低之培養液；而且，還追蹤數天有關這些培養侵犯對批式培養之細胞存活效果。因為由血清內之細胞凋零保護劑制約的胞內反應仍持續，這種因血清抽離造成之培養侵犯的真正開始亦可能延遲。

只有少量實驗進行相關之已適應並恆定生長於無血清培養液之懸浮液的重組細胞株的生產。目前，這些條件是生技產業最喜愛者，但是同時細胞株更脆弱且更不強健。在Goswami等人1999之報告，其說明表現 γ -干擾素之CHO細胞培養在那些條件下之實驗。表現額外之異源BCL-2之培養的存活有改善，但侷限於批式培養7天後僅約40%的活細胞而已。沒有人知道BCL-xL表現對適應並永久生長於無血清條件下之宿主細胞存活力/存活之效果。

由上述討論，很清楚地生技社群需要進一步增加細胞存活力，尤其是已適應無血清生長並夠格於無血清生產治療與診斷用之生藥的細胞株。於批式培養中，若能以高存活力延長細胞於固定期之存活，會明顯影響產率與成本效益，藉此生產期每額外增加一天都會造成大貢獻。

【發明內容】

在本發明中，我們提供策略以進一步改善在無血清之培養液的懸浮液中恆定成長之生產細胞株之存活。該策略係根據遺傳工程處理之宿主細胞，以改善抗-細胞凋零之作用性多肽的細胞內含量。很驚訝地發現，抗-細胞凋零之

作用性基因的細胞內含量可實質改善細胞存活力，且對細胞生產力亦無任何負面效果。

經顯示，非放大之異源導入的抗-細胞凋零基因，例如 BCL-2 或 BCL-xL，對適應且通常生長於無血清與/或無蛋白質條件之細胞的存活力/存活，僅有很小效果(參照圖 5)。此發現已由 Goswami 等人 1999 之報告所支持。現在，本發明說明/提供一個劇烈改善宿主細胞存活力/存活之新方法，特別是對建立與培養於無血清條件下者。利用放大促成之過度表現來改善抗細胞凋零作用性蛋白，例如 BCL-xL 或 BCL-2 之胞內含量，可延遲/抑制細胞凋零。本發明很驚訝發現，藉大量之過度表現諸如 BCL-xL 之抗細胞凋零蛋白，不僅是未負面影響所需蛋白表現量之能進一步改善存活力/存活之適當工具而已。相反地，在 BCL-xL 過度表現之細胞，細胞生產力還增加(例如參照圖 2 與 3)。因而，本發明提供熟諳此藝者新的遺傳修飾宿主細胞，特別是倉鼠或鼠類生產細胞株，而且還有生成這種發明性生產細胞株之方法。只要能以非常充分方式改善目前的生產方法之經濟活力，此發現對生產生物醫藥肽/蛋白將非常有利。與目前技藝比較，本發明之大優點在於其不僅提供改善蛋白生產過程之限制因子-細胞存活力，之方法，同時提供高蛋白質生產率。

因而，本發明提供具改善的存活性質且非常適於生產生物醫藥蛋白質之遺傳工程處理的宿主細胞。該改善之存活性質係根據細胞內增加之抗細胞凋零基因的量。較佳者為

哺乳類來源之宿主細胞、更加者為鼠類融合瘤/骨髓瘤或倉鼠細胞，尤其是已適應且恆定培養於無血清與/或無蛋白質之培養液者。

本發明亦提供顯示比方增加的抗-細胞凋零基因表現量之哺乳類宿主細胞的產生方法，包括(i)將編碼抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與視情形之至少一種所欲的基因之核酸序列導入哺乳類宿主細胞族群，其中該基因係操作上連接於至少一種允許該基因表現之調控序列，(ii)將該細胞族群培養於至少可表現該選擇用之可放大的標示者基因與該細胞凋零基因，且係有利於取得至少該抗-細胞凋零基因之多複製數的條件，以及(iii)由該細胞族群選取至少併入多複製數之抗-細胞凋零基因的細胞。

因而，本發明亦提供在宿主細胞表現抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與至少一種所欲的基因之方法，包括(i)將編碼抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與所欲的基因之核酸序列導入宿主細胞族群，其中該基因係操作上連接於至少一種允許該基因表現之調控序列，與(ii)將該細胞族群培養於可表現該基因之條件。

利用任何這些方法之一處理宿主細胞，可提供包括至少一種高複製數之抗-細胞凋零基因之宿主細胞。

最後，本發明亦提供在任何根據本發明之宿主細胞生產所欲蛋白之方法，包括(i)培養細胞於有利抗-細胞凋零基因與所欲基因表現之條件，與(ii)由細胞與/或細胞培養上

澄液分離所欲之蛋白。

【實施方式】

本發明提供經導入編碼抗-細胞凋零基因、選擇性之放大用的標示者基因與至少一種所欲的基因之核酸序列而遺傳修飾之宿主細胞。在一較佳具體實施例，該抗-細胞凋零基因、選擇性之放大用的標示者基因與所欲的基因，操作上連接於至少一個允許這些基因表現之調控序列。在更一具體實施例，該宿主細胞之遺傳修飾包括導入一種以上之抗-細胞凋零基因。

以此方式修飾之宿主細胞，允許抗-細胞凋零基因與選擇性放大用之標示者以及視情形之所欲基因共表現。選擇性放大用之標示者，不僅使我們可安定選取轉感染之宿主細胞選殖系，亦可放大抗-細胞凋零基因。本發明顯示，放大抗-細胞凋零基因，提供達成抗-細胞凋零作用性蛋白之細胞內含量更有效之方法；與未放大任何抗-細胞凋零蛋白編碼序列者比較，可有效改善宿主細胞之存活。

因為延遲或抑制宿主細胞內之計畫性的細胞死亡，例如細胞凋零所強化之細胞存活，為根據本發明之遺傳修飾的宿主細胞之特徵。很驚訝地發現，經任何之本發明方法修飾的宿主細胞族群，係經培養至少9天，其中細胞之總存活率至少為約50%(亦參照圖5)。8天批式培養後，根據本發明生成的宿主細胞之存活力至少可達60%。在本發明之進一步具體實施例，7天之批式培養後細胞之存活力至少可達約75%。在另一個具體實施例，6天之批式培養後細

胞之存活力至少可達約85%。此藝無法得知存活力當量，至少對無血清之培養，與/或和生物醫藥之無血清生產相關聯者係如此。此藝所述之存活力經7天批式培養後，限制於40% (Goswami等人，1999)。因而，據此定特徵之宿主細胞係本發明範圍所涵蓋。

「細胞存活力」或「細胞存活力」係目標細胞持續活著並表現功能之能力，且包括因抑制或延遲細胞凋零或自然細胞死亡而保護細胞免於細胞死亡。細胞存活力或細胞存活之測定方法係此藝所熟知。例如，細胞存活力可利用相位差顯微鏡、螢光顯微鏡或使用諸如錐藍、碘化丙錠或碘化丙錠/吡啶橙之組合等非細胞滲透性染料之流動細胞計數來決定。這些方法在 Current Protocols in Cytometry, John Wiley & Sons, Inc., 更新版，都以實例說明，其全文並列於此供參考。

因而，本發明亦係有關抑制或延遲宿主細胞死亡之方法，包括將本發明之宿主細胞，例如上述之宿主細胞培養於至少有一種抗-細胞凋零基因表現之條件，並可抑制或延遲宿該主細胞之死亡。在一較佳具體實施例，該細胞之細胞死亡係由已計畫性之細胞死亡，更佳者係因細胞凋零所造成。

本發明亦提供顯示增加的表現量之抗細胞凋零基因的哺乳類宿主細胞之產生方法，包括(i)將編碼抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與視情形之至少一種所欲的基因之核酸序列導入哺乳類宿主細胞族群，其中該基

因係操作上連接於至少一種允許該基因表現之調控序列，
(ii)將該細胞族群培養於至少可表現該選擇用之可放大的
標示者基因與該抗-細胞凋零基因，且係有利於取得至少
該抗-細胞凋零基因之多複製數的條件，以及(iii)由該細胞
族群選取至少併入多複製數之抗-細胞凋零基因的細胞。

根據本發明之任何方法遺傳修飾的宿主細胞與非轉感染
以及非放大之親代細胞比較，顯示增加之抗-細胞凋零蛋
白的表現。「親代細胞」意指未顯示增加之抗-細胞凋零基
因表現的細胞；而且，通常與根據本發明之例如，導入與
放大編碼抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基
因與視情形之至少一種所欲的基因之核酸序列的遺傳修飾
細胞，生長在相同或實質上相同之條件。抗-細胞凋零蛋
白之增加的表現"意指例如，過度表現，亦即，與未根據
本發明之任何修飾的方法比較，例如，藉由導入與放大編
碼抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與視
情形之至少一種所欲的基因之核酸序列加以修飾者，該蛋
白在宿主細胞之表現量至少增加30倍，以至少增加50倍較
佳，以增加至少100倍更佳。

因而，本發明亦提供經本文所述之任何方法遺傳修飾，
並顯示過度表現之抗-細胞凋零基因的宿主細胞；亦即，
與未根據本發明之任何修飾的方法比較，該基因在宿主細
胞之表現量至少增加約30倍。在進一步之具體實施例，本
發明亦關於與未經本發明意義修飾之細胞比較，其過度表
現量至少顯示增加50倍的宿主細胞。在另一具體實施例，

本發明提供與未經本發明揭示方式所修飾之細胞比較，其過度表現量至少顯示增加約100倍的宿主細胞。圖7以實例說明由本發明方法產生之宿主細胞可達到之表現量。將本發明方法應用於宿主細胞之修飾過程，例如，進一步增加抗-細胞凋零基因之複製數，可進一步增加抗-細胞凋零基因之表現量。將一或多種抗-細胞凋零基因之多複製數導入宿主細胞亦是可了解的。

在本發明意義之「宿主細胞」或「目標細胞」為倉鼠細胞，較佳者為BHK21、BHK TK⁻、CHO、CHO-K1、CHO-DUKX、CHO-DUKX B1與CHO-DG44細胞或任何此類細胞株之衍生物/子代。特佳者為CHO-DG44、CHO-DUKX、CHO-K1與BHK21，益佳者為CHO-DG44與CHO-DUKX細胞。在進一步之具體實施例，本發明之宿主細胞亦意指鼠類骨髓瘤細胞，較佳者為NS0與Sp2/0細胞或任何此類細胞株之衍生物/子代。在本發明意義可使用之鼠類與倉鼠細胞之實例表1亦有摘要。然而，這些細胞，包括但不限於人類、小鼠、大鼠、猴子與啮齒類細胞株之其他哺乳類細胞，或包括但不限於酵母菌、昆蟲與植物細胞之真核細胞的衍生物/子代，亦可做為本發明之意義使用，特別係生產生物醫藥蛋白質。

表1：倉鼠與鼠類生產細胞株

細胞株	次序號碼
NS0	ECACC No. 85110503
Sp2/0-Ag14	ATCC CRL-1581
BHK21	ATCC-CCL-10
BHK TK ⁻	ECACC No. 85011423

HaK	ATCC CCL-15
2254-62.2 (BHK-21 derivative)	ATCC CRL-8544
CHO	ECACC No. 8505302
CHO-K1	ATCC CCL-61
CHO-DUKX (=CHO duk ⁻ , CHO/dhfr ⁻)	ATCC CRL-9096
CHO-DUKX B1	ATCC CRL-9010
CHO-DG44	Urlaub et al., Cell 33[2], 405-412, 1983
CHO Pro-5	ATCC CRL-1781
V79	ATCC CCC-93
B14AF28-G3	ATCC CCL-14
CHL	ECACC No. 87111906

建立、適應後，宿主細胞最好能完全培養於無血清條件，且視情形係在無任何動物來源之蛋白質/肽的培養液中。市售培養液諸如 Ham's F12(Sigma, Deisenhofen, Germany)、RPMI-1640(Sigma)、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Sigma)、Minimal Essential Medium(MEM ; Sigma)、Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM ; Sigma)、CD-CHO(Invitrogen, Carlsbad, CA)、CHO-S-Invitrogen、無血清之CHO Medium (Sigma)與無蛋白之CHO Medium (Sigma)俱為適當營養溶液之範例。任何之這些培養液，必要時皆得補充一些化合物，例如激素與/或其他生長因子（諸如胰島素、轉鐵蛋白、表皮細胞生長因子、類胰島素生長因子）、鹽（諸如氯化鈉、鈣、鎂、磷酸鹽）、緩衝液（諸如HEPES）、核苷（諸如腺苷、胸苷）、麩胺醯胺、葡萄糖或其他相當之能量來源、抗生素、微量元素等。亦得包括任何熟諳此藝者熟知之其他適當濃度之必要補充。在本發明使用無血清之培養液較佳，但補充適當量血清之培養液亦可做為培養宿主細胞之

用。為培養與選取表現選擇用之基因的遺傳修飾細胞，我們在培養液中添加適當之選擇藥劑。

為改善宿主細胞存活力，最好是如上述之生產細胞，本發明亦關於高量表現的bcl-2超家族之抗-細胞凋零基因。因而，編碼bcl-2超家族之基因適於生產根據本發明之宿主細胞。因此，利用導入編碼bcl-2超家族基因、選擇用之可放大的標示者基因與至少一種所欲的基因之核酸序列之遺傳修飾的宿主細胞，亦為本發明意義所涵蓋。表2中列出抑制或延遲計畫性之細胞死亡或細胞凋零之屬於bcl-2超家族成員之實例。哺乳類、線虫(*C. elegans*)或病毒來源之此家族的多數蛋白，具有與細胞凋零抑制劑，BCL-2(BCL-2類似物區域BH1-BH4)相似之2-4個區域之延長的胺基酸序列。此些均為進行本發明之抗細胞凋零基因/蛋白質之適當候選物。

本發明之進一步具體實施例以細胞較佳，其存活係藉導入編碼BCL-xL、BCL-2、BCL-w、BFL-1、A1、MCL-1、BOO、BRAG-1、NR-13、CDN-1、CDN-2、CDN-3、BHRF-1、LMW5-HL或CED-9之核酸序列而延長。在一更佳之具體實施例，該編碼本發明之抗-細胞凋零基因之核酸序列為脊椎動物之DNA分子。較佳之脊椎動物為哺乳類。更佳者，本發明之核酸序列編碼名為BCL-xL或BCL-2之多肽。以BCL-xL編碼基因最佳。亦佳者為具有序列辨識號碼：1 (與GenBank Accession Number Z23115一致)或序列辨識號碼：2 (與GenBank Accession Number M13995一

致)之序列的核酸。最佳者為序列辨識號碼：1。由其他脊椎物種編碼之任何這些基因的同系物，亦適於進行本發明。甚且，亦佳者為編碼任何表2之抗-細胞凋零基因的核苷酸序列，特別是具有表2所引之任何 GenBank Accession Number 的序列。抗-細胞凋零作用基因之實例亦可參照美國專利號碼 6,303,331、5,834,309 與 5,646,008 與 WO 95/006342，其並列於本文供參考。亦可參考 Boise 等人，Cell 74, 597-608, 1993。WO 95/006342 以實例說明如何分離 BCL-xL 編碼序列。

編碼抗-細胞凋零蛋白之核酸序列意欲包括任何不論在體外或將編碼序列導入目標細胞後會轉錄與轉譯成抗-細胞凋零蛋白之核酸序列。該抗-細胞凋零蛋白編碼序列得為原生(野生型)基因以及自然產生(經自發突變)，或重組之遺傳工程的突變體與變體、切短版與片段、功能性相當物、衍生物、同系物與自然產生或野生形之融合物；只要編碼之多肽的生物功能活性，即抗細胞凋零功能維持，且未實質改變即可。較佳之編碼多肽與相當之野生型抗-細胞凋零蛋白質比較，至少具有50%，更佳者為至少具有80%，益佳者為至少具有100%或更多之功能性生物活性。「野生型蛋白」意指完全、未切短、未修飾、自然產生之編碼多肽的對偶基因。

抗-細胞凋零多肽之「功能性生物活性」可經由對表現該特別多肽之轉感染細胞的定量細胞凋零分析來決定，其例諸如 TUNEL 分析、Annexin V 分析、利用螢光顯微鏡之

啉橙/溴化乙錠染色或碘化丙錠/吡啉橙染色、或流動細胞計數分析或其他分析。這些分析為此藝所熟知且其說明可參照例如 *Current Protocols in Cytometry*, John Wiley & Sons, Inc., 更新版。

