402639

年月日 89.5.04 修正補充 本

申請日期	82.11.30
案號	82110126
類別	C12N 15/80, 15/00, C12P 21/02

（以上各欄由本局填註）

A4
C4

公告本

發明 新型 專利說明書

一、發明新型名稱	中文	蛋白質生產及蛋白質傳送
	英文	PROTEIN PRODUCTION AND PROTEIN DELIVERY
二、發明創作人	姓名	1.道格拉斯.崔克 2.麥克W.哈特藍 3.理查F.沙登
	國籍	美國
	住、居所	1.美國.麻卻諸塞州02174亞林頓市.布藍德塢路87號 2.美國.麻卻諸塞州01719布克斯波若市.瑞德農場路167號 3.美國.麻卻諸塞州02181威爾斯利市.布利斯圖路106號
三、申請人	姓名（名稱）	越核治療公司
	國籍	美國
	住、居所（事務所）	美國.麻卻諸塞州02139劍橋.烏木街195號
	代表人姓名	理查F．沙登

402639

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

402639

年月日 89.5.04 修正補充 本

申請日期	82.11.30
案號	82110126
類別	C12N 15/80, 15/00, C12P 21/02

（以上各欄由本局填註）

A4
C4

公告本

發明 新型 專利說明書

一、發明新型名稱	中文	蛋白質生產及蛋白質傳送
	英文	PROTEIN PRODUCTION AND PROTEIN DELIVERY
二、發明創作人	姓名	1.道格拉斯.崔克 2.麥克W.哈特藍 3.理查F.沙登
	國籍	美國
	住、居所	1.美國.麻卻諸塞州02174亞林頓市.布藍德塢路87號 2.美國.麻卻諸塞州01719布克斯波若市.瑞德農場路167號 3.美國.麻卻諸塞州02181威爾斯利市.布利斯圖路106號
三、申請人	姓名（名稱）	越核治療公司
	國籍	美國
	住、居所（事務所）	美國.麻卻諸塞州02139劍橋.烏木街195號
	代表人姓名	理查F．沙登

402639

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

年 月 日 修正 補充
89.6.08

五、發明說明（17）

一新穎蛋白質或新穎核酸）。DNA獲得之來源可為自然發生或使用遺傳工程技術或人工合成方法可產生者。轉染進入初級細胞或二級細胞的DNA可編碼一或多種治療性產物。轉染進入初級細胞或二級細胞後，外源性DNA穩定嵌入接受者細胞基因體中（與出現在所使用之DNA構築體之額外序列一起），表現或行使其他功能。或者，外源性DNA游離性存在於受轉染初級細胞或二級細胞中。

編碼欲得產物之DNA可於一可誘發啟動子之控制下進入細胞，使得細胞生產或進入個體後不表現產物但可予以誘發（即，產量之誘發係於受轉染細胞產生後但於植入前後均可）。編碼欲得產物之DNA當然亦可用進入後立即表現之方式進入細胞（即，不需誘發）。

如在此所教導的，基因尋標法可以被用於以一分離自一不同基因的調節序列或一經由遺傳工程的方法製造之新穎調節序列去取代一基因已存在的調節序列。這種調節序列可以被包含於啟動子，促進子，骨架連接區域(scaffold-attachment region)，負性調節元件，轉錄起始位置，調節性蛋白質結合位置或已述序列之組合。(或者，影響所產生的RNA或蛋白質之結構或穩定性的序列可以被取代，移除，加入或另外經由尋標法加以修正，這些序列包括多腺核苷化訊號，mRNA穩定元件，剪接位置，促進或修正該蛋白質運輸或分泌特性之引導序列。或其它改變或改善蛋白質或RNA分子之功能或穩定性的序列)。根據本發明的方法，外源性D

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ / ）

發明背景

目前對於經由施用治療性蛋白質來治療疾病的研究包括供傳統性醫藥傳送（例如，靜脈內，皮下，或肌肉內注射）之治療性蛋白質之體外生產，及較近期地，基因治療。

具治療性意義的蛋白質通常經由置入編碼具治療性意義的蛋白質之外源性ＤＮＡ到合適的細胞內加以生產。目前對於基因治療方面可行之研究利用到感染性的載體，例如反轉錄病毒載體，其中包含欲表現的遺傳物質。這樣的研究本身具有限制，例如在載體生產時產生可複製病毒之潛在可能性，治療性病毒與內源性病毒之間發生重組，潛在性生成具新穎細胞特異性，宿主範圍之感染性因子，或增加毒性及細胞殺傷力；獨立嵌入大量細胞中，增加腫瘤產生性插入事件之危險性；在反轉錄病毒中限制選殖能力（其限制治療應用性）並於短期在體內表現目的產物。一較好的研究係提供基因產物，特別是在避免關於目前可用方法之風險及提供長期生產這一點上具有價值。

發明概述

本發明相關於供體外治療性蛋白類的生產及供經由基因治療之治療性蛋白類的生產及傳送的改良方法。本方法敘述一種活化內源性細胞基因表現的研究方式，並進而使得被活化之內源性細胞基因進行增幅，其不需要編碼具治療目的之蛋白質之外源性ＤＮＡ進行體外的操作或轉染。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（60）

n位於ＥＰＯ第２－５個ｅｘｏｎ的上游。轉錄，剪接及轉譯的產物為ｈＥＰＯ訊號胜肽第１－４個胺基酸被ｈＧＨ第１－３個胺基酸殘基所取代之蛋白質。該兩個具體事實不同點在於外來調節性序列插入之相對位置及產生最終加工之轉錄本(transcript)所需要的特殊剪接形式。

質體ｐＸＥＰＯ－１０用於藉由基因尋標於人類第７對染色體上內源性ｈＥＰＯ基因以ｈＧＨ第１個ｅｘｏｎ取代ｈＥＰＯ第１個ｅｘｏｎ。質體ｐＸＥＰＯ－１０構築如下。首先，中間質體ｐＴ１６３藉由將６仟鹽基對ＨｉｎｄⅢ－ＢａｍＨＩ片段（見實施例１ｆ）在ＨｉｎｄⅢ－ＢｏｍＨＩ切割之ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔⅡＳＫ＋（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，ＬａＪｏｌｌａ，ＣＡ）內插入ｈＥＰＯ譯碼區　域之上游。該連接後的產物以ＸｈｏＩ及ＨｉｎｄⅢ切割並連接至來自ｐＭＣｌｎｅｏＰｏｌｙＡ〔Ｔｈｏｍａｓ，Ｋ．Ｒ．及Ｃａｐｅｃｃｈｉ，Ｍ．Ｒ．Ｃｅｌｌ　５１：５０３－５１２（１９８７），可用來自Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，ＬａｊｏｌｌａＣＡ者〕之１．１仟鹽基對ＨｉｎｄⅢ－ＸｈｏＩ片段上。在聚合酶鏈反應中使用寡核苷酸１３．１－１３．４而產生一融合片段，其中老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ１（ｍＭＴ－Ｉ）啟動子－ｈＧＨ第１個ｅｘｏｎ序列融合於ｈＥＰＯ　第１個ｅｘｏｎ序列。首先，寡核苷酸１３．１及１３．２被用來自ｐＸＧＨ５（圖１）增幅約０．

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ ）

本發明相關於受轉染之細胞，包括受轉染之初級細胞及受轉染之二級細胞（即，非不死化細胞）及受轉染之不死化細胞，其有利於生產蛋白質，特別是治療性蛋白質的製造，相關於製造這些細胞的方法，使用這些細胞供體外蛋白質的製造及相關於基因治療的方法。本發明之細胞為脊椎動物來源，特別是哺乳動物來源及甚至較特別的是人類來源。藉由本發明方法所產生的細胞包含編碼一治療性產物的外源性ＤＮＡ，或外源性ＤＮＡ本身為一治療性產物及／或造成該受轉染細胞以較高程度表現基因或使該受轉染細胞具有與相關未受轉染細胞不同之調節或誘發型式之外源性ＤＮＡ。

本發明亦相關於轉染初級細胞，二級細胞及不死化細胞以使其包括外源性遺傳物質的方法，相關於產生選殖細胞株或異源性細胞株的方法及使用該受轉染初級細胞，二級細胞及不死化細胞來免疫動物，或在免疫動物身上產生抗體的方法。

本發明特別相關於一種在脊椎動物來源，特別是在哺乳動物來源的細胞中進行之基因尋標或相似性重組的方法。也就是說，其相關於將ＤＮＡ經由相似性重組置入脊椎動物來源之初級細胞，二級細胞或不死化細胞，使得該ＤＮＡ被置入初級細胞，二級細胞或不死化細胞之基因體ＤＮＡ上的預選位置。該所使用的尋標序列係藉由外源性ＤＮＡ欲嵌入的位置加以決定（選擇之參考）。本發明進而

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（66）

ＥＰＯ啟動子及上游序列進行對應性重組的細胞包含一種多形性基因，其中ｍＭＴ－Ｉ啟動子及非轉錄性序列，ｈＧＨ５’未轉譯序列及ｈＧＨ　第１個ｅｘｏｎ，及一包含ｈＥＰＯ　第１個ｉｎｔｒｏｎ前１０個鹽基對之１０鹽基對長連接子於相對於ｈＥＰＯ密碼區域－６２０位置的Ｈｉｎｄ Ⅲ處插入（見圖６）。位於正常沈默之ｈＥＰＯ啟動子上游之ｍＭＴ－Ｉ啟動子將於初級或二級皮膚纖維母細胞中，指揮具（５’至３’）非轉譯性ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ及ｈＧＨ序列，ｈＧＨ第１個ｅｘｏｎ同於ｈＥＰＯ　第１個ｉｎｔｒｏｎ前１０個鹽基對的１０鹽基ＤＮＡ，及正常性ｈＥＰＯ啟動子及ｈＥＰＯ第１個ｅｘｏｎ（相對於ＥＰＯ密碼區域－６２０至＋１３）之訊號的製造。來自ｈＥＰＯ　第１個ｉｎｔｒｏｎ之１０鹽基對連接子序列作為剪接主動位置將ｈＧＨ　第１個ｅｘｏｎ與位於ｈＥＰＯ　第２個ｅｘｏｎ上游之下一個下游剪接被位置融合。該轉錄本之處理將因而剪出ｈＥＰＯ啟動子，第１個ｅｘｏｎ，及第１個ｉｎｔｒｏｎ序列。以ｈＧＨ　ｅｘｏｎ１取代ｈＥＰＯ　第１個ｅｘｏｎ產生ｈＥＰＯ訊號胜肽前４個胺基酸以ｈＧＨ第１－３個胺基酸取代之蛋白質，並製造一具功能之多形性訊號胜肽，其藉由後轉譯處理成熟蛋白質上移除並自表現細胞分泌。

可使用習知方法構築一系列相關於ｐＸＥＰＯ－１０

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（3）

相關於有本發明產生之相似性重組之初級細胞，二級細胞或不死化細胞，被稱為相似重組性（HR）初級細胞，二級細胞或不死化細胞，及相關於HR初級細胞，二級細胞或不死化細胞的用途。

本發明亦相關於一種活化（即，開啟）一出現於脊椎動物來源之初級細胞，二級細胞或不死化細胞中的基因，該基因在細胞中正常是不表現的或當細胞得到時並不以生理上有意義的程度加以表現。根據本發明的方法，相似性重組被用於以一造成該受轉染細胞以較高程度表現基因或使該受轉染細胞具有與相關未受轉染細胞不同之調節或誘發型式之外源性DNA，取代或破壞當細胞得到時與其中基因正常性連結的調節區域。本發明因而相關於一種經由開啟或活化一內源性基因的方法，該內源性基因與受轉染之初級細胞，二級細胞或不死化細胞中編碼一希望之產物。

在一個具體事實中，該活化基因可以進而經由含有一可篩選標記而被增幅，該可篩選標記具有的特性為含有該可篩選標記基因之增幅拷貝的細胞可以經由在合適的篩選劑存在下培養細胞而加以篩選出。該鄰近或連接於被增幅之可篩選標記基因之內源性基因在含有被增幅之可篩選標記基因的細胞中亦可被增幅。包含許多份拷貝之被活化內源性基因的細胞有利於供體外蛋白質的生產及基因治療。

如在本發明所揭示之基因尋標及增幅特別有利於開啟

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（67）

及pXEPO－11的構築體。在這些構築體中，mMT－I啟動子及hGH序列的相對位置，及mMT－I／hGH序列插入hEPO上游序列的位置皆為多變的以創造有助於基因尋標之多形性轉錄，使得融合之轉錄本表現更有效率，或具其他希望的特性。此種構築體將得到相同的結果，因此該hGH／hEPO融合基因藉由基因尋標而在正常hEPO基因上受到一外源性啟動子的控制。

例如在hEPO基因上游之6仟鹽基對HindIII－BamHI片段（見實施例1f）據有許多限制酶鑑識序列而可以作為neo基因及mMT－I啟動子／hGH融合片段的嵌入位置。一個這樣的位置，位於該HindIII位置上游約1．3仟鹽基對之BglII位置，在此區域為獨特的，且可作為一或多個可篩選標記及一衍生自另一個基因的調節性序列插入的用途，該調節性序列可以作為在初級人類細胞、二級人類細胞或不死化人類細胞中活化EPO表現之用途。

首先，中間型質體pT164係經由將在hEPO編碼區域上游6Kb之HindIII－BamHI片段（實施例1f）嵌入以HindIII－BamHI切割之pBluescriptIISK+（Stratagene，LaJolla，CA）中構築而成。質體pMClneoPolyA〔Thomas，K．R．及Capccchi，M．R．Cell51：503－512（

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 4 ）

會形成相當大的轉錄單位且因此難以分離及表現之基因的表現，或開啟整個蛋白質的編碼區域上未可知或尚未選殖之基因。本發明亦敘述一種相似性重組用於轉變一基因成為ｃＤＮＡ拷貝，去除ｉｎｔｒｏｎ，供轉移入酵母菌或細菌中進行體外蛋白質的生產的方法。

本發明受轉染的細胞有利於在人類及動物上的許多應用。在一具體事實中，該細胞可被植入一人類或一動物身上以供在人類或動物身上進行蛋白質的傳送。例如，人類生長激素（ｈＧＨ），人類ＥＰＯ（ｈＥＰＯ），人類胰島素調理素及其他蛋白質可以系統性或局部性在人類身上被傳送而提供治療的助益。包含表現一治療性產物之受轉染細胞且治療性產物可以自由進出之屏障設計可以用來將細胞駐留體內一固定的位置，或保護並分離細胞，免於宿主免疫系統的攻擊。屏障設計特別有利於並使得受轉染不死化細胞，來自其他生物種類的受轉染細胞（異種性受轉染細胞，ｘｅｎｏｇｅｎｉｃ），或來自一非組織抗原相容性配合之提供者（受轉染異體性細胞，ａｌｌｏｇｅｎｉｃ），可以被植入以供人類或動物的治療或供農業用途（例如，肉類及日常產品）。屏障設計亦允許經由接近細胞之方便的短期（即，暫時性）治療，並當治療計畫因任何理由停止時可以移出。受轉染之異種性及異體性細胞可作為短期基因治療的用途，使得該細胞所產生的基因產物在體內被傳送直到該細胞受到宿主免疫系統的排斥為止。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（71）

一訊息的產生：（5′到3′）非轉譯性metallothionein及hGH序列，hGH第1個exon，與hEPO第1個intron前10個鹽基對相同之10鹽基對之DNA，及hEPO上游區域及hEPO第1個exon（相對於EPO編碼序列，自約－1920到＋13）。來自hEPO第1個intron之10鹽基對連接子序列作為一剪接提供位置以便將hGH第1個exon融合到下游的剪接接受位置，其為於hEPO第2個exon的正上游位置。所得到的轉錄本的加工將因此剪接出hEPO上游序列，啟動子區域，第1個exon，及第1個intron序列。當使用pXEPO－10，－11及－12時，該訊息之轉錄後加工可以經由利用體外突變產生法以除去剪接接受位置加以改善，該剪接接受位置位於介於mMT－I啟動子及hEPO第1個exon之間的hEPO上游序列中，其本來會減少製造希望的訊息所需要之生產行剪接事件的發生程度。以hGH第1個exon取代hEPO第1個exon導致一蛋白質中hEPO訊息胜肽中前4個胺基酸被hGH之第1個到第3個胺基酸所取代，製造出一功能性，融合之訊息胜肽，其藉由轉譯後加工自成熟蛋白質上去除且由表現細胞中分泌出來。

實施例3．　上游序列之被尋標修正及該被尋標基因的增幅

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 5 ）

本發明之受轉染細胞亦有利於提升抗體的產生或供免疫人類或動物以對抗致病因子。經植入的受轉染細胞可以用來傳送免疫性抗原，引起對宿主細胞及體液免疫反應的刺激。這些免疫反應可以被設計成保護宿主免於未來的感染性因子的感染（即，疫苗用途），刺激或調節直接對抗一正發生之感染的疾病作戰能力，或產生抗體直接對抗在體內經由受轉細胞所產生的抗原，該受轉染細胞有利於治療性或診斷性目的。可移除之屏障設計可以作為允許一終止抗原的曝露之簡單設計。或者，最終會被排斥的細胞（異種性或異體性受轉染細胞）可以作為限制抗原的曝露，因為抗原的生產會因為細胞被排斥而停止。

本發明的方法可以用於生產會產生廣泛範圍之治療上有用的產物之初級細胞，二級細胞或不死化細胞，這些產物包括（但不限於）：一激素，細胞激素，抗原，抗體，酵素，凝血因子，輸送蛋白質，受體，調節性蛋白質，結構性蛋白質，反義ＲＮＡ。另外，本發明的方法可以用於產生細胞，該細胞會生產有利於一治療性產物的體外生產及基因治療之非自然發生之ＲＮＡ酶，蛋白質，或核酸。

圖示簡述

圖１為質體ｐＸＧＨ５之概要圖示，其包括在老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ啟動子的控制下之人類生長激素（ｈＧＨ）基因。

