

五 發明之詳細說明：

本發明針對可提供出人意表之高表現位準之人紅血球生成素複殖基因，針對該基因之表現，及針對活體外產製活性人紅血球生成素。

5. 紅血球生成素（下文稱之為 EPO）為循環之糖蛋白，於高等生物可刺激紅血球之生成，參見 Carnot 等人 Compt Rend., 143 : 384 (1906)；因而偶爾稱之為紅血球生成興奮因子。

10 人紅血球壽命約 120 天，如此每日總紅血球中約有 1 / 120 在網狀內皮系統中破壞；同時，每日產生紅血球數目相當穩定以維持各時間之紅血球位準（Guyton, Textbook of Medical Physiology, pp 56-60, W.B.Saunders Co., Philadelphia (1976)）。

15. 紅血球係由骨髓中紅血球母細胞之成熟及分化而產生，而 EPO 為一因子，作用於較未分化細胞及誘使他們分化成紅血球（Guyton，上文）。

EPO 為臨床治療貧血，尤其腎性貧血之有展望療劑，唯咎於可得性低而未普及於實際治療用途。

20. 至於 EPO 用作療劑，須考慮可能之抗原問題，故較好 EPO 自人源原料製成；舉例言之可採用得自患再生不良性貧血等會分泌大量 EPO 之病人血液或尿液。唯此等原料之供應量有限，參見例如 White et al., Rec. Progr. Horm. Res., 16:219 (1960)；

Espada et al., Biochem. Med., 3:475(1970) ;
Fisher, Pharmacol. Rev., 24:459 (1972) 及 Gordon,
Vitam. Horm. (N.Y.) 31:105 (1973) , 其揭示內容
併入以資參考。

5. EPO 產物之製法通常係濃縮及純化得自呈現高 EPO 位
準，如患再生不良性貧血等病病人之尿；參見如美國專利
案 4,397,840 ; 4,303,650 及 3,865,801，其揭示文併入
以資參考。此種尿之供應量有限造成實際使用 EPO 之一大
障礙，因而高度須自健康人尿製備 EPO 產物。使用健康人
10 尿之一問題為比起貧血病人其 EPO 含量低；此外，健康人
尿含有某種抑制因子，在夠高濃度時會對抗製造紅血球，
因而，僅在遵行有意義之純化手續後方可由其中衍得之
EPO 獲致滿意療效。

15. EPO 亦可自綿羊血漿回收，由此種血漿中分離 EPO
已提供滿意強度及安定的水溶性製劑，參見 Goldwasser, Control
Cellular Dif. Develop., Part A; pp 487-494,
Alan R. Liss, Inc., N.Y., (1981)，併入本文以資
參考。唯預期綿羊 EPO 對人具抗原性。

20. 如此，雖然 EPO 為合意療劑，但習知分離及純化技術
伴以天然供應源不足以大量生產此化合物。

Sugimoto 等人於美國專利案 4,377,513 中描述 EPO
之一種大量製法，包含於活體內增殖人類淋巴母細胞，包
括 Namalwa , BALL-1 , NALL-1 , TALL-1 及 JBL

他人對 EPO 製法之報告使用遺傳工程技術見於同業文

獻，唯尚未揭示有用內容^(成)該產物之化學性質。相對地，本專利申請案提供大量生產可展現人 EPO 生物性質之蛋白質。此技術亦可產製化學上與真實人 EPO 有別之蛋白質，唯仍展現類似的（於某些例中，改善的）性質。

5. 欲求方便起見，展現人 EPO 生物性質之所有此等蛋白質於下文稱之為 EPO 而無視其化學上是否完全相同。

本發明針對可表現出人意表之高位準人 EPO 的基因複製，其表現，及由其中於活體外大量產製活性人 EPO；亦描述 EPO 產製用之合宜表現媒介，表現細胞，純化方案及相關製程。

容後詳述，EPO 乃部分純化而得，^再進一步純化成均質，^並以^胰蛋白酶消化以產生特定片段。此等片段經純化及定其序列；EPO 寡核苷酸基於此等序列設計及合成，此等寡聚物用以甄選人基因組庫，由此而分離 EPO 基因。

15. EPO 基因係基于其 DNA 序列而證實，此序列配合許多已定序列之胰蛋白酶消化片段；然後，一塊基因組純株用以藉混成而驗證 EPO mRNA 可於人類^{胎兒的}（20 週齡）mRNA 中檢得。製得人胎肝 cDNA 庫並甄選，得三 EPO cDNA 純株（在甄選 750,000 以上重組體後），其中二株測知為全長，藉^由完整編碼序列及實質 5' 端及 3' 端^的未轉譯序列所判斷者。此等 cDNA 已表現於如下二者：
 : SV-40 病毒變性猴細胞（COS-1 細胞系；Gluzman, Cell 23:175-182(1981)）及中國倉鼠卵巢細胞（CHO 細胞系；Urlaub, G. 及 Chasin, L.A. Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 77:4216-4280 (1980)) . 由 COS 細胞產生之 EPO 於活體內外均為生物活性 EPO , 而由 CHO 細胞產生之 EPO 於活體外呈生物活性 , 未於活體內試驗。

5. EPO cDNA 純株具有令人感興趣之 14 — 15 胺基酸 (aa) 開放的閱讀架構 , 帶有起始子及終結子距編碼區上游 20. 至 30. 個核苷酸 (nt) 。 以複製 EPO 基因性狀感染之大腸桿菌代表性試樣已貯於馬里蘭州洛克維爾市美國種型培養蒐集會 , 以新增編號 ATCC 40153 可得。

第 1 圖為一個人類 EPO 基因的一個 87 對氮鹼基對 ^{基序列;} exon 之氮鹼

10. 第 2 圖例示於 ^{人類} 胎肝 mRNA 偵檢 EPO mRNA ;

第 3A 圖例示自 λ — HEPOFL 13. 核苷酸序列演繹得之

EPO 蛋白質胺基酸序列 ;

第 3B 圖例示於 λ — HEPOFL 13. 中之 EPO cDNA 核苷酸序列及由其 ^{演譯出} 演繹得之胺基酸序列 ;

15. 第 4A 圖例示 4 個不 ^{相關的} 入 EPO 基因組純株之 DNA 插入物之相對位置 ;

第 4B 圖例示人 EPO 基因表現作用子及外作用子結構拼圖 ;

第 4C 圖例示第 4B 圖所例示之 EPO 基因之 DNA 序列 ;

20. 第 5A 、 5B 及 5C 圖例示媒介 91023(B) 之營構 ;

第 6. 圖例示 COS — 1 細胞產生之 EPO 與天然 EPO 比較其 SDS 聚丙烯醯胺膠分析 ;

第 7. 圖例示 EPO 純株 , λ — HEPOFL 6. 之核苷酸及胺基酸序列 ;

第 8 圖例示 EPO 純株， λ - HEPOFL 8 之核苷酸及
胺基酸序列；

第 9 圖例示 EPO 純株， λ - HEPOFL 13 之核苷酸及
胺基酸序列；

5. 第 10 圖圖解例示質體 PRKI - 4 ；

第 11 圖圖解例示質體 pdBPV - MMTneo (342-12) 。

本發明針對 EPO 基因之複殖及藉活體外表現該等基
因而產製 EPO 。

10 專利及科學文獻中充斥著重組產物製法報告，一般
言之，此等技術涉及分離及合成所^的要基因序列，及使用
技藝精湛人士易得之技術於~~原核或真核~~原核或真核細胞內表現該
序列。一俟給定基因經分離，純化及插入轉移媒介（亦
即植株）則確保可以實質量而取得。媒介帶有其複殖基
15 因，轉移至合宜微生物或細胞系，如細菌、酵母、哺乳
類細胞如 COS - 1（猴腎），CHO（中國倉鼠卵巢），
昆蟲細胞系等；在此~~種~~媒介隨微生物或細胞系之增殖而
複製，可藉習知方式由此~~種~~分離；如此提供基因之一連
續更新來源，供進一步操作，修飾及轉移至其它媒介或
同一媒介中其它部位。

20. 表現常可如下達成：將複殖基因以合宜取向及閱讀
架構移至轉移媒介中適當位置，因而自原核或真核基因
轉譯讀過將導致合成蛋白質前驅物，^其包含由複殖基因編
碼之胺基酸序列其連接至~~原核或真核~~原核或真核基因之 Met 或
胺端序列。它例中，轉錄及轉譯起始信號可由複殖基因

的合宜基因組片段提供。多種特定蛋白質切割技術可用以於合意點切割蛋白質前驅物（若產生的話）以便釋出合意胺基酸序列，繼以藉習知手段純化。若干例中，可產生含合意胺基酸序列之蛋白質而毋需特殊切割技術，亦可自細胞釋出至胞外生長培養基內。

5.

人 EPO 基因組純株之分離

如下文所述人 EPO 係自患再生不良貧血病人尿純化成均質；以胰蛋白酶完全消化此純 EPO，所得片段藉逆相高級液相層析分開，自梯度差分中回收，及進行微序列分析。胰蛋白酶消化片段序列列於第 3 圖，容后詳述；兩個胺基酸序列，Val—Asn—Trp—Lys 及 Val—Tyr—Ser—Asn—Phe—Leu—Arg 選供設計寡核苷酸探子（分別從較前胰蛋白酶消化片段生成寡核苷酸池，長 17 核苷酸及 32 倍簡併，及長 18 核苷酸及 128 倍簡併之寡核苷酸；以及從較後胰蛋白酶消化片段生成兩池，各長 14 核苷酸，各為 48 倍簡併）。32 倍簡併的 17mer 池用以於 Ch4A 媒介甄選人基因組 DNA 庫（22），使用 Woo 及 O' Malley 在原位放大程序之修飾法（47）而製得甄選用濾片。

10

15.

20.

本文所用括弧內阿拉伯字(1)至(6)係指以數字次序列於本專利說明書尾之公開文獻。

檢出混交至 17mer 之噬菌體，滙聚成小組，以 14mer 及 18mer 池探檢。混交至 17mer, 18mer 及 14mer 池之噬菌體經溶菌斑純化；各片段次選殖入 M 13 媒介內，藉 Sanger 及 Coulson, (23)(1977) 之二去氧鏈終結法定其序列。混

交至一純株中 32 倍變異的 17 mer 之該區列示於第 1 圖；此 DNA 序列在開放之閱讀架構內含有核苷酸，可精確編碼用以演繹核苷酸 17 mer 池之胰蛋白酶消化片段。復次，分析 DNA 序列指出 17 mer 混交區均包含 ^{在一起} 87 bp 作用子內，由潛在可能之剪接接受者及供給者位置所限定。

5.

正向確證此純株（本文中定名 λ -HEPO1 及 λ -HEPO2）為 EPO 基因組純株，已藉定出（含其它胰蛋白酶消化片段編碼訊息之）額外外作用子之序列而得。

EPO cDNA 純株之單離

10.

北向沾移分析(6)人胎（20 週齡）肝 mRNA 係使用 95 核苷酸單股探子進行，此探子係由含部分第 1 圖所示 87 bp 外作用子之 M 13 純株製得者。如第 2 圖所例示者，在胎肝 mRNA 可檢得強信號。精確地辨識此帶為 EPO mRNA 係藉使用同一探子以甄選胎肝 mRNA 之噬菌體 λ cDNA

15.

庫而達成(25)。獲得若干混成純株之頻度為每甄選 250,000 重組體即約有 1 者為陽性。此等純株（ λ -HEPOFL 13 及 λ -HEPOFL 8）之完整核苷酸及演繹之胺基酸序列示如第 7 圖及第 8 圖。EPO 編碼訊息含在 cDNA 5' 端該半之 594 核苷酸內，包括極具疏水性 27 胺基酸前導子及

20.