利用此藝所熟知之標準技術，例如位置特定突變形成或聚合酶鏈反應媒介之突變形成，得製備該修飾之核酸序列。在本發明中，特佳之 bcl-xL 核酸序列為分離的序列辨識號碼：1 (與 GenBank Accession Number Z23115 一致) 之聚核苷酸。本發明進一步包括與 GenBank Accession No. Z23115 序列或其他 BCL-xL 編碼序列功能上相當之核酸序列。在一較佳具體實施例，該編碼 BCL-xL 之蛋白質為人類者；在一更佳之具體實施例其係起源於倉鼠。然而，編碼其他物種之 BCL-xL 之核酸序列亦為本發明之意義所涵蓋。BCL-xL 蛋白質係 bcl-x 基因所編碼。該基因產生兩種不同的 RNA 分子，其一編碼 BCL-xL (長型式) 另一個編碼 BCL-xS (短型式)。BCL-xS 缺少 BCL-xL 之一段 63 個胺基酸。經顯示 BCL-xS 有助細胞凋零，因而使用 cDNA，而非基因體片段表現 BCL-xL 較佳。在另一較佳具體實施例，其涵蓋改善之抗-細胞凋零性質之 BCL-xL 突變體或 BCL-2 突變體，例如刪除 BH3 與 BH4 保存區間之非保存區域，因此增加突變之蛋白質變體的蛋白質安定性 (Chang 等人，1997；Figueroa 等人，2001)。

表 2： bcl-2 超家族之抗-細胞凋零基因

聚核苷酸	GenBank Accession No.	聚核苷酸	GenBank Accession No.
bcl-xL(人)	Z23115	nr-13(雞)	AF120211
bcl-xL(小鼠)	L35049		
bcl-xL(大鼠)	U34963		
bcl-xL(雞)	Z23110		
bcl-2(人)	M13995	bhfr-1 (疱疹病毒) bhfr-1(E-B病毒)	AF120456 A22899
bcl-2(小鼠)	M16506		
bcl-2(大鼠)	L14680		
bcl-2(雞)	Z11961		
bcl-2(倉鼠)	AJ271720	lmw5-HL (非洲豬熱病毒)	L09548
bcl-w(人)	U59747		
bcl-w(小鼠)	U59746		
bcl-w(大鼠)	AF096291	cdn-1(人)	AAQ95492 (NAGENESEQ)
bfl-1(人)	U27467		
Al(小鼠)	U23774	cdn-2(人)	AAQ95493 (NAGENESEQ)
mcl-1(人)	AF147742		
mcl-1(小鼠)	U35623		
mcl-1(大鼠)	AF115380		
mcl-1(雞)	AF120210	cdn-3(人)	AAQ95494 (NAGENESEQ)
boo(小鼠)	AF102501		
brag-1(人)	S82185	ced-9 (線蟲)	L26545

本文所用之「核酸序列」意指寡核苷酸、核苷酸或聚核苷酸及其片段或部分，且涵蓋基因體來源或合成之DNA或RNA，其可為單或雙股並可代表意義與反義股。本發明之聚核苷酸包括其中一或多種密碼子已經由其同義物所取代之核酸區域。另外包括具有編碼序列之聚核苷酸，其為編碼序列之自然發生的對偶基因變體，例如序列辨識號碼：1或序列辨識號碼：2之編碼序列變體。如此藝所知者，對

偶基因變體為聚核苷酸之替代型，其可能有實質上不改變編碼的多肽之功能的一或多種核苷酸之取代、刪除或加成。多肽之功能通常由該編碼多肽之功能性生物活性所決定。因而，實質上不改變編碼的多肽之功能，意指與對應之野生型編碼的多肽比較，該編碼的多肽之功能性生物活性至少具有50%，更佳者為至少具有80%，益佳者為至少具有100%或更多。

「編碼」之用語意指核酸中核苷酸之特定序列，諸如在染色體中之基因或mRNA的固有性質，其係做為合成在生物過程中具有定義之核苷酸(亦即rRNA、tRNA、其他RNA分子)或胺基酸序列之其他聚合物與巨分子之模版，及其所生成之生物性質。因此，若一個基因生成之mRNA之轉錄與轉譯生成細胞中或其他系統之蛋白，則該基因即編碼蛋白質。不論是其核苷酸序列與mRNA序列一致，且通常在序列表提供之編碼股；或是做為基因或cDNA轉譯之模版的非編碼股，皆得指為編碼該基因或cDNA之蛋白質或其他產物者。因為遺傳密碼之退化，編碼蛋白質之核酸包括任何具有不同核苷酸序列，但是而編碼該蛋白質之相同胺基酸序列之核酸。編碼蛋白質之核酸與核苷酸序列得包括插入序列。

在本文中「Cdna」之用語意指由逆轉錄所生產之去氧核糖核苷酸，而且典型地係mRNA或基因生成之其他RNA之第二股所合成。若為雙股，則cDNA分子具有編碼或意義股與非編碼或反義股。

通常如本文所用者，大寫字母(例如 BCL-xL)意指多肽(例如基因表現之產物)；而小寫字母(例如 bcl-xL)意指聚核苷酸(例如基因)。此外，在此專利說明書通篇中，除非有其他說明，單數型「一個(a)」「一個(an)」與「該」皆包括複數型。

「多肽」之用語與胺基酸殘基序列或蛋白質交互使用，並意指任何長度之胺基酸聚合物。這些用語亦包括經由反應的後轉譯修飾之蛋白質，這些反應包括但不限於糖化、乙醯化、磷酸化或蛋白質加工。可在多肽結構中進行修飾與改變，例如與其他蛋白質融合、胺基酸序列取代、刪除或插入，同時維持分子之生物性功能活性。例如，可在多肽或其背後之核酸編碼序列，做某些胺基酸序列之取代，而且可得具類似性質之蛋白質。如上述，較佳之蛋白質為由序列辨識號碼：1之核酸序列編碼之BCL-xL蛋白質序列。藉由對其背後之核酸序列進行位置特定突變生成或聚合酶鏈反應媒介之突變生成，可製備利用胺基酸之水療法指數(Kyte等人，J. Mol. Biol. 157：105-132, 1982)提供功能性相當之BCL-xL多肽的胺基酸取代。

如上述，本發明係有關遺傳修飾之宿主細胞，以及產生此種宿主細胞之方法。在一個具體實施例，該宿主細胞包括異源引入之編碼抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與視情形之至少一種所欲的基因之聚核苷酸序列。「選擇用之可放大的標示者基因」具有選擇用標示者基因之性質，但當細胞培養於適當條件時，另外允許放大

(亦即，生成該基因之活成內染色體或外染色體型式的另外複製數)基因本身與鄰近該選擇用之可放大的基因之基因。本發明特別提供宿主細胞，不僅包括一個複製數之導入的抗-細胞凋零基因，亦包括多複製數之該抗-細胞凋零基因，例如超過5，10，20，50或100個複製數之導入的抗-細胞凋零基因。

這種宿主細胞，例如可經由包括下列之方法取得：(i)將編碼抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與視情形之至少一種所欲的基因之核酸序列導入哺乳類宿主細胞族群，其中該基因係操作上連接於至少一種允許該基因表現之調控序列，(ii)將該細胞族群培養於至少可表現該選擇用之可放大的標示者基因與該抗-細胞凋零基因，且係有利於取得至少該抗-細胞凋零基因之多複製數的條件，以及(iii)由該細胞族群選取至少併入多複製數之抗-細胞凋零基因的細胞。以此方式生成之宿主細胞包括，例如至少5個複製數之併入的異源性抗-細胞凋零基因。在進一步之具體實施例，該宿主細胞包括，例如至少10個複製數之併入的異源性抗-細胞凋零基因。在另一個具體實施例，可得包括至少50個導入之複製數的異源性抗-細胞凋零基因之宿主細胞。在進一步之具體實施例，該宿主細胞包括，例如至少100個複製數之併入的異源性抗-細胞凋零基因。適當之抗-細胞凋零基因係那些上述者，特別係那些表2所列者，例如編碼BCL-xL者。

通常本發明之宿主細胞較佳者係包括，其複製數允許其

表現量夠高到能經由抑制或延遲計畫性之細胞死亡，而增強細胞族群存活之抗-細胞凋零基因。更佳者為，宿主細胞不僅包括允許改善細胞存活之複製數的抗-細胞凋零基因，亦顯示同樣由遺傳修飾之宿主細胞編碼之高量表現的所欲基因。對熟諳此藝者而言，發現具有減少細胞凋零率之最高效果，而不劇烈造成細胞生長率減少或遺傳不安定性，並且對所欲之蛋白質的生產率亦無負面影響之抗-細胞凋零基因的最高可容許表現量之方法，係已知的。其包括但不限於，例如產生生長曲線、利用測定非滲透性染料之排除而經顯微鏡或流動細胞計數法偵測細胞存活力、藉TUNEL或Annexin V分析定量細胞凋零、由ELISA決定產品滴定度並經數次繼代由南方或斑點污漬雜合或定量PCR評估轉感染基因之遺傳安定性。

在本發明中，若抗-細胞凋零基因，例如bcl-xL基因之表現量與親代、非放大細胞比較，達到編碼多肽之胞內存活的有效濃度，例如即達到充分增加之細胞存活。充分增加之細胞存活之提供係例如，當該bcl-xL基因或任何其他抗-細胞凋零基因之表現量與親代細胞族群比較，致使細胞族群於培養6、7、8或9天後至少增加約20%之存活。更佳者為與親代細胞族群比較，於培養6、7、8或9天後細胞存活至少增加約30%，益佳者為至少增加約50%。培養期9天後，當至少約50%之培養細胞存活時，亦達足夠之細胞存活。若抗-細胞凋零基因編碼BCL-xL，於培養9天後，當至少約60%之細胞存活時，亦達足夠之細胞存活。在一

個具體實施例，當培養9天後至少約60%之細胞族群存活時，其亦達充分增加之細胞存活。在進一步之具體實施例，當培養7天後至少約75%之細胞族群存活；甚且，若培養6天後至少約85%之細胞存活時，其即達充分增加之細胞存活。

「選擇用可放大之標示者基因」通常係編碼真核細胞在那些條件下生長所需之酶。例如，該選擇用可放大之標示者基因得編碼DHFR，該基因係在轉感染之宿主細胞生長於選擇性藥劑，胺甲喋呤(MTX)條件下所放大。表3之非限制性實例選擇用基因亦為可放大之標示者基因，其可用以實現本發明。為回顧表3所列之選擇用可放大之標示者基因，請參照Kaufman, Methods in Enzymology, 185: 537-566(1990)，其並列本文供參考。據此，根據本文所述任何方法之遺傳修飾宿主細胞皆為本發明所涵蓋，其中該選擇用可放大之標示者基因編碼具有二氫葉酸還原酶(DHFR)、麩胺醯胺合成酶、CAD、腺苷去胺酶、腺苷酸去胺酶、UMP合成酶、IMP 5'-去氫酶、黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶、HGPRT酶、胸苷激酶、胸苷酸合成酶、P糖蛋白170、核糖核苷酸還原酶、天冬醯胺合成酶、精胺酸琥珀醯酸合成酶、鳥胺酸去羧酶、HMG CoA還原酶、乙醯葡糖胺轉移酶、蘇胺酸-tRNA合成酶或 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATP酶的功能之多肽。

較佳之選擇用可放大之標示者基因為編碼嘌呤合成所必須之二氫葉酸還原酶(DHFR)之基因。缺少DHFR基因之細

胞在無嘌呤之培養基無法生長。因而，DHFR具有選取並放大在缺少嘌呤之培養基中生長的基因之顯性選擇用標示者之用途。與DHFR基因聯合所用之藥劑為胺甲喋呤(MTX)。因而，本發明包括生成哺乳類宿主細胞之方法，包括(i)將抗-細胞凋零基因、編碼DHFR的基因導入哺乳類細胞族群，與(ii)在含胺甲喋呤條件放大該抗-細胞凋零基因。據此，將轉感染基因培養於不含血清、無次黃嘌呤/胸苷之培養基並逐漸增加MTX的量，由培養基中無MTX開始，至MTX濃度介於2毫微莫耳濃度至2000毫微莫耳濃度，更典型地介於2毫微莫耳濃度至1000毫微莫耳濃度。逐漸增加MTX濃度，其倍數因子為2-10。在一較佳方法，該抗-細胞凋零基因另外編碼表2所列之任何一個基因。在一更佳方法，該抗-細胞凋零基因編碼BCL-2或BCL-xL；而且在一益佳方法為編碼BCL-xL。

表3：選擇用可放大標示者基因

Selectable Amplifiable Marker Gene	Accession Number	選擇用藥劑
Dihydrofolate reductase	M19869(倉鼠) E00236(小鼠)	胺甲喋呤(MTX)
金屬硫蛋白	D10551(倉鼠) M13003(人) M11794(大鼠)	鎘
CAD(氨甲醯-磷酸合成酶： 天冬醯胺轉氨甲醯酶： 二氫乳醯酸酶)	M23652(倉鼠) D78586(人)	N-磷酸乙醯-L-天冬胺酸
腺苷去胺酶	K02567(人) M10319(小鼠)	Xyl-A-或腺苷，2'去氧共間型黴素
AMP(腺苷酸)去胺酶	D12775(人) J02811(大鼠)	腺嘌呤、氮絲胺酸、共間型黴素
UMP合成酶	J03626(人)	6-氮尿苷，吡唑喹喃
IMP 5'去氫酶	J04209(倉鼠)	黴酚酸

[S]

	J04208(人) M33934(小鼠)	
黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶	X00221(大腸桿菌)	微酚酸與有限的黃嘌呤
突變HGPRTase或突變胸苷激酶	J00060(倉鼠) M13542, K02581(人) J00423, M68489(小鼠) M63983(大鼠) M36160(疱疹)	次黃嘌呤、胺基蝶呤與胸苷(HAT)
胸苷酸激酶	D00596(人) M13019(小鼠) L12138(大鼠)	5-氟去氧尿苷
P-糖蛋白170 (MDR1)	AF016535(人) J03398(小鼠)	多重藥物，例如亞德里亞徽素、長春新鹼、秋水仙素
核糖核苷酸還原酶	M124223, K02927(小鼠)	Aphidicolin
麩胺醯胺合成酶	AF150961(倉鼠) U09114, M60803(小鼠) M29579(大鼠)	甲硫胺酸砒亞胺(MSX)
天冬醯胺合成酶	M27838(倉鼠) M27396(人) U38940(小鼠) U07202(大鼠)	β -天冬胺醯氧肪酸酯合歡胺酸，5'-氮胞苷
精胺酸琥珀醯胺合成酶	X01630(人) M31690(小鼠) M26198(牛)	刀豆胺酸
鳥胺酸去羧酶	M34158(人) J03733(小鼠) M16982(大鼠)	α -二氟甲基鳥胺酸
HMG-CoA還原酶	L00183, M12705(倉鼠) M11058(人)	Compactin
N-乙醯葡萄糖胺轉移酶	M55621(人)	突尼卡徽素
蘇胺酸t-RNA合成酶	M63180(人)	疏螺體素
Na ⁺ K ⁺ -ATP酶	J05096(人) M14511(大鼠)	烏本苷

利用 DHFR 編碼基因做為選擇用可放大之標示者的適當宿主細胞為哺乳類細胞，較佳者為鼠類骨髓瘤或倉鼠細胞。更佳者為缺少 DHFR 活性之 CHO-DUKX(ATCC CRL-9096) 及 CHO-DG44(Urlaub 等人，Cell 33 [2], 405-412, 1983) 細胞。為延展 DHFR 放大方法至其他細胞型態，可能使用編

碼對胺甲碟呤敏感性降低之蛋白質的突變體DHFR基因，聯合含正常數目之內生性野生型DHFR基因之宿主細胞(Simonson等人，1983；Wigler等人，1980；Haber等人，1982)。

本發明之另一個具體實施例亦提供經導入之編碼抗-細胞凋零基因、DHFR基因與至少一種所欲的基因之核酸序列而遺傳修飾之宿主細胞。在進一步之具體實施例，該宿主細胞之抗-細胞凋零基因，編碼任何表2所列之抗-細胞凋零基因，較佳者係bcl-xL基因，更佳者係編碼具有序列辨識號碼：1序列之bcl-xL基因。經由導入編碼bcl-xL、DHFR基因與至少一種所欲的基因之核酸序列而遺傳修飾之宿主細胞係本發明最喜歡者，因而，亦係本發明之主題。然而，通常宿主細胞係在本發明意義之內，包括至少異源之抗-細胞凋零基因、選擇用可放大標示者基因與一種所欲的基因，其中該抗-細胞凋零基因係表2之任何基因，而該選擇用可放大標示者基因係表3所列之任何基因。

「選擇用藥劑」之用語意指干擾缺少特定選擇用之基因的宿主細胞生長或存活之物質。例如，為選取轉感染細胞之例如APH(胺基配糖體磷酸轉移酶)之抗生素抗性基因之存在，使用抗生素，Geneticin(G418)。選擇用藥劑亦得包括「放大藥劑」，若該選擇用標示者基因依賴其可放大之選擇用標示者，其定義為供本文之目的做為放大該可放大基因之複製數之藥劑。例如，MTX為選擇用藥劑對DHFR基因之放大有用途。放大選擇用藥劑之實例為，但不限於