圖２為質體ｐｃＤＮＥＯ之概要圖示，其包括嵌入質

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（81）

exon5序列，酵母菌轉錄終只序列，酵母菌質體複製序列，LTR，gpt基因，hGH3′非轉錄序列。

來自TC1及TC2的線狀片段順序行嵌入hGH基因兩側的相對位置。當以輔助性反轉錄病毒重複感染（superinfection）這些細胞後，LTR經由此區域所指揮的轉錄作用將導致一RNA在兩端具有LTR。此RNA的剪接將產生一種其中正常hGH intron被移除的分子。該被加工的轉錄本之反轉錄作用將造成經加工之hGH融合基因之雙股DNA拷貝的累積。由該雙重尋標的反轉錄病毒性感染之細胞中分離出DNA，並以一在該轉錄單位之LTR中切割一次之酵素加以切割。該被切割的物質在促進環化反應的條件下進行黏接，被送入酵母菌細胞中，且該細胞接著被曝露於針對URA3基因所進行的篩選之下。只有採取URA3基因的細胞（URA3連接於被TC1及TC2所送入的序列及該經加工之hGH基因）能夠生長。這些細胞包含一將在半乳糖的誘發下表現hGH蛋白質且在細胞中經由被融合之酵母菌引導胜肽序列分泌出該hGH蛋白質的質體，酵母菌引導胜肽序列在分泌時會被切除而產生一成熟，具生物活性之hGH分子。

在細菌細胞中的表現係伴隨著簡單地在TC1及TC2中，將來自pBR322之安比西林（ampicillin）一抗藥性基因取代酵母菌URA3基因，將ta

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 6 ）

體ｐｃＤ之ＢａｍＨＩ位置之來自質體ｐＳＶ２ｎｅｏ之ｎｅｏ編碼區域（ＢａｍＨＩ－ＢｇｌＩＩ片段）；來自ｐＢＲ３２２之Ａｍｐ－Ｒ及ｐＢＲ３２２Ｏｒｉ序列；及ｐｏｌｙＡ，１６Ｓ剪接交會位置及來自ＳＶ４０之早期啟動子區域。

圖３為質體ｐＸＥＰＯ１之概要圖示。該實體黑弧表示ｐＵＣ１２骨幹且該箭頭表示安比西林（ａｍｐｉｃｉｌｌｉｎ）抗藥性基因的轉錄方向。該斜線弧表示老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ啟動子（ｐｍＭＴ１）。該空心且為黑方塊所中斷的弧表示人類紅血球生成素ＥＰＯ基因（黑色方塊顯示ｅｘｏｎ且該箭頭指示ｈＥＰＯ轉錄的方向）。限制核酸酶辨識處的相對位置亦加以標明。

圖４為質體ｐＥ３ｎｅｏＥＰＯ之概要圖示。人類紅血球生成素基因的相對位置及ｎｅｏ和ａｍｐ抗藥性基因被標示出。箭頭指出不同基因的轉錄方向。ｐｍＭＴ１表示老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ啟動子（驅動ｈＥＰＯ的表現）且ｐＴＫ表示疱疹簡單病毒胸腺核苷激酶啟動子（驅動ｎｅｏ的表現）。圖譜中的點狀區域標示人類ＨＰＲＴ序列的位置。限制核酸酶辨識處的相對位置亦加以標明。

圖５為轉錄性活化ｈｅｐｏ基因之策略的概要圖示；細線表示ｈＥＰＯ序列；粗線為老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎＩ啟動子；點狀方塊為ｈＧＨ之５′非轉譯

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（7）

區域；實心方塊為hGH第1個exon；開口性方塊為hEPO編碼序列；HIII，HindIII位置。

圖6為轉錄性活化hepo基因之策略的概要圖示；細線表示hEPO序列；粗線為老鼠metallothionein I啟動子；點狀方塊為hGH之5′非轉譯區域；實心方塊為hGH第1個exon；斜線方塊為10鹽基對來自hEPO第1個intron的連接子；開口性方塊為hEPO編碼序列；HIII，HindIII位置；交叉線方塊為hEPO之5′非轉譯區域；且開口性方塊為hEPO編碼序列；HIII，HindIII位置。

圖7為一紅血球生成素在一被尋標之人類細胞株中表現並進行逐步在0·02，0·05，0·1，0·2及0·4μM之甲胺基蝶呤（methotrexate）中進行篩選的圖示。

圖8為質體pREPO4之概要圖示。

發明詳述

發明總覽

本發明及其中以參考方式加入的方法相關於脊椎動物來源，特別是哺乳動物來源之受轉染初級及二級細胞，其以外源性遺傳物質（DNA或RNA）進行轉染，並編碼一臨床上有用產物，相關於轉染初級及二級細胞而使其具外源性遺傳物質之方法，相關於產生可表現外源性遺傳物

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 8 ）

質之選殖株細胞或是異源性細胞株的方法，相關於經由本發明受轉染細胞之利用提供生理上有用份量之產物給一需要之個體之方法，相關於免疫動物來對抗可表現與該受轉染細胞表現之產物有抗原相關性之表位（epitopes）的致病性病毒或微生物之方法，及相關於產生抗體直接對抗受轉染初級、二級或不死化細胞之產物的方法。臨床上有用的產物可以經由自受轉染細胞的純化而於體外產生，也可以經由植入一非人類或人類（基因治療）而於體內製造。不論在體內或體外生產，臨床上有用的產物可以包括激素類，細胞激素類，抗原類，抗體類，酵素類，凝血因子類，運輸蛋白質類，受體類，調節性蛋白質類，結構性蛋白質，轉錄因子類，及反義ＲＮＡ。另外，本發明的方法可以用於產生可生產非自然發生之ＲＮＡ酶類，蛋白質類，或核酸類之細胞。

在一個具體事實中，本發明相關於一種脊椎動物細胞，特別是哺乳動物來源之基因或ＤＮＡ尋標（targeting）的方法。也就是說，其相關於將ＤＮＡ經由相似性重組（homologous recombinantion）置入脊椎動物來源之初級細胞，二級細胞或不死化細胞，使得該ＤＮＡ被置入初級細胞，二級細胞或不死化細胞之基因體ＤＮＡ上的預選位置。該所使用的尋標序列係藉由外源性ＤＮＡ欲嵌入的位置加以決定（選擇之參考）。本發明進而相關於有本發明產生之相似性重組

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（9）

之初級細胞，二級細胞或不死化細胞，被稱為相似重組性（ＨＲ）初級細胞，二級細胞或不死化細胞，及相關於ＨＲ初級細胞，二級細胞或不死化細胞的用途。

本發明亦相關於在脊椎動物來源之初級細胞，二級細胞或不死化細胞中基因開啟或活化的方法，該基因正常時未於細胞中表現或表現未達明顯之程度。對應性重組法或尋標法係用來以一引起基因表現程度較相關未受轉染細胞者為高之調節序列取代或破壞正常相關於該基因之調節區域。本發明因而相關於一種經由開啟或活化一內源性基因的方法，該內源性基因與受轉染之初級細胞，二級細胞或不死化細胞中編碼一希望之產物。

在一些具體事實中，外源性ＤＮＡ經過與受轉染（接受者）細胞之基因體ＤＮＡ進行之相似性重組可以根據本發明加以實施。在一個具體事實中，外源性ＤＮＡ的置入造成一正常下不表現的或表現程度太低而對體外蛋白質傳送或基因治療無甚益處之基因的活化。在第二個具體事實中，編碼一具治療性用途的產物之序列經由相似性重組在接受者細胞之基因體上的預選位置嵌入接受者細胞的基因體中，使得嵌入位置為精確可知且該位置可以針對其被偏好的特性加以選擇（例如，允許外源性ＤＮＡ之高程度表現的位置）。

在第三個具體事實中，本發明敘述一種活化（即，開啟）及增幅一在一受轉染初級細胞、二級細胞或不死化細

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（10）

胞中編碼一希望產物之內源性基因。也就是說，其相關於一種經由與基因體ＤＮＡ之間之相似性重組方法，該方法置入非正常功能性連接於內源性基因之ＤＮＡ序列及（1）當其在內源性基因位置或鄰近內源性基因位置嵌入宿主基因體，其可以改變（例如，活化）內源性基因的表現，且進而（2）允許篩選出其中被活化內源性基因經過增幅之細胞。在本發明中有利的可增幅序列包括，但不限於：編碼可篩選標記二氫葉酸還原酶、腺核苷去胺酶及ＣＡＤ基因（編碼三功能性蛋白質：磷酸胺基甲酯製造酶，天門冬胺酸轉胺基甲醯酶，及二氫乳清酸酶）的序列。亦可使用這些序列及其他可增幅序列的修正者。根據本發明的方法，該編碼一可篩選標記之可增幅序列及改變該內源性基因之表現調節之ＤＮＡ序列，與在細胞基因體上一預選位置之基因體ＤＮＡ序列相似之ＤＮＡ序列聯合被置入初級細胞、二級細胞或不死化細胞。此位置通常在編碼一治療性產物的基因上游或之中，或在影響希望基因之功能的位置。改變內源性基因表現的ＤＮＡ序列，編碼一可篩選標記之可增幅序列，及與基因體ＤＮＡ預選位置相似之序列，可以用一單一ＤＮＡ構築體，或以分開而在一受轉染細胞之基因體上物理性連接的序列形式被置入初級細胞、二級細胞或不死化細胞。進而，該ＤＮＡ可以單股，雙股ＤＮＡ，在一或兩個末端具有或不具有單股區域的形式置入，或該ＤＮＡ可以環狀ＤＮＡ形式嵌入。當外源性ＤＮＡ

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（11）

被置入細胞後，該細胞在適合相似性重組發生於基因體ＤＮＡ及被置入ＤＮＡ之部份之間的條件下被培育。介於基因體ＤＮＡ及被置入ＤＮＡ之間的相似性重組導致一相似性重組初級細胞、二級細胞或不死化細胞，其中改變一內源性基因表現的序列，及編碼一可篩選標記之可增幅序列，係合作性連接於一編碼治療性產物的內源性基因。在篩選出編碼一可篩選標記之可增幅ＤＮＡ之增幅的條件下培養得到的相似性重組細胞，得到一包含一被增幅之可篩選標記及一同時被增幅且其表現已被改變之內源性基因的細胞。藉此方法產生的細胞可以在合適該治療性產物的條件下加以培養，藉此在體外產生治療性產物，或該細胞可以作為一治療性蛋白質體內傳送的用途（即，基因治療）。

額外的具體事實為具有可行性的。該尋標事件可為一調節性序列單純之嵌入，將該內源性基因製於一新的調節序列的控制下（例如，經由一啟動子或一促進子，或兩者同時嵌入一內源性基因的上游）。該尋標事件可為一單純之調節元件的刪除，如一組織特異性負性調節序列的刪除。該尋標事件可以取代一已存在之元件；例如一組織特異性促進子可以被一較其自然發生之元件具更廣或不同的細胞型特異性的促進子加以取代，或表現不同於相關之未轉染細胞之調節或誘發型式。在此具體事實中該自然發生的序列被刪除且新的序列被加入。在所有的情形中，尋標事件的確認可以藉助於使用與尋標ＤＮＡ物理性聯結之一或

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（12）

多個可篩選標記基因，使得其中外源性ＤＮＡ已嵌入宿主細胞基因體中的細胞被篩選出。尋標事件的確認亦可以藉助於使用一個或多個表現負性篩選特性之一個或多個篩選基因，使得負性篩選的標記連接於該外源ＤＮＡ，但是必須規劃使得負性篩選的標記位於尋標序列的兩端，且因而一與宿主細胞基因體中序列發生之正確相似性重組事件不會引起負性篩選標記的穩定嵌入。有利於此目標之標記類包括簡單疱疹病毒胸腺核苷激酶（ＴＫ）基因或細菌性黃嘌呤－鳥糞嘌呤磷酸核糖基轉移酶。

本發明亦相關於使用相似性重組將一基因轉變成一ｃＤＮＡ拷貝（一去除ｉｎｔｒｏｎ的基因拷貝）。該ｃＤＮＡ拷貝可以被轉移到酵母菌或細菌以供體外蛋白質的產生，或該ｃＤＮＡ拷貝可以被嵌入一哺乳細胞以供蛋白質的生產。若該ｃＤＮＡ打算轉移到微生物細胞中，包含尋標序列之兩個ＤＮＡ構築體經由相似性重組被嵌入，一個構築體位於編碼一治療性產物之人類基因的上游而另一個構築體位於該基因的下游。在上游嵌入的序列，包括與在基因體上編碼一成熟，經加工之治療性蛋白質之第一個胺基酸之ＤＮＡ的或其上游位置的序列相似的ＤＮＡ序列；一反轉錄病毒之ＬＴＲ；編碼一在微生物中供篩選之標記之序列；一在為生物細胞中具有功用之調節性元件；及可促進自微生物細胞分泌之編碼一引導胜肽ｌｅａｄｅｒｐｅｐｔｉｄｅ）之ＤＮＡ。在上游嵌入的序列係嵌入

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（13）

編碼一成熟，經加工之治療性蛋白質之第一個胺基酸的基因體ＤＮＡ的鄰近上游區。在下游嵌入的序列包括與在基因體上編碼一成熟，經加工之治療性蛋白質之最後一個胺基酸之ＤＮＡ的或其下游位置的序列相似的ＤＮＡ序列；一微生物性轉錄終止序列；能夠在微生物細胞中指導ＤＮＡ複製之序列；及一反轉錄病毒ＬＴＲ。在下游嵌入的序列係嵌入編碼一成熟，經加工之治療性蛋白質之終止密碼子（ｃｏｄｏｎ）ＤＮＡ的鄰近下游區。當兩種外源性ＤＮＡ分別被置入細胞後，該細胞在適合相似性重組發生於基因體ＤＮＡ及被置入ＤＮＡ之間的條件下被培育，藉此產生相似性重組細胞。選擇性地，構築體的其中之一或兩者可以編碼一或多個供正性篩選或負性篩選含有該ＤＮＡ構築體的細胞的標記，且一當構築體的其中之一或兩者已嵌入細胞候可以添加一篩選步驟到本方法之中。或者，編碼在微生物細胞中供篩選之標記的序列及能夠指揮ＤＮＡ在微生物細胞中複製的序列可以兩者同時存在於尋標質體的上游或下游，或在微生物細胞中供篩選的標記可以出現在尋標構築體的下游，且能夠在微生物細胞中指揮ＤＮＡ複製的序列可以出現在尋標構築體的上游。該相似性重組細胞隨即在適合ＬＴＲ指揮的轉錄，加工處理及適合反轉錄編碼治療性蛋白質之基因之ＲＮＡ產物的條件下進行培養。反轉錄做用的產物為一ＤＮＡ構築體，該構築體包含一編碼治療性蛋白質之無ｉｎｔｒｏｎ的ＤＮＡ拷貝，其

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（14）

合作性地與包含兩個上述外源性ＤＮＡ構築體連接。經由本發明方法所生產之該無ｉｎｔｒｏｎ的ＤＮＡ構築體隨即被嵌入一微生物細胞中，該微生物隨即與適合該治療性蛋白質之表現及分泌的條件下進行培養。

受轉染細胞

在此使用之名詞初級細胞包括出現在分離自脊椎動物組織來源之細胞懸浮液之細胞（於其貼附之前，即黏附於一組織培養基質如盤或瓶），及衍生自組織之外植體，前二種細胞均第一次貼附，且細胞懸浮液衍生自這些貼附細胞。名詞二級細胞或細胞株指稱在培養時所有後續步驟中的細胞。也就是說，第一次一貼附之初級細胞自培養基質上移除並再貼附（繼代），其在此稱為二級細胞，如同所有在後續繼代中的細胞。二級細胞為已經過一或多次繼代之二級細胞所組成之細胞株。組成一細胞株之二級細胞：1）已經過一或多次繼代；2）在培養時表現之平均族群加倍時間為定數；3）表現接觸性抑制，附著依賴性生長之特性（附著依賴性不適用於分佈於懸浮液培養之細胞）；及4）非不死化。

經由主題方法所轉染的細胞可分成四種型態或範圍：1）當得到時不製造或包含治療性產物的細胞，2）製造或包含治療性產物但其份量小於正常值（其份量少於生理上正常較低量）或為有缺陷的形式的細胞，3）可以在生理上正常程度製造治療性產物，但是打算調整或增進其內

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（15）

容及產量的細胞，及4）其中希望改變編碼一治療性產物之基因的調節或誘發型態。

藉由本發明方法轉染之初級細胞或二級細胞可由不同組織中得到且包括所有可以人工培養之細胞種類。例如，可藉本方法轉染之初級細胞及二級細胞包括纖維母細胞，角質細胞，上皮細胞（例，乳房上皮細胞，小腸上皮細胞），內皮細胞，膠細胞，神經細胞，血液組成份子（例，淋巴球，骨髓細胞），肌肉細胞及這些體細胞種類之前驅細胞。初級細胞適合由將施用該受轉染初級細胞或二級細胞之個體上取得。然而，初級細胞可由供給者（非接受者）取得，供給者為同種或不同種（例，老鼠，大鼠，兔子，貓，狗，豬，牛，鳥，綿羊，山羊，馬）。

受轉染初級細胞及二級細胞已予以製造，不論是否經表現型篩選，其顯示可表現編碼一治療性產物，包括，例如，hGH，EPO及胰島素調理素之外源性DNA。

不死化細胞亦可經由本方法加以轉染，且作為蛋白質生產或基因治療的用途。經由本發明的方法有利於蛋白質的生產及基因治療的不死化人類細胞株的實施例包括，但不限於：HT1080，HeLa，MCF－7胸癌細胞，K－562白血症細胞，KB上皮腫瘤細胞，2780AD卵巢上皮腫瘤細胞，Raji（ATCC CCL 86）細胞，Jurkat（ATCC TIB 152）細胞，Namalwa（ATCC CRL 1432

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（16）

）細胞，ＨＬ－６０（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２４０）細胞，Ｄａｕｄｉ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２１３）細胞，ＲＰＭＩ８２２６（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１５５）細胞及ＭＯＬＴ－４（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１５８２）細胞。來自其他生物種類的細胞（例如，中國倉鼠卵巢（ＣＨＯ）細胞或老鼠Ｌ細胞）可作為體外蛋白質的生產或基因治療的用途。另外，表現在體外基因增幅的特性之初級或二級人類細胞，以及來自其它生物種類的初級細胞或二級細胞可作為體外蛋白質的生產或基因治療的用途。