166 胺基酸成熟蛋白質。

辨識成熟蛋白質之 N 端係植基於再生不良性貧血病人尿中所分泌之蛋白質 N 端序列，如此中所例示者（第 1 圖）及如 Goldwasser (26) 及 Yanagawa (21) 所報導者。

目前仍未知此 N 端（Ala-Pro-Pro-Arg ……）是

否代表循環中 EPO 所出現之真實 N 端，或此切割是否出現在腎或尿。

- 第 3 圖下方劃綫之胺基酸序列代表胰蛋白酶消化片段或已得蛋白質序列訊息之 N 端部分。演繹得之胺基酸序列精確吻合已定其序列之胰蛋白酶消化片段，確證單離之基因編碼有人 EPO。

人 EPO 基因之結構及序列

- 4 個獨立人 EPO 基因組純株之 DNA 插子的相對位置示如第 4A 圖。此等複製之 DNAs 與寡核苷酸探子及與由兩類 EPO cDNA 純株製得之各種探子進行混成分析，將 EPO 基因置於如第 4A 圖粗黑線所示之約 3.3kb 區內；此區之完整序列分析（參見例 4。）並與 cDNA 純株比較，獲得如第 4B 圖所示 EPO 基因之內作用子與外作用子結構拼圖。EPO 基因分割成 5 外作用子，部分外作用子 I，全部外作用子 II、III 及 IV；以及部分外作用子 V 含有蛋白質編碼訊息；其餘外作用子 I 及 V 分別編碼有 5' 端及 3' 端之未轉譯序列。

於 COS 細胞內一過性表現 EPO

- 欲驗證生物活性 EPO 可在活體外細胞培養系中表現，進行 COS 細胞表現研究⁽⁵⁸⁾，供一過性研究用之媒介—P91023(B) 述於例 5，此媒介含有腺病毒主要後期啓動子，SV 40 聚腺苷基化序列，SV 40 複製起點，SV 40 促進子及腺病毒 VA 基因。 λ —HEPOFL 13 中之 cDNA 插入物（參見第 8 圖）插入腺病毒主要後期啓動子下游之 P

91023(B) 媒介內；此新媒介辨識為 pPTFL 13。

- 在此營構物轉感染 COS-1 細胞 M6 品系後 24 小時 (Horowitz et al, J. Mol. Appl. Genet. 2:147-149 (1983))，洗滌細胞，轉入不含血清之介質內，48 小時後^收獲細胞。然後，使用 EPO 之定量放射性免疫效價法 (5) 檢視釋入培養上清液中之 EPO 含量^低。如表 1 (例 6) 所示，表現免疫反應性 EPO；亦檢視由 COS-1 細胞所產生之 EPO 生物活性。在一個分開的實驗中，含有得自 λ -HEPOFL 13 之 EPO cDNA 之媒介轉感染入 COS-1 細胞內，介質如上文所述而回收；然後，介質中之 EPO 如下而定量：活體外生物效價分析 ^3H -胸腺核苷及 CFU-^{二者}一~~ET~~中之任一者 (12, 29) 及活體內效價分析低氧小鼠及空腹大~~鼠~~二者中之任一者 (30, 31) (參見表 2, 例 7)。結果驗證生物活性 EPO 係於 COS-1 細胞內產製者。
15. 經由“西向沾移法”，使用多源抗-EPO 抗體，COS 細胞產生之 EPO 於 SDS-聚丙烯醯胺^膠上具活動性，此與由人尿製成之天然 EPO 完全相同 (例 8)；如此，COS-1 產生之 EPO 其糖基化程度可能類似天然 EPO。

20. 含有其它啓動子之不同媒介亦可用於 COS 細胞或其它哺乳類或真核細胞。可用於執行本發明之如此它種啓動子例包括 SV 40 早期及晚期啓動子，鼠金屬硫因質基因啓動子 (鳥類或哺乳類逆病毒長終端重複子中所見啓動子，桿病毒 (bacculovirus) 多面體基因啓動子及其它。執行本發明有用之其它細胞類別之例包括大腸桿菌

- 、酵母、哺乳類細胞如 CHO (中國倉鼠卵巢) C127 (猴上皮) 3T3 (鼠纖維母細胞) CV-1 (非洲綠猴腎)，及昆蟲細胞如自 Spodoptera frugiperda 及 Drosophila melanogaster 而得者。此等通選啓動子及／或細胞類則得以調節 EPO 表現時間或產量^{高低}，產生細胞末一類型之 EPO，及在較價廉較易控制之條件下生長大量可產生 EPO 之細胞。

- 保有哺乳類表現利益但產生高程度表現細胞系所需時間較少之一表現系，係由昆蟲細胞系與在此細胞系中可繁殖之 DNA 病毒所組成。此病毒為核多面體病毒，具雙股圓形 DNA 基因組，為 128kb。核被囊體呈桿形，包裝成兩種形式：未阻絕型 (膜發芽病毒) 及阻絕型 (包封於感染細胞核內之蛋白質晶體內)。此等病毒可例行地於活體外昆蟲細胞培養中增殖，適用於所有常例動物病毒學方法，典型細胞培養介質為營養鹽液及 10% 胎犢血清。

- 在活體外，當未阻絕型病毒 (NOV) 進入細胞並移向複製之核時，病毒之生長即啓始；複製者為核。活體應用之起始相 (感染後 8-18 小時) 期間，核被囊體於核中組配，繼以呈 NOVs 經漿膜出芽，將感染遍及細胞培養；此外，部分核被囊體繼而 (感染後 18+ 小時) 保持於核內，阻絕於蛋白質基質內一稱之為多面體包涵體 (PIB)。此型在細胞培養中不具感染性。此基質由稱之為多面體素 (Polyhedrin) 分子量 33. kd 之一種蛋白

質所組成。各 PIB 直徑約 1 μ m，每核之 PIB 多達 100；顯然感染周期末期有大量多面體素產生，高達總細胞蛋白質之 25%。

5. 因為 PIB 在活體外複製周期不佔任何角色，故多面體素基因可從病毒染色體中刪去而對^{活體外}生活力無任何影響。在病毒用作表現媒介中，吾人將~~多面體素~~基因編碼區取代以待表現之外來 DNA，將之置於多面體素啟動子的控制之下，導致不會形成 PIB 之病毒表現型。

10 此系統已由若干研究學者所採納，其中最值得矚目者為 Pennock 等人及 Smith 等人。Pennock 等人 (Gregory D. Pennock, Charles Shoemaker, and Lois K. Miller, Molecular and Cell Biology 3 :84. p. 399-406) 報告置於多面體素啟動子控制之下，一種細菌蛋白質 (β -半乳糖苷酶) 有高位準表現。

15. 另一種核多面體病毒衍生得之表現媒介由 Smith 等人所呈示 (Gale E. Smith, Mas D. Summers and M. J. Fraser, Molecular and Cell Biology, May 16, 1983, pp. 2156-2165, 經由表現人 β -干擾素驗證其媒介功效；如所預期者發現合成產物經糖基化並自昆蟲細胞中分泌出。例 14 中，描述修飾含 Autographa Californica 核多面體病毒 (AcNPV) 多面體基因之質體，允許 EPO 基因易於插入質體內因而可在多面體啟動子之轉錄控制之下。結果所得 DNA 與得自野生型 AcNPV 之完整染色體 DNA 共同轉感染入昆蟲細胞內。基因重組

20.

事件導致 AcNPVC 多面體素基因區取代以得自質體的 DNA；所得重組病毒子裔當中可因擁有 EPO 基因 DNA 序列而鑑別出，此重組病毒在重行感染昆蟲細胞時預期可產生 EPO。

5. EPO 於 CHO, C127 及 3T3，及昆蟲細胞內表現之例示於例 10 及 11 (CHO)，13 (C127 及 3T3)，及 14 (昆蟲細胞)。

經由原核或真核細胞表現本發明經複製之 EPO 基因所產生之生物活性 EPO 可由醫師及／或獸醫師用於活體內治療哺乳動物種屬；自然，活性成分用量取決於待處理病情之嚴重程度，所選給藥途徑，及活性 EPO 之專一活性；唯最終由醫師及／或獸醫師決定。由臨床醫師所決定之此種活性 EPO 用量於本文中亦稱為“EPO 治療有效”量，例如在綿羊慢性腎衰竭伴同之誘發低增生性貧血治療中，EPO 每日有效量為 10 單位／仟克歷 15 至 40 日，參見 Eschback et al., J. Clin. Invest., 74 : 434 (1984)。

15. 活性 EPO 可由任何適合待治療病情之途徑給藥，較好，EPO 注射入待治療動物血流，技藝精湛人士易了解較佳途徑將隨待治療病情而異。

雖活性 EPO 可呈純或實質為純之化合物給藥，唯較好呈藥物配方或製劑。

供動物或人用二者之本發明配方包含：如上述活性 EPO 蛋白質，伴同一種或一種以上藥用合格載劑及非必

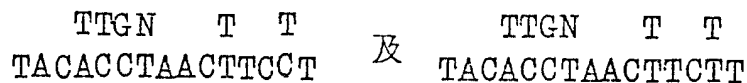
須地其它治療成份。載劑須為“合格”者，意指可與配方中其它成分相配伍而不會有害用藥人。合意地，配方中不應包括氧化劑及其它已知與胜肽不相容之物質。配方可便利地呈單位劑型存在，可由藥學界任何方法製得；各方法皆包括將活性成分與（構成一種或一種以上附屬成分之）載劑聯合的步驟。一般言之，配方製法為均勻緻密地聯合活性成分與液體載劑或細分之固體載劑或二者，然後視需要將產品成形為合意配方。

適合注射用之配方便利地包含：活性成分之無菌水溶液與（較好與接受人血液呈等張性之）溶液。此種配方便利之製法為：將固體活性成分溶於水中以製得水溶液，對該溶液滅菌，可呈單一或多劑量容器存在，如熔封之安瓿或小瓶。

15. 本文所用 EPO / cDNA 包括先導有 ATG 字碼子之成熟 EPO / cDNA 基因，及 EPO 蛋白質等位變體之編碼 EPO / cDNA。一個等位體例示於第 3 A 及 3 B 圖。EPO 蛋白質之 1-甲硫胺酸衍生物（Met-EPO）及 EPO 蛋白質之等位變體。第 3 A 圖序列例示之成熟 EPO 蛋白質始於序列 Ala. Pro. Pro. Arg ……，其開始以數字“1”標示於第 3 A 圖；Met-EPO 始於序列 Met. Ala. Pro. Pro. Arg ……。

20. 提出下列各例有助於了解本發明而其真正範圍列舉於附隨之請求專利部份；須了解於所列程序中可進行修飾而未悖離本發明精義，所有溫度皆以攝氏度數表示且

144 至 150)，製得兩池 14 mer，各為 32 倍簡併性



差別在白胺酸字碼子首位。寡核苷酸以聚核苷酸激酶 (New England Biolabs) 及 $\gamma^{32}\text{p-ATP}$ (New England

5. Nuclear) 在 5' 端標記以 ^{32}p 。寡核苷酸比活性在 1000 至 3000 Ci/mmole 寡核苷酸間變化。於噬菌體 λ 中之入基因組 DNA 庫 (Lawn 等人, 22) 使用原由 Woo 等人 (47) (1978) 所述原地放大程序之修飾方法甄選。約 3.5×10^5 噬菌體以 6000 噬菌體 / 150 mm 培養皿 (NZCYM 介質) 密度培種，於 37 度培育至溶菌斑可見，唯小 (約 0.5 mm)；於 4 度冰冷 1 小時後，溶菌斑之雙重複現體移至尼龍膜 (New England Nuclear)，於新鮮 NZCYM 皿上 37 度培育過夜。然後濾物藉浮選 10 分鐘而變性及中和，分別各於 0.5N NaOH-1M NaCl 及 0.5 M
10. Tris (pH8)-1M NaCl 薄膜上。於 80 度真空烘烤 2 小時後，濾物於 $5 \times \text{SSC}$ ，0.5% SDS 中洗滌 1 小時，以濕紙巾溫和刮擦而去除濾片表面細胞殘渣；此刮擦減少探子與濾物之背景結合。然後，濾物以 H_2O 清洗，於 48 度於 3M 四甲基氯化銨，10mM NaPO_4 (pH6.8)， $5 \times \text{Denhardt's}$
15. ，0.5% SDS 及 10 mM EDTA 中預混交 4 至 8 小時。繼以加入濃度 $0.1 \cdot \text{p mol/ml}$ 之 ^{32}p 標記 17 mer，於 48 度混交 72 小時，混成後，濾物如下廣作洗滌：於 $2 \times \text{SSC}$ (0.3 M NaCl-0.03M 檸檬酸鈉，pH7) 於室溫；繼以於 3 M TMACl-10mM NaPO_4 (pH6.8) 室溫 1 小時，及於混
- 20.