表3者。

本發明適於產生生產生物醫藥多肽/蛋白質之宿主細胞。本發明特別適於顯示增強之細胞存活力與生產力的細胞來表現高產率之大量不同的所欲基因。「所欲基因」、「選取序列」或「產物基因」在本文具相同意義，並意指任何長度之編碼所欲產物之聚核苷酸序列，亦會被指稱為「所需產物」之用語。選取序列得為全長度或切短的基因、融合或標示的基因，而且得為cDNA、基因體DNA或DNA片段，又以cDNA較佳。其得為原生序列，亦即自然產生型式或得為突變型，否則即是視需要加以修飾者。這些修飾包括將密碼子最佳化，使密碼子在選取之細胞表現最佳功能、人性化或貼標籤。選取之序列得編碼分泌的、細胞質的、細胞核、膜結合或細胞表面之多肽。「所需產物」包括蛋白質、多肽、其片段、肽、反義RNA等之全部能在選取的宿主細胞表現者。所需之蛋白質得為例如抗體、酶、胞動素、淋巴動素、附著分子、受體、衍生物或其片段，及任何其他做為激動劑或拮抗劑之多肽，與/或具有治療或診斷用途。所需蛋白質多肽之實例亦可見下文。

就定義而言，任何導入宿主細胞之序列或基因，相對於宿主細胞皆稱為「異源序列」或「異源基因」，即使該導入序列或基因與宿主之內生序列或基因一致亦同。例如，導入倉鼠宿主細胞之倉鼠bcl-xL基因在定義上即是異源基因。

利用「表現載體」，得將例如編碼BCL-xL之核酸序列之

異源基因序列導入目標細胞，以真核細胞較佳，又以哺乳類表現載體更佳。建構載體之方法係熟諳此藝者所熟知，且在不同之發表文章中皆有說明。特別之建構適當載體之技術，包括諸如啟動子、增強子、終結與聚腺嘌呤信號、選取標示物、複製起源與剪切信號等功能成分之說明，在 Sambrook 等人，1989，及其所引之參考資料皆有相當詳細之回顧。載體可能包括，但不限於質體載體、噬菌質體、粘接質體、人工/迷你-染色體，或諸如桿狀病毒、逆轉錄病毒、腺病毒、腺病毒相關病毒、疱疹單純病毒、噬菌體之病毒載體。真核表現載體典型地亦包含促成載體在細菌傳布之原核序列，諸如複製起源與在細菌中選取用之抗生素基因。多種含聚核苷酸得操作上連接於其內之選殖位置的真核表現載體係此藝所熟知，某些並得市購諸如 Stratagene, La Jolla, CA ; Invitrogen, Carlsbad, CA ; Promega, Madison, WI 或 BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA。

在一較佳具體實施例，該表現載體至少包括編碼肽/多肽的核苷酸序列轉錄與轉譯所需之調控序列的核酸序列。在一更特定具體實施例，該表現載體至少包括允許編碼抗-細胞凋零基因、選擇用可放大之標示者基因與所欲基因的核苷酸序列轉錄與轉譯(表現)之調控序列。

「調控序列」包括啟動子、增強子、終結與聚腺嘌呤信號及其他表現控制單元。得於不同細胞型態表現功能之不論誘導性或構造性調控序列，皆為此藝所知。轉錄調控單

位通常包括欲表現之基因序列的上游啟動子、轉錄起始與終結位置與聚腺嘌呤信號序列。轉錄起始位置之用語，意指相當於併入初級轉錄體亦即mRNA前驅物之第一個核酸建構物中之核酸；轉錄起始位置得與啟動子序列重疊。轉錄終結位置之用語意指通常出現在所欲基因之3'端或欲轉錄序列之延伸的核苷酸序列，其會造成RNA聚核酶終結轉錄。聚腺嘌呤信號或聚-A加成信號提供在真核RNA 3'端之特定位置的切斷與至3'端約100-200腺嘌呤核苷酸(聚A尾巴)序列核心之後轉錄加成之信號。聚腺嘌呤信號序列包括位於切斷位置上游約10-30核苷酸之AATAAA序列，加上下游序列。已知有不同之聚腺嘌呤單元，例如SV40晚與早期聚A或BGH聚A。轉錄調控單元包括每個欲表現之個別多肽的轉錄起始位置(AUG)、停止密碼子與聚A信號。在某些建構物中還包括內部之核糖體進入位置(IRES)。IRES定義如下。為將表現最佳化，不論在轉錄或轉譯層面，對欲表現之核酸序列可能需去除、加成或改變5'與/或3'未轉譯部分，以消滅潛在之額外的不適當替代轉錄起始密碼子或其他可能干擾或減少表現之序列。另外之共識核糖體結合位置可即插入開始密碼子之5'端以增強表現。為產生分泌性多肽，該選取序列通常會包括編碼可指引新合成多肽到達與穿過多肽之分泌性路徑的ER膜之引導子肽信號序列。引導子肽通常，但非全面性位於分泌蛋白質之胺基端，且在蛋白質通過ER膜後即會被信號肽酶切斷。分泌用之序列通常，但非必要包括其信號序列。在無原生

信號序列時，可將異源信號序列融合於選取之序列。無數之信號序列係此藝已知，且可得自諸如 GenBank 與 EMBL 之序列資料庫。

表現載體得包含表現抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與視情形之所欲的基因之單一轉錄單位，例如利用 IRES 單元或某些基因之插入序列指引，以在操作上將全部單元連接於相同啟動子或啟動子/增強子。替代性地，表現載體得具有一或多種轉錄單位，而前述單元得由分開之轉錄單位表現，而每個轉錄單位含相同或不同調控序列。在另一替代方式，超過一種表現載體包括一或多種轉錄單位，每個皆得用以表現前述單元，得經共轉感染使用並導入宿主細胞，或為依次序之不同回合或任何次序之轉錄的導入單位。只要轉錄單位能充分表現，得選用每個載體之任何組合。進一步之經認定為必要之單元，可能位於表現載體上諸如另外之抗-細胞凋零基因、所欲基因或選擇用標示者。本發明之先決條件為，若非在一或兩個載體之分開的轉錄單位即是在單一載體之同一轉錄單位，將抗-細胞凋零基因與選擇用可放大之標示者基因共導入，以允許抗-細胞凋零基因與選擇用可放大之標示者基因共放大。在進一步之具體實施例，該抗-細胞凋零基因、選擇用可放大之標示者基因還有所欲基因係同時併入，若非在一或兩個載體之分開的轉錄單位即是在單一載體之一或多個轉錄單位，以允許抗-細胞凋零基因與選擇用可放大之標示者基因與所欲基因之共放大。

「啟動子」意指控制其操作上連接之基因或序列轉錄的聚核苷酸序列。啟動子包括RNA聚核酶結合與轉錄起始之信號。所用啟動子會在表現涵蓋所選序列之宿主細胞的細胞型態表現功能。不同來源之包括構造性、誘導性與阻遏性啟動子之大量啟動子係此藝所熟知(並在諸如GenBank之資料庫中已經辨識)，而且可得即是或包含於選殖之聚核苷酸者(例如來自諸如ATCC以及其他市售或個別來源之貯存庫)。就誘導性啟動子而言，啟動子係對應信號而增加或減少活性。例如，含四環黴素操作者序列(tetO)之四環黴素(tet)啟動子得利用四環黴素-調控轉活化蛋白(tTA)來誘導。在有tet時，tTA與tetO之結合受抑制。其他誘導性啟動子包括jun、fos、金屬硫蛋白與熱休克啟動子，請參照例如Sambrook等人，1989與Gossen等人，1994。經辨識為高表現之強啟動子的真核啟動子為SV40早期啟動子、腺病毒之主要晚期啟動子、小鼠金屬硫蛋白-I啟動子、Rous肉瘤病毒長終端重複與人類巨細胞病毒即早期啟動子(CMV)。其他異源哺乳類啟動子包括，例如肌動蛋白絲啟動子、免疫球蛋白啟動子、熱休克啟動子。前述啟動子係此藝所熟知者。

本文所用「增強子」意指作用於啟動子以增強其操作連接之基因或編碼序列之轉譯的聚核苷酸序列。不像啟動子，增強子具相當方向性與位置獨立，且發現係在轉錄單位之5'或3'，在插入序列以及在編碼序列本身。因而，儘管實例上增強子得與啟動子在物理與功能上重疊，然而，增

強子得放在轉錄起始位置之上游或下游或與啟動子有相當距離。大量的不同來源啟動子係此藝所熟知(並在諸如GenBank之資料庫中已辨識，例如SV40增強子、CMV增強子、多瘤病毒增強子、腺病毒增強子)，而且可得即是或包含於選殖之聚核苷酸者(例如來自諸如ATCC以及其他市售或個別來源之貯存庫)。有些包括啟動子之聚核苷酸(諸如一般用之CMV啟動子)亦包括增強子。例如上述之所有的強啟動子亦包括強的增強子。

「轉錄單位」係定義建構物內之含一或多個待轉錄的基因之區域，其中，該基因內含之片段操作上彼此連接，並由單一啟動子轉錄；其結果，使不同之基因至少在轉錄上相連接。每個轉錄單位得轉錄並表現超過一個蛋白質或產物。每個轉錄單位將包括該單位所含之任何選取序列轉錄與轉譯所需之調控單位。

「操作上連接」意指其所處位置允許其以所欲方式表現功能之兩個或更多之核酸序列或序列單元。例如，若其作用為順式控制或調節連接序列之轉錄，啟動子與/或增強子即操作上連接於編碼序列。通常，操作上連接之DNA序列係連續的，但亦不盡然；然而，在需要連接兩個蛋白質編碼區域，或為分泌性引導子之情形時，將為連續且在讀取骨架上。然而，儘管操作連接之啟動子通常位於編碼序列上游，卻未必與其連續。增強子只要能增加編碼序列之轉譯，不需要是連續者。為此，其得位於編碼序列之上游或下游，甚至是有一段距離。聚腺嘌呤位置若位於編碼序

列3'端，且能使轉錄繼續由編碼序列至聚腺嘌呤信號時，其即操作上與編碼序列連接。經此藝已知之重組方法即可完成連接，例如使用PCR方法、接合於適當之限制位置或經由黏接。若無適當之限制位置，亦得使用根據傳統方式之合成寡核苷酸連接子或適應子來進行。

本文所用「表現」之用語意指宿主細胞內之異源核酸序列之轉錄與/或轉譯。宿主細胞中所需產物之表現量，得根據細胞中對應之mRNA的量或選取序列編碼所需多肽的量來決定。例如，由選取序列轉錄之mRNA得經北方污漬雜合、核糖核酸梅RNA保護、與細胞RNA之原位雜合或經PCR定量(參照 Sambrook 等人，1989；Ausubel 等人，1987 更新版)。得利用多種方法定量選取序列編碼之蛋白，例如藉 ELISA、藉西方污漬、藉放射免疫分析、藉免疫沉澱、藉分析蛋白之生物活性或藉蛋白之免疫染色並附隨 FACS 分析(參照 Sambrook 等人，1989；Ausubel 等人，1987 更新版)。

本文所用「增強表現」、「過度表現」或「高量表現」之用語意指永續與高量之異源選取序列之表現，在本發明中以導入宿主細胞之抗-細胞凋零基因，例如 bcl-xL 或 bcl-2 與/或所欲基因較佳。增強表現得利用多種方式達成。在本發明中，諸如 bcl-xL 之抗-細胞凋零基因，或任何其他表 2 所列基因加上選擇用可放大之標示者基因之表現，提供更有效之選取與辨識高量表現異源基因之宿主細胞。選擇用可放大之標示者基因不僅允許我們選取安定之轉感染

細胞株，也允許所欲之異源基因之基因放大。該核酸序列之另外複製數得整合入細胞之基因體或額外之人工染色體/迷你染色體，或得放入基因副體。此方法得結合螢光活化細胞分類(FACS)-使用例如螢光蛋白質(例如GFP)或細胞表面標示物等另外的選取標示物，以支持選取共放大抗-細胞凋零基因之重組宿主細胞。得達成增強表現(不論就其本身或組合上述可能之情形時)之其他方法包括但不限於，使用(人工)轉錄因子或以天然或合成藥劑處理細胞，以向上調控內生或異源基因表現、改善編碼BCL-xL之mRNA或蛋白質本身的安定性(例如刪除無關蛋白質生物功能之蛋白酶易感性區域)、增加mRNA轉譯或使用基因副體質體(根據做為複製起源之病毒序列，諸如SV40、多瘤病毒、腺病毒、EBV或BPV)來增加基因劑量、放大啟動子序列(Hemann等人，1994)或根據DNA連環之體內放大系統(Monaco等人，1996)。熟諳此藝者以此藝之方法，可辨識與定量已增加複製數之例如，放大的異源抗-細胞凋零基因，例如利用南方污漬分析或定量PCR方法。如何選取最適控制並進行此分析，係熟諳此藝者之知識範圍。這種方法之實例之一係本文所述之實例。

藉上述方法可依此產生宿主細胞，故其包括至少多複製數之導入的抗-細胞凋零基因，例如至少5、10、20、50或100複製數之導入的抗-細胞凋零基因。

「內部核糖體進入位置」或「IRES」說明功能上促成無關IRES之5'的基因轉譯起始之序列，並允許動物細胞中

之兩個順反子(開放讀取骨架)轉譯自單一轉錄本。IRES提供獨立之核糖體進入位置以供正在其下游之開放讀取骨架之轉譯。不像細菌mRNA之聚順反子般，亦即編碼多種不同由該mRNA依序轉譯者之多肽，動物之多數mRNA為單順反子者，並僅編碼一個蛋白質之合成。在真核細胞之聚順反子轉錄本，轉譯會由最5'端之轉譯起始位置起始，於第一個停止密碼子終止，且該轉譯本會由核糖體釋出，造成僅mRNA之第一個編碼多肽之轉譯。在真核細胞，具IRES操作上連接於第二個或後續之開放讀取骨架之聚順反子的轉錄本，其允許下游之開放讀取骨架之依序轉譯，以產生由該相同轉錄本編碼之兩種或多種多肽。該IRES得為不同長度且得自不同來源，例如腦心肌炎病毒(EMCV)或細小核糖核酸病毒。先前已有人說明不同之IRES序列及其在載體建構之用途(Pelletier等人，1988；Jang等人，1989；Davies等人，1992；Adam等人，1991；Morgan等人，1992；Sugimoto等人，1994；Ramesh等人，1996；Mosser等人，1997)。同操作上連接於IRES 3'端之下游編碼序列，不論以任何距離，都不會負面影響下游基因之表現。藉改變距離並測量做為距離函數之表現情形，可很方便決定IRES與下游基因開始處之間的最佳或許可之距離。

本文所用「插入序列」之用語意指通常出現在很多真核基因中之不同長度的非編碼核酸序列，其係經由必須依賴插入序列兩端之高度保存或靠近的序列之剪切方法，由新

轉錄之mRNA前驅物去除。通常，剪切過程需要插入序列之5'端與3'端正確切除，而且生成之mRNA的端正確接合，使得產生成熟之具蛋白質合成的適當讀取骨架之mRNA。很多剪切捐助者與剪切接受者位置，亦即在表現序列-插入序列與插入序列-表現序列邊界密接周圍之序列的特徵已決定，而且Ohshima等人，1987也提供回顧。

得利用任何此藝熟諳之技藝進行真核宿主細胞經聚核苷酸或表現載體之「轉感染」，以生成遺傳修飾細胞或基因轉殖細胞，其說明請見Sambrook等人，1989或Ausubel等人，1987(更新版)。轉感染方法包括，但不限於脂質體-媒介之轉感染、鈣-鄰酸鹽共沉澱、電孔動化、聚陽離子(諸如DEAE-葡聚糖)-媒介之轉感染、原子質體融合、病毒感染與微注射。該轉感染以安定之轉感染較佳。轉感染方法在特別之宿主細胞株與型態有利時，提供最佳之轉感染頻率與異源基因之表現。適當方法得由例行過程決定。為了安定轉感染，建構物若非整合入宿主細胞基因體即是人工染色體/迷你染色體或位於基因副體，以便於宿主細胞內安定維持。

「選擇用標示者基因」係僅允許帶該基因之細胞在相當的選取藥劑下，受專一性之順或反向選取之基因。藉由說明，抗生素抗性基因得做為正的選擇用標示者基因，其允許以相當之抗生素條件，做為正向選擇經該基因轉型之宿主細胞的標示者；至於，非轉型宿主細胞在選擇之培養條件則無法生長或存活。選擇用標示者得為正、負或雙功能