外源性ＤＮＡ

外源性ＤＮＡ以本方法嵌入初級細胞，二級細胞或不死化細胞之外源性ＤＮＡ：１）編碼一轉譯或轉錄產物之ＤＮＡ，而其在細胞中的表現為需要的，或編碼一轉譯或轉錄產物之部份的ＤＮＡ，例如有利於治療一存在狀況或預防其發生之蛋白質或ＲＮＡ產物（例如ｈＧＨ，ＥＰＯ或胰島素調理素）；或２）ＤＮＡ不編碼一基因產物但其本身為有用的，如有利於治療一存在狀況或防其發生之轉錄調節序列或ＤＮＡ。

轉染初級細胞或二級細胞之ＤＮＡ可編碼整個欲得產物，或可編碼，例如，該產物之活性或功能性部分。產物可為，例如，一激素，細胞素，抗原，抗體，酵素，凝血因子，輸送蛋白質，受體，調節性蛋白質，結構性蛋白質，反義ＲＮＡ，ＲＮＡ酶或一非自然性蛋白質或核酸（即

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

年 月 日 修正 補充
89.6.08

五、發明說明（17）

一新穎蛋白質或新穎核酸）。DNA獲得之來源可為自然發生或使用遺傳工程技術或人工合成方法可產生者。轉染進入初級細胞或二級細胞的DNA可編碼一或多種治療性產物。轉染進入初級細胞或二級細胞後，外源性DNA穩定嵌入接受者細胞基因體中（與出現在所使用之DNA構築體之額外序列一起），表現或行使其他功能。或者，外源性DNA游離性存在於受轉染初級細胞或二級細胞中。

編碼欲得產物之DNA可於一可誘發啟動子之控制下進入細胞，使得細胞生產或進入個體後不表現產物但可予以誘發（即，產量之誘發係於受轉染細胞產生後但於植入前後均可）。編碼欲得產物之DNA當然亦可用進入後立即表現之方式進入細胞（即，不需誘發）。

如在此所教導的，基因尋標法可以被用於以一分離自一不同基因的調節序列或一經由遺傳工程的方法製造之新穎調節序列去取代一基因已存在的調節序列。這種調節序列可以被包含於啟動子，促進子，骨架連接區域(scaffold-attachment region)，負性調節元件，轉錄起始位置，調節性蛋白質結合位置或已述序列之組合。(或者，影響所產生的RNA或蛋白質之結構或穩定性的序列可以被取代，移除，加入或另外經由尋標法加以修正，這些序列包括多腺核苷化訊號，mRNA穩定元件，剪接位置，促進或修正該蛋白質運輸或分泌特性之引導序列。或其它改變或改善蛋白質或RNA分子之功能或穩定性的序列)。根據本發明的方法，外源性D

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（18）

ＮＡ的置入導致控制內源性基因表現的內源性序列被破壞，其係經由取代全部或部份內源性（基因體）序列或另外破壞內源性序列之的功能。在這種情形中使用尋標法去取代的地方，一編碼功能區域，融合性，多功能性蛋白質的蛋白質可因此產生，其由兩個或多個蛋白質結合結構上，酵素性，或結合子（ｌｉｇａｎｄ）或受體結合的特性至單一多肽上。

可篩選標記

許多可篩選標記可嵌入初級或二級細胞中。例如，使用一種可賦予可篩選表現列如抗藥性，營養自營性，抗細胞毒劑或一種表面蛋白質之表現之可篩選標記。可使用之可篩選標記基因包括ｎｅｏ，ｇｐｔ，ｄｈｆｒ，ａｄａ，ｐａｃ，ｈｙｇ及ｈｉｓｄ。被賦予以可篩選表現型使接受者初級或二級細胞之確認及分離具可行性。編碼可篩選標記（例如ａｄａ，ｄｈｆｒ及多功能性ＣＡＤ基因，其編碼磷酸胺基甲酯製造酶，天門冬胺酸轉胺基甲醯酶，及二氫乳清酸酶）之可增幅的基因具有額外的特徵，即他們使含有嵌入基因體之可篩選標記之被增幅拷貝的細胞得以被篩選。此特性提供一個機構去明顯增加希望被增幅之一鄰近基因或連結基因的拷貝數目。

可篩選標記可分成兩個領域：正性可篩選性或負性可篩選性。在正性篩選中，表現正性可篩選標記之細胞能於篩選藥劑處理下生存（例如ｎｅｏ，ｇｐｔ，ｄｈｆｒ，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（19）

ａｄａ，ｐａｃ，ｈｙｇ，ｍｄｒｌ及ｈｉｓＤ）。在負性選擇中，表現負性可篩選標記之細胞在篩選藥劑存在下會被破壞（如，ｔｋ，ｇｐｔ）。

ＤＮＡ構築體

包含外源性ＤＮＡ及，選擇性地，含編碼可篩選標記密碼之ＤＮＡ，及在接受者初級或二級細胞中表現外源性ＤＮＡ所必須之額外序列之ＤＮＡ構築體，被用來轉染可表現該產物之初級或二級細胞。該ＤＮＡ構築體亦可包含與宿主細胞ＤＮＡ進行對應性重組之尋標序列。包含不轉譯基因產物之外源性ＤＮＡ序列之構築體（其本身為治療性產物）且選擇性地包含編碼可篩選標記之ＤＮＡ，可用來轉染初級細胞，二級細胞或不死化細胞。該ＤＮＡ構築體可以經由不同的方法嵌入細胞，包括電擊轉染法（ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ），微細注射法（ｍｉｃｒｏｉｎｊｅｃｔｉｏｎ），磷酸鈣沉澱法（ｃａｌｃｉｕｍ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｐｒｅｃｉｐｉｔａｔｉｏｎ），及微脂體－多膜法（ｌｉｐｏｓｏｍｅ－ｐｏｌｙｂｒｅｎｅ）或ＤＥＡＥ右旋物－媒介轉染法（ＤＥＡＥ ｄｅｘｔｒａｎ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ）。或者，感染性載體，如反轉錄病毒，疱疹病毒，腺病毒，腺病毒相關病毒，腮腺炎病毒及小兒麻痺病毒載體，可作為ＤＮＡ嵌入之使用。

在一個具體事實中，ＤＮＡ構築體包含外源性ＤＮＡ

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（20）

及一或多個分開之尋標序列，通常位於外源ＤＮＡ的兩端。尋標序列為通常在初級或二級細胞基因體出現之ＤＮＡ序列〔例，一必要基因，一非必要基因或無密碼之ＤＮＡ，或經先前修正而存在於基因體中的序列〕。此構築體有利於（在一接受者細胞基因體上的預選位置）嵌入編碼治療性產物之外源性ＤＮＡ，如一激素，一細胞素，一抗原，一抗體，一酵素，一凝血因子，一運輸性蛋白質，一受體，一調節性蛋白質，一結構性蛋白質，一反義ＲＮＡ酶或一非自然性蛋白質或核酸。特別是，外源性ＤＮＡ可編碼下列基因：凝血因子ＶⅢ、凝血因子ＩＸ，紅血球生成素，α－１－抗胰蛋白酶，降血鈣素，糖腦苷酶，生長激素，低密度脂蛋白受體（ＬＤＬ），衍脂蛋白Ｅ，ＩＬ－２受體及其拮抗者，胰島素，球蛋白，免疫球蛋白，分解性抗體，白血球間質素，類胰島素生長因子，過氧化物岐化酶（ｄｉｓｍｕｔａｓｅ），免疫反應修正劑，副甲狀腺素，干擾素，神經生長因子，組織血纖維蛋白溶酶原活化劑，株落刺激因子，及具有改良或新穎生物特性或在體內具有更希望之半生期或轉換時間之上述蛋白質。此構築體亦有利於（在一接受者細胞基因體上的預選位置）嵌入本身為治療產物之外源性ＤＮＡ，如足以在受轉染初級或二級細胞中隔離一蛋白質或核酸之ＤＮＡ序列，與細胞調節性蛋白質結合之ＤＮＡ序列，改變二級或三級染色體結構之ＤＮＡ序列或在初級或二級細胞之基因體中轉錄性調

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（>|）

節單位。

外源性ＤＮＡ，尋標序列及可篩選標記可用單一ＤＮＡ構築體或分開之構築體進入細胞。ＤＮＡ構築體之全長依元件數目（外源性ＤＮＡ，尋標序列，可篩選標記基因）及其全長而有所不同。整個構築體長度通常至少２０個核苷酸。在一構築體中外源ＤＮＡ與基因體ＤＮＡ有足夠的相似性進行對應性重組，則此構築體包含單一元件，外源性ＤＮＡ。在此具體事實中，外源性ＤＮＡ，由於其相似性，亦可目標性嵌入基因體ＤＮＡ且不需要額外之尋標序列。此種構築體有利於剔除，取代或修補一存在之ＤＮＡ序列，如完整之基因，一部分基因，一調節性元素或其部分，或放置功能相似調節性及結構性序列於被移去的ＤＮＡ區域。當外源ＤＮＡ包含有利於被連結序列之篩選或增幅的標記時亦為有利的。

在第二個具體事實中，ＤＮＡ構築體包含外源性ＤＮＡ，尋標ＤＮＡ序列及具至少一種可篩選標記密碼之ＤＮＡ。在此第四個具體事實中，構築體元件之順序可為尋標序列－外源性ＤＮＡ－編碼－可篩選標記之ＤＮＡ－尋標序列。在此具體事實中，一個或更多可篩選標記可為此構築體所包含，其使得基於可篩選表現型之選擇具可行性。構築體穩定嵌入之細胞以篩選劑處理將生存下來；穩定轉染之細胞有一部分為ＨＲ細胞，其可藉不同的方法予以確認，包括ＰＣＲ，Ｓｏｕｔｈｅｒｎ氏雜交法及表現型篩

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（22）

選。

在第三個具體事實中，在ＤＮＡ構築體中之元件順序為：尋標序列－第１個可篩選標記－尋標序列－第２個可篩選標記。在此具體事實中第２個可篩選標記顯示負性篩選之特性。即，第２個可篩選標記之基因產物藉由在合適而包含殺死表現第２個可篩選標記細胞之藥劑（典型地為一藥物或代謝類似物）之培養基上生長而予以逆選擇。在第１個可篩選標記兩側之尋標序列與宿主細胞基因體中類似序列間之重組造成可篩選標記１之尋標嵌入，其中第２個可篩選標記並未嵌入。此重組事件產生之細胞為以第１個可篩選標記穩定轉染但非以可篩選標記２穩定轉染，且該細胞藉由在含有篩選第１個可篩選標記之篩選劑及逆篩選第２個可篩選標記之篩選劑之培養基上生長而予以篩選。

在第四個具體事實中，該ＤＮＡ構築體包括一正性可篩選標記以允許含有該標記之經增幅拷貝的細胞得以被篩選。這種標記的增幅造成兩側的ＤＮＡ序列同時增幅。在此具體事實中，構築體組成物之間的順序為，例如，尋標序列－編碼一可增幅正性可篩選標記的ＤＮＡ－編碼第二個可篩選標記的ＤＮＡ（選擇性地）－相關於在一合適啟動子的控制下一欲加以表現的外源性基因或僅有一可活化內源性基因的啟動子之ＤＮＡ序列－尋標ＤＮＡ序列。

一ＤＮＡ構築體包含一可誘發啟動子來控制外源性Ｄ

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（2）

ＮＡ之表現，使可誘發之表現具可行性。選擇性地，該ＤＮＡ構築體可包含一複製之細菌性起源及細菌性抗藥性標記，其允許在細菌中大量繁殖質體。一ＤＮＡ構築體包含攜帶可篩選標記密碼之ＤＮＡ及額外序列，如啟動子，多腺核苷化位置及剪接會合處，可用來受轉染初級或二級細胞一種可篩選表現型（例，質體ｐｃＤＮＥＯ，其流程表現於圖２）。使用此法，此種ＤＮＡ構築體可以和一尋標ＤＮＡ序列同時轉染初級或二級細胞。

在所有ＤＮＡ構築體的實施例中，外源性ＤＮＡ具一或多種產物之密碼，其可為或每一個可為一或多種治療產物，因此使得傳送多種產物具可行性。

受轉染細胞的用途

使用在此所述之本發明的方法及ＤＮＡ構築體所產生的細胞可以作為廣泛目的的使用。產生的脊椎動物來源之初級細胞、二級細胞或不死化細胞，其中１）在一接受者細胞中已出現的ＤＮＡ被修復，改變，刪除，或取代；２）編碼一治療性產物之一基因或ＤＮＡ序列（或編碼其他希望的產物）或本身為一治療性產物而在一預選位置嵌入一接受者細胞的基因體之中（即，基因尋標）；３）在初級接受者細胞、二級接受者細胞或不死化接受者細胞中出現的調節序列已被修復，改變，刪除，或取代；或４）一整體基因或部份基因已被修復，改變，刪除，或取代。相似性重組作用亦可被用於產生普遍性的提供者細胞，其中

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（24）

涉及組織抗原相容性之細胞表面標記已被修復，改變，刪除，或取代，或其中該標記的表現被改變，修復或降低。

本發明的細胞有利於治療性產物於體外的生產，該治療性產物可以經由傳統醫藥途徑去純化及傳送。例如，初級人類細胞、二級人類細胞或不死化人類細胞可以含一調節性區域之外源性ＤＮＡ加以轉染，該外源性ＤＮＡ經過與基因體ＤＮＡ序列發生相似性重組，得到以一允許該目標基因有新穎的表現及／或調節之調節性序列取代一內源性目標基因的調節序列，且最後經由該受轉染細胞產生治療上有用之產物。若在該尋標ＤＮＡ中包含一合適的可選擇標記基因，則該被活化之內源性基因可進而被增幅。不論增幅作用是否發生，這些細胞可以進行大規模的培養以收穫細胞內及細胞外的蛋白質產物。

本發明之受轉染細胞為有用的，如受轉染初級細胞之族群，受轉染選殖細胞株，受轉染異源性細胞株，及如至少以前述三種細胞之一為代表性細胞之混合細胞，如一用來治療一具不正常或不欲之情形且對一治療性產物之傳送有回應情況之個體之傳送系統，其為：１）一治療性蛋白質（例，一種蛋白質相關於個體生理需要而缺乏或減產，在個體中之利用有缺陷，無效率或不適當；一種蛋白質具新穎功能，如酵素性或運輸性功能）或２）一種治療性核酸（例，結合於或隔離一種調節性蛋白質之ＤＮＡ，抑制基因表現或具本質上酵素活性之ＲＮＡ）。在本發明提供

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

五、發明說明（75）

一治療性蛋白或核酸的方法中，受轉染初級細胞，選殖細胞株或異源性細胞株，以足夠量或藉合適之途徑施用於一不正常或不欲之情況而待治療之個體，而以生理上適合之程度表現該外源性ＤＮＡ或使其可作用。一生理上適合之程度為近乎該產物在身體生產之份量或造成不正常或不欲情況之改善。在本方法中施用之細胞為以攜帶一治療性產物密碼之外源性ＤＮＡ轉染之細胞，外源性ＤＮＡ本身為治療性產物或者外源性ＤＮＡ，如調節性序列，其經由對應性重組進入基因體ＤＮＡ之預定位置並產生作用引起接受者細胞產生平常在細胞中不表現之產物或生產較相關未轉染細胞表現程度為高之產物。在一具體事實中送入一調節性序列（例，一啟動子），其取代或破壞正常與一基因相連之調節性序列，並使該基因之表現較相關未轉染細胞為高，或者使得調節或誘發的型態與相關之未轉染細胞不同。

經由在此所敘述的方法所製造之產生一治療性蛋白質的細胞，該產生的細胞可以用於基因治療，該細胞的產生經由：１）治療性蛋白質之隨機嵌入，２）進行相似性重組以將該治療性蛋白質尋標進入細胞的基因體，３）進行相似性重組以活化或開啟一治療利益之基因，或４）與前述三個方法之一配合之基因增幅。根據本發明在此所敘述者，不死化細胞被包含於許多半通透性屏障設計之一內。該設計的通透特性為細胞在植入一動物時該細胞不能離開

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（76）

該設計，但是治療性產物則可以自由的通透且可以離開該屏障設計並進入圍繞移植體的局部空間或進入系統性循環之中。一些過濾膜可以針對此目的加以利用，其包括但不限制於：纖維素，乙酸纖維素酯，硝基纖維素，聚碸，二氟聚亞乙烯，氯聚乙烯聚合物及氯聚乙烯聚合物之衍生性聚合物。或者，屏障設計可以被用於使得來自其他生物種類的初級細胞、二級細胞或不死化細胞可以作為人類基因治療的用途。來自其他生物種類的細胞的用途偏好在非人類細胞對蛋白質生產的目的是有利的時候或在非人類細胞蛋白質為治療上有用的時候，例如衍生自鮭魚的細胞可做為鮭魚降血鈣素（calcitonin）生產的用途，且衍生自豬的細胞可作為豬胰島素生產的用途。

來自非人類之生物種類的細胞亦可作為體外蛋白質的生產。這些細胞可以為經由在此敘述的方法而產生一治療性蛋白質之初級細胞、二級細胞或不死化細胞，該細胞得產生是經由：1）治療性蛋白質之隨機嵌入，2）發生相似性重組作用將該治療性蛋白質尋標嵌入一細胞的基因體中，3）發生相似性重組作用而活化開啟一具有治療性目的之基因，或4）進行與前述三個方法之一結合之基因增幅作用。來自其他生物種類的細胞的用途偏好在非人類細胞對蛋白質生產的目的是有利的時候（例如CHO細胞）或在非人類細胞蛋白質為治療上或商業上有用的時候，例如衍生自鮭魚的細胞可作為鮭魚降血鈣素（calcit