- 成溫度 5 至 15 分鐘。在以強化屏作兩日自動放射綫攝影後約偵檢得 120 個強複現訊號；檢出陽性者，集中於池 8，重行篩皿及重行甄選，重複三次，各二濾片使用半量 14 mer 池及第三濾片使用 17 mer。篩皿及混交用條件及 17 mer 如上述，唯 14 mer 之混交係於 37 度。在自動放射綫攝影之後，於室溫 50% 甲醯胺內歷 20 分鐘而自 17 mer 濾片去除探子，濾片於 52 度與 18 mer 探子重新混交。兩個獨立噬菌體混交至全部三探子。得自一噬菌體（本文中定名 λ HEP01）之 DNA 以 Sau 3A 消化至完全，次復殖入 M13 以供使用 Sanger 及 Coulson, (23) (1977) 二去氧鎂終結法進行 DNA 序列分析。編碼 EPO 胰蛋白酶消化片段（下方劃綫區）之開放型閱讀架構其核苷酸序列及演繹之胺基酸序列述於本文。內作用子序列示以小寫字母；外作用子序列（87 核苷酸）示以大寫字母。符合一致剪接受者(a)及供給者(d)的序列下方劃綫（見第 4 C 圖）。

實例 2：人胎肝 mRNA 之北向沾移法分析

5 μ g 人胎肝 mRNA（自 20 週齡胎肝製得）及成人肝 mRNA 於 0.8% 瓊脂糖甲醯胺膠電泳，使用 Derman 等人，Cell, 23:731 (1981) 之方法移至硝基纖維素。然後，單股探子自含第 1 圖例示極子之 M13 模版製得；引子為 20 mer，係自與原始 17 mer 探子相同的胰蛋白酶消化片段衍生而得。探子之製法如前述 Anderson 等人，PNAS, (50) (1984)，唯在以 Sma I 消化後（製得 95 核

5. 苷酸長合意探子含 74 核苷酸編碼序列)，小片段藉 Sepharose CI4B 柱上 0.1N NaOH-0.2M NaCl 內層析而自 M13 模版中提純。濾物於 68 度混交至約 5×10^6 cpm 之此探子歷 12 小時，於 68 度 $2 \times$ SSC 中洗滌，以強化屏曝光六日；鄰近行列內之 1200 核苷酸之單一標註 mRNA (以箭頭指示) (第 2 圖) 被移動了。

實例 3：胎肝 CDNA

10. 製得與例 2 全然相同之探子，採標準溶菌斑甄選 (Benton Daris, Science, (54) (1978)) 程序供甄選於媒介 λ -Ch21A 中製得之胎肝 cDNA 庫 (Toole 等人, Nature, (25) (1984)); 在甄選 1×10^6 溶菌斑後分離三個獨立陽性純株 (本文中定名 λ -HEPOFL6 (1350bp), λ -HEPOFL8 (700bp) 及 λ -HEPOFL13 (1400bp))。在次復殖 λ M13 後, λ -HEPOFL13 及 λ -HEPOFL6 整個插子定出序列 (分別為第 9 圖及第 7 圖), λ -HEPOFL8 僅有部分定出序列而餘者假定與另二純株完全相同 (第 8 圖)。5' 端及 3' 端之未轉譯序列以小寫字母表示而編碼區以大寫字母表示。

15. 參照第 3 A 圖及第 3 B 圖, 核苷酸序列下方所示演繹之胺基酸序列其成熟蛋白質之第一胺基酸標號始於 1。推定之前導子肽示如胺基酸命名之各帽。成熟蛋白質之半胱胺酸單元復示如 SH, 而可能之 N-鍵連糖基化如星號; 下方劃綫之胺基酸指示由 N-端蛋白質定序列或如例 1 由定出 EPO 胰蛋白酶消化片段序列所鑑別之單

元。下方部分劃綫者指示無法明確測知之某些胰蛋白酶消化片段之胺基酸序列中之單元。cDNA 純株 λ -HEPOFL 6, λ -HEPOFL8 及 λ -HEPOFL13 已貯積, 分別可以新增編碼號 ATCC 40156, ATCC 40152 及 ATCC 40153 得自馬里蘭州洛克維爾市美國種型培養蒐集會。

5.

實例 4 : EPO 基因之基因組結構

得自 Hae III/Alu I 庫之四獨立基因組純株 (λ -HEPO 1, 2, 3 及 6) 其相對大小及位置示如第 4 A 圖重疊綫。寬綫代表 EPO 基因位置, 顯示既知鑑識內核酶切割位之標度 (Kb) 及位置。含 EPO 基因區由兩股完全定其序列, 使用經指導之外核酶 III 經過此區產生一系列刪除。五個 EPO mRNA 編碼之外作用子代表性圖解於第 4 B 圖。外作用子 I 精確 5' 端界限目前未知; 外作用子之蛋白質編碼部分加深, 此區完整核苷酸序列示於第 4 C 圖。各外作用子之既知界限以實心垂直棒劃成直綫。基因組純株 λ -HEPO1, λ -HEPO2, λ -HEPO3 及 λ -HEPO 6 已貯積, 分別以新增編號 ATCC 40154, ATCC 40155, ATCC 40150, 及 ATCC 40151 得自馬里蘭州洛克維爾市美國種型培養蒐集會。

10.

15.

20.

實例 5 : 媒介 p91023(B) 之結構

轉形媒介為 Kaufman et al., Mol. Cell Biol., 2:1304 (1982) 所述之 pAdD26SVpA(3), 此媒介之構造示於第 5 A 圖。簡言之, 此質體含鼠二氫葉酸鹽還原酶 (DHFR) cDNA 基因, 在腺病毒 2 (Ad2) 主要後期啓動子

之轉錄控制之下。5'端剪接位置示於腺病毒 DNA，自免疫球蛋白基因衍生而得之 3'端剪接位置，存在於 Ad₂ 主要後期啓動子

與 DHFR 編碼序列間。SV40 早期聚腺苷基化位置位居

DHFR 編碼序列下游。原核生物衍得之 pAdD26SVpA(3) 段係得自 pSV0d (Mellon et al., Cell, 27:279 (1981)) 且不含既知可於哺乳類細胞中抑制複製之 pBR322 序列 (Lusky et al., Nature, 293:79 (1981))。

pAdD26SVpA(3) 轉為質體 pCVSVL2 如第 5 A 圖所示，前者刪去其中兩個 Pst 1 位之一面轉為質體 pAdD26SVpA(3)(d)；達成此轉化之方式為：以 Pst 1 部分消化，使用一個酶之缺陷，因而得直線質體次群，其中僅切割一個 Pst 1 位；繼以 Klenow 處理；接合而重新環化，及甄選出刪去位在 SV40 聚腺苷基化序列 3' 端處之 Pst 1 位。

腺病毒三分前導子及病毒相關基因 (VA 基因) 插入 pAdD26SVpA(3)(d)，如第 5 A 圖例示者。首先，pAdD26SVpA(3)(d) 以 Pvu II 切割而製成直線分子，敞口於構成三分前導子的三元件 3' 端部分內；然後，pJAW43 (Zain et al., Cell, 16:851 (1979)) 以 XhoI 消化，以 Klenow 處理，以 Pvu II 消化，於丙烯醯胺膠 (6% 於 Tris 硼酸鹽緩衝液內；Maniatis 等人，上文) 上電泳而分離含第三前導子第二部分之 140 bp 片段。其後，140 bp 片段接合至經 Pvu II 消化之 pAdD26SVpA(3)(d)；接合產物用以將大腸桿菌轉成四環素抗藥性者，使用 Grunstein-Hogness 程序採 ³²P 標記探子混交至 140 bp 片段而甄選菌落。從陽性混交菌落製得 DNA，以測試重新構成之 Pvu II 位係在 (第二及第三腺病毒後期前導子專一性的) 經插入之 140

bp DNA 之 5'端 或 3'端 側；Pvu II 址之正確取向在 140 bp 插子之 5'端 側，第 5 A 圖中此質子定名 pTPL。

含有 SV40 促進子序列之 SV40 Ava II D 片段如下而得：以 Ava II 消化 SV40 DNA，以 Pol I 之 Henow 片段加鈍端，Xho I 聯結子接至各片段，以 Xho I 消化以打開 Xho I 位，及以膠電泳單離第四大(D)片段。然後，此片段接合至 Xho I 切割之 pTPL，得質體 pCVSVL2-TPL。pCVSVL2-TPL 中 SV40 D 片段取向使得 SV40 後期啓動子取向如同腺病毒主要後期啓動子。

欲將腺病毒相關 (VA) 基因引進 pCVSVL2-TPL 內，首先營構得質體 pBR322，含腺病毒 2 型 Hind III B 片段。腺病毒 2 型 DNA 以 Hind III 消化，B 片段以膠電泳單離；此片段插入事先已以 Hind III 消化之 pBR322 內；在大腸桿菌轉形成安比西林抗藥性後，甄選重組體是否有插入 Hind III B 片段，插入取向以鑑識酶消化測定。

pBR322-Ad Hind III B 含有腺病毒 2 型 Hind III B 片段，取向如第 5 B 圖所示。

如第 5 B 圖例示者，VA 基因便利地自質體 pBR322-Ad Hind III B 而得：係以 Hpa I 消化，加上 ECOR 1 聯結子，及以 ECOR 1 消化，繼以回收 1.4 kb 片段。然後，具 ECOR 1 粘性末^端之片段接合至（事先以 ECOR 1 消化之）PTL EcoR 1 址；在性狀 *E. coli* HB101 及選出四環素抗藥性後，菌落以濾片混交^具至 VA 基因專一性之 DNA 而甄選。DNA 從陽性混交純株製得，以鑑識^內核^酸

酶消化尋其特徵；所得質體定名 p91023。

如第 5 C 圖例示者，p91023 之兩個 EcoR 1 位係以 EcoR 1 切割 p91023 至完全而去除，產生兩個 DNA 片段，一約 7 kb，另一約 1.3 kb。後者片段含 VA 片段。兩片段各端使用 pol I 之 Klenow 片段填入，然後兩片段接合在一起。質體 p91023(A) 含 VA 基因，類似 p91023 唯刪去兩個 EcoR 1 位，經由 Grunstein-Hogness 以 VA 基因片段甄選，及經由習知限制酶^{作用位}分析而識別。

5. p91023(A) 中單一 Pst 1 位去除，代之以 EcoR1 位。
10. p91023(A) 以 Pst 1 切割至完全，以 Pol-I Klenow 片段處理而產生沖流端。EcoR1 聯結子接至 p91023(A) 鈍 Pst 1 位；直線 p91023(A) 有 EcoR1 聯結子搭接在鈍 Pst 1 位，與未接合的聯結子分開，以 EcoR1 消化至完全並重行接合。回收如第 5 C 圖闡釋之質體 p91023(B)，
15. 識別其結構類似 p91023(A)，唯有 EcoR1 位取代前一 Pst 1 位。質體 p91023(B) 已貯積，可以新增編號 ATCC 39754 得自馬里蘭州洛克維爾市美國種型培養蒐集會。

實例 6

20. cDNA 純株 (λ -EPOFL6 及 λ -EPOFL13；例 3) 插入質體 p91023(B) 內，分別形成 pPTFL6 及 pPTFL13；然後，8 μ g 各純 DNA 使用 DEAE-葡聚糖法 (下文) 用以性狀感^染 5×10^6 COS 細胞。12 小時後，洗滌細胞，以氯醌 (0.1 mM) 處理 2 小時，再度洗滌並曝於含 10% 胎犢血清之 10 ml 培養^基 24 小時；培養^基 改成 4 ml 不

含血清培養^基，48小時後收獲。

免疫活~~性~~ EPO 產量由 Sherwood 及 Goldwasser(55) 之放射性免疫分析法定量，抗體係 Judith Sherwood 博士提供；碘化追蹤劑從例 1 均質 EPO 製得。^{該分析法}靈敏度約 1 ng/ml，結果示如下表 1。

5.

表 1

媒介	釋入培養基內 EPO 含量程度(ng/ml)
pPTFL13	330
pPTFL6	31

10. pPTFL13 已貯存，以新增編號 ATCC 39990 可得自馬里蘭州洛克維爾市美國種型培養蒐集會。

實例 7

15. EPO cDNA (λ -HEPOFL13) 插入 p91023(B) 媒介內，性狀感染入 COS-1 細胞，如上述收獲 (例 6)，唯略去氫處理。

活體外生物活性 EPO 之測量法或為使用菌落形成效價法，以鼠胎肝細胞作 CFU-E 源，或為 3H- 胸腺核苷攝取分析法，使用得自苯胼注射鼠之脾細胞。此等分析法靈敏度約為 25 毫單位 / 毫升。活體內生物活性 EPO 之測量法係使用低氧小鼠法或空腹大鼠法，而^{該分析法}靈敏度約 100 mU/ml。任一分析法自模擬條件培養^基皆未檢得活性。純株 EPOFL13 表現之 EPO 結果示如下表 2，其中報告之活性以單位 / 毫升表示，使用商業定量 EPO (Toyobo, Inc.) 作標準。

表 2

從以 I 型 EPO cDNA 轉感染 COS 細胞分泌之 EPO

	分析法	活 性
	RIA	100 ng/ml
5.	CFU-E	$2 \leq 0.5$ U/ml
	^3H -Thy	$3.1 \leq 1.8$ U/ml
	低氧小鼠	1 U/ml
	空腹大鼠	2 U/ml

實例 8 : SDC 聚丙烯醯胺膠分析得自 COS 細胞之 EPO

10. 媒介 91023(B)(上文)中以 EPO (λ -HEPOFL13) cDNA 基
 性狀感染之 COS 細胞釋入培養的 180 ng EPO 在 10% SDS
 Laemlli 聚丙烯醯胺膠上電泳，電轉移至硝基纖維素紙
 (Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:
 4350 (1979))。濾片如表 1 以抗 EPO 抗體探測，洗滌
 15. 以 ^{125}I -staph A 蛋白質重行探測；濾片行自動放射線
 攝影兩日；如例 1 所述，天然均質 EPO，或在碘化前 (B 綫)
 或在碘化後 (C 綫) 電泳 (參見第 6 圖)。所用
 標誌子包括以 ^{35}S 甲硫胺酸標記的血清白蛋白 (68,000
 d) 及卵白蛋白 (45,000 d)。

20. 實例 9 : RK1-4 之營構

單離得自質體 PSV2DHFR 之 Bam HI-Pvu II 片段 (Subramani et al., Mol. Cell. Biol. 1:854-864 (1981)) (片段 A)，含有 SV40 早期區啓動子，鄰接鼠二氫葉酸鹽還原酶 (DHFR) 基因，係 SV40 啓進子；