者。正向選擇用標示者，藉賦予藥物抗性或補償宿主細胞之代謝或異化缺陷而允許選取帶標示者之基因。相形之下，負向選取標示者允許帶標示者細胞受選擇性消滅。例如，利用HSV-tk基因做為標示者，可使細胞對諸如無環鳥苷與丙氧鳥苷之藥劑敏感。只要其編碼產物維持選擇用性質，本文所用之選擇用標示者基因，可包括放大之選擇用基因，包括重組之遺傳工程處理之突變體與變體、片段、功能性相當物、衍生物、同系物與原生之選擇用標示者基因之融合物。有用之衍生物，通常在與選擇用性質相關之選擇用標示者的區域或功能部位具實質序列相似性(於胺基酸層次)。目前已有多種包括雙功能(亦即正/負)標示者之標示者基因的說明，(參照例如 WO 92/08796 與 WO 94/28143)其並列於本文供參考。例如，通常用於真核細胞之選擇用基因包括，胺基配糖體磷酸轉移酶基因(APH)、高黴素磷酸轉移酶(HYG)、二氫葉酸還原酶(DHFR)、胸苷激酶(TK)、麩胺醯胺合成酶、天冬醯胺合成酶與編碼對新黴素(G418)、嘌呤黴素、組胺醇D、博萊黴素與變體鏈絲黴素(phleomycin)等之基因。

選擇亦得利用例如細胞表面標示物、細菌 β -半乳糖酶或螢光蛋白(例如綠色螢光蛋白(GFP)及其來自水母(*Aequorea victoria*)與另一種水母(*Renilla reniformis*)或其他物種之變體、紅色螢光蛋白、螢光蛋白及其來自 *Discosoma* 或其他物種之變體)藉螢光活化細胞分類(FACS)選取細胞。

根據本文之教誨，本發明亦提供在宿主細胞表現抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與至少一種所欲的基因之方法。該方法包括下列步驟：(i)將編碼抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與至少一種所欲的基因之核酸序列導入宿主細胞族群，較佳者為倉鼠宿主細胞族群，其中該基因係操作上連接於至少一種允許該基因表現之調控序列，(ii)將該細胞族群培養於可表現該基因的條件。對熟諳此藝者而言，如何將一或多種聚核苷酸導入宿主細胞之方法、教誨係如上述所例示者。甚且，本發明亦給予實例，說明一或多種基因如何與至少一種調控者序列連接，以表現該基因。適於表現該基因之宿主細胞係本發明所提及者。抗-細胞凋零基因之適當中選物列於表2。較佳者係任何編碼BCL-xL或BCL-2序列之表現，更佳者係任何編碼BCL-xL序列之表現。在該方法之進一步更佳具體實施例，共表現之宿主細胞包括任何編碼表3所列之任何一種選擇用可放大之標示者的序列。益佳之方法為，其中該宿主細胞包括編碼異源BCL-xL之序列且包括編碼表3所列之任何一種選擇用可放大之標示者的序列。最佳之方法為，其中該宿主細胞包括編碼異源BCL-xL與DHFR之序列。

本發明提供之方法，允許熟諳此藝者產生歸因於延遲或抑制計畫性之細胞死亡，而顯示增強之細胞存活之特別是為生產目的之新宿主細胞。目前已發現將細胞恆久培養於懸浮液，尤其是無血清培養液之劇烈增加細胞存活力與產

量的有利策略。根據本發明之細胞非常適於生產多種所需之多肽。本發明所述之遺傳修飾宿主細胞，不僅編碼負責增強細胞存活之基因，並視情形編碼任何編碼所需肽之任何所欲基因。據此，本發明亦提供熟諳此藝者在宿主細胞生產所欲蛋白質之方法，包括i)將本發明之任何宿主細胞培養於有利表現抗-細胞凋零基因與所欲基因之條件，與(ii)由細胞與/或細胞培養上澄液分離所欲之蛋白。本發明亦提供以該細胞生產由所欲基因所編碼之至少一種所需蛋白的用途。

所需蛋白質係那些上述者。尤其是，所需蛋白質/多肽係例如，但不限於胰島素、類胰島素生長因子、hGH、tPA；諸如間白素(IL)之胞動素，例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18，干擾素(IFN) α 、IFN β 、IFN γ 、IFN ω 或IFN τ ，腫瘤壞死因子(TNF)(諸如)TNF α 與TNF β 、TNF γ 、TRAIL、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、MCP-1與VEGF。亦包括促紅血球生成素或任何其他激素生長因子之生產。根據本發明之方法，可很有利地用來生產抗體及其片段。這種片段包括，例如Fab片段(抗原結合片段=Fab)。Fab片段係由鄰近之恆定區抓在一起之兩種鏈的可變區組成。這些可利用蛋白酶例如，以木瓜酵素由傳統抗體消化形成；但是類似之Fab片段亦可同時經由遺傳工程生產。進一步之抗體片段包括F(ab')₂片段，得利用胃蛋白酶之蛋白質切斷製備。

利用遺傳工程方法可能生產僅由重鏈(VH)與輕鏈(VL)可變區組成之縮短的抗體片段。其經指名為Fv片段(可變區片段=可變區部分之片段)。因為這些Fv片段缺少經由恆定鏈之半胱氨酸之兩個鏈的共架結合，Fv片段通常經過安定化。利用短的肽片段連接重鏈與輕鏈之可變區是有利的，例如10-30個胺基酸，以15個胺基酸較佳。以此方式取得由肽連接子連接之包括VH與VL之單一肽股。這種抗體蛋白質名為單鏈-Fv(scFv)。由前藝所知之此類Fv-抗體蛋白之實例說明請見Huston等人，(1988, PNAS 16: 5879-5883)。

近年來，已發展出製備scFv做為多體衍生物之不同策略。此係欲造成特別是具改善之藥理與生物分布性質以及增強之結合抗體親抗原性的重組抗體。為達成多體化之scFv，故將scFv製成具多體化功能部位之融合蛋白。該多體化功能部位得為例如IgG之CH3區域或諸如白胺酸-拉鍊功能部位之捲繞的捲繞結構(螺旋結構)。然而，亦有使用scFv之VH/VL區域間之作用來多體化之策略(例如雙、三與五體)。所謂雙體，熟諳此藝者亦指二價同雙體scFv衍生物。縮短scFv分子之連接子至5-10個胺基酸會形成其中有一交鏈VH/VL-重疊之同雙體。藉併入雙硫鍵架橋得將雙體抗體另外安定化。來自前藝之雙體抗體蛋白之實例可見Perisic等人(1994, Structure 2: 1217-1226)。

所謂微抗體，熟諳此藝者亦指雙價、同雙體scFv衍生物。其由包含免疫球蛋白CH3區域，較佳者為IgG之融合蛋

白組成；最佳者做為雙體化區域之IgG1係經由支點區域(例如，亦源於IgG1)與連接子區域連接於scFv。來自前藝之微抗體抗體蛋白之實例可見Hu等人(1996, Cancer Res. 56: 3055-61)。

所謂三抗體，熟諳此藝者亦指三價、同雙體scFv衍生物(Kortt等人，1997 Protein Engineering 10: 423-433)。不用連接子序列而經VH-VL直接融合之scFv衍生物會形成三體。

熟諳此藝者亦熟悉具雙-、三-或四價結構並衍生自scFv之所謂的微抗體。該多體化係由雙-、三-或四體之捲繞的捲繞結構進行(Pack等人，1993 Biotechnology 11: 1271-1277; Lovejoy等人，1993 Science 259: 1288-1293; Pack等人，1995 J. Mol. Biol. 246: 28-34)。

本發明之較佳宿主細胞係本文所說明且以增強之細胞存活為其特徵者。特別是較佳者為根據本發明之遺傳修飾的宿主細胞，包括編碼抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與至少一種所欲的基因之核酸序列。更佳者為包括多複製數之這些基因的宿主細胞，至少有抗-細胞凋零基因與選擇用可放大之標示者基因。多複製數之這些基因亦係利用本文所述方法取得，例如藉基因放大方法與/或以熟諳此藝者已知之任何其他方式(例如，導入基因之連環)提供宿主細胞多基因複製數。

適當之抗-細胞凋零基因為，但不限於表2所列者。較佳者係包括多複製數之BCL-xL編碼基因與多複製數之任何

表3所列之選擇用可放大之標示者基因的宿主細胞。最佳之選擇用可放大之標示者基因為DHFR編碼基因。

適於生產蛋白之宿主細胞係顯示過度表現抗-細胞凋零基因者，與未根據本發明方法修飾的宿主細胞之該蛋白的表現量比較，其至少增加約30倍，以至少約50倍較佳，又以至少約100倍更佳。

甚且，適當的是於培養9天後，顯示至少約50%存活力之宿主細胞族群。甚且，本發明之適當與較佳之宿主細胞是培養8天後，顯示至少約60%存活力者。甚且，適於本發明意義之宿主細胞為，於至少7天後，顯示至少約75%之細胞存活力者。在另一具體實施例，宿主細胞族群於培養6天後，以顯示至少約85%存活力為適當且較佳。在抗-細胞凋零基因編碼BCL-xL之情形，可取得於培養9天後，至少約60%；培養8天後，至少75%；培養7天後，至少約85%的存活力之細胞(例如參照圖5)。而且，與未經基因放大方法修飾之親代細胞族群比較，以經過6、7、8或9天培養後，其存活至少增加約20%之宿主細胞特別適當。更佳者係，與親代細胞族群比較，經6、7、8或9天培養後，其存活至少增加約30%之宿主細胞族群，益佳者為其存活至少增加約50%之宿主細胞族群。

在本發明意義之適當的宿主細胞或宿主細胞族群，包括倉鼠細胞，以BHK21、BHK TK⁻、CHO、CHO-K1、CHO-DUKX、CHO-DUKX B1與CHO-DG44細胞較佳，或得為任何此類細胞株之衍生物/子代。特佳者為CHO-DG44、

CHO-DUKX、CHO-K1與BHK21；更特別者為CHO-DG44與CHO-DUKX細胞。在本發明進一步之具體實施例，宿主細胞亦意指鼠類骨髓細胞，較佳者為NS0與Sp2/0或任何此類細胞株之衍生物/子代。然而，那些細胞、其他哺乳類細胞之衍生物/子代，包括但不限於人類、小鼠、大鼠、猴子與啮齒類細胞株；或真核細胞，包括但不限於酵母菌、昆蟲與植物細胞，亦可做為生產目的之本發明意義的用途。

通常係經多步驟方法，才能選取已顯示增加之存活力並表現高量所需蛋白的重組宿主細胞。選取策略有賴細胞是否由至少三個相關基因(抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因、所欲的基因、與視情形之額外的選擇用標示者基因)平行共轉感染、是否將該所欲基因導入已經顯示如本文所述之增加的細胞存活力之細胞，或是否將該抗-細胞凋零基因加上選擇用可放大之標示者基因導入已表現所欲基因之宿主細胞。

在第一種情形，其篩選或選取與所欲基因共轉感染之任何表現選擇用標示者的轉感染細胞，以辨識併入所欲基因之細胞。典型地，將轉感染宿主細胞培養於選擇用培養液，例如約2週，以選擇彼表現選擇用標示者。其後，逐步將細胞暴露於連續增量之放大的選取藥劑，至少共放大編碼抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與所欲的基因之核酸序列，直到取得充分表現之異源的所需產物以及抗-細胞凋零基因產物。每個選取步驟皆得以細胞

集中物或結合，例如有限稀釋之純種系選取來進行。若使用諸如 GFP 之適當標示者，得利用螢光活化細胞分類 (FACS) 進行選取。

在第二種情形，適當之宿主細胞係至少經所欲的基因與選擇用標示者基因轉感染；並視情形加上與先前所用的選擇用可放大之標示者基因不同之選取用可放大的基因，以產生具增強之存活力的宿主細胞。之後，至少篩選或選取那些表現與所欲基因共轉感染之選取用標示者的轉感染細胞，以辨識併入所欲基因之細胞。典型地，將轉感染宿主細胞培養於選擇用培養液，以選擇彼表現選擇用標示物者。視情形，為產生具增強之存活力的宿主細胞，選取用培養液亦得包含具先前所用之選擇用可放大之標示者基因專一性的選取用藥劑。選取步驟得以細胞集中物或結合例如，有限稀釋之純種系選取來進行。若使用諸如 GFP 之適當標示者，得利用螢光活化細胞分類 (FACS) 來進行選取。若使用另一種選擇用可放大之標示者基因進行轉感染時，視情形，亦得續行細胞之進一步的放大步驟，以至少增加所欲基因之複製數。

在第三種情形，以抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與視情形之另外一種選擇用標示者基因與/或所欲的基因，將重組之宿主細胞或已表現所欲基因之生產細胞株共轉感染；藉此，其使用與建立重組之生產細胞株不同的標示者以進行選取。將轉感染之宿主細胞株培養於選取用培養基約 2 週，進行選取，以表現新導入之標示

者基因。視情形，該選取用培養基亦含具先前使用之選取用標示者專一性之選取用藥劑，以生成重組之生產細胞株。其後，逐步將細胞暴露於連續增加量之放大的選取藥劑，至少共放大抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與視情形共轉感染之所欲的基因，直到至少取得充分表現之抗-細胞凋零基因產物為止。每個選取步驟皆得以細胞集中物或可結合，例如有限稀釋之純種系選取來進行。若使用諸如 GFP 之適當標示者，得利用螢光活化細胞分類(FACS)來進行選取。

所欲之蛋白以培養液中之分泌性多肽的形式回收較佳，或若其表現時無分泌性信號，得由宿主細胞溶胞物回收。必須由其他重組蛋白與宿主細胞蛋白純化所欲之蛋白，以取得所欲蛋白之實質均質的製備物。第一步，先將細胞與/或顆粒性細胞碎片由培養液或溶胞物去除。其後，將所欲產物由污染之可溶蛋白、多肽與核酸中純化，例如藉免疫親合力或離子交換管柱區分、乙醇沉澱、反相 HPLC、Sephadex 色析、矽膠或諸如 DEAE 之陽離子交換樹脂之色析法。通常，教導熟諳此藝者如何純化宿主細胞表現之異源蛋白的方法係此藝所熟知的。這種方法之說明請見例如 Harris 與 Angal, Protein Purification Methods, Rickwood 與 Hames 編輯, The Practical Approach Series, IRL Press (1995) 或 Robert Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag (1988)，二者皆並列於本文供參考。

本發明的通常主題之一，係提供熟諳此藝者顯示已增加

細胞存活的宿主細胞。藉任何本文所述方法，抑制或延遲計畫性之細胞死亡，例如細胞凋零，皆得增加細胞存活。增強本文意義之細胞存活的最充分方式為，提供宿主細胞多複製數之至少一種異源導入之抗-細胞凋零基因，並培養該宿主細胞於允許抗-細胞凋零基因複製數高度表現之條件。本發明亦提供至少包括5個複製數之異源抗-細胞凋零基因的宿主細胞。本發明亦提供至少包括10個複製數之異源抗-細胞凋零基因的宿主細胞。甚且，本發明亦提供宿主細胞，至少包括20個複製數；在另一個具體實施例，至少50個複製數；在進一步之具體實施例，至少100個複製數之異源抗-細胞凋零基因。本發明，提供熟諳此藝者數種如何生成此類包括多複製數之異源抗細胞凋零基因的宿主細胞之方法。那些方法包括但不限於上述者：例如(i)於選擇性藥劑驅使下，逐步放大至少一種異源導入之抗-細胞凋零基因，(ii)利用並導入上述之基因副體質體，增加至少一種異源導入之抗-細胞凋零基因之基因劑量，(iii)或使用根據例如 Monaco 等人，1996所述之DNA連環體外放大系統，其並列於本文供參考。

適當之抗-細胞凋零基因係任何表2所列者，特別係由任何指向表2之核酸序列所編碼者。較佳者為包括多複製數之編碼BCL-xL或BCL-2的基因之宿主細胞，更佳者為編碼BCL-xL，而益佳者為具序列辨識號碼：1之序列的核酸所編碼之BCL-xL。在進一步之具體實施例，以編碼BCL-2或具序列辨識號碼：2之序列的抗-細胞凋零基因較佳。亦佳

者為包括不同之抗-細胞凋零基因，例如選自表2所列者，的宿主細胞。在本發明一更佳具體實施例，混合物至少有一個複製數編碼異源之BCL-xL。

適當之宿主細胞係任何本發明所述者，例如表1所提者。更佳者為倉鼠或鼠類來源，例如鼠類骨髓瘤細胞之宿主細胞。益佳者為CHO或BHK細胞，特別係CHO-DG44、BHK21、BHK TK⁻、CHO、CHO-K1、CHO-DUKX、CHO-DUKX B1與CHO-DG44細胞，或得為任何此類細胞株之衍生物/子代。最佳者為CHO-DG44、CHO-DUKX、CHO-K1與BHK21；特別是CHO-DG44與CHO-DUKX細胞。