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（27）

onin）生產的用途，且衍生自豬的細胞可作為豬胰島素生產的用途，及衍生自牛的細胞可以作為牛生長激素生產的用途。

本發明受轉染的細胞有利於在人類及動物上的許多應用。在一具體事實中，該細胞可被植入一人類或一動物身上以供在人類或動物身上進行蛋白質的傳送。例如，人類生長激素（hGH），人類EPO（hEPO），或人類胰島素調理素可以系統性或局部性在人類身上被傳送而提供治療的助益。包含表現一治療性產物之受轉染細胞且治療性產物可以自由進出之屏障設計可以用來將細胞駐留體內一固定的位置，或保護並分離細胞，免於宿主免疫系統的攻擊。屏障設計特別有利於並使得受轉染不死化細胞，來自其他生物種類的受轉染細胞（異種性受轉染細胞），或來自一非組織抗原相容性配合之提供者（受轉染異體性細胞），可以被植入以供人類或動物的治療或供農業用途（例如，肉類及日常產品）。屏障設計亦允許經由接近細胞之方便的短期（即，暫時性）治療，並當治療計畫因任何理由停止時可以移出。

本發明之受轉染細胞亦有利於提升抗體的產生或供免疫人類或動物以對抗致病因子。經植入的受轉染細胞可以用來傳送免疫性抗原，引起對宿主細胞及體液免疫反應的刺激。這些免疫反應可以被設計成保護宿主免於未來的感染性因子的感染（即，疫苗用途），刺激或調節直接對抗

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（38）

一正發生之感染的疾病作戰能力，或產生抗體直接對抗在體內經由受轉細胞所產生的抗原，該受轉染細胞有利於治療性或診斷性目的。可移除之屏障設計可以作為允許一終止抗原的曝露之簡單設計。或者，最終會被排斥的細胞（異種性或異體性受轉染細胞）可以作為限制抗原的曝露，因為抗原的生產會因為細胞被排斥而停止。

實施例之解釋

如在此所敘述者，申請人已示範該ＤＮＡ可以被送入初級脊椎動物細胞、二級脊椎動物細胞或不死化脊椎動物細胞且可經由相似性重組作用嵌入受轉染初級細胞、二級細胞或不死化細胞。也就是說，他們已在初級哺乳動物細胞、二級哺乳動物細胞或不死化哺乳動物細胞中展示基因尋標法。他們進一步展示該外源性ＤＮＡ在相似性重組（ＨＲ）細胞中表現出希望的功能，且該正確被尋標的細胞可以基於適當被尋標嵌入的ＤＮＡ所給予可偵測的表現型加以驗證。

另外，本發明相關於一種使用受轉染初級細胞、二級細胞或不死化細胞製造蛋白質的方法。本方法涉及以編碼一治療性產物之外源性ＤＮＡ或以足以尋標且活化編碼一治療性產物之內源性基因去轉染初級細胞、二級細胞或不死化細胞。例如，實施例１ｇ，１ｊ，２，３及４敘述經由一被挑選之內源性基因的尋標及活化產生蛋白質。

申請人們亦敘述ＤＮＡ構築體及供經由基因尋標法加

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（29）

以活化之內源性細胞基因之增幅的方法（實施例1f－1k及實施例3）且進而敘述一基因可經由基因尋標法被插入一初級細胞、二級細胞或不死化細胞之基因體上一預選位置（實施例1d）。

申請人敘述一有利於在人類基因體上尋標至一特別基因位置（HPRT基因位置）的質體構築及基於藥物抵抗性表現型的篩選（實施例1a）。該質體被命名為pE3Neo，且其在細胞基因體上HPRT位置的嵌入所產生的細胞具有一hprt，6－TG抗藥性表現型且亦為G418抗藥性。如其中所敘述的，他們已顯示pE3Neo在基因尋標嵌入一被建立之人類纖維母細胞後可適當地表現功能（實施例1b），其顯示係經由驗證該DNA被送入被見建立之細胞中HPRT基因的第3個exon位置。

另外，申請人們展示使用pE3Neo在初級人類皮膚纖維母細胞、二級人類皮膚纖維母細胞或不死化人類皮膚纖維母細胞中進行的基因尋標法（實施例1c）。本申請案進而展示DNA末端的修正可以幫助DNA尋標進入基因體DNA中（實施例1c及1e）。

實施例1f－1h及實施例2示範說明的具體事實為在人類EPO基因的上游之正常調節序列被改變，使得在未受轉染的初級人類皮膚纖維母細胞株或二級人類皮膚纖維母細胞株中不會以可偵測出的量表現的EPO基因可以

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（30）

開始表現。在一具體事實中，尋標的產物留下正常而完整的ＥＰＯ基因，但是在在老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ啟動子的控制下。實施例１ｉ及１ｊ展示相似尋標構築體作為在初級人類皮膚纖維母細胞或二級人類皮膚纖維母細胞中活化內源性生長激素基因的用途。在其他敘述在人類纖維母細胞中活化ＥＰＯ的表現的具體事實中，尋標事件的產物為融合性轉錄單位，其中人類生長激素基因第１個ｅｘｏｎ位於ＥＰＯ第２－５個ｅｘｏｎ的上游。轉錄產物（由老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ啟動子加以控制），經過剪接，並轉譯後的蛋白質為其中ｈＥＰＯ訊號胜肽之第１－４個胺基酸被ｈＧＨ之第１－３個胺基酸殘基加以取代。該蛋白質的融合區域，即該訊號胜肽，在有細胞分泌出以前就被去除。實施例５敘述尋標構築體及產生可將一基因（具有ｉｎｔｒｏｎ）轉變成一可表現之該基因ｃＤＮＡ拷貝（沒有ｉｎｔｒｏｎ）的細胞之方法，並於微生物（例如，酵母菌或細菌）細胞中回收該可表現的ｃＤＮＡ分子。實施例６敘述一尋標載體的構築，其命名為ｐＲＥＰＯ４而可供雙重篩選及其中ｄｈｆｒ基因被複製之細胞的篩選。當內源性ｈＥＰＯ基因經由相似性重組作用被活化後，質體ｐＲＥＰＯ４已被用於ＨＴ１０８０細胞（一種不死化人類細胞株）中增幅人類ＥＰＯ（ｈＥＰＯ）基因位置。如其中所敘述的，在含有甲胺基蝶呤（ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ）的培養基中逐步

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（21）

的篩選導致在能夠抵抗0．4μM甲胺基蝶呤（methotrexate）的細胞中hEPO的產量增加70倍。

這些實施例提供經由基因尋標法活化或活化且增幅內源性基因的方法，其不需要操作或標的基因蛋白質編碼區域之其他用途。經由這些方法，正常下不活化的基因可以在細胞中被活化，這些細胞具有偏好體外蛋白質（例如，醫藥品）製造或體內傳送方法（例如，基因治療）的特性。圖5及6示範說明兩種轉錄性活化hEPO基因的策略。

使用在此說明的方法及DNA構築體或質體，或使用其對於一嫻於此技藝者而言係甚為明顯的修正，編碼一治療性產物（例如，蛋白質，RNA酶，核酸）之外源DNA可以被插入脊椎動物（例如，哺乳動物，包括人類及非人類）初級細胞或二級細胞之基因體上的預選位置。

本發明將以下列實施例加以示範說明，然並不打算給予任何的限制。

實施例

實施例1　以基因尋標方式產生之受轉細胞株之生產

基因尋標發生於受轉染DNA經對應性重組而嵌入或部分取代基因體DNA序列。然而此事件可發生於任何轉染實驗期間，其通常被一發生率大量超出之事件所掩蓋，即質體DNA藉由非對應性，或無法解釋，重組之方式嵌

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（32）

入。

a．一有利於篩選在人類細胞中基因尋標事件之構築體之產生

一種篩選標的化事件的研究是由基篩選出因受轉染ＤＮＡ之嵌入而造成基因功能之喪失。人類ＨＰＲＴ基因具次黃嘌呤－磷酸核糖基轉移酶之密碼。ｈｐｒｔ細胞可藉其生長於含核苷酸類似物６－硫代鳥糞嘌呤（６－ＴＧ）之培養基中進行篩選：具野生型（ＨＰＲＴ⁺）對偶基因之細胞被６－ＴＧ所殺，然而具突變型（ｈｐｒｔ⁻）對偶基因之細胞可生存。發生標的化事件而破壞ＨＰＲＴ基因功能的細胞因而在６－ＴＧ培養基中可加以篩選。

為了構築用於尋標ＨＰＲＴ基因之質體，由ＨＰＲＴ序列１１，９６０－１８，８６９位置（Ｇｅｎｅｂａｎｋ　稱其為　ＨＵＭＨＰＲＴＢ；Ｅｄｗａｒｄｓ，Ａ等人，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　６：５９３－６０８（１９９０））延伸而來的６．９仟鹽基對Ｈｉｎｄ Ⅲ位置。得到的次選殖株於ＨＰＲＴ基因片段上第３個ｅｘｏｎ中之唯一Ｘｈｏ位置切割且嵌入含衍自ｐＭＣｌＮｅｏ（ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）之ｎｅｏ基因之１．１仟鹽基對Ｓａｌ－ＸｈｏⅠ片段，破壞了第３個ｅｘｏｎ之密碼區域。選擇ｎｅｏ轉錄方向而與ＨＰＲＴ轉錄方向相反者並命名為ｐＥ３Ｎｅｏ。以ｎｅｏ破壞之方式取代正常ＨＰＲＴ第３個ｅｘｏｎ將導致一ｈｐｒｔ⁻，６－ＴＧ抗藥性表現型

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（33）

。該細胞亦將為抗Ｇ４１８者。

ｂ．於一已建立之人類纖維母如胞株內進行基因尋標

基因尋標先前曾被報告用於不死化組織培養細胞株。為了作為尋之正性控制組及合適地建立在基因尋標時ｐＥ３Ｎｅｏ的功能，人類纖維瘤細胞株ＨＴ１０８０（ＡＴＣＣ　ＣＣＫ　１２１）以ＰＥ３Ｎｅｏ進行電擊轉染。作為在不死化細胞系中尋標的示範，且在基因尋標時合適地建立ｐＥ３Ｎｅｏ的功能，人類細胞系ＨＴ１０８０（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１２１）經由電擊轉染方式以ｐＥ３Ｎｅｏ加以轉染。

ＨＴ１０８０細胞在電擊轉染前維持添加ＨＡＴ（次黃嘌呤／胺基蝶翅素／黃嘌呤）及１５％牛血清（Ｈｙｃｌｏｎｅ）之ＤＭＥＭ中。電擊轉染前兩天，這些細胞轉移至相同但不含胺基蝶翅素的培養基中。活躍增殖期細胞以胰蛋白酶處理並以含１５％牛血清之ＤＭＥＭ中稀釋，離心，最後以每毫升１３．３佰萬細胞之濃度再懸浮於ＰＢＳ（磷酸鹽緩衝之食鹽水）。ｐＥ３Ｎｅｏ以Ｈｉｎｄ Ⅲ切割，由ｐＵＣ１２骨幹分離８仟鹽基對ＨＰＲＴ－ｎｅｏ片段，以酚萃取及酒精沈澱予以純化，並以６００微克／毫升濃度再重建。其中５０微升（３０微克）加入電擊轉染小管（０．４厘米電極溝；Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）並加入７５０微升之細胞懸浮液１仟萬個細胞）。電擊轉染條件為４５０伏特。２５０微

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（34）

法拉第（Bio-Rad GenePulser；Bio-Rad Laboratories）。小管中液體立刻加入含14%牛血清之DMEM中得到每25毫升培養基1佰萬個細胞之懸浮液。25毫升之處理過的細胞懸液覆於152米直徑組織培養皿並於37℃，5%CO_2中培養。24小時後，直接加入G418溶液至器皿中使最終濃度為800微克／毫升G418。五天後培養基更換為DMEM／15%牛血清／800微克／毫升G418。電擊轉染後9天，培養基更換為DMEM／15%牛血清／800微克／毫升G418及10μM6－硫代鳥糞嘌呤。雙重篩選開始後14－16天以選殖棒挑出抗G418及6－TG之株落。

五個代表性尋標實驗於HT1080中的結果示於表1

表 1

轉染	經處理細胞數	G418及6－TG株落數
1	1×10^7	32
2	1×10^7	28
3	1×10^7	24
4	1×10^7	32
5	1×10^7	66

就第5個轉染實驗而言，用於決定全部G418株落

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

五、發明說明（35）

數之控制組培養皿顯示由開始之１×１０⁷受處理細胞可產生３３，７１０個Ｇ４１８株落。因此，目標化或未目標化事件之比率為６６／３３，７００，或１比５１０。在總共５個實驗中，目標化事件之出現頻率為３．６×１０⁶，或受處理細胞之０．０００３６％。

限制酶與使用來自ｎｅｏ及ＨＰＲＴ基因之探子的Ｓｏｕｔｈｅｒｎ氏雜交實驗確定ｎｅｏ基因位於ＨＰＲＴ第３個ｅｘｏｎ之預期位置上。

ｃ．在初級與二級人類皮膚纖維母細胞中進行基因尋標

ｐＥ３Ｎｅｏ以ＨｉｎｄⅢ切割，由ＰＶＣ１２骨幹上分離８仟鹽基對ＨＰＲＴ－ｎｅｏ片段，以酚萃取及乙醇沈澱加以純化。ＤＮＡ以２毫克／毫升再懸浮。３佰萬個二級人類包皮纖維母細胞於０．５毫升體積中以１００微克ＨｉｎｄⅢ切割之ｐＥ３Ｎｅｏ（５０微升）進行電擊轉染（２５０伏特及９６０微法拉第）。進行分開之３個轉染實驗，共處理９佰萬個細胞。細胞進行處理並篩選具ｇ４１８抗藥性者。作為Ｇ４１８篩選之每個１５０毫米培養皿覆蓋５００，０００個細胞。篩選後１０天，培養基更換為含４００微克／毫升Ｇ４１８及１０μＭ６－ＴＧ之人類纖維母細胞培養。以兩種藥聯合篩選多持續１０天。培養皿以鏡檢方式掃瞄以定出抗兩種藥物之人類纖維母細胞株落。Ｇ４１８及６－ＴＧ株落每９佰萬個受處

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（36）

理細胞中有４個。所有細胞之０．０００１％（或佰萬中有１個）可形成株落。用於決定Ｇ４１８株落全部數量之控制組培養皿顯示由開始之９×１０⁶個受處理細胞中可產生２，８５０個Ｇ４１８株落。因此被尋標與未被尋標事件之比率為４／２，８５０，或１比７１２。限制酶及使用來自ｎｅｏ及ＨＰＲＴ基因之引子的Ｓｏｕｔｈｅｒｎ氏雜交試驗確定ｎｅｏ基因位於ＨＰＲＴ 第３個ｅｘｏｎ之預期位置並顯示尋標已於此４個選殖細胞株中發生。抗兩種藥物之株落亦可藉轉染初級細胞（１／３．０×１０⁷）而予以分離。

數個ｐＥ３Ｎｅｏ尋標化實驗之結果總結於表２。ＨｉｎｄⅢ切割過的ｐＥ３Ｎｅｏ可直接轉染或於轉染前以外核酸酶Ⅲ處理產生５’單股突出（見實施例１ｃ）。具單股由１７５至９３０鹽基對之ＤＮＡ製備物長度予以測試。僅使用ＨｉｎｄⅢ切割之ｐＥ３Ｎｅｏ時，１／７９９ Ｇ４１８抗性株落以限制酶及Ｓｏｕｔｈｅｒｎ氏雜交分析證實ｎｅｏ基因經尋標作用嵌入ＨＰＲＴ基因（全部分離出２４個被尋標株落）。尋標作用使用１７５鹽基對之突出時受到最大之刺激（約１０倍刺激），其中１／８０ Ｇ４１８株落表現作為診斷於ＨＰＲＴ上尋標之限制片段（全部分離到９個目標化株落）。因此，使用在此敘述之條件及重組性ＤＮＡ構築體，尋標作用在正常人類纖維母細胞中易於被觀察到且整體尋標頻率（被尋標選殖

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（37）

株數除以穩定受轉染抗Ｇ４１８株落之總數）可用如實施例１ｅ中所述之方法，以含單股突出尾端之尋標構築體轉染而予以刺激。

表２　尋標至人類纖維母細胞中ＨＰＲＴ基因位置

pE3neo處理	實驗次數	每G418菌落中被尋標之數	被尋標克隆的總數
HindⅢ切割	6	1/799	24
175鹽基對突出	1	1/ 80	9
350鹽基對突出	3	1/117	20
930鹽基對突出	1	1/144	1

ｄ．產生一構築體供一治療性基因標的性嵌入人類基因體中及其於基因尋標上之用途

一種ｐＥ３Ｎｅｏ變異體，其中一治療性基因嵌入ＨＰＲＴ密碼區域中鄰近或緊接ｎｅｏ基因的位置，可作為將一治療所需的基因尋標而進入接受者初級或二級細胞基因體中特殊之位置上。此種ｐＥ３Ｎｅｏ變異體可予以構築供將ｈＧＨ基因尋標而進入ＨＰＲＴ基因上。

ｐＸＧＨ５以ＥｃｏＲＩ切割並分離出ｈＧＨ基因及與其連接的老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ（ｍＭＴ）啟動子。ＥｃｏＲＩ突出以來自大腸桿菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＤＮＡ聚合酶之ｋｌｅｎｏｗ片段補齊。分別地，ｐＥ３ｎｅｏ以ＸｈｏＩ切割，其在ｎｅｏ片段及ＨＰＲＴ ｅｘｏｎ之交會處切割（嵌入第３個ｅｘｏｎ之３’端交會處。該綫形質體之ＸｈｏＩ突出端以衍自大腸桿

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（38）

菌（E·coli）ＤＮＡ聚合酶之klenow片段補齊，且得到之片段連接至４·１仟鹽基對平頭ｈＧＨ－ｍＭＴ片段。由連接混合物而來的細菌株落以限制酶分析找尋ｈＧＨ－ｍＭＴ片段單一嵌入，並選擇ｈＧＨ基因與ｎｅｏ基因轉錄的方向相同者並命名為ｐＥ３Ｎｅｏ／ｈＧＨ。ｐＥ３Ｎｅｏ／ｈＧＨ以ＨｉｎｄⅢ切割，釋出含ＨＰＲＴ；ｎｅｏ及ｍＭＴ－ｈＧＨ序列之１２·１仟鹽基對片段。切割過的ＤＮＡ依實施例１８ｃ中所述予以處理並轉染進入初級或二級人類纖維母細胞。Ｇ４１８　６－ＴＧ株落如實施例１ｃ中所述對ｍＭＴ－ｈＧＨ及ｎｅｏ序列之標的性嵌入ＨＰＲＴ基因進行篩選及分析。個別株落使用商業化可用之免疫試驗（Ｎｉｃｈｏｌｓ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）對ｈＧＨ表現進行試驗。