- 小 t 抗原內作用子，及 SV40 聚腺苷基化序列。其餘片段如下得自媒介 p91023(A) (上文)，p91023(A) 以 Pst I 於接近腺病毒啓動子之單一 Pst I 位 消化而使質體直線化，或接合至合成 Pst I 至 EcoR I 逆轉子且重行環化 (在原 Pst I 位產生 PstI-EcoRI-Pst I 位 ; 91023(B'))；或以 DNA 聚合酶 I 大片段處理以破壞 Pst I 位，及接合至合成 EcoR I 聯結子並重行環化 (在原始 Pst I 位產生 EcoR I 位 ; 91023(B))。結果所得二質體 91023(B)及 91023(B') 各以 Xba 及 EcoR I 消化而製得二片段 (F 及 G)；經由接合得自 p91023(B) 之片段 F 與得自 p91023(B') 之片段 G，及得自 p91023(B) 之片段 G 與得自 p91023(B') 之片段 F，產生兩個新質體，在原始 Pst I 位含有或 EcoR I - Pst I 位或 Pst I - EcoR I 位。含有 Pst I - EcoR I 位之質體而 Pst I 位最靠近腺病毒主要後期啓動子者定名 p91023(C)。

- 媒介 p91023(C) 以 Xho I 消化至完全，結果所形成之直線 DNA 帶有粘性^{末端}，與 DNA 聚合酶 I 大腸桿菌大片段進行終端填充反應而變成鈍端；此 DNA 接合如下製得之含 SV40 促進子之 340 bp Hind III-EcoRI 片段。

得自 SV40 且含 SV40 複製起點及促進子之 Hind III - Pvu II 片段插入質體 c lac 內 (Little et al., Mol. Biol. Med. 1:473-488 (1983))。c lac 媒介之製法為：以 BamHI 消化 c lac DNA，以 DNA 聚合酶 I 大

片段填入粘端，及以 Hind III 消化 DNA；結果所得質體 (c SVHPlac) 藉接合至 Pvu II 鈍端而再生 BamHI 位。

自 C SVHPlac 製得，接合至 PSV0d 之 EcoRI-Hind III 片段，~~EcoRI - Hind III 片段 (Mellon 等人，上文)~~ (含有質體之複製起點)，並選取所得質體 pSVHPOd; 則製得含

5. SV40 起點 / 促進子之 pSVHPOd 之 340 bp EcoRI - Hind III 片段，兩端皆以 DNA 聚合酶 I 大片段形成鈍端，並接合至上述經 Xho I 消化且加鈍端之 p91023(C) 媒介。結果所形成之質體 (p91023(C) / Xho / 鈍端加 EcoRI / Hind III / 鈍端 SV40 起點加促進子) 其中 Hind III - EcoR I 片

10. 段取向使得該片段內之 BamHI 位最靠近 VA 基因者定名 pES105。質體 pES105 以 BamHI 及 Pvu II 消化，亦單以 Pvu II 消化；分離含腺病毒主要後期啟動子之 BamHI - Pvu II 片段 (片段 B)，及含抗藥性基因 (四環素抗藥性) 質體及其它序列之 Pvu II 片段 (片段 C)。

15. 接合片段 A、B 與 C，所得質體示如第 10 圖經分離且定名 RK1-4。質體 RK1-4 已貯於馬里蘭州洛克維爾市美國種型培養蒐集會，以新增編號 ATCC 39940 可得。

實例 10：於 CHO 細胞表現 EPO - 方法 I

20. 上述得自質體 pPTFL13 之 DNA (20 μg) (實例 6) 以鑑識內核酶 Cla I 消化而使質體直綫化，接合至得自質體 pAdD26SVp(A)1 之經 Cla I 消化的 DNA (2 μg)，後者含有由腺病毒主要後期啟動子所驅動之完整二氫葉酸鹽還原酶 (DHFR) (Kaufman and Sharp, Mol. and Cell Biol. 2:1304-1319 (1982))。此接合 DNA 用以性^狀感染

- DHFR 陰性 CHO 細胞 (DUKX-BII, Chasin L.A. and Urlaub G. (1980) PNAS 77 4216-4220), 在生長兩日後, 併合有至少一個 DHFR 基因之細胞在缺核苷且補充有 10% 經滲析胎牛血清之 α 培養中選取; 在選擇性培養基中生長兩週後, 自原始^{培養}皿中取出菌落, 滙集成組, 每池 10 - 100 菌落, 重行培種並於缺核苷之 α 培養中生長至融合。在 methotrexate 選擇前生長池中所得培養^基上清液以 RIA 分析其 EPO, 顯出陽性 EPO 生產之池在 methotrexate ($0.02 \mu\text{M}$) 存在下生長, 繼以次復殖並重行分析。EPO Cla 4 α 4.02-7 係得自 EPO Cla 4 α 4.02 池之單一亞純株, 釋於 $460 \mu\text{g/ml}$ EPO 進入含 $0.02 \mu\text{M}$ MTX 之培養^基內 (表 3)。EPO Cla 4 α 4.02-7 為供生產 EPO 之特選細胞系, 貯於美國種型培養蒐集會 (新增編號 ATCC CRL 8695)。目前, 此純株在濃度漸增之 MTX 中進行逐步選擇, 推斷可得能產生甚至更高程度^{產量} EPO 之細胞。由 RIA 測知呈陰性之池, 自 (在 methotrexate ($0.02 \mu\text{M}$) 存在下生長的) 對應培養所得 methotrexate 抗藥性菌落, 再度 EPO 池中以 RIA 重行分析。非陽性之培養進行次復殖, 在濃度更增之 methotrexate 中生長。
20. 經由重複如下循環 - 在漸增濃度之 methotrexate 存在下培養細胞及選出倖存者 - 可完成逐步 methotrexate (MTX) 選擇。各次循環中, 藉 RIA 及藉活體外生物活性測培養上清液中之 EPO。各逐步致大中所用 methotrexate 濃度程度為 $0.02 \mu\text{M}$, $0.1 \mu\text{M}$ 及 $0.5 \mu\text{M}$ 。如表 3 所示, 在

0.02 μ M MTX 一次選擇循環後，顯著程度之 EPO 釋入培養培養基內。

表 3
釋入培養基中之 EPO 程度

5.	試 樣	分析法	α 培養基收穫物	α 培養基收穫物中之 0.02 μ M methotrexate 50 ng/ml
	4 α 4 池	RIA	17 ng/ml	
	4 α 4 單一菌落			
	純株 (0.02-7)	RIA	-	460 ng/ml

10. 實例 11：於 CHO 細胞內表現 EPO - 方法 II

得自純株 λ HEPOFL13 之 DNA 以 EcoRI 消化，含 EPO 基因之小 RI 片段次複製入質體 RKI - 4 之 EcoRI 位 (參見例 10)；然後，此 DNA (RKFL13) 用以直接 (未經消化) 性感染 DHFR- 陰性 CHO 細胞，選擇及放大如上例 10 進行。

15. RKFL13 DNA 亦藉原質融合及微注入而插入 CHO 細胞內。質體 RKFL13 已貯存，以新增編號 ATCC 39989 可得自馬里蘭州洛克維爾市美國種型培養蒐集會。

表 4

釋入培養基之 EPO 位準

試 樣	分 析 法	α 培養基收穫物	α 培養基收穫物中之 <u>0.02μM methotrexate</u>
菌落池 A	RIA	3 ng/ml	42 ng/ml (池) 150 ng/ml (純株)
	^3H -Thy	--	1.5 U/ml
5. 單一菌落純株 (0.02C-Z)	RIA	--	90 ng/ml
	^3H -Thy	--	5.9 U/ml
微注入池 (DEPO-1)	RIA	60 ng/ml	160 ng/ml
	^3H -Thy	1.8 U/ml	--

10. 較佳單一菌落純株已貯存，並以新增編號 ATCC CRL8695 可得自馬里蘭州洛克維爾市美國種型培養蒐集會。

實例 12：於 COS-1 細胞中表現 EPO 基因組純株

- 用以表現 EPO 基因組純株之媒介為 pSV0d (Mellon 等人，上文)；得自 pSV0d 之 DNA 以 HindIII 消化至完全，以 DNA 聚合酶 I 大片段加上鈍端。EPO 基因組純株 λ -HEPO3 以 EcoRI 及 HindIII 消化完全，如上分離含 EPO 基因之 4.0 kb 片段並加鈍端。此片段自 HindIII 位至恰超過聚腺苷基化訊號之區其核苷酸序列示如第 4 圖。
15. EPO 基因片段插入 pSV0d 質體片段內，分離並證實在二取向正確營構成的重組體。質體 CZ2-1 其 EPO 基因呈取向 "a" (亦即 EPO 之 5' 端最靠 SV40 起點)，質體 CZ1-3 呈相反取向 (取向 "b")。

質體 CZ1-3 及 CZ2-1 如例 7 性^狀感染入 COS-1 細胞，收穫培養基，分析其免疫反應性 EPO；得自 CZ2-1 之

培養上清液中偵檢得約 31 ng/ml EPO，得自 CZ1-3 爲 16-31 ng/ml。

基因組純株 HEP01, HEP02 及 HEP06 可插入 COS 細胞內，供以類似方式表現。

5. 實例 13：於 C127 及於 CHO 細胞內表現

pBPVEPO 之營構

質體含有在鼠金屬硫因質啓動子轉錄控制之下之 EPO cDNA 序列並聯結至完整牛乳頭狀瘤病毒 DNA 者如下製得。

10. pEPO49f

質體 SP6/5 購自 Promega Biotec 公司，此質體以 EcoRI 消化完全，得自 λ -HEPOFL13 之 1340 bp EcoRI 片段藉 DNA 接合酶插入。結果所形成之質體，其中 EPO 基因之 5'端最靠近 SP6 啓動子（如 EglI 及 Hind III 消化測知者）者定名 pEPO49f。此取向中，PSP 6/5 聚聯結子中 BamHI 位直接鄰接 EPO 基因之 5'端。

15.

pMMTneo Δ BPV

第 11 圖例示之質體 pdBPV-MMTneo (342-12) (Law et al., Mol. and Cell Biol. 3:2110-2115 (1983)) 以 BamHI 消化完全而產生兩片段：一大片段，長約 8kb，含 BPV 基因組；及一小片段，長約 6.5 kb，含 pML2 複製起點及安比西林抗藥性基因，金屬硫因質啓動子，新黴素抗藥性基因，及 SV40 聚腺苷基化訊號。消化後之 DNA 以 DNA 接合酶重新環化，僅含 6.8 kb 片段之質

20.

體由 EcoRI 及 BamHI 鑑識內核酸酶消化而辨識，一質體定名 pMMTneo Δ BPV。

pEPO15a

5. pMMTneo Δ BPV 以 Bgl II 消化完全，pEPO49f 以 BamHI 及 Bgl II 消化完全，由凝膠分離製得含完整 EPO 編碼區之約 700 bp 片段；經 Bgl II 消化之 pMMTneo Δ BPV 與 700 bp BamHI/Bgl II EPO 片段接合，所得含 EPO cDNA 之質體與 (EPO 基因之專一性) 寡核苷酸 d (GGTCATCTGTCCCCTGTCC) 探子行菌落混成而識別。混成分析呈陽性之質體中，一者 (pEPO15a) 其 EPO cDNA 之取向使得 EPO cDNA 5' 端最靠近金屬硫因質啟動子者係藉著 EcoRI 及 KpnI 消化而辨識。
- 10.

pBPV-EPO

15. 質體 pEPO15a 以 BamHI 消化完全而令質體成直線化，質體 pdBPV-MMTneo(342-12) 亦以 BamHI 消化完全而產生 6.5 及 8 kb 之兩片段。含完整牛乳頭狀瘤病毒基因組之 8 kb 片段行凝膠分離；pEPO15a/BamHI 與 8 kb BamHI 片段接合在一起，經由使用 BPV 基因組專一性寡核苷酸探子 d(P-CCACACCCGGTACACA-OH) 行菌落混交而辨識含 BPV 片段之質體 (pBPV-EPO)。以 Hind III 消化 pBPV-EPO DNA 指出 BPV 基因組之轉錄方向與金屬硫因質啟動子之轉錄方向 (如於 pdBPV-MMTneo(342-12)，參見第 11 圖相同。質體 pdBPV-MMTneo(342-12) 可以新增編號 ATCC 37224 得自馬里蘭州洛克維爾市美國種型
- 20.

培養蒐集會。

表現

下法用以表現 EPO。

方法 I

5. 製得 DNA pBPV-EPO, 約 25 μg 用以採標準磷酸鈣沈澱技術 (Grahm et al., Virology, 52:456-67(1973)) 而性^狀感染 1×10^6 C127 (Lowy et al., J. of Virol. 26:291-98 (1978)) CHO 細胞。性^狀感染後 5 小時, 去除性^狀感染培養, 細胞經甘油衝擊, 洗滌, 並加入含 10%, 胎牛血清之新 α 培^基養。48 小時後, 細胞以胰蛋白酶消化, 並以 1:10 之比例分裂, 係於含 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 之 DME 培^基養內 (Southern et al., Mol. Appl. Genet. 1:327-41 (1982)); 細胞培育二至三週。然後將 G418 性^狀抗^菌落一一分鑿入微滴定井中, 於 G418 存在下生長至次融合為止; 繼以洗滌細胞, 加入含 10% 胎牛血清之新培^基養, 24 小時後收穫培^基養, 測驗經調整之培^基養, 由放射性免疫分析法及活體外生物分析法顯示呈 EPO 陽性。
- 10.
- 15.