上述之宿主細胞得另外藉導入至少一種所欲之異源基因加以修飾；因此，本發明亦關於包括如上述之多複製數的抗-細胞凋零基因，並進一步包括至少一種所欲基因之宿主細胞。

本發明之實施除非另有說明，將使用傳統細胞生物、分子生物、細胞培養、免疫學及其類似者，且皆屬於此藝之技藝。這些技術在目前之文獻皆完全揭示。例如參照 Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)；Ausubel 等人，Current Protocols in Molecular Biology (1987更新版)；Brown編輯，Essential Molecular Biology, IRL Press (1991)；Goeddel編輯，Gene Expression Technology, Academic Press (1991)；Bothwell 等人編輯，Methods for Cloning and Analysis of

Eukaryotic Genes, Bartlett Publ. (1990) ; Wu等人，編輯，
 Recombinant DNA Methodology, Academic Press (1989) ;
 Kriegler, Gene Transfer and Expression, Stockton Press
 (1990) ; McPherson等人，PCR : A Practical Approach,
 IRL Press at Oxford University Press (1991) ; Gait編輯，
 Oligonucleotide Synthesis (1984) ; Miller & Calos編輯，
 Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (1987) ; Butler
 編輯，Mammalian Cell Biotechnology (1991) ; Pollard等
 人，編輯，Animal Cell Culture, Humana Press (1990) ;
 Freshney等人，編輯，Culture of Animal Cells, Alan R.
 Liss (1987) ; Studzinski, 編輯，Cell Growth and
 Apoptosis, A Practical Approach, IRL Press at Oxford
 University Press (1995) ; Melamed等人，編輯，Flow
 Cytometry and Sorting, Wiley-Liss (1990) ; Current
 Protocols in Cytometry, John Wiley & Sons, Inc. (更新版)
 ; Wirth & Hauser, Genetic Engineering of Animals Cells,
 in : Biotechnology 第2冊，Pühler編輯，VCH, Weinheim
 663-744 ; 一系列之 Methods of Enzymology (Academic
 Press, Inc.) 與 Harlow 等人，編輯，Antibodies : A
 Laboratory Manual (1987)。

本專利說明書所提之全部出版品與專利申請，係熟諳此
 藝者有關本發明之技術水準的指標。本文所引用之全部出
 版品與專利申請，藉此全文並列供參考，以更完整說明有
 關本發明之技藝狀態。參考下列實例，將更易了解上文之

本發明的一般描述，然而其僅用以說明本發明之某些具體實施例，無論如何皆非用以限制本發明。

實例

縮寫

CHO：中華倉鼠卵巢

DHFR：二氫葉酸還原酶

ELISA：酶連接免疫吸附分析

FACS：螢光活化細胞分離器

FITC：異硫氰酸鹽螢光素

HRPO：辣根過氧化酶

HT：次黃嘌呤與胸苷

IRES：內部核糖體進入位置

MTX：胺甲喋呤

PAGE：具炳烯醯胺膠電泳

PBS：磷酸緩衝鹽液

PI：碘化丙錠

SEAP：分泌性之鹼性磷酸酶

SDS：十二酯硫酸鈉

sICAM：可溶性細胞內附著分子

方法

1.細胞培養

將永久培養於補充以次黃嘌呤與胸苷 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 之無血清培養液之懸浮液 CHO-S-SFMII (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的 CHO-DG44/dhfr^{-/-} (Urlaub 等

人，1983)，保溫於37℃、含5%CO₂之溼度調整的恆溫箱之細胞培養燒瓶中。每2-3天，接種細胞濃度為 2×10^5 細胞/毫升，並利用CASY1細胞計數器(Schaerfe System; Germany)分析細胞懸浮液(500微升)之細胞數及存活力。存活力亦可利用錐藍染色排除來確認。單細胞選殖係利用標準稀釋技術，以96井箱子進行。為了以DHFR為基礎之選取穩定轉感染的CHO-DG44細胞之用，我們使用無次黃嘌呤與胸苷之CHO-S-SFMII培養液。將20毫微莫耳濃度MTX(Sigma, Germany)加入培養液，做為放大選取用藥劑來完成以DHFR為基礎之基因放大。做為批式培養用，將純種系以二重複接種入含12毫升適當培養液之細胞培養燒瓶(T25)，並保溫於恆溫箱中7-9天而不加任何新鮮培養液。當將CHO-DG44細胞培養於CHO-S-SFMII培養液時，補充以10%胎牛血清(Sigma, Germany)。為了繼代，每2-3天將細胞以胰蛋白酶處理(在含血清時CHO-DG44便會附著)並以 2×10^5 細胞/毫升之濃度接種於新鮮培養液中。

2. 表現載體

根據pAD-CMV載體(Werner等人，1998)之基礎載體pBID，會媒介由CMV啟動子/增強子驅使之異源基因的構造成表現。此外，pBID編碼dhfr之迷你基因做為可放大之選擇用標示者(例如參照EP 0 393 438)。由pAD-sICAM(Werner等人，1998)分離出含sICAM之HindIII/SalI片段，並選殖入pBID之相當位置(HindIII與SalI)，以生成pBID-sICAM。以如下方式將人類bcl-xL(序列辨識號碼：1,

GenBank Accession Number Z231.15)與bcl-2 (序列辨識號碼：2, GenBank Accession Number M13995)同系物選殖入表現載體。為建構pBID-bcl-2，首先將bcl-2以PCR由人類總RNA放大，並再選殖入pCR2.1-TOPO選殖載體(Invitrogen, Carlsbad, CA)。利用EcoRI，將其從那裡切出並接合入pBID之相當的EcoRI位置。利用Klenow-DNA聚合酶，將填滿之PmeI-切出的pDD6 (Fussenegger等人，1998)之IRES-bcl-xL片段，選殖入pBID-sICAM之XbaI位置生成雙順反子之pBID-sICAM-bcl-xL表現載體。利用SalI/XhoI消化與再接合，將sICAM-IRES單元由pBID-sICAM-bcl-xL削減，此載體為建構pBID-bcl-xL之基礎。PSEAP2-對照組懷藏受SV40啟動子控制之人類的分泌性鹼性磷酸酶(Clontech, Palo Alto, CA)。pGL2-對照組包含受SV40啟動子驅使之螢火蟲的蟲螢光素酶(Promega, Madison, USA)。

3. 暫時與穩定之轉感染

利用Fugene6試劑(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)進行轉感染。每次轉感染，將2毫升之含 0.6×10^6 指數生長之CHO-DG44細胞之補充以HT的CHO-S-SFMII培養液接種入6井小室之井中。每次轉感染，依照製造商之方法，使用總共4微克之質體-DNA與10微升之Fugene6試劑。暫時之轉感染進行三重複，並於轉感染48小時後收集上澄液與細胞。為了穩定之轉感染，於轉感染後72小時以無HT之CHO-S-SFMII培養液取代培養液，並於分析或選

殖前選取混合之細胞族群2週，而且每3-4天換培養液。單細胞之選殖係利用標準稀釋技術。為放大整合入宿主細胞染色體之異源基因，將衍生自混合之遺傳修飾的宿主細胞族群接種入含200微升之補充以20毫莫耳濃度MTX的無HT之CHO-S-SFMII培養液至96井小室。以3週選取放大之單細胞純種系，並擴展入細胞培養燒瓶。

4.sICAM ELISA

以標準方法(Ausubel等人，1994更新版)，利用兩個自行生產發展之sICAM專一性單株抗體(例如美國專利號碼5,284,931與5,475,091所述)，其中之一抗體為HRPO-共軛者，經ELISA定量上澄液之sICAM滴定度。以純化sICAM蛋白為標準。由Spectra Fluor Plus讀取機(TECAN, Crailsheim, Germany)分析樣本。

5.報導者酶分析

根據方法，以Promega之Luciferase Assay System(Madison, WI)決定螢火蟲的蟲螢光素酶報導者酶活性。根據方法，以Clontech之Great EscAPe SEAP套件(Palo Alto, CA)測定SEAP活性。利用Spectra Fluor Plus讀取機(TECAN, Crailsheim, Germany)分析樣本。

6.西方式污漬分析

利用西方污漬分析確認親代宿主細胞CHO-DG44與遺傳修飾的宿主細胞之BCL-2與BCL-xL之表現。以500微升溶解緩衝液(1% Triton X-100、15毫莫耳濃度NaCl、10毫莫耳濃度Tris-HCl pH 7.5加上50微克/毫升苯基甲烷磺醯氟化

物與200微升之全來自Roche Diagnostics的蛋白酶抑制劑混合物)萃取約 1×10^6 之細胞。溶胞物以13000xg離心10分鐘，使之澄清。根據製造商方法(Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany)，以Bradford分析定蛋白質濃度。然後，將萃取物貯存於 -80°C 備用。取等量蛋白(20微克)進行10% SDS-PAGE (Novex; Invitrogen, Carlsbad, CA)並於其後電污漬於硝基纖維素膜(Invitrogen, Carlsbad, CA)。以5%脫脂奶粉阻斷後，利用來自Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)之BCL-2或BCL-xL專一性的小鼠單株抗體偵測蛋白。觀測蛋白係以抗-小鼠過氧化酶-偶合之二級抗體(Dianova GmbH, Hamburg, Germany)利用ECL偵測系統(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)進行。

7.細胞凋零之定量

利用以螢光為基礎之TUNEL-分析(BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA)定量片段化之DNA量。收取 1×10^6 細胞，以PBS洗過，並以1%聚甲醛之PBS溶液於 4°C 處理15分鐘。經另外之PBS清洗步驟後，將細胞混以70%乙醇並根據製造商方法進行分析。以FACSCalibur(Becton-Dickinson)進行每個樣本之10000個細胞的FITC與PI發射情形分析。

8.標示之粒線體的流動細胞計數法

每個樣本收取500000個細胞，以PBS洗，並以1%聚甲醛之PBS溶液於 4°C 處理15分鐘。於第二次PBS清洗後，已可

進行以螢光為基礎的細胞粒線體之染色。由1毫莫耳濃度貯存液製備含500微微莫耳濃度之粒線體選取用的Mito Tracker Green FM染料(Molecular Probes, Eugene, OR)之PBS溶液。將細胞保溫於200微升，37°C之染色溶液15分鐘。其後，以PBS洗細胞兩次，懸浮於400微升PBS，並進行流動細胞計數分析。定每個樣本10000個細胞之綠色螢光發射。

實例1：暫時與安定模式之存活與產物基因之過度表現

一般傷風治療藥sICAM(可溶性胞內附著分子1)會與ICAM受體競爭鼻病毒之結合並防止此一般傷風之起源劑與進入細胞及後續感染所需之ICAM受體作用(Bella等人，1999；Marlin等人，1990)。為詳細評估抗-細胞凋零基因bcl-2與bcl-xL之暫時表現對sICAM產生之影響，將等量之sICAM編碼質體pBID-sICAM以三重複與pBID-bcl-2、pBID-bcl-xL或同基因型對照組pBID共轉感染(圖1)入缺乏dhfr之CHO-DG44。讓細胞永久生長於無血清之補充以次黃嘌呤與胸苷的CHO-S-SFMII(Invitrogen, Carlsbad, CA)之懸浮液。轉感染後48小時，利用自行生產之sICAM專一性抗體、經ELISA定量懸浮液之sICAM滴定度。在BCL-2之表現劇烈減低對照組pBID之sICAM生產至10%之情形，異位的BCL-xL之表現卻增加sICAM產率達60%(圖2A)。這些資料經SEAP表現情形(以pSEAP2-對照組交換pBID-sICAM)證實，其顯示所觀察之BCL-2與BCL-xL的生產特徵係一般性而非sICAM/BCL-2或sICAM/BCL-xL表現之組

合效果(圖 2B)。而且，為評估 BCL-2 與 BCL-xL 之表現對細胞生產參數之影響是否與分泌性產物蛋白連結、甚或受其限至，還利用胞內螢光素酶報導者進行一致性之產物分析說明(以 pGL2-對照組取代 pBID-sICAM)。螢光素酶生產特徵與前述 SEAP 及 sICAM 表現情形相關，證實這些細胞凋零-壓制基因對 CHO-DG44 細胞之總體產量之正面(bcl-xL)與負面(bcl-2)影響(圖 2C)。所需蛋白在 BCL-2 表現後之減量生產情形，在適應懸浮液生長之 COS-7 細胞(ATCC CRL-1651)、定錨依賴之 CHO-K1 (ATCC CCL-61)與 CHO-DUKX 細胞(ATCC CRL-9096)亦發現。

儘管暫時轉感染實驗對異源基因在廣泛圍之細胞型態與複製數之代謝工程能力給我們高度可信賴之資料，卻僅有穩定之混合族群得無疑地證實所觀察之表現型。因而，生成每個 pBID-sICAM/pBID-bcl-2、pBID-sICAM/pBID-bcl-xL、pBID-sICAM/pBID-組態之 6 個混合族群之 sICAM 滴定度情形。於無 HT 之 CHO-S-SFMII 培養液利用以 DHFR 為基礎之選取來選取表現異源基因之轉感染的細胞族群。圖 3 顯示在 3 天培養期中由那些穩定轉感染之混合族群所生產之 sICAM 的絕對產量。每個值表示經 5 次繼代後所有族群之平均 sICAM 產量，而每次繼代皆取一些樣本。如暫時轉感染可見者，BCL-2 之表現對 sICAM 產量有負面影響，滴定度減低達 50%；至於與工程處理僅供 sICAM 表現之對照組族群比較，BCL-xL 之表現增加此一般傷風治療劑的總體產率達 30%。這些在暫時與穩定表現組態所得之相關性

結果，建議我們欲設計抗-細胞凋零之工程策略，應僅考慮追隨所得之存活決定者的小心分析。

實例2：bcl-2與bcl-xL之dhfr-放大的基因表現對穩定之生產sICAM的細胞純種系之存活力與抗-細胞凋零之效果

為評估抗-細胞凋零工程處理對無血清之批式培養的基因轉殖CHO-DG44細胞株之效果，選取由CHO-DG44與pBID-sICAM/pBID-bcl-2、pBID-sICAM/pBID-bcl-xL或pBID-sICAM/pBID載體組合穩定共轉感染、且來自6種混合之細胞族群的個別最高生產sICAM之細胞族群做進一步分析。利用於96井小室之限制的細胞稀釋，進行兩個單細胞之無性繁殖步驟，一個係在無HT之CHO-S-SFMII培養液(非放大之細胞純種系)；另一個包括單回合之MTX-誘發之DHFR-為基礎之放大，且以20毫微莫耳濃度之MTX補充無HT之CHO-S-SFMII培養液(放大之細胞純種系)。利用ELISA篩選最高之sICAM生產者之細胞純種系，每個基因組態選取兩個最好之純種系做進一步分析。除了pBID-sICAM外，這些細胞純種系亦含下列之一的建構物：(i)位於HMNI-1、HMNI-2(未放大)及HMNI-3、HMNI-4(已放大)之pBID (僅有載體之對照組)，(ii)位於HMNIBC-1、HMNIBC-2(未放大)及HMNIBC-3、HMNIBC-4(已放大)之pBID-bcl-2，(iii)位於HMNIBX-1、HMNIBX-2(未放大)及HMNIBX-3、HMNIBX-4(已放大)之pBID-bcl-xL。

每天偵測批式培養之細胞培養瓶中全部的細胞純種系，持續一週。如圖4可見，所有非放大之細胞純種系，包括

僅有載體之對照組，展現類似之存活力情形，此清楚顯示 BCL-2 與 BCL-xL 對存活力之效果可忽視。於第 7 天，存活力在所有情形皆降至約 30-40%。然而，在含放大之異源基因的純種系之下降期，可發現細胞存活力明顯較高。在有關細胞死亡之保護，BCL-xL 明顯比 BCL-2 表現好 (圖 5)。在表現 BCL-xL 之細胞株 (HMNIBX-3/4)，於第 9 天仍有 70% 之活細胞，比較表現 BCL-2 之細胞株 (HMNIBC-3/4) 之約 60% 與基因轉殖對照組細胞株 (HMNI-3/4) 之無活細胞。與存活力增加相關，使用螢光為基礎之 TUNEL 分析，於 2、4 及 6 天時評估放大之細胞純種系，亦顯示起始細胞死亡程序之細胞百分比劇烈減少 (圖 6)。至於，在第 2 天時全部之基因轉殖組態幾乎皆未發現凋零之細胞，而第 4 天時則可見凋零之細胞明顯增加。增加最少者達 5%，為表現 BCL-xL 之細胞；隨之為表現 BCL-2 之細胞為 10%；至於基因轉殖之對照組細胞的凋零細胞幾乎達 30%。於第 6 天時，不同的轉感染細胞株間之差異更明顯。BCL-xL 之細胞凋零抑制潛力與 BCL-2 比較至少高 3 倍；因為在此階段後者 BCL-xL 之細胞凋零細胞達 30%，而前者僅 10%。在未表現任何異源抗-細胞凋零基因之基因轉殖對照組細胞，細胞凋零細胞之數目則已達 60%。