二級人類纖維母細胞以ｐＥ３Ｎｅｏ／ｈＧＨ轉染抗硫代鳥糞嘌呤的選殖株對穩定表現ｈＧＨ作分析，以限制酶及Ｓｏｕｔｈｅｒｎ氏雜交反應。在經分析之１３個ＴＧ株落中有８個株落證實ｈＧＨ基因已嵌入至內生性ＨＰＲＴ基因。所有８個株落皆穩定表現明顯量之ｈＧＨ，具２２·７微克／１０^{6}個細胞／２４小時之平均表現程度。或者，質體ｐＥ３ｎｅｏＥＰＯ，見圖４，可以作為將ＥＰＯ尋標嵌人類ＨＰＲＴ基因位置的用途。利用相似性重組作用將一具有治療目的之基因尋標進入一細胞基因體ＤＮＡ的特異性位置的用途可以加以擴及且更有利於經由

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（39）

一基因之插入而生產治療性目的（例如，醫藥品，基因治療）之產品，經此種用途包含基因被增幅之拷貝的細胞可以藉由將細胞曝於一合適的藥物篩選組合中來予以篩選。例如，pE3neo／hGH（實施例1d）可以經由在pE3neo／hGH中緊鄰hGH或neo基因的位置插入dhfr，ada，或CAD基因而加以修正。初級細胞、二級細胞或不死化細胞以此質體加以轉染並對正確的尋標事件加以確認。這些細胞可以進一步以增加濃度之適合篩選含有經增幅基因的藥物（針對dhfr，篩選性藥劑為甲胺基蝶呤（methotrexate）），針對多功能性CAD基因，篩選性藥劑為 N－（亞磷酸乙醯基）－L－天門冬酸鹽（PALA），及針對ada；篩選性藥劑為一腺嘌呤核苷酸（如腺苷酸））進行處理。在此方式中該具治療性利益的基因之嵌入部份將隨著用於篩選增幅拷貝之基因同時增幅。因此使細胞產生針對治療性用途的基因所進行之遺傳工程可以簡易地經由預選位置加以控制，在該預選位置中尋標構築體被嵌入且在該預選位置中被增幅的拷貝停留於被增幅的細胞中。

e．修正DNA末端以增進尋標作用

一些證據顯示3突出端牽涉大腸桿菌（E．coli），噬菌體，啤酒酵母菌（S． cerevesiae）及Xenopus laevis之一些對應性重組途徑。在Xenopus laevis的卵中，具長度數

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（40）

佰個鹽基對之3’突出端的分子經微細注入後與其他類似分子進行之重組比使用由限制酶切割產生具非常短之突出（4個鹽基對）的分子要快得多。在酵母菌中，數佰鹽基對長之3’突出端的產生顯然為減數分裂重組之速限步驟。尚無報告有證據涉及3’突出端在人類細胞中重組，且無案例具任何修正過的ＤＮＡ基質顯示增進尋標作用（對應性重組之一種）於任何物種內之跡象。在人類細胞中，3’突出端對尋標作用的影響尚無試驗。在下列實施例描述之實驗建議5’突出端對初級及二級人類纖維母細胞中尋標作用最為有效。

藉由修正轉染ＤＮＡ分子之末端而增進尋標作用的報告尚沒有出現。本實施例可用於示範將綫形ＤＮＡ分子末端由雙股形式轉換成一單股形式，可刺激在初級及二級人類纖維母細胞基因體內的尋標作用。

１１００微克之質體ｐＥ３Ｎｅｏ（實施例１Ａ）以ＨｉｎｄⅢ切割。該ＤＮＡ可直接於酚萃取及乙醇沈澱後使用，或者藉凝膠電泳由ＰＵＣ１２載體序列分離僅含ＨＰＲＴ及ｎｅｏ基因之８仟鹽基對ＨｉｎｄⅢ片段。以ＥｘｏⅢ分解ＨｉｎｄⅢ切割之ＤＮＡ造成在兩端延伸之外核甘分解性切割，開始於自由之3’端，且留下5’突出端。外核甘分解性作用之程度，即所得到之5’突出之長度，可用不同之ＥｘｏⅢ分解時間予以控制。執行Ｈｉｎｄ切割之ｐＥ３Ｎｅｏ１００微克之ＥｘｏⅢ分解係依提

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（41）

供者的建議條件，分別作用３０秒，１分鐘，１．５分鐘，２分鐘，２．５分鐘，３分鐘，３．５分鐘，４分鐘，４．５分鐘，及５分鐘。為瞭解分解之程度於每個時間取出少量約１微克之ＥｘｏⅢ處理過的ＤＮＡ，在提供者建議的條件下用ｍｕｎｇ豆核酸酶處理，且該ＤＮＡ以凝膠電泳分開。測量未處理，ＨｉｎｄⅢ切割之ｐＥ３Ｎｅｏ及以ＥｘｏⅢ及ｍｕｎｇ豆核酸酶處理之相同分子間大小的差異。大小差別除以２得到該分子兩個５’突出端的平均長度。使用上述之時間距於３０℃分解，產生之５’突出應由１００至１，０００鹽基長。

由每個時間距而得到之６０微克ＥｘｏⅢ處理之ＤＮＡ（全部以ＨｉｎｄⅢ切割之ｐＥ３Ｎｅｏ）被純化後電擊轉染進入初級或二級人類纖維母細胞，以實施例１ｃ中所述的條件。藉由每種ＥｘｏⅢ處理之製物備物所增進尋標作用的程度以Ｇ４１８　６－ＴＧ株落數定量並與以ＨｉｎｄⅢ切割但未以ＥｘｏⅢ處理之ｐＥ３Ｎｅｏ進行尋標得到的數目比較。

３’突出端的效果亦可使用類似的系統予以定量。在此情形中ＨｉｎｄⅢ切割之ｐＥ３Ｎｅｏ以噬菌體Ｔ７第６基因外核酸酶（Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）於提供者建議之不同時間距下處理。分解程度（每端３’突出之平均長度）之決定及電擊轉染的條件如上對經ＥｘｏⅢ處理之ＤＮＡ的敘述。藉由每

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ㄐㄧ）

種Ｔ７第６基因外核酶處理之製備物而增進尋標作用的程度由Ｇ４１８　６－ＴＧ株落數予以定量並與以Ｈｉｎｄ Ⅲ切割但未以Ｔ７第６基因外核酶處理之ｐＥ３Ｎｅｏ進行尋標得到的數目比較。

其他產生５’及３’突出端之方法亦具可行性，例如，將兩個彼此部分重複的綫狀分子變性再聯合將可產生分子混合物，每個分子具３’突出或５’突出於兩端上，及無法與原始綫將分子分辨之再聯合片段。突出長度藉由非正常介於兩個ＤＮＡ片段間之ＤＮＡ長度予以決定。

ｆ．構築供初級及二級人類纖維母細胞中將人類血紅素生成素基因置於老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ啟動子之控制下之用的尋標載體

下列可用於示範一本發明之具體實施例，其中人類紅血球生成素（ＥＰＯ）基因上游之正常正性及負性調節序列被更改以允許人類紅血球生成素在初級或二級人類纖維母細胞株中表現，其原來並不以明顯量表現ＥＰＯ。

於人類ＥＰＯ密碼區域上游存在之特異性區域可藉ＰＣＲ增幅。有利於此目的之三組引子係分析已發表人類ＥＰＯ〔Ｇｅｎｅｂａｎｋ記作ＨＵＭＥＲＰＡ；Ｌｉｎ，Ｆ－Ｋ，等人，Ｐｒｏｃ，Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ８２：７５８０－７５８４（１９８５）〕後加以設計的。這些引子對可增幅６０９，６０３或５９０鹽基對之片段。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（47）

表 3

引子	HUMERPA 順序	序列	片段大小
F1	2→20	5′ AGCTTCT GCTTCCAGAC (SEQ ID NO 1)	
R2	610→595	5′ GGGGTCC CTCAGCGAC (SEQ ID NO 2)	609鹽基對
F2	8→24	5′ TGGGCTT CCAGACCCAG (SEQ ID NO 3)	
R2	610→595	5′ GGGGTCC CTCAGCGAC	603鹽對基
F3	21→40	5′ CCAGCTA CTTTGCGGA ACTC (SEQ ID NO 4)	
R2	610→595	5′ GGGGTCC CTCAGCGAC	590鹽基對

該3個片段本質上為重複的且在本實驗中互換使用。690鹽基對的片段由相對於起始位置－623延伸至－

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（44）

14（HUMERPA核苷位置2至610），兩端與ClaI連接子連接。得到的ClaI連接片段以ClaI切割並嵌入pBluescriptⅡSK／+（Stratagene），方向為HUMERPA核苷位置610鄰近質體多連接子中SalI位置。該質體，P5'EPO，可分別地在EPO上游片段（各別在HUMERPA核苷位置150及405）之唯一FspI或DfiI位置上切割並連接至metallothionein啟動子。典型上，來自mMT－I基因〔不含任何mMT密碼序列；Hamer，D．H．及WallingM．，J．Mol．Appl．Gen．1：273－288（1982）；該片段亦可使用由來自Genbank，即MUSMTI，MUSMTIP，MUSMTIPRM，可用於mMT序列之分析所設計之PCR引子以已知方法由老鼠基因體DNA分離〕之1．8仟鹽基對EcoRI－BglⅡ片段用已知方法製成平頭且與SfiI切割（亦製成平頭）或FspI切割之p5'EPO連接。分析得到擇殖株的方向性且使用mMT前方BagⅡ位置位於質體多連接子中SalI位置近端者在初級及二級人類纖維母細胞中進行尋標。在最終產物中該方向指揮mMT轉錄HUMERPA核苷酸位置610。該得到的質體對mMT插入FspI及SfiI位置者分別命名為p5'EPO－mHTF及p5'EPO－mMTS。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（45）

當需要修正，刪除及／或取代位於原始標的基因上游的負性調節性序列或增強子時額外的上游序列為有用的。例如ＥＰＯ，於肝以外及直腸外組織中抑制ＥＰＯ表現之一負性調節元素序列〔Ｓｅｍｅｎｚａ，Ｇ．Ｌ．等人，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０：９３０－９３８（１９９０）〕可被刪除。在６仟鹽基對片　段中進行一系列之刪除。該刪除區域可用具廣泛宿主－細胞活性之增強子〔例，由巨細胞病毒（ＣＭＶ）而來之增強子〕加以取代。

選擇在ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔⅡＳＫ／＋載體中６０９鹽基對５’ＥＰＯ片段之方向，因為ＨＵＭＥＰＲＡ序列以一ＢａｍＨＩ（遠端）及ＨｉｎｄⅢ位置（近端）置於其５’端。因此，一正常位於６０９鹽基對片段上游之６仟鹽基對ＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄⅢ片段〔Ｓｅｍｅｎｚａ，Ｇ．Ｌ．等人，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０：９３０－９３８（１９９０）〕藉已　知方法由基因體ＤＮＡ分離。例如，一個噬菌體，巨質體，或酵母菌人工染色體基因庫可用６０９鹽基對ＰＣＲ增幅出的片段作為探針進行篩選。標的選殖株將具有６仟鹽基對ＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄⅢ片段且其可藉由已知方法比較其限制圖譜與人類ＥＰＯ基因附近之限制圖譜而予以確認。或者，使用６０９鹽基對片段作為探針構築ＥＰＯ基因上游人類基因體之限制酶圖譜，可確認酵素產生一源自ＨＵＭＥＰＲ

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（46）

A順序2及609間並延伸超過上游BamHI位置；該片段可由經合適切割的人類基因體DNA進行電泳而分離並連接於一細菌性或酵母菌選殖載體上。正確的選殖株將與609鹽基對5'EPO探針雜交並包含一6仟鹽基對BamHI－HindⅢ片段。分離之6仟鹽基對片段以適當方向插入p5'EPO，p5'EPO－mMTF，或p5'EPO－mMTS（如此一來HindⅢ位置接近HUMEPRA核苷酸位置2）。額外之上游序列可用已知方法分離，使用染色體步查技術（chromosome walking techniques）或藉由可與609鹽基對5'EPO探針雜交之酵母菌人工染色體之分離。

上述之選殖技巧使得EPO上游序列可在體外修正供後續初級及二級人類母細胞尋標性轉染。這些技巧敘述mMT啟動子簡易的插入，及刪除負性調節區域，及刪除負性調節區域並以具廣泛宿主－細胞活性之增強子加以取代。

g．尋標至人類EPO基因兩側序列並藉篩選分離被尋標之初級，二級及長生之人類纖維母細胞

為了尋標，質體以限制酶切割使插入之發生遠離質體骨幹。以p5'EPO－mMTS而言，HindⅢ及SalI之切割釋出2．4仟鹽基對的尋標片段DNA，其包含1．8仟鹽基對mMT啟動子及分別於5'及3'端

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

五、發明說明（47）

有４０５鹽基對及２０４鹽基對，係為了將此構築體尋標而進入ＥＰＯ基因之調節區域上。該ＤＮＡ或單獨此２，４仟鹽基對尋標片段藉酚萃洗及乙醇沈澱予以純化並以實施例１８ｃ中所述條件轉染進入初級或二級人類纖維母細胞。受轉染細胞覆蓋於在人類纖維母細胞培養基中的１５０毫米培養皿上。４８小時後該細胞以１０，０００細胞／平方公分之密度覆於２４孔盤內〔約每孔２０，０００個細胞；若尋標發生率為每10^6個可選殖細胞（實施例１ｃ），則需要測試約５０個孔以分離單一表現株〕。這些於被轉染後ＤＮＡ尋標而進入ＥＰＯ上游對應性區域的細胞將於ｍＭＴ啟動子的控制下表現ＥＰＯ。１０天後，整個孔內上清液使用一商業化可用免疫試驗套件（Ａｍｇｅｎ）對ＥＰＯ表現作測試。由表現ＥＰＯ的孔而來之選殖株係使用已知方法分離，典型地藉由分配到個別孔內或盤內之異源性族群細胞每一部分的試驗，試驗這些正反應細胞，並依需要重複，最後，藉由篩選每一孔種植一細胞之９６孔微效價盤分離出被尋標的株落。來自整個盤之溶解物中之ＤＮＡ亦可使用一ｍＭＴ特異性引子配合位於ＨＵＭＥＲＰＡ核苷酸位置１上游之一引子藉ＰＣＲ對一片段之增幅加以分析。這對引子應增幅出一段精確符合基於該ＤＮＡ序列所預測之大小的ＤＮＡ片段。正性反應盤以胰蛋白酶處理並以連續較低之稀釋度再覆於盤上，並依需要重複ＤＮＡ製備及ＰＣＲ步驟以分離被尋標的細胞。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（48）

在此敘述之尋標程序亦可用來在不死化人類細胞（例如，ＨＴ１０８０纖維母細胞，ＨｅＬａ，ＭＣＦ－７，乳癌，細胞，Ｋ－５６２白血癌細胞，ＫＢ癌細胞或２７８０ＡＤ卵瘤細胞）活化ｈＧＨ的表現以達為了傳統藥物傳送而製造ｈＧＨ之目的。

在此所敘述的尋標計劃亦可以用於在不死化人類細胞（例如，ＨＴ１０８０（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１２１）纖維母細胞，ＨｅＬａ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２）細胞，ＭＣＦ－７（ＡＴＣＣ　ＨＴＢ　２２）乳癌細胞，Ｋ－５６２（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２４３）白血癌細胞，ＫＢ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１７）上皮腫瘤細胞２７８０ＡＤ（Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｂｌｉｅｋ，Ａ．Ｍ．等人，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４８：５９２７－５９３２（１９８８））卵巢腫瘤細胞）中活化ｈＧＨ的表現，以作為供醫藥傳送之ｈＧＨ生產的目的。

ｈ．尋標至人類ＥＰＯ基因兩側序列並藉由一正性或一聯合正性／負性篩選系統分離被尋標之初級，二級及不死化人類纖維母細胞

構築ｐ５’ＥＰＯ－ｍＭＴＦ，ｐ５’ＥＰＯ－ｍＭＴＳ或其具有額外上游之６仟鹽基對ＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄⅢ片段之衍生物的策略可接著進行插入ｎｅｏ基因於ｍＭＴ啟動子附近之步驟。另外，一負性篩選標記，例如ｇｐｔ〔來自ｐＭＳＧ（ｐｈａｒｍａｃｉａ）或另外合適

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（47）

的來源〕，可於pBluescriptⅡSK／＋多連接子中插入HUMEPRA序列的附近。在前一種情形，G418藉由株落群中製備之DNA進行PCR增幅或限制酶及Southern氏雜交分析予以分離及篩選而證實被尋標的株落。在後一種情形，G418株落置於含6－硫代黃嘌呤之培養基中以篩選掉pGT基因嵌入者〔Besnard，C．等人，Mol．Cell．Biol．7：4139－4141（1987）〕。另外，HSV－TK基因可置於如pGT之插入者之相反一端，使得藉由在含400微克／毫升G418，100μM6－硫代黃嘌呤，及25毫克／毫升gancyclovir之人類纖維母細胞培養基中培養細胞可篩選出neo及篩選掉gpt及TK。該雙重負性篩選應可提供對真實被尋標事件一幾乎絕對的篩選且Southern氏移漬分析提供一最後的確認。

此處敘述之尋標程序亦可用於不死化人類細胞（例，HT1080纖維母細胞，HeLa，MCF－7乳癌細胞，K－562白血癌細胞，KB腫瘤細胞或2780AD卵癌細胞）中活化hEPO的表現以達為了傳統藥物傳送而製造hEPO的目的。