方法 II

20. C127 或 CHO 細胞如方法 I 所述共同性^狀感染以 25 μg pBPV-EPO 及 2 μg pSV2neo (Southern 等人, 上文), 此有約十倍莫耳過量之 pBPV-EPO; 在性^狀感染後, 其程序如同方法 I。

方法 III

C127 細胞如方法 I 所述性^狀感染以 30 μg pBPV-EPO

，在性^狀感染及分裂（1：10）後，每三日更換一次新培養基；約2週後，BPV變性細胞之病灶顯著，個別病灶檢出置於微滴定盤之1 cm井中，生長成次融合之單層並於經調理培^基養中檢測其EPO活性或抗原性。

5. 實例 14：於昆蟲細胞中表現

pIVEV EPOFL13 之營構

質體媒介 pIVEV 已貯存，以新增編號 ATCC 39991 可得自馬里蘭州洛克維爾市美國種型培養蒐集會。此媒介如下而修飾。

10. pIVEVNI

pIVEV 以 EcoRI 消化而令質體成直綫，使用 DNA 聚合酶 I 大片段形成鈍端，單一 Not I 聯結子。

GGCGGCCGCC

CCGCCGCCG

15. 經鈍端接合而插入；所得質體定名 pIVEVNI。

pIVEVSI

pIVEV 以 SmaI 消化而直綫化，單一 Sfi I 聯結子

GGGCCCCAGGGGCC

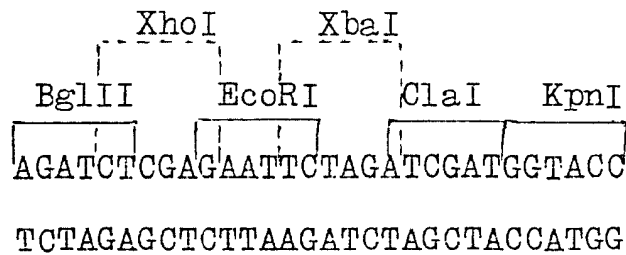
CCCCGGGTCCCCGG

20. 經鈍端接合而插入；所得質體定名 pIVEVSI。

pIVEVSIBgKp

質體 pIVEVSI 以 Kpn I 消化而直綫化，經由以雙股外核酸酶 Bal 31 消化而自各端去除約 0 至 100 bp。所得任何未全然鈍化之端以 DNA 聚合酶 I 大片段弄鈍，

聚聯結子



經鈍端接合而插入。聚聯結子以二取向插入。一質體其中聚聯結子取向使得聚聯結子中 Bgl II 位係最靠近多面體基因啓動子者定名 pIVEVSIBgKp；一質體其中聚聯結子中 KpnI 位係最靠近多面體基因啓動子者定名 pIVEVSIKpBg。在 pIVEVSI 內原始 KpnI 位與多面體啓動子間刪去之基對數目未測知。pIVEVSIBgKp 已貯存，以新增編號 ATCC 39988 可得自馬里蘭州洛克維爾市美國種型培養蒐集會。

pIVEVSIBgKpN1

pIVEVNI 以 KpnI 及 Pst I 消化完全而產生兩片段，一大片段含質體複製起點及多面體基因 3'端者係以凝膠分離製得（片段 A）；pIVEVSIBgKp 以 Pst I 及 KpnI 消化完全而產生兩片段，而小片段含多面體基因啓動子及聚聯結子者以凝膠單離製得（片段 B）。然後，片段 A 與 B 由 DNA 接合酶接合而生成新質體 pIVEVSIBgKpN1，它含部分刪去之多面體基因且其中已插入聚聯結子，而亦含由多面體基因區側出的 NotI 位（取代已破壞之 EcoRI 位）及 SfiI 位。

pIVEPO

pIVEVSIBgKpN1 以 EcoRI 消化完全而令質體成直綫，插入得自 λ -HEPOFL13 之 1340 bp EcoRI 片段。質體含 EPO 基因其取向使得 EPO 基因之 5'端最靠近多面體啓動子，而多面體基因之 3'端以 Bgl II 消化識別，一種具上述取向之質體定名 pIVEPO。

5.

於昆蟲細胞中表現 EPO

經由性狀大腸桿菌菌株 JM101-tgl 製得大量 pIVEPO 質體。質體 DNA 藉澄清溶解物技術 (Maniatis 及 Fritsch, 冷泉港手冊) 而離並藉 CsCl 離心而進一步純化。

10.

野生型 Autographa californica 多面體性病毒 (AcNPV) 品系 L-1 DNA 其製備法係以酚萃取病毒粒子，繼以 CsCl 純化病毒 DNA。

15.

然後此 DNA 使用磷酸鈣性感染程序 (Potter and Miller, 1977) 共同性感染至 Spodoptera frugiperda 細胞 IPLB-SF-21 (Vaughn et al., In Vitro Vol. B, pp. 213-17 (1977))。對於各血被共同性感染之細胞使用 1 μ g 野生型 AcNPV DNA 及 10 μ g pIVEPO；各血於 27°C 培育 5 日，然後收穫上清液，藉放射免疫分析法及藉活體外生物分析法確證 EPO 表現於上清液中。

20.

實例 15：EPO 之純化

經 COS 細胞調理之培養基 (121) 其 EPO 濃度高達 200 μ g/l，濃縮成 600 ml，係使用 10,000 分子量截留超濾膜，如 Millipore Pellican 配有 5 平方呎膜。如例 6 藉 RIA 進行分析。得自超濾之滯留物對著 4 ml

10 mM 磷酸鈉 (緩衝成 pH 7.0) 行滲析過濾。經濃縮^及滲析過濾調理的培養^基於 380 mg 總蛋白質中含有 2.5 mg EPO; EPO 溶液進一步濃縮成 186ml, 於 110,000 xg 離心 30 分鐘而去除沈澱蛋白質。

5. 含 EPO (2.0 mg) 之上清液以 50% 乙酸調整至 pH 5.5, 令之於 4 °C 攪拌 30 分鐘, 於 13,000 xg 離心 30 分鐘而去除沈澱。

羧甲基 Sepharose 層析

10. 自離心而得之上清液 (20 μ l) 含 200 μ g EPO (24 mg 總蛋白質), 施與充有 CM-Sepharose (20 ml) 於 10 mM 乙酸鈉 pH 5.5 中平衡之柱; 以 40 ml 同一緩衝液洗。結合於 CM-Sepharose 之 EPO 以 100 ml 梯度 NaV(0-1) 於 10 mM 磷酸鈉 pH 5.5 溶離分 (於 2 mg 總蛋白質中合計 50 μ g) 經滙集, 以 Amicon YM 15. 10 超濾膜濃縮成 2 ml。

逆相 HPLC

20. 得自 CM-Sepharose 之含 EPO 濃溶離分進一步藉逆相 - HPLC 使用 Vydac C-4 柱純化, EPO 以 1 ml/分鐘流速施於於溶劑 B 中平衡之柱 (溶劑 A 為 0.1% $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ 於水; 溶劑 B 為 0.1% $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ 於 CF_3CN); 柱以 10% B 洗 10 分鐘, EPO 以直綫梯度 B (10 - 70% 計 60 分鐘) 溶離。滙集並凍乾含 EPO 之溶離分 (於 120 μ g 總蛋白質中有 40 μ g EPO); 凍乾之 EPO 於含 0.15M NaCl 之 pH 7.5 之 0.1 M Tris-HCl 中重行調製, 及

於逆相 HPLC 上重行層析；含 EPO 之溶離分經滙集並藉 SDS-聚丙烯醯胺（10%）凝膠電泳（Lameli, V.K., Nature）分析。滙集之 EPO 溶離分於 25 μg 總蛋白質中含有 15.5 μg EPO。

5. 本發明已詳細說明，包括其較佳具體實例；唯須了解技藝精湛人士在考慮本文說明書及附圖後將可做成修飾及改善而未悖離如附隨之請求專利部份所界定之本發明精義與範疇。

203160

參 考 文 獻

1. Jacobson, L. O., Goldwasser, E. Fried, W., and Plzak, L. F., Trans. Assoc. Am. Physicians 70:305-317 (1957).
2. Krantz, S. B. and Jacobson, L. O. Chicago: University of Chicago Press 1970. pp. 29-31.
3. Hammond, D. and Winnick, S. Ann. N.Y. Acad. Sci. 230:219-227 (1974).
4. Sherwood, J. B. and Goldwasser, E., Endocrinology 103:866-870 (1978).
5. Fried, W. Blood, 40:671-677 (1972).
6. Fisher J. J. Lab. and Clin. Med. 93:695-699 (1979).
7. Naughton, B. A., Kaplan, S. M., Roy M., Burdowski, A. J., Gordon, A. S., and Piliero, S. J. Science 196:301-302.
8. Lucarelli, G. P., Howard, D., and Stohlman, F., Jr. J. Clin. Invest 43:2195-2203 (1964).
9. Zanjani, E. D., Poster, J., Burlington, H., Mann, L.I., and Wasserman, L. R. J. Lab. Clin. Med. 89:640-644 (1977).
10. Krantz, S. B., Gallien-Lartigue, O., and Goldwasser, E. J. Biol Chem. 238:4085-4090 (1963).
11. Dunn, C. D., Jarvis, J. H. and Greenman, J. M. Exp. Hematol. 3:65-78 (1975).
12. Krystal, G. Exp. Hematol. 11:649-660 (1983)
13. Iscove, N. N. and Guilbert, L. J., M. J. Murphy, Jr. (Ed.) New York: Springer-Verlag, pp. 3-7 (1978).
14. Goldwasser, E., ICN UCLA Symposium, Control of Cellular Division and Development, A.R. Liss, Inc.,

203169

pp. 487-494 (1981).

15. Cline, M. J. and Golde. D. W. Nature 277:177-181 (1979).
16. Metcalf, D., Johnson, G. R., and Burgess, A. W. Blood 55:138- (1980)
17. Krane, N. Henry Ford Hosp. Med. J. 31:177-181 (1983).
18. Eschbach, J., Mladenovic, J., Garcia, J., Wahl, P., and Adamson, J. J. Clin. Invest. 74:434-441 (1984).
19. Anagnostou, A., Barone, J., Vedo, A., and Fried, W. Br. J. Hematol 37:85-91 (1977).
20. Miyake, T., Kung, C., and Goldwasser, E. J. Biol. Chem. 252:5558-5564 (1977)
21. Yanagawa, S., Hirade, K., Ohnota, H., Sasaki, R., Chiba, H., Veda, M., and Goto, M. J. Biol. Chem. 259:2707-2710 (1984).
22. Lawn, R. M., Fritsch, E. F., Parker, R. C., Blake, G., and Maniatis, T. Cell 15:1157- (1978).
23. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. Proc. Nat'l. Acad. Sci., U.S.A. 74:5463- (1977).
24. Zanjane, E. D., Ascensao, J. L., McGlave, P. B., Banisadre, M., and Ash, R. C. J. Clin. Invest. 67: 1183- (1981).
25. Toole, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., Sultzman, L. A., Buecker, J. L, Pittman, D. D., Kaufman, R. J., Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E. C., Amphlett, G. W., Foster, W. B., Coe, M. L., Knutson, G. J., Fass, D. N., and Hewick, R. M. Nature in Press
26. Goldwasser, E. Blood Suppl. 1, 58, xlii (abstr) (1981).

27. Sue, J. M. and Sytkowdki, A. J. Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 80:3651-3655 (1983).
29. Bersch, N. and Golde, D.W., In Vitro Aspects of Erythropoiesis, M.J. Murphy (Ed.) New York:Springer-Verlag (1978)
30. Cotes, P. M. and Bangham, D. R. Nature 191:1065- (1961).
31. Goldwasser, E. and Gross, M. Methods in Enzymol 37:109-121 (1975).
32. Nabeshima, Y.-i, Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, M., and Ogata, K. Nature 308:333-338 (1984).
33. Young, R. A., Hagenbuchle, O. and Schibler, U. Cell 23:451-558 (1981).
34. Medford, R. M., Nguyen, H. T., Destree, A. T., Summers, E. and Nadal-Ginard, B. Cell 38:409-421 (1984).
35. Ziff, E. B. Nature 287:491-499 (1980).
36. Early, P. Cell 20:313-319 (1980).
37. Sytkowski, A. Bio. Biop. Res. Comm. 96:143-149 (1980).
38. Murphy, M. and Miyake, T. Acta. Haematol Jpn. 46: 1380-1396 (1983).
39. Wagh, P. V. and Bahl, O. P. CRC Critical Reviews in Biochemistry 307-377 (1981).
40. Wang, F. F., Kung, C. K.-H. and Goldwasser, E. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 42:1872 (abstr) (1983).
41. Lowy, P., Keighley, G. and Borsook, H. Nature 185: 102-103 (1960).
42. VanLenten, L. and Ashwell, G. J. Biol. Chem. 247: 4633-4640 (1972).