為證實抗-細胞凋零基因之放大狀態，遂進行 BCL-2 與 BCL-xL 指向之西方污漬分析。圖 7 顯示僅基因轉殖對照組細胞株 HMNI-1 之基準 BCL-2 (圖 7A) 與 BCL-xL (圖 7B) 表現量接近偵測極限，並與親代 CHO-DG44 細胞者相當。此顯

示存活之基因表現並未受以DHFR為基礎之選取向上調控，與較早之追隨G418媒介的選取報告之偏向增強的存活之偏見結果有所不同(Tey等人，2000a)。與基因轉殖對照組HMNI-1和親代CHO-DG44(圖12A與12B，HMNIBC-3/4與HMNIBX-3/4)比較，利用以DHFR為基礎之放大，BCL-2與BCL-xL之表現情形得分別增加至少80-100倍與30-40倍。在非放大之基因轉殖細胞株，BCL-2與BCL-xL之表現量增加不到10倍。此蛋白量明顯很低係為充分之抗-細胞凋零保護效果(圖5)。以具雙順反子組態之表現載體--pBID-sICAM-bcl-xL轉感染之細胞可得相當結果。在此轉譯單位之第一個順反子的sICAM之遞增轉譯，其起始係古典之cap-依賴型；而第二個順反子之bcl-xL的cap-依賴型，係由衍生自腦心肌炎病毒之IRES單元所驅使。選擇用可放大之標示者dhfr係包含在相同載體之分開的轉譯單位。

BCL-2與BCL-xL媒介之抗-細胞凋零工程之詳細分析例示這些存活決定者之高量表現係必須的，以便在永久培養於無血清條件之CHO-DG44細胞展現任何明顯之保護效果。

實例3：利用斑點污漬分析定基因之複製數

整合入轉感染宿主細胞CHO-DG44之異源抗-細胞凋零基因bcl-2與bcl-xL之複製數係利用斑點污漬分析來決定。為此目的，利用市售Qiagen之Genomic Blood & Tissue Kit(Hilden, Germany)，根據製造商所述方法，由基因轉殖與親代CHO-DG44細胞株分離基因體DNA。將通常介於0.5-

15微克之不同量基因體DNA之溶於鹼性緩衝液者，使用附著於抽器裝置之歧管(其細節請見Ausubel等人，1994，更新版)二重複施用於帶正電之Hybond N+尼龍膜(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)。應點斑點之基因體DNA的量，視其後將由雜合之探針搜尋之目標序列的相對量而定。然後進行雜合分析以決定污漬之DNA製備物之bcl-2與bcl-xL序列的量。遵照Gene Images任意主導prime標識模式(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)之方法，產生任意主導之FITC-dUTP標示之bcl-2與bcl-xL專一性探針；若非利用由EcoRI消化pBID-bcl-2所得bcl-2專一性之640鹼對片段，即是利用PvuII/BclI消化pBID-bcl-xL之bcl-xL專一性730鹼對片段做為標識反應之模板。根據Gene Images任意主導prime標識模式之方法，雜合係於雜合烤箱中以65℃進行隔夜。雜合後濾膜以0.2xSSC/0.1% SDS，65℃洗兩次、各20分鐘，然後根據Gene Images CDP-Star偵測模組(Amersham Biosciences)，繼續抗體發展與偵測。信號定量係利用VDS-CL Imager System(Amersham Biosciences)。分離自基因轉殖細胞之基因體DNA的bcl-2或bcl-xL專一性信號之信號強度係與固定分子數之分別為pBID-bcl-2或pBID-bcl-xL表現質體(根據質體分子量為基礎計算之數目)之標準曲線比較，且用來估計基因體DNA樣本內的目標DNA之絕對量。因為內生性bcl-2與bcl-xL基因，親代細胞株CHO-DG44之基因體DNA的雜合信號將由轉殖基因信號減去。然後將基因轉殖樣本之複

製數除以每個樣本之DNA量，以取得每個細胞之基因複製數並根據每個細胞5 pg之DNA量，乘以5 pg。為正常化所比較之樣本間DNA的量，於脫去濾器上之第一種探針後，在相同濾器之第二次雜合反應中以部分倉鼠的mbh-1基因(myc-為基礎之排列的同系物1)為內部控制基因探針。

藉此方式，可決定經由導入與放大bcl-2或bcl-xL基因(例如，如本文所述者)之遺傳修飾的宿主細胞，包括至少5、10、20、50或100複製數之異源bcl-2與bcl-xL基因者。

實例4：藉添加血清調節粒線體數目

為明顯影響生長於無血清條件之CHO-DG44的存活，很清楚的需要高BCL-2或BCL-xL劑量，起始我們思考是否粒線體之量與因而對計畫性細胞死亡之敏感性係視血清而定。因為發現血清係細胞凋零之重要保護因素，而且粒線體係細胞死亡調節者(類似BCL-2與BCL-xL)之主要平台，此假設更令人信服。

以決定血清依賴型之特定粒線體量為焦點，CHO-DG44細胞，若非培養於無血清之CHO-S-SFMII培養液的懸浮液，即是培養於補充以10% FCS之CHO-S-SFMII中成附著細胞。於所述條件培養2週後，兩種培養之細胞皆利用MitoTracker Green FM-粒線體專一性之螢光染料描述其特定粒線體含量。因MitoTracker Green FM會以膜電位依賴方式在粒線體累積，故其係定量這些胞器之良好工具(Metivier等人，1998)。與培養在含血清之細胞比較，粒線體專一性染色在無血清之細胞培養中明顯增加。FACS-

媒介之分析定量特定粒線體含量激發達3倍(圖8)。因無血清條件下粒線體清楚放大，故簡明建議血清依賴型細胞株之成功抗-細胞凋零工程處理需增加BCL-2或BCL-xL表現量以補足與這些胞器相關之細胞凋零機制的特定增加。

引用參考資料

- Adam, M.A. et al., *J Virol* 1991, 65, 4985 - 4990
- Al-Rubeai, M. et al., *Curr Opin Biotechnol* 1998, 9, 152-156
- Ausubel, F.M. et al., *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. 1994 (updated)
- Bella, J. et al., *J Struct Biol* 1999, 128, 69-74
- Boise, L.H. et al., *Cell* 1993, 74, 597 - 608
- Bothwell et al. eds., *Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes*, Bartlett Publ., 1990
- Brown ed., *Essential Molecular Biology*, IRL Press, 1991
- Butler ed., *Mammalian Cell Biotechnology*, 1991
- Chang, B.S. et al., *Embo J* 1997, 16(5), 968 - 977
- Chung, J. D. et al., *Biotechnol Bioeng* 1998, 57, 164-171
- Cotter, T. G. et al., *Trends Biotechnol* 1995, 13, 150-155
- Davies, M.V. et al., *J Virol* 1992, 66, 1924 - 1932
- deZengotita, V.M. et al., *Biotechnol Bioeng* 2000, 69, 566 - 576
- Fassnacht, D. et al., *Cytotechnology* 1998, 26, 219-225
- Figuerola, B. Jr. et al., *Biotechnol Bioeng* 2001, 73, 716-723
- Follstad, B.D. et al., *Eur J Biochem* 2000, 267, 6534-6540
- Franek, K. et al., *J FEBS Lett* 1991, 284, 285-287
- Franek, F. et al., *Immunol Lett* 1996, 52, 139-144.
- Freshney et al., eds., *Culture of Animal Cells*, Alan R. Liss, 1987
- Fussenegger, M. et al., *Nat Biotechnol* 1998, 16, 468-472
- Fussenegger, M. et al., *Cytotechnology* 2000, 32, 45-61
- Gait ed., *Oligonucleotide Synthesis*, 1984
- Goeddel ed., *Gene Expression Technology*, Academic Press, 1991
- Gossen, M. et al., *Curr Opi Biotech* 1994, 5, 516 - 520
- Goswami, J. et al., *Biotechnol Bioeng* 1999, 62, 632-640
- Green, D.R. et al., *Science* 1998, 281, 1309 - 1312
- Haber, D.A. et al., *Somatic Cell Genetics* 1982, 8, 499 - 508
- Harlow et al., eds., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1987
- Harris and Angal, *Protein Purification: A Practical Approach*, Pickwood and Hames, eds., IRL Press, 1995

- Hemann, C. et al., *DNA Cell Biol* **1994**, *13*(4), 437 - 445
- Hu et al., *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3055 - 3061
- Huston C. et al., *PNAS* **1988**, *85*(16) 5879 - 5883
- Itoh, Y. et al., *Biotechnol Bioeng* **1995**, *48*, 118-122
- Jang, S.K. et al., *J Virol* **1989**, *63*, 1651 - 1660
- Kaufman, R.J., *Methods in Enzymology* **1990**, *185*, 537 - 566
- Kortt et al., *Protein Engineering* **1997**, *10*, 423 - 433
- Kriegler, Gene Transfer and Expression, Stockton Press, **1990**
- Kyte, J. et al., *J Mol Biol* **1982**, *157*, 105 - 132
- Laken, H.A. et al., *Curr Opin Biotechnol* **2001**, *12*, 175 - 179
- Loyvejoy et al., *Science* **1993**, *259*, 1288 - 1293
- Marlin, S. D. et al., *Nature* **1990**, *344*, 70-77
- Mastrangelo, A. J. et al., *Trends Biotechnol* **1998**, *16*, 88-95
- Mastrangelo, A.J. et al., *Biotechnol Bioeng* **1999**, *65*, 298-305
- Mastrangelo, A. J. et al., *Biotechnol Bioeng* **2000a**, *67*, 555-564
- Mastrangelo, A. J. et al., *Biotechnol Bioeng* **2000b**, *67*, 644-554
- McPherson et al., PCR: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, **1991**
- Melamed et al., eds., Flow Cytometry and Sorting, Wiley-Liss, **1990**
- Mercille, S. et al., *Biotechnol Bioeng* **1994**, *44*, 1140-1154
- Mercille, S. et al., *Biotechnol Bioeng* **1999a**, *63*, 529-543
- Mercille, S. et al., *Biotechnol Bioeng* **1999b**, *63*, 516-528
- Metivier, D. et al., *Immunol Lett* **1998**, *61*, 157-163
- Miller & Calos eds., Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, **1987**
- Monaco, L. et al., *Gene* **1996**, *180*, 145 - 150
- Moore, A. et al., *Cytotechnology* **1995**, *17*, 1-11
- Morgan, R.A. et al., *Nucl Acids Res* **1992**, *20*, 1293 - 1299
- Mosser, D.D. et al., *BioTechniques* **1997**, *22*(1), 150 - 156
- Ohshima, Y. et al., *J Mol Biol* **1987**, *195*, 247 - 259
- Pack et al., *Biotechnology* **1993**, *11*, 1271 - 1277
- Pack et al., *J. Mol. Biol.* **1995**, *246*, 28 - 34
- Pan, G. et al., *J Biol Chem* **1998**, *273*, 5841-5845
- Pelletier, J. et al., *Nature* **1988**, *334*, 320 - 325
- Perisic O, et al., *Structure* **1994**, *2*, 1217 - 1226
- Pollard et al., eds., Animal Cell Culture, Humana Press, **1990**
- Ramesh, N. et al., *Nucl Acids Res* **1996**, *24*, 2697 - 2700
- Reynolds, J.E. et al., *Exp Cell Res* **1996**, *225*, 430 - 436
- Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., **1989**

- Sanfeliu, A. et al., *Biotechnol Bioeng* 1999, 64, 46-53
- Sanfeliu, A. et al., *Biotechnol Bioeng* 2000, 70, 421-427
- Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, 1988
- Simonson, C.C. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80, 2495 - 2499
- Simpson, N. H. et al., *Biotechnol Bioeng* 1997, 54, 1-16
- Simpson, N.H. et al., *Biotechnol Bioeng* 1998, 59, 90-98
- Simpson, N.H. et al., *Biotechnol Bioeng* 1999, 64, 174-186
- Studzinski, ed., Cell Growth and Apoptosis. A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press 1995
- Sugimoto et al., *Biotechnology* 1994, 12, 694 - 698
- Terada, S. et al., *Cytotechnology* 1997, 25, 17-23
- Tey, B. T. et al., *Biotechnol Bioeng* 2000a, 68, 31-43
- Tey, B. T. et al., *J Biotechnol* 2000b, 79, 147-159
- Tusjimoto, Y., *Genes to Cell* 1998, 3, 697 - 707
- Urlaub, G. et al., *Cell* 1983, 33, 405-412
- Werner, R. G. et al., *Arzneim.-Forsch./Drug.Res.* 1998, 48, 870-880
- Wigler, M. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77, 3567 - 3570
- Wirth and Hauser, Genetic Engineering of Animals Cells, in: *Biotechnology Vol. 2*, Pühler ed., VCH, Weinheim 663-744
- Wu et al., eds., *Recombinant DNA Methodology*, Academic Press (1989)
- Wyllie, A.H. et al., *Int Rev Cytol* 1980, 68, 251 - 306
- Zanghi, J. A. et al., *Biotechnol Bioeng* 1999, 64, 108-119
- Zanghi, J. A. et al., *Biotechnol Prog* 2000, 16, 319-325

【圖式簡單說明】

圖 1 圖示供轉感染 CHO-DG44 細胞之表現載體設計。P/E 意指含增強子與啟動子單元之組合單位，P 為啟動子單位而 T 為轉譯之傳信者 RNA 聚腺嘌呤化所需之轉譯終止位置。sICAM 意指所欲基因，而 bcl-2 與 bcl-xl 指抗細胞凋零基因。dhfr 意指可放大之選擇用標示者二氫葉酸還原酶。箭頭指示轉錄單位內之轉錄起始位置。

圖 2 比較短暫轉感染之 CHO-DG44 細胞於轉感染後 48 小時之表現情形。圖 2A 之 pBID-sICAM、圖 2B 之 pSEAP2-對照組 (Clontech, Palo Alto, CA) 與圖 2C 之 pGL2-對照組 (Promega, Madison, WI) 係經 pBID-bcl-2、pBID-bcl-xL 或

對照組 pBID 轉感染。

圖 3 顯示經 pBID-sICAM 與 pBID、pBID-bcl-2 或 pBID-bcl-xL 共轉感染、選取與培養於無黃嘌呤/胸苷的 CHO-S-SFMII 培養液 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 之 CHO-DG44 之安定混合族群 sICAM 之表現情形。每個值都是在 3 天培養期、5 次繼代期之 6 個混合族群之平均 sICAM 產量。

圖 4 評估選殖之細胞株 HMNI-1/2 (經 pBID-sICAM 與 pBID 共轉感染之對照組細胞株)、HMNIBC-1/2 (經 pBID-sICAM 與 pBID-bcl-2 共轉感染) 與 HMNIBX-1/2 (經 pBID-sICAM 與 pBID-bcl-xL 共轉感染) 於 7 天批式培養期使用錐藍染料排除之存活力。選取重組之 CHO-DG44 細胞並培養於無黃嘌呤/胸苷的 CHO-S-SFMII 培養液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。

圖 5 顯示使用錐藍染料排除之存活力百分比情形，胺甲碟呤放大之細胞選殖系 HMNI-3/4 (經 pBID-sICAM 與 pBID 共轉感染之對照組細胞株)、HMNIBC-3/4 (經 pBID-sICAM 與 pBID-bcl-2 共轉感染) 與 HMNIBX-3/4 (經 pBID-sICAM 與 pBID-bcl-xL 共轉感染) 於 9 天批式培養於無黃嘌呤/胸苷，但含 20 毫微莫耳濃度之 MTX 的 CHO-S-SFMII 培養液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。

圖 6 顯示表現 BCL-2 或 BCL-xL 之胺甲碟呤放大的 CHO-DG44 細胞選殖系之細胞凋零特徵。使用螢光為基礎之 TUNEL 分析 (BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA)，於第 2、4 與 6 天時評估 HMNI-3/4 (經 pBID-sICAM 與 pBID

共轉感染之對照組細胞株)、HMNIBC-3/4(經 pBID-sICAM 與 pBID-bcl-2 共轉感染)與 HMNIBX-3/4(經 pBID-sICAM 與 pBID-bcl-xL 共轉感染)之批式培養於無黃嘌呤/胸苷, 但含 20 毫微莫耳濃度之 MTX 的 CHO-S-SFMII 培養液 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 之凋零細胞百分比。