在此所敘述的尋標計劃亦可以用於在不死化人類細胞（例如，HT1080（ATCC CCL 121）纖維母細胞，HeLa（ATCC CCL 2）細胞，M

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（50）

ＣＦ－７（ＡＴＣＣ　ＨＴＢ　２２）乳癌細胞，Ｋ－５６２（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２４３）白血癌細胞，ＫＢ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１７）上皮腫瘤細胞２７８０ＡＤ（Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｂｌｉｅｋ，Ａ．Ｍ．等人，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４８：５９２７－５９３２（１９８８））卵巢腫瘤細胞）中活化ｈＧＨ的表現，以作為供醫藥傳送之ｈＧＨ生產的目的。

ｉ．構築可將人類生長激素基因置於在初級人類纖維母細胞中老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ啟動子之控制下的尋標質體

下列實施例用來示範本發明之一具體事實，其中人類生長激素基因被更改以在初級或二級人類纖維母細胞中表現人類生長激素。

與那些在實施例１ｆ中所述為了尋標至ＥＰＯ基因調性區域的分子相似的尋標分子係使用源自人類生長激素Ｎ基因之５’端之被選殖ＤＮＡ片段而產生。一約１．８仟鹽基對片段分佈於ＨＵＭＧＨＣＳＡ（輸入Ｇｅｎｅｂａｎｋ）核苷酸位置３７８７－５４３２（此有兩個ＥｃｏＮＩ位置而產生大小方便於選殖或涉及此片段之次選殖之診斷性切割的片段）藉由分析此區域序列而設計ＰＣＲ引子予以增幅。該區域由ｈＧＨ基因Ｎ　第１個ｉｎｔｒｏｎ延伸至轉譯開始位置５’上游約１．４仟鹽基對處。ｐＵＣ１２以ＥｃｏＲＩ及ＢａｍＨＩ切割，以ｋｌｅｎｏ

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（51）

w處理產生平頭，並於稀釋的條件下再形成環，導致已失去EcoRI及BamHI位置之質體。該質體命名為PUC12XEB。HindⅢ連接子被連接於增幅出的hGH片段上且得到的片段以HindⅢ切割再連接於HindⅢ切割之PUC12XEB上。得到的質體PUC12 XEB－5’hGH，以EcoRI及BamHI切割後移除緊接hGH轉錄起始位置上游之0．5仟鹽基對片段。該切割過之片段連接於來自mMT－I基因〔不包含任何mMT密碼區域；Hamer，D．H．及Walling，M．J．Mol． Appl．Gen．1：273－288（1982）；該片段亦可使用來自Genbank；即MUSMTI，MUSMTIP，MUSMTIPRM，可用於mMT序列之分析中所設計之PCR引子由老鼠基因體DNA中藉已知方法分離〕之1．8仟鹽基對EcoRI－BglⅡ片段。質體p5’hGH－mMT具兩側皆是上游hGH序列之mMT啟動子。

上述選殖技巧使得hGH上游序列在試管中被修正以接著進行初級或二級人類纖維母細胞之被尋標轉染。該策略敘述mMT啟動子之簡單插入。其他策略亦可考慮，例如，在插入之mMT序列上游插入具廣泛宿主－細胞特異性之一增強子。

j．尋標至人類hGH基因兩側之序列且藉由篩選而分離被尋標之初級，二級及不死化人類纖維母細胞

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（57）

為了尋標，質體以限制酶切割使插入之發生遠離質體。在ｐ５’ｈＧＨ－ｍＭＴ的情形下，ＨｉｎｄⅢ之切割釋出一２．０仟鹽基對之尋標片段，其包括１．８仟鹽基對之ｍＭＴ啟動子而在５’及３’兩側具ＤＮＡ以便將此構築體尋標於ｈＧＨ基因之調節區域上。該ＤＮＡ或僅２．９仟鹽基對尋標片段藉由酚萃洗及乙醇沈澱予以純化並於實施例６中所述條件轉染進入初級或二級人類纖維母細胞。旋轉染細胞覆於具人類纖維母細胞培養基之１５０毫米培養皿中。４８小時後細胞以１０，０００個細胞／平方公分之密度〔每孔約２０，０００個細胞；若尋標發生率為每１０^{6}個可選殖細胞有１個（實施例１ｃ），則需要測試５０個孔左右才能分離到單一表現株落〕覆於２４孔盤上。被轉染用的ＤＮＡ尋標而進入ｈＧＨ之上游對應性區域的細胞將在ｍＭＴ啟動子的控制下表現ｈＧＨ。１０天後，所有孔內上清液使用商業化可用之免疫試驗套件（Ｎｉｃｈｏｌｓ）對ｈＧＨ加以測試。由顯示製造ｈＧＨ的孔而來的細胞使用習用方法分離，典型上藉由測試分佈於個別孔或盤內之異源性族群細胞之每一部分，測試陽性反應的孔，並依需要重複，最後藉由篩選每孔種一細胞之９６孔微效價盤而分離被尋標的株落。來自全部盤溶解物之ＤＮＡ亦可使用一ｍＭＴ特異性引子配合一位於ＨＬＭＧＨＣＳＡ核苷酸位置５，４３２下游引子以ＰＣＲ對一片段之增幅加以分析。該對引子應增幅出一大小精確符

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（53）

合基於該ＤＮＡ序列之預期的ＤＮＡ片段。陽性反應盤以胰蛋白酶處理並以連續較低稀釋度再覆於盤中，且依需要重複ＤＮＡ的製備及ＰＣＲ步驟以分離被尋標的細胞。在此所述之尋標程序亦可用於不死化人類細胞（例如，ＨＴ１０８０纖維母細胞，Ｈｅｌａ，ＭＣＦ－７乳癌細胞，Ｋ－５６２白血癌細胞，ＫＢ癌細胞或２７８０ＡＤ卵癌細胞）活化ｈＧＨ的表現以達為了傳統藥物傳送而製造ｈＧＨ的目的。

在此所敘述的尋標計劃亦可以用於在不死化人類細胞（例如，ＨＴ１０８０（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１２１）纖維母細胞，ＨｅＬａ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２）細胞，ＭＣＦ－７（ＡＴＣＣ　ＨＴＢ　２２）乳癌細胞，Ｋ－５６２（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２４３）白血癌細胞，ＫＢ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１７）上皮腫瘤細胞２７８０ＡＤ（Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｂｌｉｅｋ，Ａ．Ｍ．等人，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４８：５９２７－５９３２（１９８８））卵巢腫瘤細胞）中活化ｈＧＨ的表現，以作為供醫藥傳送之ｈＧＨ生產的目的。

ｋ．尋標至人類ｈＧＨ兩側序列並藉由一正性或一聯合的正性／負性篩選系統分離被尋標的初級，二級及不死化人類纖維母細胞

構築ｐ５’ｈＧＨ－ｍＭＴ之策略可緊接著進行插入ｎｅｏ基因於ｍＭＴ啟動子附近之額外步驟。另外，可將

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（54）

一負性篩選標記，例如gpt〔來自pMSG（Pharmacia）或另外合適的來源〕於pUC12多連接子處插入HUMGHCSA附近。在前一種情形，G418^{2}株落藉由來自混合株落製備的DNA進行PCR增幅或限制酶及Southern氏雜交分析加以篩選及分離而確認被尋標的株落。在後一種情況，G418 株落被置入含硫代黃嘌呤的培養基中以篩選掉gpt基因嵌入者〔Besnard，C．等人，Mol．Cell．Biol．7：4139－4141（1987）〕。另外，HSV－TK基因可置於如gpt之插入者之相反一端，使得藉由於含400微克／毫升G418，100μM6－硫代黃嘌呤，及25微克／毫升gancyclouir之人類纖維母細胞培養基中培養細胞可篩選出neo且篩選掉gpt及TK。此雙重負性篩選可提供對於真實被標定事件一近乎絕對的篩選。Southern氏雜交分析則具確認性。

在此敘述之尋標程序亦可於不死化人類細胞中（例如H1080纖維母細胞，Hela，MCF－7乳癌細胞，K562白血癌細胞，KB癌細胞或2780AD卵癌細胞）活化hGH的表現以達供傳統藥物傳送製造hGH之目的。

在此所敘述的尋標計劃亦可以用於在不死化人類細胞（例如，HT1080（ATCC CCL 121）纖

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（55）

維母細胞，HeLa（ATCC CCL 2）細胞，MCF-7（ATCC HTB 22）乳癌細胞，K-562（ATCC CCL 243）白血癌細胞，KB（ATCC CCL 17）上皮腫瘤細胞2780AD（Van der Bliek，A．M．等人，Cancer Res．48：5927-5932（1988））卵巢腫瘤細胞）中活化hGH的表現，以作為供醫藥傳送之hGH生產的目的。

在實施例1f及1i中提及，以及在實施例1g，1h，1j及1k中使用的尋標構築體可以被修正為含有可增幅之可篩選標記（例如，ada，dhfr，或CAD），該可篩選標記有利於篩選其中被活化內源性基因及可增幅之可篩選標記均被增幅的細胞。這種細胞，其表現或能夠表現編碼一治療性產物的內源性基因，可以作為製造蛋白質（例如，hGH及hEPO）以供傳統醫藥傳送或基因治療的用途。

1．藉電擊轉染法以外源性DNA及一可篩選標記基因對初級及二級纖維母細胞進行之轉染

快速生長或早期靜止階段之纖維母細胞予以胰蛋白酶處理及由塑膠表面以培養基冲刷。取少量細胞懸淨液加以計算，且剩餘之細胞進行離心。抽出上清液並將細胞再懸浮於5毫升之電擊轉移緩衝液（20mM HEPES pH7．3，137mM NaCl，5mM KCl，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（56）

0．7mM Na_2HPO_4，6mM右旋糖）。該細胞再次離心，抽離上清液，並再將細胞懸浮於含1毫克／毫升乙醯化牛血清白蛋白之電擊轉移緩衝液中。最終細胞濃度約3×10^6細胞／毫升。電擊轉染應於懸浮後立即進行。

超螺旋之質體DNA加入具0．4厘米電極溝（Bio－Rad）之滅菌管。最終DNA濃度通常至少為120微克／毫升。0．5毫升之細胞懸浮液隨即加入該管中（約含1．5×10^6個細胞），並緩慢混合細胞懸浮液及DNA溶液。電擊轉染以Gene－Pulser儀器（Bio－Rad）進行。電容及電壓分別設定為960微法拉第及250－300伏特。當電壓增加，細胞存活降低，但存活細胞中穩定將送入DNA嵌入其基因體之比率大為增加。根據這些既得參數，可觀察到約14－20毫秒之電擊時間。

受電擊轉染之細胞置於室溫下約5分鐘，且管中液體小心地以無菌輸送管移出。該細胞直接加入預溫之培養基10毫升（如上述具15%牛血清）於一10米盤中並如上述培養。次日，吸取培養基並換上10毫升新鮮培養基且再培養16－24小時。在次日進行細胞次培養以決定選殖效率及篩選抗G418之次殖株。細胞以胰蛋白酶處理，計算並貼附；典型上來說，纖維母細胞以10^3細胞／10厘米盤濃度貼附來決定選殖效率且以1－2×10

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（57）

^{4}個細胞／１０厘米盤濃度進行Ｇ４１８篩選。

人類纖維母細胞在具３００－４００微克／毫升Ｇ４１８（Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ，雙硫酸鹽而具約５０％有效成分；Ｇｉｂｃｏ）之纖維母細胞培養基中（具１５％牛血清）對Ｇ４１８抗藥性進行篩選。選殖效率之決定則不加入Ｇ４１８。貼附細胞培養１２－１４天，其後株落以福馬林固定，用結晶紫染色並加以計數（對於作選殖效率實驗之培養盤）或使用選殖棒予以分離（對於作Ｇ４１８篩選之培養盤）。兔子纖維母細胞之電擊轉染及篩選基本上如同人類纖維母細胞，除了使用之條件以外。兔子纖維母細胞在含１克／毫升Ｇ４１８濃度之培養基中篩選抗藥性株落。

纖維母細胞由新鮮切除之人類包皮中分離。細胞５０，０００個細胞／平方公分種於加入１０％牛血清之ＤＭＥＭ中。當細胞聚集時以胰蛋白酶處理得到纖維母細胞並予以電擊轉染。電擊轉染條件藉以質體ｐｃＤＮＥＯ之轉染予以評估。一代表性轉染實驗使用近乎完善之條件（６０毫克質體ｐｃＤＮＥＯ於２５０伏特電擊電壓及９６０微法拉第電容之下）產生每５８８個受處理細胞中有一個Ｇ４１８株落（所有處理細胞之０．１７％），或每７１個可選殖株中有１個Ｇ４１８株落（１．４％）。

當分別進行９個於幾乎完善之條件下（６０微克質體ｐｃＤＮＥＯ於３００伏特電壓及９６０微法拉第電容下

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（58）

）之電擊轉染實驗，平均觀察到每１，８９９個被處理之細胞就有１個Ｇ４１８株落（０．０５％），而在１／８８２至１／７５００之範圍內。相對地每３８個可選殖細胞中平均有１個Ｇ４１８株落（２．６％）。

較低繼代之初級人類纖維母細胞藉由以質體ｐｃＤＮＥＯ及ｐＸＧＨ５之共轉染（ｃｏ－ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ）轉變成ｈＧＨ表現細胞。典型地，６０微克之等莫耳兩質體之混合物在近乎完善之條件下（電擊電壓３００伏特且電容９６０微法拉第）予以轉染。該實驗結果每１４，７０５個受處理細胞產生１個Ｇ４１８株落。

這些細胞及其他以相同轉染條件分離之細胞的ｈＧＨ表現資料總結於下。最後，全部Ｇ４１８株落之９８％可生大量培養細胞。

經分析之Ｇ４１８－ｒ株落數目	１５４
Ｇ４１８／表現ｈＧＨ之株落數目	６５
平均ｈＧＨ表現程度	２．３微克ｈＧＨ／１０^{6}個細胞／２４小時
最大ｈＧＨ表現程度	２３．０微克ｈＧＨ／１０^{6}個細胞／２４小時

穩定之受轉染細胞亦藉由以ｐＸＧＨ３０１轉染初級或二級人類纖維母細胞而業已產生，ｐＸＧＨ３０１為ｎｅｏ及ｈＧＨ基因同時出現於一個質體分子之ＤＮＡ構築

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線

五、發明說明（59）

。pXGH301經由一兩個步驟組成的過程加以構築。自pBR322（在pBR322中的位置23－651）分離SaII－ClaI片段並嵌入以SalI－ClaI切割之pcDNEO，因而將一BamHI位置送入pcDNEO之SV40早期啟動子區域的上游。該質體，pBNEO，以BamHI進行切割且一2．1Kb包含在SV40早期啟動子控制下的neo基因之片段被分離，並插入以BamHI進行切割之pXGH5。一具有該2．1仟鹽基對BamHI片段之單一嵌入之質體被分離得到，其中neo及hGH彼此以同樣的方向進行轉錄。該質體被命名為pXGH301．例如，以60微克pXGH301於300伏特及960微法拉第下轉染1．5×10⁶個細胞。G418抗藥性株落由受轉染二級纖維母細胞分離之頻率為每1．5×10⁶個細胞產生652個G418抗藥性株落（每2299個受處理細胞中有1個）。該株落群中約59％表現hGH。

實施例2　構築導致人類生長激素與紅血球生成素序列融合之多形性轉錄單位之尋標質體

下述可作為本發明兩個具體事實之示範說明，其中人類EPO基因上游正常調節性序列被更改使得在未體轉染狀態不能以可偵測量表現EPO之初級或二級纖維母細胞株可表現hEPO。在這些具體事實中，尋標作用之產物為多形性轉錄單位，其中人類生長激素基因第1個exo

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（60）

n位於ＥＰＯ第２－５個ｅｘｏｎ的上游。轉錄，剪接及轉譯的產物為ｈＥＰＯ訊號胜肽第１－４個胺基酸被ｈＧＨ第１－３個胺基酸殘基所取代之蛋白質。該兩個具體事實不同點在於外來調節性序列插入之相對位置及產生最終加工之轉錄本(transcript)所需要的特殊剪接形式。

質體ｐＸＥＰＯ－１０用於藉由基因尋標於人類第７對染色體上內源性ｈＥＰＯ基因以ｈＧＨ第１個ｅｘｏｎ取代ｈＥＰＯ第１個ｅｘｏｎ。質體ｐＸＥＰＯ－１０構築如下。首先，中間質體ｐＴ１６３藉由將６仟鹽基對ＨｉｎｄⅢ－ＢａｍＨＩ片段（見實施例１ｆ）在ＨｉｎｄⅢ－ＢｏｍＨＩ切割之ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔⅡＳＫ＋（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，ＬａＪｏｌｌａ，ＣＡ）內插入ｈＥＰＯ譯碼區　域之上游。該連接後的產物以ＸｈｏＩ及ＨｉｎｄⅢ切割並連接至來自ｐＭＣｌｎｅｏＰｏｌｙＡ〔Ｔｈｏｍａｓ，Ｋ．Ｒ．及Ｃａｐｅｃｃｈｉ，Ｍ．Ｒ．Ｃｅｌｌ　５１：５０３－５１２（１９８７），可用來自Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，ＬａｊｏｌｌａＣＡ者〕之１．１仟鹽基對ＨｉｎｄⅢ－ＸｈｏＩ片段上。在聚合酶鏈反應中使用寡核苷酸１３．１－１３．４而產生一融合片段，其中老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ１（ｍＭＴ－Ｉ）啟動子－ｈＧＨ第１個ｅｘｏｎ序列融合於ｈＥＰＯ　第１個ｅｘｏｎ序列。首先，寡核苷酸１３．１及１３．２被用來自ｐＸＧＨ５（圖１）增幅約０．