203163

43. Lee-Huang, S. Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 81: 2708-2712 (1984).
44. Fyhrquist, F., Rosenlof, K., Gronhagen-Riska, C., Hortling, L. and Tikkanen, I. Nature 308:649-652 (1984).
45. Ohkubo, H., Kageyama, R., Vjihara, M., Hirose, T., Inayama, S., and Nakanishi, S. Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 80:2196-2200 (1983).
46. Suggs, S. V., Wallace, R. B., Hirose, T., Kawashima, E. H. and Itakura K. Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 78:6613-6617 (1981).
47. Woo, S. L. C., Dugaiczyk, A., Tsai, M.-J., Lai, E. C., Catterall, J. F. and O'Malley, B. W. Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 75:3688- (1978).
48. Melchior, W. B. and VonHippel, P. H. Proc. Nat'l. Acad. Soc. U.S.A. 70:298-302 (1973).
49. Orosz, J. M. and Wetmis, J. G. Biopolymers 16:1133-1199 (1977).
50. Anderson, S. and Kingston, I. B. Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 80:6836 6842 (1983).
51. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E. L. V., Whittle, H., Waterfield, M.D. and Seeburg, P. H. Nature 309:418-425 (1984).
52. Fisher, J. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 173:289-305 (1983).
53. Kozak, M. Nuc. Acid Res. 12:857-872(1984).
54. Benton, W. D. and Davis, R. W. Science 196:180-182(1977).

55. Sherwood, J. B. and Goldwasser, E. Blood 54:885-893 (1979).
56. Derman, E., Krauter, K., Walling, L., Weinoerger, C., Ray, M., and Darnell, J.T., Cell 23:731- (1981)
57. Gluzman, Y., Cell 23:175-182 (1981)
58. Hewick, R.M., Hunkapiller, M.E., Hood, L.E., and Dreyer, W.J. J. Biol. Chem. 256:7990-7997 (1981)
59. Towbin, H., Stachelin, T., and Gordon, J., Proc. Natl Acad. Sci 76:4380- (1979)
60. Carnott, P., Deflandre, C. C.R. Acad. Sci, Paris 143:432- (1906).

203103

發明

之名稱： 復殖之人類紅血球生成素基因及其產品

新型

四、摘要說明：

描述得自人胎肝並提供出人意表之高表現位準的人紅血球生成素 (EPO) 復殖基因。亦描述該基因於活體外表現以生產活性人 EPO 。

附註：本案已向 美 國 (地區) 申請專利

申請日期： 1985.1.22

案 號： 693,528

203100

公告本

gactctacgcctgtggccagggccagagccttcagggacccttgactccccgggctgtgtgcatttcag_a

ACG	GGC	TGT	GCT	GAA	CAC	TGC	AGC	TTG	AAT	GAG	AAT	ATC
Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	Asn	Ile

ACT	GTC	CCA	GAC	ACC	AAA	GTT	AAT	TTC	TAT	GCC	TGG	AAG
Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala	Trp	Lys

AGG	ATG	GAG	<u>gtgagttccttttttttttttctttcttttggagaatctcatttgcgagcctg</u>
Arg	MET	Glu	d

atttggatgaaggagaaatgatc

203100

ttcattcaacaagtcttattgcataccttctgtttgctcagcttgggtgcttggggctgctgaggggcaggaggga 2250
gagggtgacatccctcagctgactcccagagtcactccctgtagGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGCCAG
ValGlyGlnGlnAlaValGluValTrpGln
GGCCTGGCCCTGCTGTCCGAAGCTGTCCTGCGGGCCAGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCACCGTGGGAGCCC 2400
GlyLeuAlaLeuLeuSerGluAlaValLeuArgGlyGlnAlaLeuLeuValAsnSerSerGlnProTrpGluPro
CTGCACCTGCATGTGGATAAAGCCGTCAGTGGCCTTCGCAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAG
LeuGlnLeuIleValAspLysAlaValSerGlyLeuArgSerLeuThrThrLeuLeuArgAlaLeuGlyAlaGln
gtgagtaggagcggacacttctgcttgcctttctgtaagaaggggagaagggtcttgcataaggagtacaggaac 2550
gtccgtatccctcccttctgtggcactgcagcgacctcctgtttctccttggcagAAGGAAGCCATCTCCC
LysGlyAlaIleSerP
CTCCAGATCGGGCCTCACCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCGGCAAAGTGTCCGAGTCTACT 2700
roProAspAlaAlaSerAlaAlaProLeuArgThrIleThrAlaAspThrPheArgLysLeuPheArgValTyrS
CCAATTCCTCCGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGAGCCCTCCAGGACAGGGACAGA
erAsnPheLeuArgGlyLysLeuLysLeuTyrThrGlyGluAlaCysArgThrGlyAspArg

203100

源自成人肝
源自胎兒肝

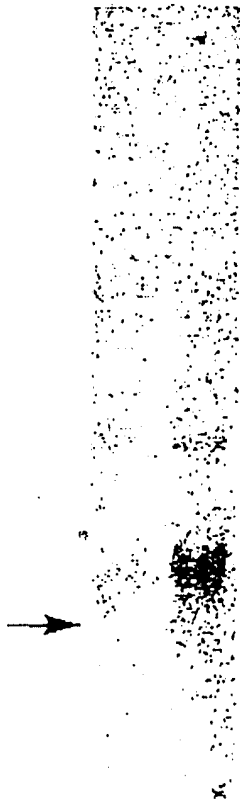


圖 2

-27
MET GLY VAL HIS GLU CYS PRO

ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU GLY LEU PRO VAL LEU GLY

1
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys
SH 10 20

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
SH 30 50

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Glu Glu Ala
50 60

Val Glu Val Trp Glu Gly Leu Ala Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Glu Ala Leu
70 80

Leu Val Asn Ser Ser Glu Pro Trp Glu Pro Leu Glu Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
90 100

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Lys Glu Ala Ile Ser
110 130

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys
130 140

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
150 160

Cys Arg Thr Gly Asp Arg
SH 166

203100

203100

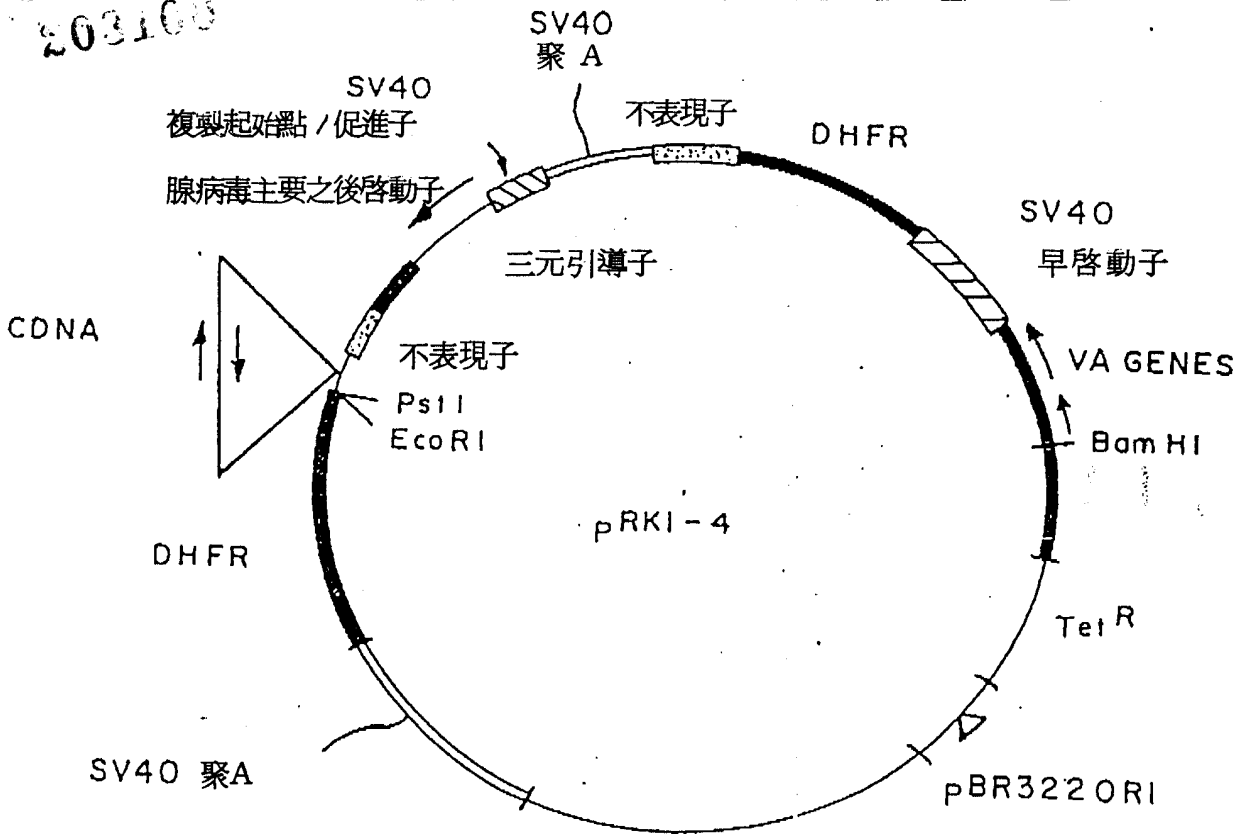


圖 10

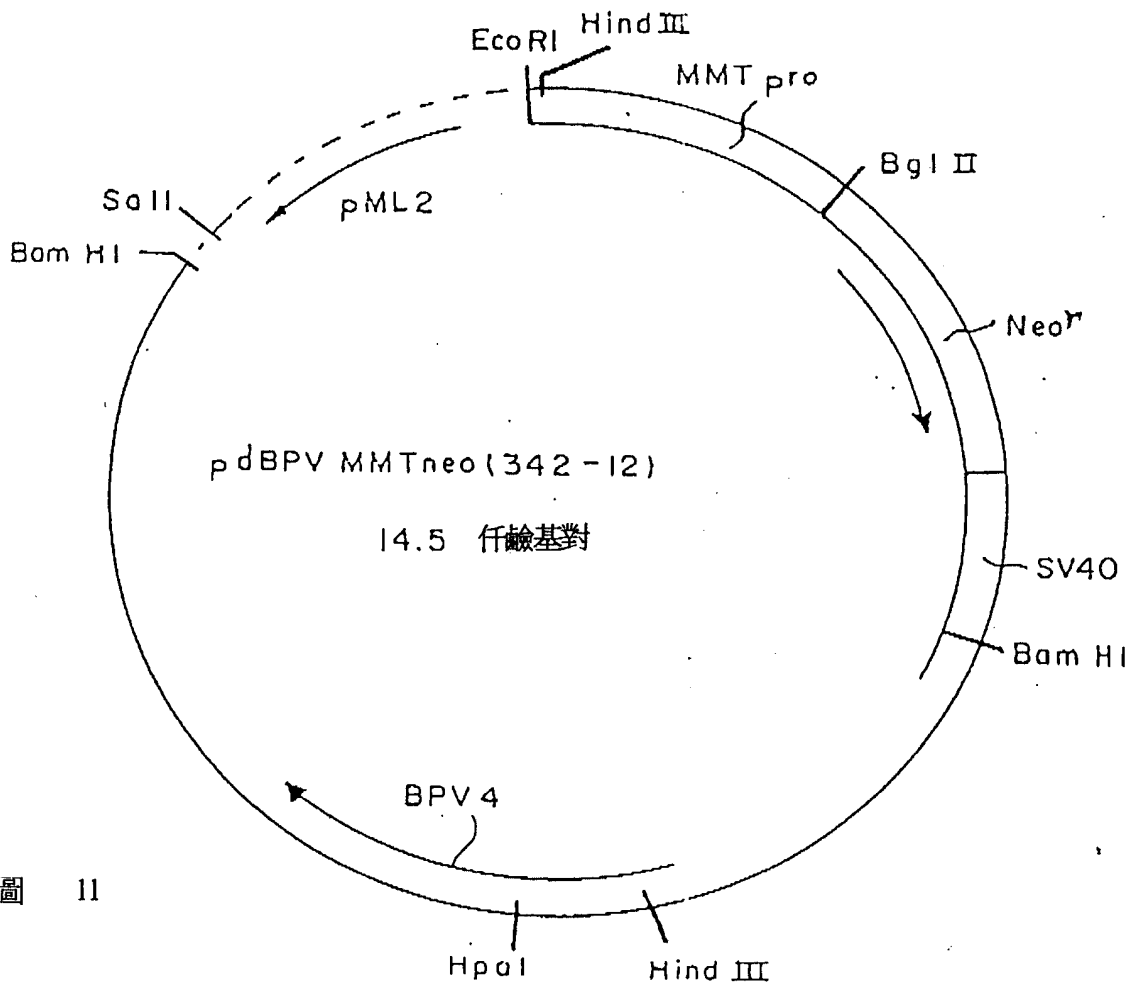


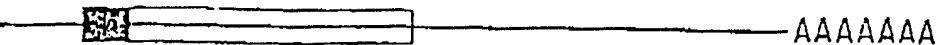
圖 11

203100

A

5'

3'