圖 7 顯示 BCL-2 與 BCL-xL 在不同重組之 CHO-DG44 細胞選殖系之西方污漬分析結果。其比較 BCL-2(圖 7A) 與 BCL-xL(圖 7B) 在未放大 (BCL-2 : HMNIBC-1/2 ; BCL-xL : HMNIBX-1/2) 或放大 (BCL-2 : HMNIBC-3/4 ; BCL-xL : HMNIBX-3/4) 之表現單順反子組態之抗-細胞凋零基因之細胞品系的表現。抗-細胞凋零基因之表現係與親代 (CHO-DG44) 與僅生產-sICAM(HMNI-1) 對照組的細胞株做比較。蛋白質係利用購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) 之具 BCL-2 或 BCL-xL 專一性之小鼠單株抗體與抗-小鼠過氧化酶偶合之二級抗體 (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) 來偵測。

圖 8 顯示以 MitoTracker 為基礎之培養於有或無血清之 CHO-DG44 的粒線體量之定量 (Molecular Probes, Eugene, OR)。FACS 媒介之粒線體計數係在培養於含 10% 血清 (灰線) 與不含血清 (黑線) 之 CHO-DG44 細胞進行。

序列表

<110> Boehringer Ingelheim Pharma KG

<120> 具有改良存活性質之宿主細胞及該細胞之產生方法。

<130> 相關案申請案號(序列方法案件 1-1314)

<140> 092106773

<141> 2003-03-26

<150> 02007144-5

<151> 2002-03-28

<160> 2

<170> PatentIn 2.1 版軟體

<210> 1

<211> 926

<212> DNA

<213> 人類的

<300>

<400> 序列辨識號碼：1

```
gaatctcttt ctctcccttc agaattttat cttggctttg gatcttagaa gagaatcact 60
aaccagagac gagactcagt gagtgagcag gtgttttggg caatggactg gttgagccca 120
tccctattat aaaaatgtct cagagcaacc gggagctggt ggttgacttt ctctcctaca 180
agctttccca gaaaggatac agctggagtc agtttagtga tgtggaagag aacaggactg 240
```

```
agggcccgaga agggactgaa tcggagatgg agacccccag tgccatcaat ggcaacccat 300
cctggcacct ggcagacagc cccgcggtga atggagccac tgcgcacagc agcagtttgg 360
atgcccggga ggtgatcccc atggcagcag taaagcaagc gctgagggag gcaggcagc 420
agtttgaact gcggtaccgg cgggcattca gtgacctgac atcccagctc cacatcaccc 480
cagggacagc atatcagagc tttgaacagg tagtgaatga actcttccgg gatggggtaa 540
actgggggtcg cattgtggcc tttttctcct tcggcggggc actgtgctgt gaaagcgtag 600
acaaggagat gcaggatttg gtgagtcgga tcgcagcttg gatggccact tacctgaatg 660
accacctaga gccttggtatc caggagaacg gcggctggga tacttttgtg gaactctatg 720
ggaacaatgc agcagccgag agccgaaagg gccaggaacg cttcaaccgc tggttcctga 780
cgggcatgac tgtggccggc gtggttctgc tgggctcact cttcagtcgg aaatgaccag 840
acactgacca tccactctac cctcccaccc ccttctctgc tccaccacat cctccgtcca 900
gccgccattg ccaccaggag aaccgg                                     926
```

<210> 2

<211> 911

<212> DNA

<213> 人類的

<400> SEQ ID NO:2

tgattgaaga	cacccccctcg	tccaagaatg	caaagcacat	ccaataaaaat	agctggatta	60
taactcctct	tctttctctg	ggggccgtgg	ggtgggagct	ggggcgagag	gtgccgttgg	120
cccccgttgc	ttttcctctg	ggaaggatgg	cgcacgctgg	gagaacgggg	tacgacaacc	180
gggagatagt	gatgaagtac	atccattata	agctgtcgca	gaggggctac	gagtgggatg	240
cgggagatgt	gggcgcgcgc	ccccggggg	ccgccccgc	accgggcatc	ttctcctccc	300
agcccgggca	cacgccccat	ccagccgcat	cccgcgaccc	ggtcgccagg	acctcgccgc	360
tgcagacccc	ggctgcccc	ggcgccgcgc	cggggcctgc	gctcagcccc	gtgccacctg	420
tgggccacct	ggcctccgc	caagccggcg	acgacttctc	ccgccgctac	cgcggcgact	480
tcgccgagat	gtccagccag	ctgcacctga	cgccttcac	cgcgcgggga	cgctttgcca	540
cggtggtgga	ggagctcttc	agggacgggg	tgaactgggg	gaggattgtg	gccttctttg	600
agttcggtgg	ggtcatgtgt	gtggagagcg	tcaaccggga	gatgtcgccc	ctggtggaca	660
acatcgccct	gtggatgact	gagtacctga	accggcacct	gcacacctgg	atccaggata	720
acggaggctg	ggtaggtgca	tctggtgatg	tgagtctggg	ctgaggccac	aggtccgaga	780
tcgggggttg	gagtgcgggt	gggctcctgg	gcaatgggag	gctgtggagc	cggcgaaata	840
aaatcagagt	tgttgcttcc	cggcgtgtcc	ctacctctc	ctctggacaa	agcgttcact	900
cccaacctga	c					911

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98132019

※申請日期：92.3.26

原申請案號：092106773

※IPC 分類：

C12N15/63 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

具有改良存活性質之宿主細胞及該細胞之產生方法

HOST CELLS HAVING IMPROVED CELL SURVIVAL PROPERTIES
AND METHODS TO GENERATE SUCH CELLS

二、中文發明摘要：

本發明係有關包括增加量之活性抗-細胞凋零基因之遺傳工程處理的哺乳類宿主細胞與產生此類細胞之方法。更特別地，本發明係關於調節宿主細胞內抗-細胞凋零活性基因的量之方法；以及關於利用延遲/抑制此類細胞之自然發生的計畫性細胞死亡而顯示增加之細胞存活力的宿主細胞。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to genetically engineered mammalian host cells comprising an enhanced level of active anti-apoptosis genes and methods to generate such host cells. More particularly, the invention pertains to methods which modulate the level of anti-apoptosis active genes within host cells and to host cells showing an enhanced cell viability by delaying/inhibiting programmed cell death naturally occurring in such cells.

八、圖式

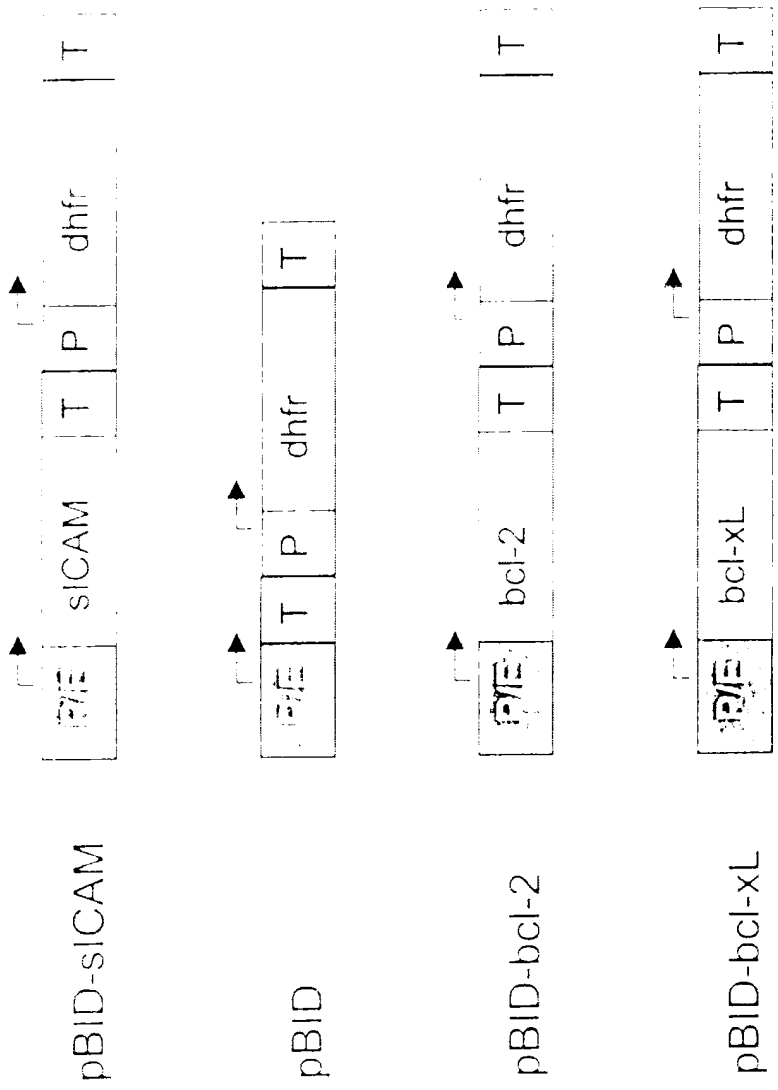
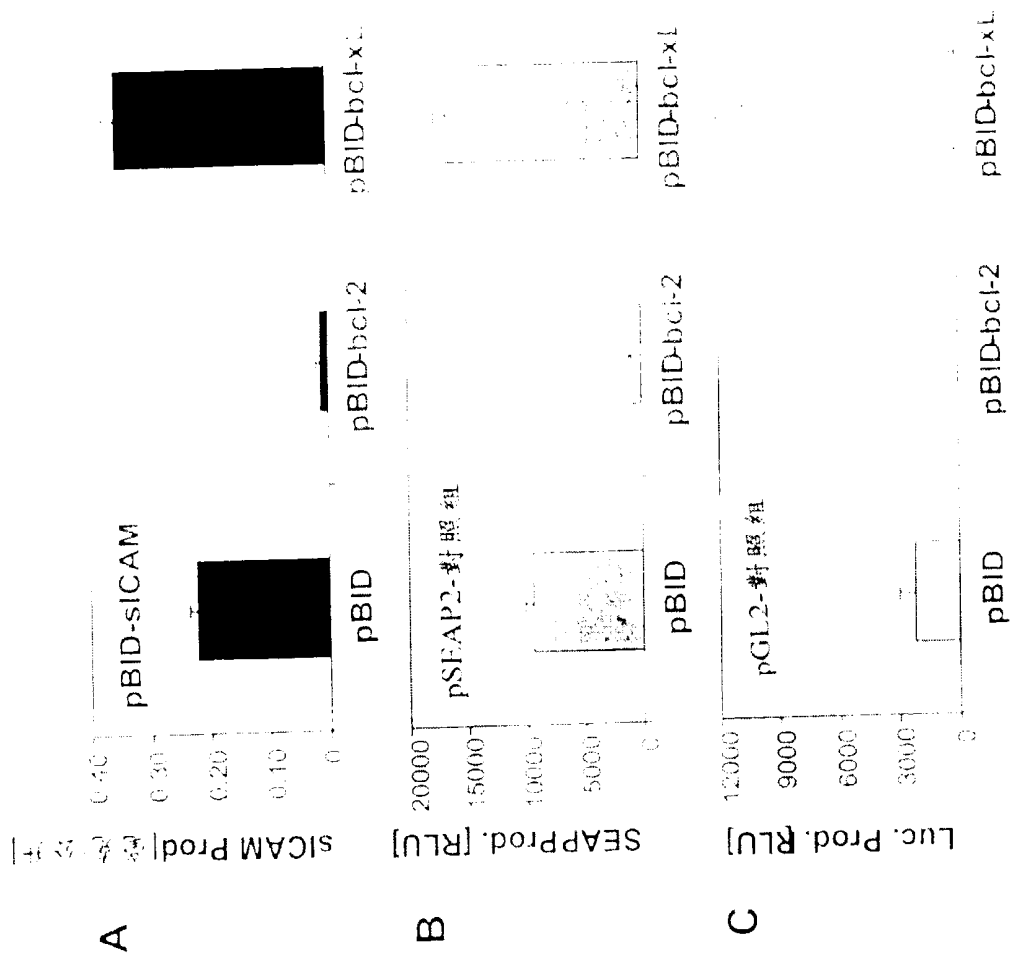