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（61）

７３仟鹽基對ｍＭＴ－Ｉ啟動子－ｈＧＨ第１個ｅｘｏｎ片段。再來，使用寡核苷酸１３．３－１３．４增幅約０．５７仟鹽基對主要包含來自人類基因體ＤＮＡ之ｈＥＰＯ　第１個ｉｎｔｒｏｎ片段。最後，混合此兩種被增幅的片段並進而以寡核苷酸１３．１及１３．４複製產生最終之融合片段（第３個融合片段），其ｍＭＴ－Ｉ之５’端具ＳａｌＩ位置且ｈＥＰＯ第１個ｉｎｔｒｏｎ序列之３’端具ＸｈｏＩ位置。融合片段以ＸｈｏＩ及ＳａｌＩ切割並連接至ＸｈｏＩ切割之ｐＴ１６３。該連接後之混合物被轉形進入大腸桿菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）且一選殖株被確認含有單一插入之第３個融合片段，其中ＸｈｏＩ位置在ｈＥＰＯ第１個ｉｎｔｒｏｎ序列之３’端再產生，且其被命名為ｐＸＥＰＯ－１０。

１３．１　５’　ＡＡＡＡＧＴＣＧＡＣ　ＧＧＴＡＣＣ

ＳａｌＩ　ＫｐｎＩ

ＴＴＧＧ　ＴＴＴＴＴＡＡＡＡＣ　ＣＡＧＣＣＴＧＧＡＧ

（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ　５）

１３．２　５’　ＣＣＴＡＧＣＧＧＣＡ　ＡＴＧＧＣＴＡ

ＣＡＧ　ＧＴＧＡＧＴＡＣＴＣ　ＧＣＧＧＧＣＴＧＧＧ　ＣＧ

（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ　６）

１３．３　５’　ＣＧＣＣＣＡＧＣＣＣ　ＧＣＧＡＧＴＡ

ＣＴＣ　ＡＣＣＴＧＴＡＧＣＣ　ＡＴＴＧＣＣＧＣＴＡ　ＧＧ

（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ　７）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（62）

13．4　5′　TTTTCTCGAG　CTAGAAC
AGA　TAGCCAGGCT　GAGAG
（SEQ　ID　NO　8）

寡核苷酸13．1中非粗體字區域與mMT－I啟動子相同，具有自然之KpnI位置於其5’端。粗體字區域表現一SalI位置尾端而將5’端轉變成一SalI位置。寡核苷酸13．2及13．3之粗體字區域表hGH序列，但非粗體字區域為來自hEPO基因之第1個intron序列。寡核苷酸13．4之非粗體字區域與hEPO第1個intron最後25個鹽基相同。粗體字區域包括一XhoI位置尾端而將被增幅片段之3’端轉變成－XhoI位置。

質體pXEPO－11藉由基因尋標將mMT－I啟動子及hEPO構造基因及啟動子區域上游hGH之第1個exon置於人類第7對染色體上內源性hEPO位置。質體pXEPO－11之構築如下。寡核苷酸13．1及13．5－13．7被用於聚合酶鏈反應以產生一融合片段，其中老鼠metallothionein I（mMT－I）啟動子－hGH　第1個exon序列與相對於hEPO譯碼區域自－1至－630之hEPO序列融合。首先，寡核苷酸13．1及13．5被用來自pXGH5（圖1）增幅約0．73仟鹽基對mMT－I啟動

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（6）

子－hGH 第1個exon片段。再者，寡核苷酸13·6及13·7被用來自人類基因體DNA增幅約0·62仟鹽基對主要包括相對於hEPO譯碼區域－1至－620之hEPO序列。寡核苷酸13·5及13·6在hGH第1個intron－hEPO啟動子區域包含10鹽基對之連接序列，其對應於自然hEPO第1個intron剪接供應處。最後，混合這兩個被增幅的片段並進而以寡核苷酸13·1及13·7增幅而產生最終融合片段（融合片段6），其於mMT－I5'端具SalI位置且於mMT－I啟動子區域之3'端具一XhoI位置。融合片段以XhoI及SalI割並連接至XhoI切割之pT163。該連接反應混合物轉形送入大腸桿菌（E·coli）且一選殖株被確認含有單一插入的融合片段6，其中XhoI位置在hEPO啟動子序列3'端再生，並將其命名為pXEPO－11。

13·5 5' CCTAGCGGCA ATGGCTA

CAG GTGAGTACTC AAGCTTCTGG

HindIII

GCTTCCAGAC CCAG (SEQ ID NO 9)

13·6 5' CTGGGTCTGG AAGCCCA

GAA GCTTGAGTAC TCACCTGTAG

HindIII

CCATTGCCGC TAGG (SEQ ID NO 10)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（64）

13．7 5′ TTTTCTCGAG CTCCGCG

XhoI

CCT GGCCGGGGTC CCTC

（SEQ ID NO 11）

寡核苷酸13．5及13．6之粗體字部分表hGH序列。斜體字區域對應於hEPO 第1個intron前10個鹽基對。剩下的序列對應於相對於hEPO譯碼區域由－620至－597之hEPO序列。寡核苷酸13．7之非粗體字區域與相對於hEPO譯碼區域－1至－24之鹽基對相同。包括XhoI位置尾端之粗體字區域將被增幅片段之3′端變成XhoI位置。

質體pXEPO－10以BamHI及XhoI切割釋出兩側皆有hEPO序列之mMT－I／hGH融合序列約7．3仟鹽基對，可作為基因尋標的用途。該片段（尋標第1個尋標片段）不包含hEPO譯碼區域，僅具hEPO密碼區域及hEPO 第1個intron序列上游約－620至－6620之間的序列指揮尋標至人類EPO基因上。第1個尋標片段使用類似實施例1c中所述的條件轉染初級或二級人類纖維母細胞。GA18 株落挑至96孔盤之個別孔中並以ELISA試驗（R&D系統，Minneapolis，MN）篩選EPO的表現。轉染DNA隨意嵌入人類基因體的細胞不能產生EPO。轉染DNA與內源性hEPO第1個intron及h

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（65）

ＥＰＯ上游序列已進行對應性重組的細胞包含一多形性基因，其中ｍＭＴ－Ｉ啟動子及非轉錄的序列及ｈＧＨ　第１個ｅｘｏｎ取代正常性ｈＥＰＯ游啟動子及ｈＥＰＯ第１個ｅｘｏｎ（見圖５）。在第１個尋標片段中非ｈＥＰＯ序列加入ｈＥＰＯ第１個ｉｎｔｒｏｎ下游之ｈＥＰＯ序列。以ｍＭＴ－Ｉ啟動子對正常性ｈＥＰＯ調節性區域進行取代將於非正常性表現ＥＰＯ之纖維母細胞中活化ＥＰＯ基因。以ｈＧＨ　第１個ｅｘｏｎ取代ｈＥＰＯ第１個ｅｘｏｎ產生以ｈＧＨ第１－３個胺基酸取代ｈＥＰＯ訊號胜肽前４個胺基酸的蛋白質，並產生一具功能之多形性訊號胜肽，其藉由後轉譯處理自成熟蛋白質上去除並由表現細胞排出。

質體ｐＸＥＰＯ－１１可藉由以ＢａｍＨＩ及ＸｈｏＩ切割釋出７．４仟鹽基對包括兩側皆有ｈＥＰＯ序列之ｍＭＴ－Ｉ／ｈＧＨ融合序列而作為基因尋標的用途。該片段（第２個尋標片段）不含ｈＥＰＯ密碼區域，僅具位於ｈＥＰＯ密碼區域的上游－１及約－６６２０間的序列指揮尋標而進入人類ＥＰＯ基因。第２個尋標片段使用類似實施例１ｇ中所述條件轉染初級或二級人類皮膚纖維母細胞。Ｇ４１８抗藥性株落被挑至９６孔盤的個別孔中並以ＥＬＩＳＡ試驗（Ｒ＆Ｄ系統，Ｍｉｎｎｅａｐｏｔｉｓ，ＭＮ）篩選ＥＰＯ的表現。轉染ＤＮＡ隨意嵌入人類基因體之細胞不能產生ＥＰＯ。轉染ＤＮＡ已與內源性ｈ

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（66）

ＥＰＯ啟動子及上游序列進行對應性重組的細胞包含一種多形性基因，其中ｍＭＴ－Ｉ啟動子及非轉錄性序列，ｈＧＨ５’未轉譯序列及ｈＧＨ　第１個ｅｘｏｎ，及一包含ｈＥＰＯ　第１個ｉｎｔｒｏｎ前１０個鹽基對之１０鹽基對長連接子於相對於ｈＥＰＯ密碼區域－６２０位置的Ｈｉｎｄ Ⅲ處插入（見圖６）。位於正常沈默之ｈＥＰＯ啟動子上游之ｍＭＴ－Ｉ啟動子將於初級或二級皮膚纖維母細胞中，指揮具（５’至３’）非轉譯性ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ及ｈＧＨ序列，ｈＧＨ第１個ｅｘｏｎ同於ｈＥＰＯ　第１個ｉｎｔｒｏｎ前１０個鹽基對的１０鹽基ＤＮＡ，及正常性ｈＥＰＯ啟動子及ｈＥＰＯ第１個ｅｘｏｎ（相對於ＥＰＯ密碼區域－６２０至＋１３）之訊號的製造。來自ｈＥＰＯ　第１個ｉｎｔｒｏｎ之１０鹽基對連接子序列作為剪接主動位置將ｈＧＨ　第１個ｅｘｏｎ與位於ｈＥＰＯ　第２個ｅｘｏｎ上游之下一個下游剪接被位置融合。該轉錄本之處理將因而剪出ｈＥＰＯ啟動子，第１個ｅｘｏｎ，及第１個ｉｎｔｒｏｎ序列。以ｈＧＨ　ｅｘｏｎ１取代ｈＥＰＯ　第１個ｅｘｏｎ產生ｈＥＰＯ訊號胜肽前４個胺基酸以ｈＧＨ第１－３個胺基酸取代之蛋白質，並製造一具功能之多形性訊號胜肽，其藉由後轉譯處理成熟蛋白質上移除並自表現細胞分泌。

可使用習知方法構築一系列相關於ｐＸＥＰＯ－１０

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（67）

及pXEPO－11的構築體。在這些構築體中，mMT－I啟動子及hGH序列的相對位置，及mMT－I／hGH序列插入hEPO上游序列的位置皆為多變的以創造有助於基因尋標之多形性轉錄，使得融合之轉錄本表現更有效率，或具其他希望的特性。此種構築體將得到相同的結果，因此該hGH／hEPO融合基因藉由基因尋標而在正常hEPO基因上受到一外源性啟動子的控制。

例如在hEPO基因上游之6仟鹽基對HindIII－BamHI片段（見實施例1f）據有許多限制酶鑑識序列而可以作為neo基因及mMT－I啟動子／hGH融合片段的嵌入位置。一個這樣的位置，位於該HindIII位置上游約1．3仟鹽基對之BglII位置，在此區域為獨特的，且可作為一或多個可篩選標記及一衍生自另一個基因的調節性序列插入的用途，該調節性序列可以作為在初級人類細胞、二級人類細胞或不死化人類細胞中活化EPO表現之用途。

首先，中間型質體pT164係經由將在hEPO編碼區域上游6Kb之HindIII－BamHI片段（實施例1f）嵌入以HindIII－BamHI切割之pBluescriptIISK+（Stratagene，LaJolla，CA）中構築而成。質體pMClneoPolyA〔Thomas，K．R．及Capccchi，M．R．Cell51：503－512（

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（68）

１９８７）；商業化產品來自Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，ＬａＪｏｌｌａ，ＣＡ〕以ＢａｍＨＩ及ＸｈｏＩ進行切割，再以大腸桿菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＤＮＡ聚合酶之Ｋｌｅｎｏｗ片段處理而製成鈍端，並純化得到的１．１仟鹽基對片段。ｐＴ１６４以ＢｇｌＩＩ進行切割並以大腸桿菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＤＮＡ聚合酶之Ｋｌｅｎｏｗ片段處理而製成鈍端。前面兩個鈍端的片段被連接在一起並使其轉形進入勝任大腸桿菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）。具有該１．１Ｋｂ　ｎｅｏ片段單一嵌入的選殖株被分離出，並經由限制酶分析法加以分析，以確認其中由於鈍端ＸｈｏＩ及ＢｇｌＩＩ位置的融合而重建之ＢｇｌＩＩ位置係距離出現在質體ｐＴ１６４上獨特之ＨｉｎｄＩＩＩ位置１．３仟鹽基對處。該得到的質體，ｐＴ１６５，可以在ｎｅｏ轉錄單位的５′端側邊之獨特ＢｇｌＩＩ處進行切割。

寡核苷１３．８及１３．９在聚合酶鏈反應中被使用來產生一片段，其中老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎＩ（ｍＭＴ－Ｉ）啟動子－ｈＧＨ第一個ｅｘｏｎ序列被額外地與一包含剪接提供位置的１０鹽基對片段加以融合。被選擇的剪接提供位置與自然ｈＥＰＯ第１個ｉｎｔｒｏｎ中的剪接提供位置相關，雖然可以使用其他很多的剪接提供位置或共同性剪接提供位置。這些寡核苷（１３．８及１３．９）可以被用於自ｐＸＧＨ５增幅約０．７３仟鹽基對之ｍＭＴ－Ｉ啟動子－ｈＧＨ第一個ｅｘｏｎ

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（69）

片段（圖1）。該被增幅的片段（片段7）以BglII進行切割並與以BglII切割之pT165連接。此連接混合物以轉形法送入大腸桿菌（E·coli），且一包含單一嵌入之片段7的選殖株被確任並命名為pXEPO-12，該片段中在mMT-I啟動子中的KpnI位置與neo基因的5′末端相鄰，且該mMT-I啟動子的方向使得轉錄係朝向獨特的HindIII位置。

13·8　5′AAAAAGATCT　GGTACCT

BglII　KpnI

TGG TTTTTAAAAC CAGCCTGGAG

（SEQ ID NO 12）

其中寡核苷13·8之非粗體字區域與mMT-I啟動子相同，在其5′方向具有自然的KpnI位置。粗體字型表示一BglII位置尾端，可將5′端轉便成一BglII位置。

13·9　5′TTTTAGATCT　GAGTACT

BglII

CAC　CTGTAGCCAT　TGCCGCTAGG

（SEQ ID NO 13）

寡核苷13·9之粗體字區域表示hGH序列。該斜體字區域相關於hEPO第1個intron中前10個鹽基對。劃上底線之BglII位置係為了質體構築的目的而加入。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝·訂·線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（70）

質體pXEPO-12經由以BamHI及HindIII進行切割釋出7．9仟鹽基對的片段可以作為尋標的用途，該片段包含neo基因及兩側為hEPO序列之mMT-I／hGH融合物。此片段（第3個尋標片段）不包含hEPO編碼區域序列，僅有在hEPO編碼區域上游約-620到約-6620之間的序列，該序列可引導在人類EPO基因位置上游進行尋標作用。第3個尋標片段使用類似於實施例1b及1c中所敘述的條件，被轉染送入初級人類皮膚纖維母細胞、二級人類皮膚纖維母細胞或不死化人類皮膚纖維母細胞。對G418有抗藥性的選殖株被挑到96孔盤的個別孔中，並經由一ELISA試驗（R& DSystems，Minneapolis，MN）篩選EPO的表現。其中受轉染的DNA隨機嵌入人類基因體的細胞不會產生EPO。其中受轉染的DNA在內源性hEPO啟動子及上游序列之間已進行相似性重組的細胞包含一融合基因，在該融合基因中，mMT-I啟動子及非轉錄序列，hGH5′端非轉譯序列，及hGHexon1，及包含hEPO第1個intron前10個鹽基對之10個鹽基對之連接子被嵌入相對於hEPO編碼區域約-1920之位置的BglII鑑識位置。mMT-I啟動子在正常之下不表現的hEPO啟動子上游的位置，將在初級人類纖維母細胞、二級人類纖維母細胞或不死化人類纖維母細胞中（或其他人類細胞）指導

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（71）

一訊息的產生：（5′到3′）非轉譯性metallothionein及hGH序列，hGH第1個exon，與hEPO第1個intron前10個鹽基對相同之10鹽基對之DNA，及hEPO上游區域及hEPO第1個exon（相對於EPO編碼序列，自約－1920到＋13）。來自hEPO第1個intron之10鹽基對連接子序列作為一剪接提供位置以便將hGH第1個exon融合到下游的剪接接受位置，其為於hEPO第2個exon的正上游位置。所得到的轉錄本的加工將因此剪接出hEPO上游序列，啟動子區域，第1個exon，及第1個intron序列。當使用pXEPO－10，－11及－12時，該訊息之轉錄後加工可以經由利用體外突變產生法以除去剪接接受位置加以改善，該剪接接受位置位於介於mMT－I啟動子及hEPO第1個exon之間的hEPO上游序列中，其本來會減少製造希望的訊息所需要之生產行剪接事件的發生程度。以hGH第1個exon取代hEPO第1個exon導致一蛋白質中hEPO訊息胜肽中前4個胺基酸被hGH之第1個到第3個胺基酸所取代，製造出一功能性，融合之訊息胜肽，其藉由轉譯後加工自成熟蛋白質上去除且由表現細胞中分泌出來。

實施例3．　上游序列之被尋標修正及該被尋標基因的增幅

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（17）

假如尋標質體包含一可以經由基因增幅的表現型對於一高濃度細胞毒性劑具有抵抗性的標記基因，其中ＥＰＯ基因已經由前述方法加以活的人類細胞可以被誘發去增幅ｎｅｏ／ｍＭＴ－１／ＥＰＯ轉錄單位。可篩選的標記基因，例如二氫葉酸還原酶（ｄｈｆｒ，篩選性藥劑為甲胺基蝶呤（ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ）），多功能性ＣＡＤ基因〔編碼磷酸胺基甲酯製造酶，天門冬胺酸轉胺基甲醯酶，及二氫乳清酸酶；篩選性藥劑為Ｎ－（亞磷酸乙醯基）－Ｌ－天門冬酸鹽（ＰＡＬＡ）〕，及腺核苷去胺酶（ａｄａ；篩選性藥劑為一腺嘌呤核苷酸），在眾多基因中特別被報導可以在不死化人類細胞株中進行增幅（Ｗｒｉｇｈｔ，Ｊ．Ａ．等人Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８７：１７９１－１７９５（１９９０））。在這些研究中，基因增幅已被報告可以在許多不死化人類細胞株中發生。ＨＴ１０８０，ＨｅＬａ，ＭＣＦ－７乳癌細胞，Ｋ－５６２白血癌細胞，ＫＢ上皮種瘤細胞，或２７８０ＡＤ卵巢上皮腫瘤細胞在合適的篩選條件下都表現增幅的現象。