27個胺基酸
之引導子

166個胺基酸之
成熟產物

200 400 600 800 1000 1200 1400 鹼基對

B

ccccgagcc																		ggaccggggc						cactgcgccc						gctctgctccg						acaccgcgcc																							
ccctggacag																		ccgcctctc						ctccaggccc						gtgggctgg						ccctgcaccg						ccgagcttcc						cgggatgagg						ccccggcgt					
ggtcaccggg																		cgcgccccag						gtcgtgagg						gccccggcc						aggcgcggag						-27						MET GLY VAL HIS GLU CYS PRO											
																																				ATG GGG GTG CAC GAA TGT CCT						▲																	
ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU GLY LEU PRO VAL LEU GLY																		CCC TCC CTC TCC CTT CTC CTC TCC CTG CTG TCC CTC CTT CTG GGC CTC CCA CTC CTG CTG GGC																																									
1																		SH						10						20																													
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys																		GCG CCA CCA GCC CTC ATC TGT GAC ACC CGA GTC CTG GAC AGG TAC CTC TTC GAG GCC AAC																																									
Glu Ala Glu																		* Arg Ile Thr Thr						SH 30						SH						40																							
GAG GCC GAG AAT ATC ACC ACC GCG TGT GCT CAA CAC TCC ACC TTG AAT CAG AAT ATC ACT																		▲																																									
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala																		GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT GUC TCC AAG ACC ATC CAG CTC GGC CAG CAG CAG CCC																		▲						60																	
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu																		GTA GAA CTC TCG CAG GGC CTG GCC CTC CTG TCC GAA CCT CTC CTC CCG CCG CAG CCC CCC CTC																		80																							
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asn Lys Ala Val Ser																		TTC CTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG GAG CCC CTC CAG CTC CAT CTG CAT AAA GCC GTC ACT																		* 100																							
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser																		CCC CTT CCC ACC CTC ACC ACT CTG CTT CCG CCT CTG CCA GCC CAG AAG GAA GCC ATC TTC																		▲ 120																							
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys																		CCT CCA GAT CCG GCC TCA GCT GCT CCA CTC CCA ACA ATC ACT GCT GAC ACT TTC CCG AAA																		140																							
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala																		CTC TTC CGA CTC TAC TCC AAT TTC CTC CCG GCA AAG CTC AAG CTG TAC ACA GCC GAG CCC																		160																							
SH																		166																																									
Cys Arg Thr Gly Asp Arg																		TCC ACC ACA GCC CAC ACA TCA ccaggctg . tctccacctg																		ggcctatcca						ccacctccct						caccacactt											
gcttgtgcca																		caccctcccc						cgccactccct						gaaccccggc						gaggggctct						cagctccagg						ccagcctgct											
ccctggacac																		tccagtgcca						gcactgacat						ctcaggggcc						aggaggactg						tccagagggc						aactctgaga											
tccaaggatg																		tcocaggccc						aacttgaggg						cccagggcag						gagccttcca						gngagcagct						ttdaacccag											
ggacagggcc																		atgctgggaa						gagcctctag						ctcactcggc						acctctgaaa						atctctgccc						aggacacgct											
tggggggcga																		cttacctggt						ctcgcacctc						ccctcaggga						caggatgacc						tggggacctt						aggctggcag											
ctgtgacttc																		tccaggcttc						acgggcatgg						gcactccctt						ggctgcaaga						gcccccttga						caccggggctg											
gtggggaacca																		tgaagcagg						atggggctg						gctctctggct						ctcatgggg						ccnagctttg						tgtattcttc											
aacctccctg																		acaaggaactg						aaacccccc						aaaaaaaaaaaa																													

圖 3'B

5' → 3'

圖 4 A

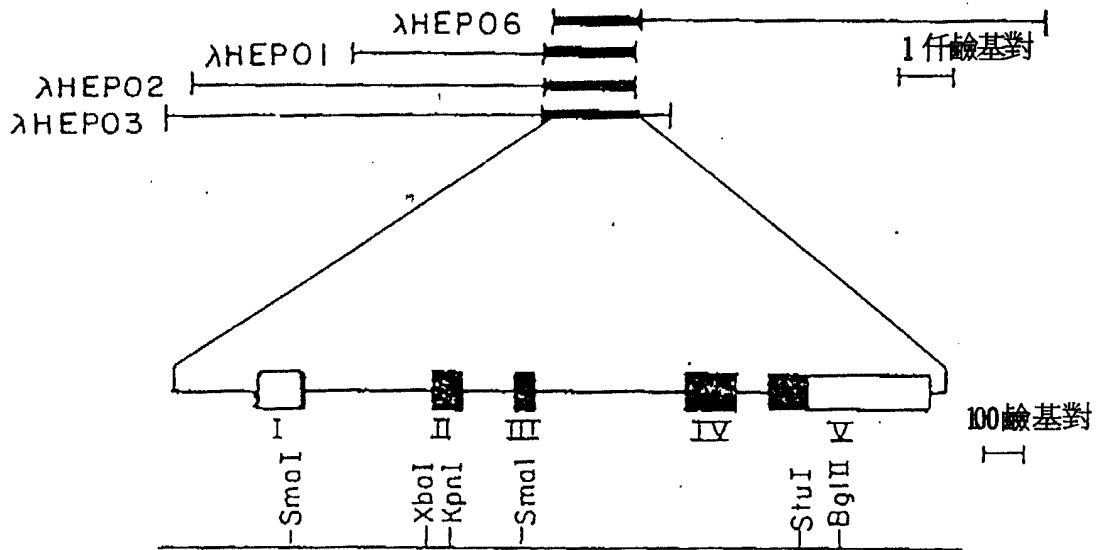


圖 4 B

aagccctcgggctccagaccagctactcttgcgggactcagcaaccacggcaactctcagagtcctccgcccagac

203100

cgagatgccccccagagagctccgggagccagccctccccagatagcagctccgcccagtcctccagggctgcza

150

accggctgcactccccctcccgagaccagggcccgaggagcagccccatgaccacacagcagctctgcagcagcc

ccgtcageccccggagcctcaacccagggctcctgcccctgctctgaccccgggtggccccctaccctggcgacce

300

ctcagcacaacagcctctcccccccccccccccccgccacgacacatgcagatnacagccccgacccccggccaga

igccgcagagtccttgggcccacCCCGGCCGCTCCCTGCCCTGCCCGCACCCGGCTGTCTCTCCCGGAGCCGGACCG

450

CCCCACCGCCCGCTCTGCTCCGACACCGCGCCCTGGACAGCCGCCCTCTCTCCAGGCCCGTGGGGCTGG

ICCTIGCACCCCGAGCTTCCCGGATGAGGCCCGCGGTGTGGTCACCCGGCGGCCCGCCAGGTCGCTGAGGGACC

60

CCGGCCACCGCGGAGATCGGGCTGCACCGctgagtaactcgcgggctgggctcctccgcccggccgggtccctgtt
MetGlyValHisG

tgagcggggatttagcgccccggctattggccagaggtggctgggttcaaggaccggcgacttgtaaggacce

750

cggaaggggaggggggtggggcagcctccacgtgccagcggggacttgggggagtccttggggatggcaaaaac

ctgacctgtaaggggacacagtttgggggttgaggggaagaaggttgggggggtctctgctgtgccagtgagag

900

gaagctgataagctgataacctgggcgctggagccaccacttatctgccagaggggaagcctctgtcacaccagg

attgaagtttggccgggagaagtggatgctggtagcctgggggtggggtgtgcacacggcagcaggattgaatga

ggccagggaggcagcacctgagtgcttgcattgggttggggacaggaaggacgagctggggcagagacgtggggatg

aggaagctgtcctccacagccacccttctccctccccgctgactctcagcctggctatctgtcttagAATGT
luCys

1200

CCTCCCTGCCCTGTCCCTTCTCCTGTCCCTGCTGCTCCCTCTGGCCCTCCAGTCCCTGGCGCCCCACCACCGC
ProAlaTrpLeuTrpLeuLeuLeuSerLeuLeuSerLeuProLeuGlyLeuProValLeuGlyAlaProProArg

CTCATCTGTACACCCGAGTCCCTGCAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACGGctgagacce
LeuIleCysAspSerArgValLeuGluArgTyrLeuLeuGluAlaLysGluAlaGluAsnIleThr

1350

圖 4 C (第一部分)

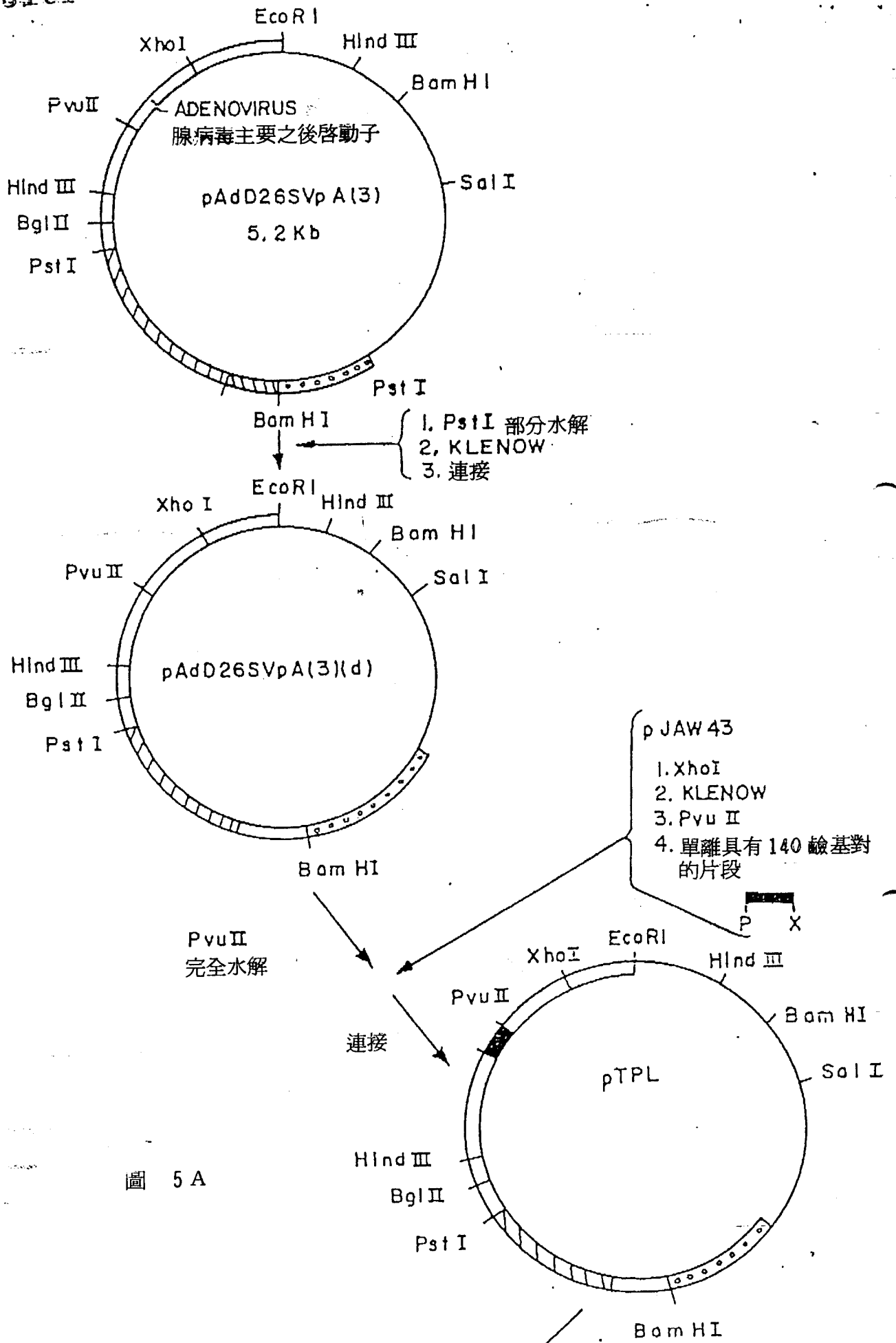
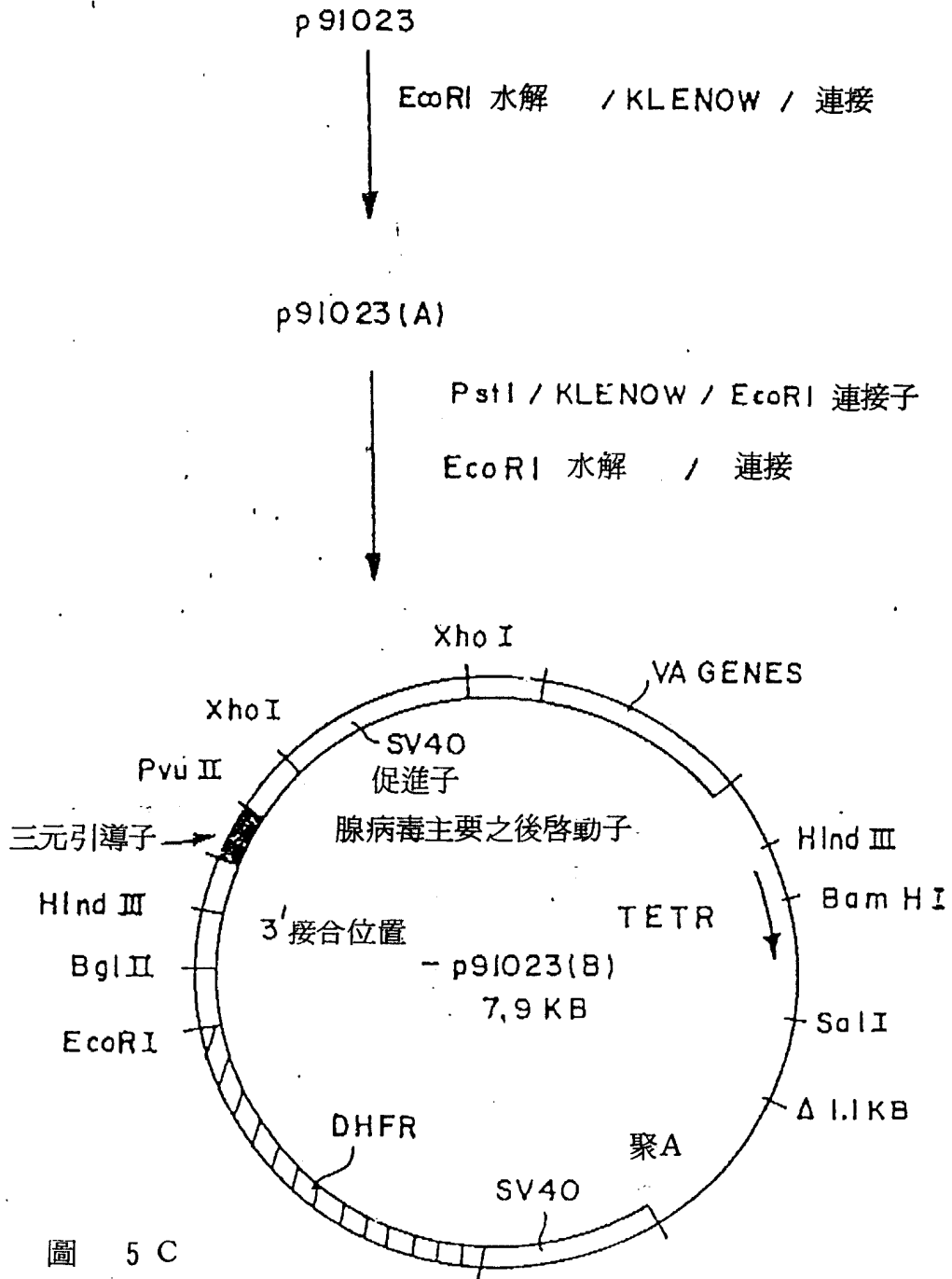