圖 1



轉感染質體

圖 2

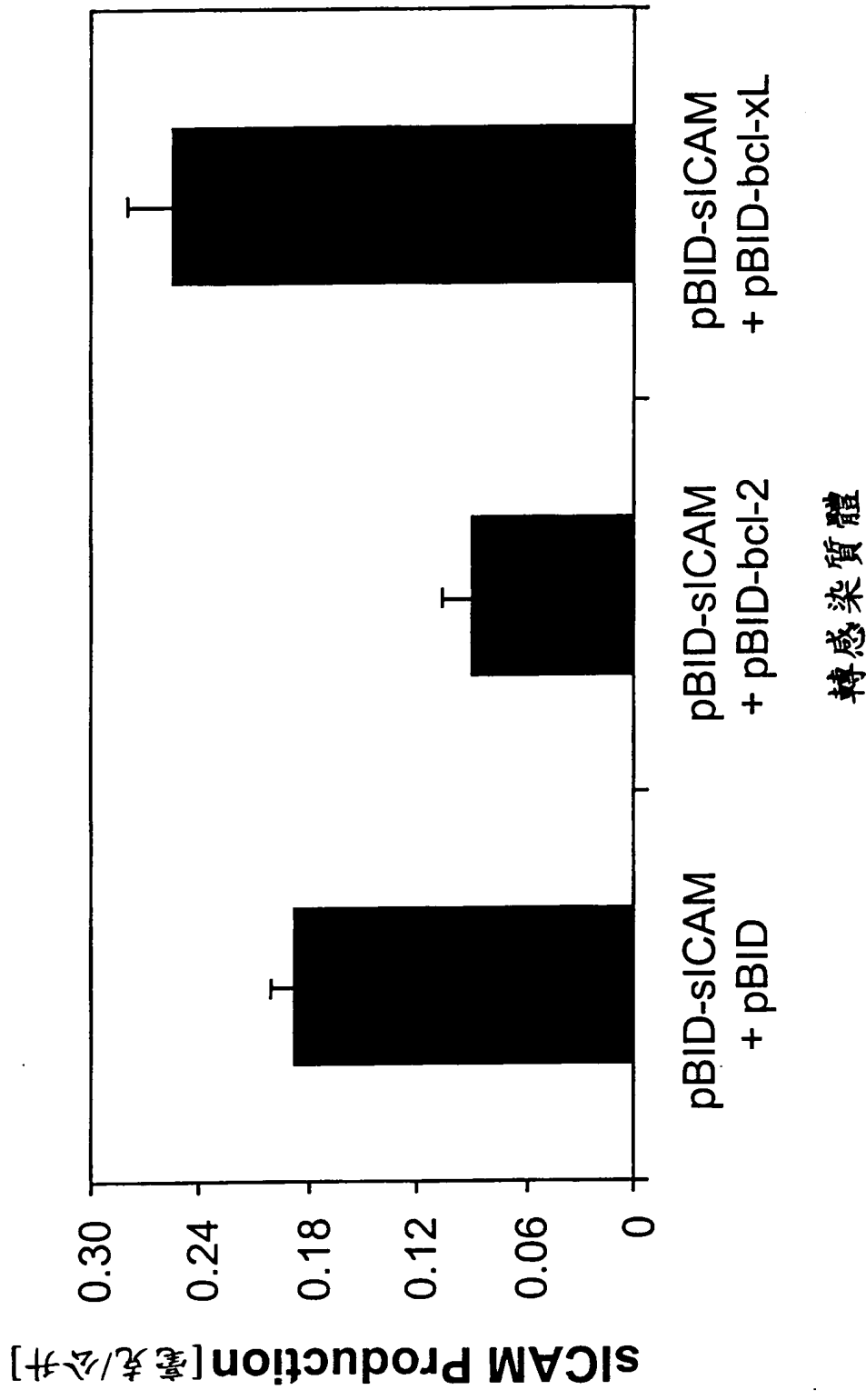


圖 3

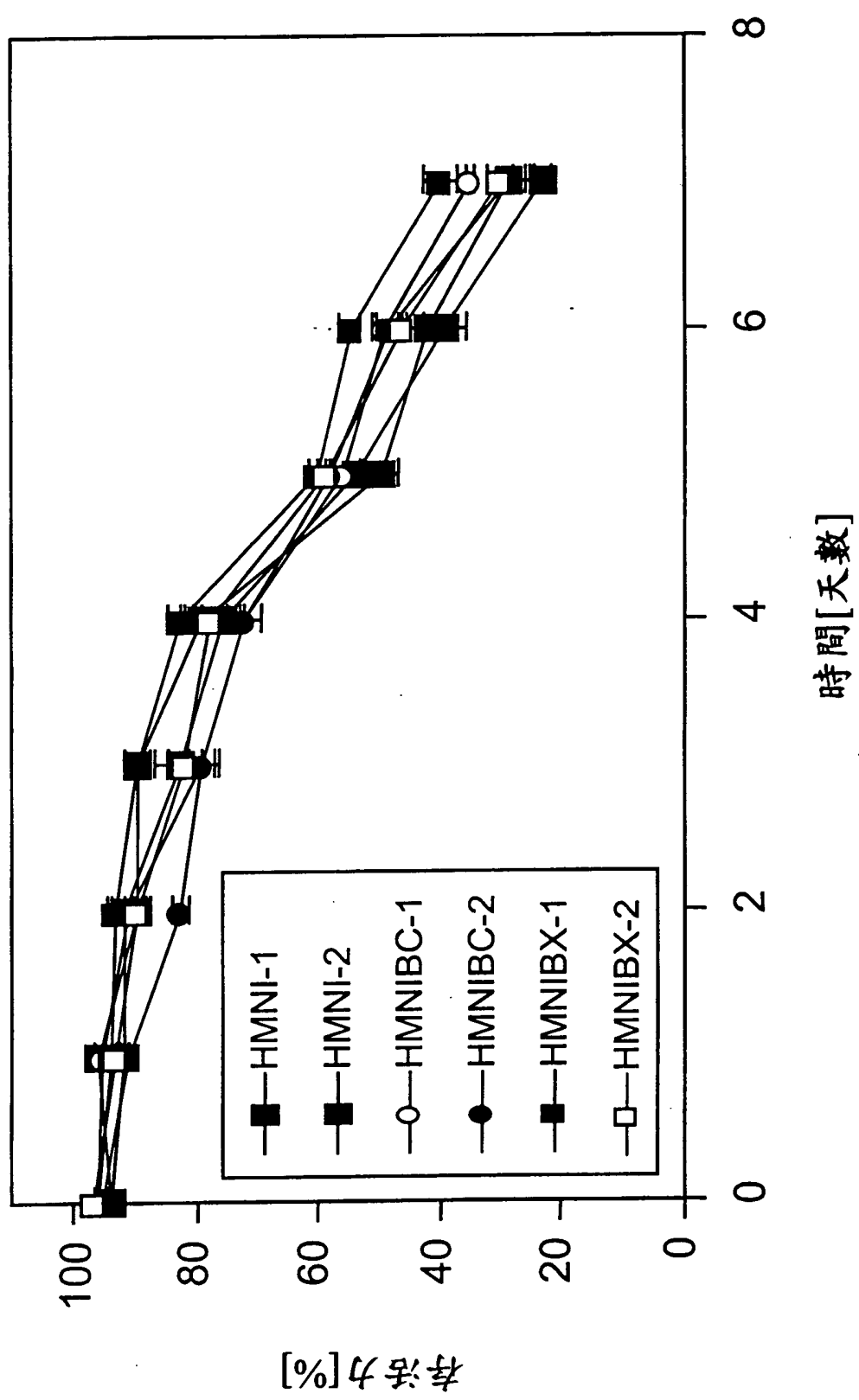


圖 4

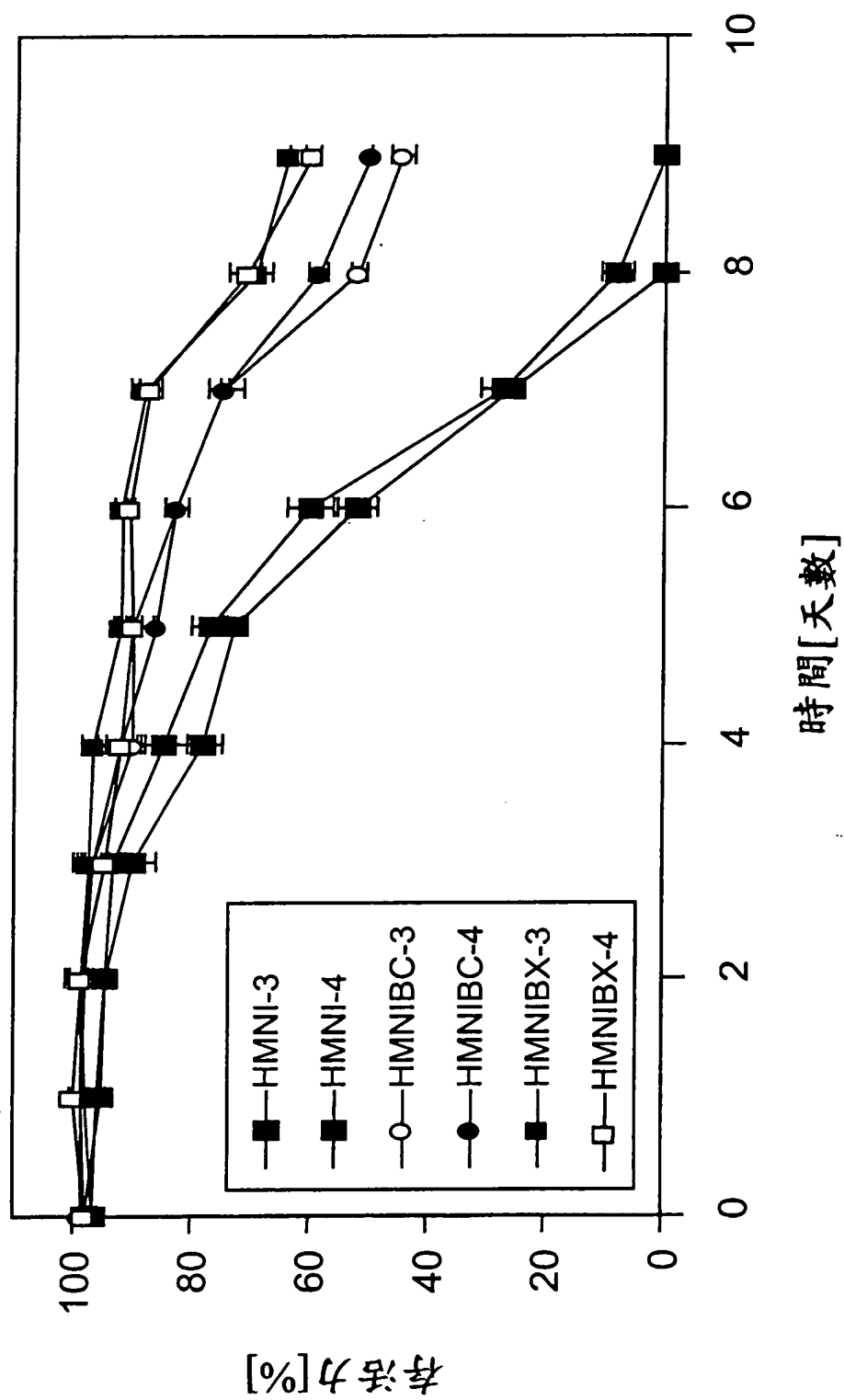
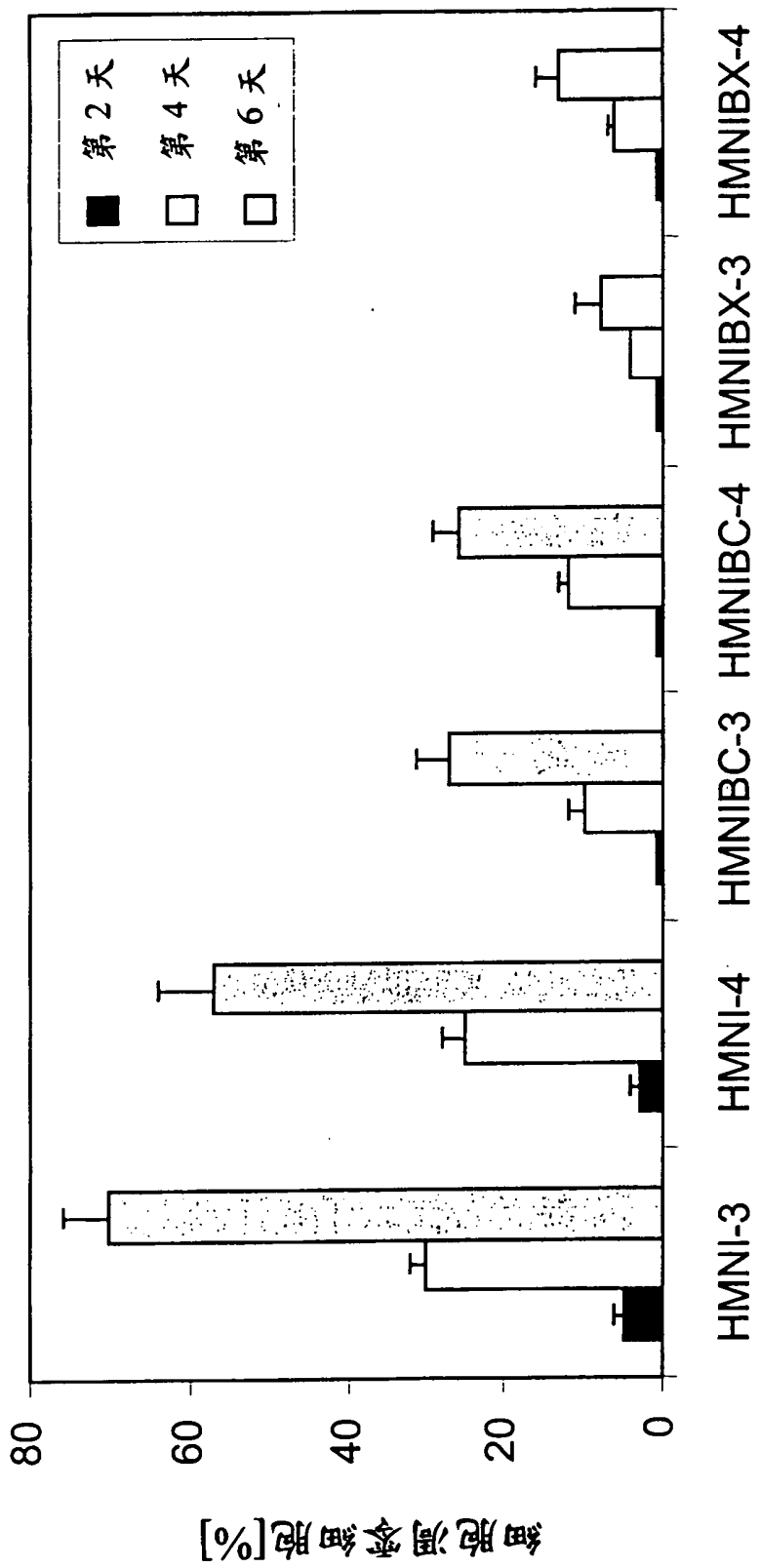


圖 5



細胞純種系

圖 6

HMNIBX-3
HMNIBX-4
HMNIBX-1
HMNIBX-2
HMNI-1
CHO-DG44

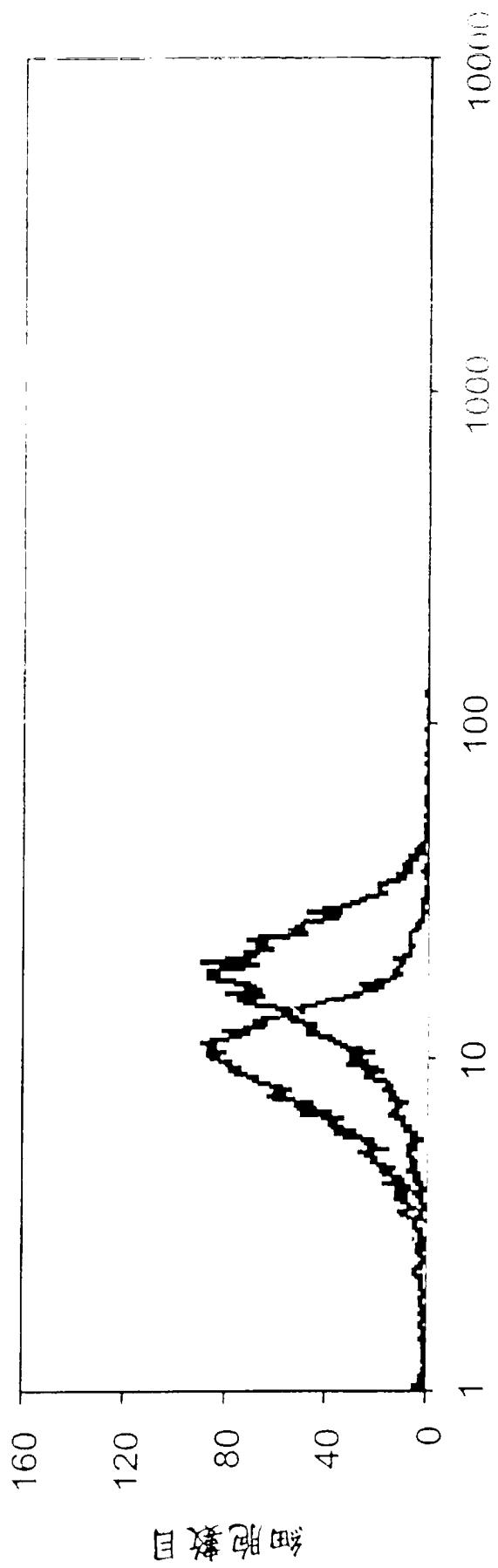
Bcl-x_L —→

B

HMNIBC-3
HMNIBC-4
HMNIBC-1
HMNIBC-2
HMNI-1
CHO-DG44

Bcl-2 —→

A



綠色螢光

圖 8

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

七、申請專利範圍：

1. 一種在倉鼠宿主細胞表現編碼抗-細胞凋零基因、選擇用之可放大的標示者基因與至少一種所欲的基因之方法，其包括：

(a)將編碼抗-細胞凋零基因 BCL-2、選擇用之可放大的標示者基因與所欲的基因之核酸序列導入倉鼠宿主細胞族群，其中該基因操作上連接於至少一種允許該基因表現之調控序列；

(b)將該宿主細胞族群培養於表現該基因之條件，

藉此，該細胞係於懸浮下生長並培養於無血清與/或無蛋白質之培養基。

2. 一種產生顯示增強表現量之抗-細胞凋零基因之倉鼠宿主細胞之方法，其包括：

(a)將編碼抗-細胞凋零基因 BCL-2、選擇用之可放大的標示者基因與視情形之至少一種所欲的基因之核酸序列導入倉鼠宿主細胞族群，其中該基因操作上連接於至少一種允許該基因表現之調控序列；

(b)將該細胞族群培養於至少可表現該選擇用之可放大的標示者基因與該抗-細胞凋零基因 BCL-2，且係有利於取得至少該抗-細胞凋零基因 BCL-2之多複製數的條件，

(c)由該細胞族群選取至少併入多複製數之抗-細胞凋零基因 BCL-2的細胞，

藉此，該細胞係於懸浮下生長並培養於無血清與/或無蛋白質之培養基。

3. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其中該倉鼠宿主細胞為中華倉鼠卵巢(CHO)細胞或幼倉鼠腎臟(BHK)細胞。
4. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其中該抗-細胞凋零基因具序列辨識號碼：2之序列。
5. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其中該選擇用之可放大的標示者基因編碼二氫葉酸還原酶(DHFR)、麩胺醯胺合成酶、CAD、腺苷去胺酶、腺苷酸去胺酶、UMP合成酶、IMP 5'-去氫酶、黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶、HGPRT酶、胸苷激酶、胸苷酸合成酶、P糖蛋白170、核糖核苷酸還原酶、天冬醯胺合成酶、精胺酸琥珀醯胺合成酶、鳥胺酸去羧酶、HMG CoA還原酶、乙醯葡萄糖胺轉移酶、蘇胺酸-tRNA合成酶或 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATP酶。
6. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其中該選擇用之可放大的標示者基因編碼DHFR。
7. 一種產生倉鼠宿主細胞之方法，其包括：
 - (a)將抗-細胞凋零基因BCL-2與DHFR基因導入倉鼠細胞族群；
 - (b)在含胺甲喋呤條件放大該抗-細胞凋零基因BCL-2，藉此，該細胞係於懸浮下生長並培養於無血清與/或無蛋白質之培養基。
8. 根據申請專利範圍第7項之方法，其中該倉鼠宿主細胞為中華倉鼠卵巢(CHO)細胞或幼倉鼠腎臟(BHK)細胞。
9. 一種抑制或延遲宿主細胞之細胞死亡之方法，其包括將

根據申請專利範圍第1至8項中任一項之方法製備之宿主細胞培養於至少表現抗-細胞凋零基因BCL-2，因而抑制或延遲該宿主細胞的細胞死亡之條件。

10. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該細胞死亡係由計畫性細胞死亡所造成。

11. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該細胞死亡係由細胞凋零所造成。

12. 根據申請專利範圍第9至11項中任一項之方法，其中該細胞係培養在無血清與/或無蛋白質之培養液。

13. 一種在宿主細胞生產所欲蛋白質之方法，其包括：

(a)將根據申請專利範圍第1至8項中任一項之方法製備之宿主細胞培養於有利表現抗-細胞凋零基因與所欲基因之條件，

(b)由細胞與/或細胞培養上澄液分離所欲之蛋白。

14. 一種根據申請專利範圍第1至8項中任一項之方法製備之宿主細胞生產至少一種由所欲基因所編碼之蛋白質之用途。