圖 5 A

203100



203100

天然 EPO 重組 EPO 天然 EPO
天 然 組 型 然 天
重 重 125/-

68仟道耳吞 →

45仟道耳吞 →



圖 6

203160

Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala
CTC	TTC	CGA	GTC	TAC	TCC	AAT	TTC	CTC	CGC	CCA	AAG	CTG	AAG	CTC	TAC	ACA	GGC	GAG	GCC
166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166	166
Sil	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg	TGA	ccaggctg	tgfccaccctg	ggcataaccga	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct
TCC	AGC	ACA	GGC	GAC	AGA														
gctctgtgcca	caccctccccc	cgcccaclccc	gcaatggacat	ctcagggggccc	aggggggacct	cagctccagcg	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct
ccatggacac	lccagctggcca	gcaatggacat	ctcagggggccc	aggggggacct	cagctccagcg	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct	ccaccctccct
lccaaaggatg	lcaacaggggccc	aacttgggggg	cccagagggcag	gagggcattcca	gaggatgacct	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga
ggacagggccc	atgctggggaa	gagggcctggag	cccagagggcag	gagggcattcca	gaggatgacct	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga
ctgggaggcga	tttaaccctgct	ctccgcaacctg	cccagagggcag	gagggcattcca	gaggatgacct	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga	lcccazagggc	gactctggaga
ctgtgagcttc	lccagggtccc	accggggcactgg	ggcaclcccctc	ggctctggct	ctcaatggggct	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc
gtggggaacca	lgaagacaggg	atggggggggctg	ggctctggct	ctcaatggggct	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg	tgtaaccctccc	cccaggtttttg
aacctcattg	accagaaactg	aaaaaacacaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa	aaaaaaaanaaa

圖 7 (第2部分)

203300

ccccggagcc ggaccggggg caccgcgccc gctcgcctccg acaccgcbcc

ccccggacag ccgcccctcc ctccaggccc gtggggctgg cccctgcaccg ccgagcctccc cgggatgaggg cccccggctg

ggccaccgag cgcgccccag gtcgctgagg gacccccggc aggcgcggag

-27
MET GLY VAL HIS GLU CYS PRO
ATC GCG GTG CAC CAA TCT CCT

ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU GLY LEU PRO VAL LEU GLY
GCC TCG CTG TGG CTT CTC CTC TCG CTC TCG TCG CCT CTG GCG CTC CCA GTC CTG CTG GCC

1
Ala Pro Pro Arg Leu Ile SH Cys Asp Ser 10 Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys 20
GCC CCA CCA CGC CTC ATC TGT GAC ACC CGA GTC CTG GAG AGG TAC CTC TTG CAG GCC AAC

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr 40
GAG GCC GAG AAT ATC ACC ACC GCG TGT CCT GAA CAC TCC AGC TTG AAT GAG AAT ATC TTT

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala 60
GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT GCC TGG AAG ACC ATG GAG CTC GCG CAC CAG GCC

Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu 80
GTA GAA GTC TCG CAG GCC CTC GCC CTC CTC TCG GAA CCT CTC CTC CCG GCC CAG GCC CTC

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser 100
TTG GTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG CAG CCC CTG CAG CTC CAT CTG GAT AAA GCC CTC ACT

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser 120
GCC GTT CCG ACC CTC ACC ACT CTC CTT CCG CCT CTG GCA GCC CAG AAG GAA GCC ATC TTT

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys 140
CCT CCA GAT CCG GCC TCA GCT GCT CCA CTC CCA ACA ATG ACT GCT GAC ACT TTC GCC AAA

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala 160
CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC CTC CCG GGA AAG CTC AAG CTC TAC ACA GGC CAG GCC

SH
Cys Arg Thr Gly Asp Arg 166
TCC ACC ACA CCG CAC AGA TCA ccagggtg tgtccactg ggcatacca ccccccccc cccccacatt

gctctgtgca ccccccccc cgcacacctt gaacccccgtc ggggggctct cagctcagcg ccagcctgtc

ccatggacac tccagtgcca gcaatgacct ctcaggggccc aggggaactg tccagagagc aactctgaga

tctaaggatg tccacggggc aacttgagggg cccagagcug gaagcattca gaggcagcct ttaaacctcg

ggacagagcc atgctgggaa ggcgcctgag ctcacctggc nccctgcaaa atctgatgcc agbacagcct

ctggaggcga tttacctgtc ttcgcaccta ccatcagggc caggatgccc tggagacctt aggtggcag

ctgtgacttc tccaggcttc acgggcatgg gcacctcccc ggtggcagga gcccccttga caccggggctg

gtgggaacca tgaagacagg atggggctgg gcctctggct ccatggggc ccaagcttgg tgtatcttc

aacctcattg acabgaactg aaaccacca aaaaaaaaaa

203160

修正
82年2月17日
補充

公告本

附件一(A):

第74102884號專利申請案中文申請專利範圍修正本

民國82年2月修訂

1 一種可編碼人類紅血球生成素(EPO)之cDNA,其具有如下所示

之核苷酸序列:

-27
MET GLY VAL HIS GLU CYS PRO
ATG GGG GTG CAC GAA TGT CCT
△

ALA TRP LEU TRP LEU LEU LEU SER LEU LEU SER LEU PRO LEU GLY LEU PRO VAL LEU GLY
GCC TGG CTG TCG CTT CTC CTG TCG CTG CTG TCG CTG CCT CTG GGC CTC CCA GTC CTG GCC

1 SH 10 20
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys
GCC CCA CCA CGC CTC ATC TGT CAC AGC CGA GTC CTG GAG AGG TAC CTC TTG GAG CCC AAG

☆ SH 30 SH 40
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
CAG GCC GAG AAT ATC ACC ACG GGG TGT CCT GAA CAC TCC AGC TTG AAT GAG AAT ATC ACT
△

50 60
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala
GTC CCA GAG ACC AAA GTT AAT TTG TAT GCC TGG AAG AGG ATG GAG CTC GCG CAG CAG GCC
△

70 80
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
GTA GAA GTG TGG CAG GCC CTG GCC CTG CTG TCG GAA GCT GTC CTG CGG GGG-CAG GCC CTG

☆ 90 100
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
TTG GTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG GAG CCC CTG CAG CTG CAT GTG GAT AAA GCC GTC AGT

110 120
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
GCC CTT CCC ACC CTC ACC ACT CTG CIT CCG GCT CTG CGA GCC GAG AAG GAA GCC ATC TCC
△

130 140
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys
CCT CCA GAT GCG GCC TCA GCT GCT CCA CTC CGA ACA ATC ACT GCT GAC ACT TTG CCC AAA

150 160
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
CTC TTC CGA GTG TAG TCC AAT TTC CTC CCG GGA AAG CTG AAG CTG TAC ACA GCG GAG GCC

SH 166
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
TGC AGG ACA GCG GAC ACA TGA

2 一種供製備人類重組紅血球生成素的方法,其包含在適當的培養基中,培養COS,或CHO細胞,該細胞係用含有如申請專利範圍第1項之人類cDNA或其片段的轉移載體,諸如,質體PTFL6,質體PTFL13,質體

RK1-4，由來自質體 PTF13 之 DNA 與來自質體 AdD 26 SV_p(A)1 之 DNA 連接所得的 DNA，質體 RKFL13 或質體 BPV-EPO，予以轉形；以及自該培養基分離出人類紅血球生成素。

3. 一種供製備具如下所示胺基酸序列之人類重組紅血球生成素的方法，其包含在適當的培養基中，培養 COS 或 CHO 細胞，該細胞係用含有具下列核苷酸序列之人類基因群 DNA 或其片段的轉移載體，諸如，質體 CZ1-3 或質體 CZ2-1，予以轉形；以及自該培養基分離出人類紅血球生成素，

ATGCCGTCACGgtgagtactcggggctgggcgctcccggccggggtccctgtt
 MetGlyValHisG
 tgagcggggatttagcggcccgctattggccaggaggtggctgggttcaaggaccggcgacttgtcaaggacc 750
 cggaaagggggagggggtggggcagcctccacgtgccagcggggacttgggggagtccttggggatggcaaaaac
 ctgacctgtgaaggggacacagtttgggggttgagggaagaaggttggggggtctgtctgtgccagtgagag 900
 gaagctgataagctgataacctgggcgctggagccaccacttatctgccagaggggaagcctctgtcacaccagg
 attgaagtttggccggagaagtggatgctgtagcctgggggtgggggtgtgcacacggcagcaggattgaatgaa 1050
 ggccagggaggcagcactgagtgcttgcattggttggggacaggaaggacgagctggggcagagacgtggggatg
 aaggaaactgtccttcacagccacccttctccctcccgcctgactctcagcctggctatctgttctagAATGT 1200

CCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGCGCTCCCTCTGGCCCTCCCAGTCCCTGGCGCCCCACCACCG
 ProAlaTrpLeuTrpLeuLeuLeuSerLeuLeuSerLeuProLeuGlyLeuProValLeuGlyAlaProProArg
 CTCATCTGTGACAGCCGAGTCCCTGGAGAGGTACCTCTTGGACGCCAAGGAGCCGAGAATATCACGgtgagacc 1350
 LeuIleCysAspSerArgValLeuGluArgTyrLeuLauGluAlnLysGluAlaGluAsnIleThr
 ctccccagcacattccacagaactcacgctcagggttcagggaactcctccagatccaggaacctggcactt
 ggtttgggggtggagtgggaagctagacactgccccctacataagaataagtctggtggccccaaaccatacct 1500
 ggaaactaggaagagcaaagccagcagatcctacgcctgtggccaggfccagagccttcaggacccttgact
 ccccggtctgtgtgcatttcagACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCCAGACAC 1650
 ThrGlyCysAlaGluIleCysSerLeuAsnGluAsnIleThrValProAspTh
 CAAAGTTAATTTCTATGCCCTGGAAGAGGATGGACgtgagttcttttttttttttttctttcttttggagaat
 rLysValAsnPheTyrAlaTrpLysArgIleGlu
 ctcatctgagcctgattttggatgaaagggagaatgatcgagggaaaggtaaaatggagcagcagagatgagg 1800
 ctgcttggggcagagaggtcagctctataatcccaggctgagatggccgagatgggagaattgcttgagccctgg
 agtttcagaccaaccttaggcagcatagtgagatccccatctctacaaacatttaaaaaatagtcaggltgaag 1950
 tgggtgatgggttagtcccagatatttgaaggctgagggcgggagatcgcttgagcccaggaatttgaggctg
 cagtgagctgtgatcacaccactgcactccagcctcagtgacagagtgaggccctgtctcaaaaaagaaaagaaa 2100
 aaagaaaaataatgagggtgtatggaatacgttcattagtcagtcactcactcactcactcattcattca