質體ｐＸＥＰＯ－１０及ｐＸＥＰＯ－１１可以經由將一正常性或突變性ｄｈｆｒ基因插入這些質體的獨特唯一之ＨｉｎｄＩＩＩ為置而加以修正。以合適的ＤＮＡ轉染ＨＴ１０８０細胞後，針對Ｇ４１８－抗藥性（由ｎｅｏ基因所賦予）的細胞進行篩選，並加以檢驗，這些細胞

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（73）

中的ｈＥＰＯ基因已經由ｎｅｏ，ｄｈｆｒ及ｍＭＴ－１序列尋標進入ｈＥＰＯ基因上游正確的位置而加以活化，這些細胞可以曝露在甲胺基蝶呤（ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ）中進行逐步篩選以針對ｄｈｆｒ的增幅及其連接之ｎｅｏ，ｍＭＴ－１，及ｈＥＰＯ序列進行篩選（Ｋａｕｆｍａｎ，Ｒ．Ｊ．Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ　２：２２１－２３６（１９９０））。在一逐步篩選的計劃中，細胞手先曝露於低濃度的ＭＴＸ（０．０１Ｚ到０．０８μＭ）中，接著連續曝露於漸增的ＭＴＸ濃度，直到使用達２５０μＭＭＴＸ或更高的濃度為止。０．０４到０．０８μＭＭＴＸ之線性漸增步驟及連續ＭＴＸ濃度兩倍增加將有效地針對被增幅的受轉染細胞株進行篩選，雖然一相對增加較少的改變亦為有效的。增幅作用經由ｄｈｆｒ基因拷貝數目的增加加以追蹤並經由體外ｈＥＰＯ的測量加以確認。藉由此策略，後續ｈＥＰＯ的過度表現是可以經由在完全於ｈＥＰＯ編碼區域之外的序列被尋標修正予以達成的。

與這些所敘述（實施例１ｉ及１ｋ）用於在人類細胞中活化ｈＧＨ的表現者類似的構築體，亦可被進一步修正以包含ｄｈｆｒ基因，其目的為得到經由在非編碼序列進行之基因尋標法及後續之增幅會過度表現ｈＧＨ基因的細胞。

實施例４．　人類ＥＰＯ基因位置在一不死化人類纖

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（74）

維細胞株中的尋標及活化

該尋標質體pXEPO－13係被製成用於試驗內源性hEPO基因可以在一人類纖維細胞中被活化之假說。首先，質體pT22．1被構築，其包含融合到老鼠metallothionein－1promoter（mMT－I）之hEPO基因之第一個密碼子上游之基因體hEPO序列之63鹽基對。寡核苷22．1到22．4被用於PCR中以融合mMT－I及hEPO序列。這些引子的特性如下：：22．1為一21鹽基之寡核而類似於mMT－IKpnI位置的上游之mMT－I啟動子開始28個鹽基對的片段；22．2及22．3為58核苷之互補性引子，其定義hEPO與mMT－I序列之融合物，使得該融合物包含hEPO基因之地一個密碼子上游的hEPO序列開始之35個鹽基對之中的28個鹽基對，且mMT－I序列開始於寡核苷22．2的第29個鹽基，包括mMT－I之自然BglII位置並延伸30個鹽基對到mMT－I序列之中；22．4為21核苷之長度並類似於hEPO基因第一個密碼子下游之hEPO序列開始725鹽基對。這些引子被用於增幅一1．4仟鹽基對DNA片段，該片段包含上述之mMT－I與hEPO序列的融合物。得到的片段以KpnI進行切割（該PCR片段包含兩個KpnI位置：一位於mMT－I啟動子區域之獨特自然KpnI位置及位於hEPO序列中之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（75）

獨特自然之KpnI位置），並加以純化。該質體pXEPOI（圖3）亦以KpnI進行切割，釋出一1．4仟鹽基對片段及a6．4仟鹽基對片段。該6．4仟鹽基對片段被純化之並被連接到1．4仟鹽基對KpnIPCR融合物片段。該得到的構築體被稱為pT22．1。第二個中間物，pT22．2，係經由將hEPO結構基因（見實施例1f）上游約6仟鹽基對之HindIII－BamHI片段連接到以BamHI及HindIII進行切割之pBSIISK+（Stratagene，LaJolla，CA）而加以構築。第三個中間體，pT22．3，係經由首先自含有新黴素磷酸轉移酶基因（neomycin phosphotransferase gene）之pMCINEOpolyA（Stratagene，，LaJolla，CA）切出一1．1仟鹽基對XhoI／BamHI片段。該片段隨即以DNA聚合酶I（New England Biolabs）之Klenow片段處理而製成鈍端。該片段隨即被連接到pBSIISK+（以聚合酶I處理而製成相似的鈍端）之HincII位置以產生pT22．3。第四個中間物，pT22．4，其製造係經由純化一1．1仟鹽基對XhoI／HindIII片段，其包括來自pT22．3的neo基因且將此片段連接到以XhoI及HindIII進行切割之pT22．2。pT22．4因此包含

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（76）

鄰近hEPO片段上游BamHI－HindIII之HindIII端之neo基因。最後，pXEPO－13係經由自pT22·1首先切出一2·0仟鹽基對EcoRI／AccI片段而加以產生。該片段之EcoRI位置定義mMT－I啟動子的5′端序列，然而該片段之AccI位置在hEPO第5個exon。因此，theAccI／EcoRI片段包含幾乎完整的hEPO表現單位，僅失去一部份的第5個exon及自然之多腺核苷化位置。此2·0仟鹽基對EcoRI／AccI片段被純化，以大腸桿菌（E·coli） DNA聚合酶之Klenow片段處理而製成鈍端，並連接到以XhoI進行切割之鈍端之pT22·4。

HT1080細胞經由以PvuI－BamHI進行切割之pXEPO－13加以轉染。以此方式切割之pXEPO－13產生三個片段；一1仟鹽基對載體片段，其包括一部份之amp基因，一1·7仟鹽基對片段之其他載體序列及一約10仟鹽基對之片段，其包含hEPO，neoandmMT－I序列。此約10仟鹽基對之BamHI／PvuI片段在BamHI位製包含下列序列：一約6·0仟鹽基對之上游hEPO基因體序列，1·1仟鹽基對neo轉錄單位，0·7仟鹽基對mMT－I啟動子及2·0仟鹽基對之片段，其包含hEPO編碼區域序列而在第5個exon中截斷。以此方式切割之45u

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝·訂·線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（77）

ｇｐＥＸＰＯ－１３被用於１千２百萬細胞的電擊轉染中（電擊轉染的條件敘述於實施例１ｂ）。該電擊轉染法總共重複八次，使得總共有９千６百萬個細胞接受電擊轉染作用。細胞與培養基混合得到每毫升１百萬個細胞之密度且取其中１毫升分散於共９６個１５０ｍｍ組織培養盤中（Ｆａｌｃｏｎ），每個包含至少３５毫升之ＤＭＥＭ／１５％牛血清。隔天，抽出培養基並以新鮮含有０．８毫克／毫升Ｇ４１８（Ｇｉｂｃｏ）的培養基替換。培養１０天後，每一盤的培養基進行取樣針對ｈＥＰＯ作ＥＬＩＳＡ分析（Ｒ＆Ｄ系統）。９６個盤中的６個包含至少１０厘單位／毫升ｈＥＰＯ。這些盤的其中之一，編號第１８號，被選擇來純化表現ｈＥＰＯ的選殖株。９６個１５０ｍｍ培養盤中每一個包含約６００個Ｇ４１８抗藥性株落（估計在全部９６個盤中共有５７，６００個４１８抗藥性株落）。在第１８號盤中約６００個株落以胰蛋白酶處理脫落並以５０細胞／毫升濃度附著於３６４孔盤中（Ｓｔｅｒｉｌｉｎ）。培養一個星期以後，單一株落在每一個３６４孔盤的大孔中約可觀察到１０個（這些盤在２４個大孔中都有１６個小孔）。每個孔在這次都進行ｈＥＰＯ表現的篩檢。這些大孔中的兩個所含的培養基中至少有２０厘單位／毫升ｈＥＰＯ。編號Ａ２的孔中發現分佈在１６個小孔中含有１５個株落。每個這些小孔中的細胞以胰蛋白酶處理脫落並轉移到一９６孔盤中１６個獨立的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（78）

孔中。進行培養後７天每個這些孔中的培養基進行取樣針對ｈＥＰＯ作ＥＬＩＳＡ分析。僅有一個孔，編號第１０號，含由ｈＥＰＯ。這個細胞株被命名為ＨＴ１６５－１８Ａ２－１０且被培養複製以供定量ｈＥＰＯ分析，ＲＮＡ分離及ＤＮＡ分離。ｈＥＰＯ生產量的定量測量得到一測量值２，５００毫單位／百萬細胞／２４小時。

一０．２仟鹽基對ＤＮＡ探子自ｈＥＰＯ第５個ｅｘｏｎ的ＡｃｃＩ位置延伸到３′非轉譯區域之ＢｇｌＩＩ位置，且被用於探尋分離自ＨＴ１６５－１８Ａ２－１０細胞的ＲＮＡ。該尋標構築體，ｐＸＥＰＯ－１３，在ｈＥＰＯ第５個ｅｘｏｎ的ＡｃｃＩ位置截斷，並不包含這些ＡｃｃＩ／ＢｇｌＩＩ序列且，因此，針對在ｈＥＰＯ基因位置上的尋標具有診斷性。只有與自然ｈＥＰＯ序列已經以相似性的方式發生重組作用之細胞才會產生含有與ＡｃｃＩ／ＢｇｌＩＩ序列相似序列之ｈＥＰＯｍＲＮＡ。ＨＴ１６５－１８Ａ２－１０被發現可以表現預期大小的一ｍＲＮＡ，其可以在北方墨漬結果中與３２－Ｐ標定之ＡｃｃＩ／ＢｇｌＩＩｈＥＰＯ探子發生雜交反應。限制酶及Ｓｏｕｔｈｅｒｎ氏墨漬分析確認ｎｅｏ基因及ｍＭＴ－Ｉ啟動子被尋標而進入ＨＴ１６５－１８Ａ２－１０細胞中兩個ｈＥＰＯ對偶基因中的一個。

這些結果顯示相似性重組作用可以用於尋標一調節區域至一正常下在人類纖維母細胞中為不表現的基因中，使

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（79）

得該基因被功能性地活化。

22·1 5′CACCTAAAATGATCTCTC TGG（SEQ ID NO 14）

22·2 5′CGCGCCGGGTGACCACAC CGGGGGCCCTAGATCTGGTGAAGCT GGAGCTACGGAGTAA（SEQ ID NO 15）

22·3 5′TTACTCCGTAGCTCCAGC TTCACCAGATCTAGGGCCCCCGGTG TGGTCACCCGGCGCG（SEQ ID NO 16）

22·4 5′GTCTCACCGTGATATTCT CGG（SEQ ID NO 17）

實施例5 無intron基因之產生

基因尋標法亦可被用於產生一經加工的基因，其中intron被去除，以供轉移到細菌或酵母菌中表現基因及體外蛋白質的產生。例如，hGH可以經由下列的研究在酵母菌細胞中加以表現。

兩個分開的尋標構築體被加以製造。尋標構築體1（TC1）包括一反轉錄病毒之LTR序列，例如來自Moloney Murine Leukemia Virus（MoMLV）的LTR，一供在人類細胞中的篩選標記（例如，來自Tn5的neo基因），一供在酵母菌

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（80）

中的篩選標記（例如，酵母菌ＵＲＡ３基因），一能構指揮基因在酵母菌中表現的調節性區域（例如，ＧＡＬ４啟動子），及選擇性地，一當與ｈＧＨ基因融合時將允許ｈＧＨ由酵母菌細胞中分泌出去的序列（引導序列）。該載體亦可以包含一允許反轉錄病毒在人類細胞中包裝（ｐａｃｋａｇｉｎｇ）的ＤＮＡ序列。該構築體被如此統合，使得上述序列被ｈＧＨ基因體序列包夾兩側，該ｈＧＨ基因經由與ｈＧＨ基因Ｎ端序列發生之相似性重組將外源性序列嵌入緊鄰ｈＧＨ基因Ｎ端序列第一個密碼子（相關於在成熟，經加工之蛋白質的第一個胺基酸位置）上游的ＴＣ１。在嵌入後ＤＮＡ序列的順序為：ｈＧＨ上游及調節性序列，ｎｅｏ基因，ＬＴＲ，ＵＲＡ３基因，ＧＡＬ４啟動子，酵母菌引導序列，包括成熟蛋白質第一個胺基酸及其下游之ｈＧＨ序列。尋標構築體２（ＴＣ２）包括足以供質體在酵母菌中複製的序列（例如，２－微米環（２－ｍｉｃｒｏｎ　ｃｉｒｃｌｅ）或ＡＲＳ序列），一酵母菌轉錄終止序列，一病毒之ＬＴＲ，及一供在人類細胞中篩選的標記基因（例如，細菌性ｇｐｔ基因）。該構築體被如此統合使得上述序列被ｈＧＨ基因體序列包夾兩側，該ｈＧＨ基因經由與ｈＧＨ基因Ｎ端序列發生之相似性重組將外源性序列嵌入緊鄰ｈＧＨ基因Ｎ端序列終止密碼子（相關於在成熟，經加工之蛋白質的第一個胺基酸位置）下游的ＴＣ２。在嵌入後ＤＮＡ序列的順序為：ｈＧＨ

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（81）

exon5序列，酵母菌轉錄終只序列，酵母菌質體複製序列，LTR，gpt基因，hGH3′非轉錄序列。

來自TC1及TC2的線狀片段順序行嵌入hGH基因兩側的相對位置。當以輔助性反轉錄病毒重複感染（superinfection）這些細胞後，LTR經由此區域所指揮的轉錄作用將導致一RNA在兩端具有LTR。此RNA的剪接將產生一種其中正常hGH intron被移除的分子。該被加工的轉錄本之反轉錄作用將造成經加工之hGH融合基因之雙股DNA拷貝的累積。由該雙重尋標的反轉錄病毒性感染之細胞中分離出DNA，並以一在該轉錄單位之LTR中切割一次之酵素加以切割。該被切割的物質在促進環化反應的條件下進行黏接，被送入酵母菌細胞中，且該細胞接著被曝露於針對URA3基因所進行的篩選之下。只有採取URA3基因的細胞（URA3連接於被TC1及TC2所送入的序列及該經加工之hGH基因）能夠生長。這些細胞包含一將在半乳糖的誘發下表現hGH蛋白質且在細胞中經由被融合之酵母菌引導胜肽序列分泌出該hGH蛋白質的質體，酵母菌引導胜肽序列在分泌時會被切除而產生一成熟，具生物活性之hGH分子。

在細菌細胞中的表現係伴隨著簡單地在TC1及TC2中，將來自pBR322之安比西林（ampicillin）一抗藥性基因取代酵母菌URA3基因，將ta

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（82）

c啟動子（deBoer等人，Proc．Natl．Acad．Sci．80：21－25（1983））取代酵母菌GAL4啟動子，將一細菌性引導序列取代酵母菌引導序列，將pBR322複製來源取代2－微米環（2－micron circle）或ARS序列，且將一細菌性轉錄終止序列（例如，trpA轉錄終止者；Christie，G．E．等人，Proc．Natl．Acad．Sci．78：4180－4184（1981））取代酵母菌轉錄終止序列。類似的是，hEPO可以在酵母菌中及細菌中表現，其經由簡單地將hGH尋標序列以hEPO尋標序列加以取代，使得酵母菌或細菌性引導序列位於緊鄰hEPO第1個密碼子（相關於成熟經加工之蛋白質中第一個胺基酸位置）上游的位置。

實施例6．　EPO基因在一不死化人類細胞株中的活化及增幅

將一dhfr表現單位嵌入pXEPO－13中的唯一HindIII位置（見實施例4）得到一新穎的尋標載體，其能夠進行雙重篩選並篩選出其中dhfr基因被增幅的細胞。在pXEPO－13中唯一的HindIII位置定義neo基因與自然在人類EPO基因上游的序列之間的聯會處將一dhfr基因置於此位置提供一具有neo基因及被衍生自自然EPO基因位置的DNA序列所包圍之dhfr基因的構築體。如pXEPO－13，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（87）

有利於經由相似性重組尋標至ＥＰＯ基因位置。如此之構築體稱為ｐＲＥＰＯ４，其被表現於圖８。該質體包含人類ＥＰＯ基因第１－４個ｅｘｏｎｓ及部份之第５個ｅｘｏｎ，以及位於ｈＥＰＯ編碼區域上游之ＨｉｎｄＩＩＩ－ＢａｍＨＩ片段。ｐＳＶｅ，ｐＴＫ及ｐｍＭＴ－Ｉ相關於來自ＳＶ４０早期區域，疱疹簡單病毒（Ｈｅｒｐｅｓ Ｓｉｍｐｌｅｘ Ｖｉｒｕｓ，ＨＳＶ）胸腺核苷激酶（ＴＫ）基因及老鼠ｍｅｔａｌｌｏｔｈｉｏｎｅｉｎ－Ｉ基因。其製造如下：以ＨｉｎｄＩＩＩ切割之ｐＸＥＰＯ－１３被純化並以ＤＮＡ聚合酶之Ｋｌｅｎｏｗ片段處理而製成鈍端．。為了得到ｄｈｆｒ表現單位，質體構築體ｐＦ８ＣＩＳ９０８０（Ｅａｔｏｎ等人，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２５：８３４３－８３４７（１９８６））以ＥｃｏＲＩ及ＳａｌＩ進行切割。一含有ｄｈｆｒ表現單位之２仟鹽基對片段由此切割中加以純化並以ＤＮＡ聚合酶之Ｋｌｅｎｏｗ片段處理而製成鈍端。此含有ｄｈｆｒ之片段隨即被連接到ｐＸＥＰＯ－１３鈍頭的ＨｉｎｄＩＩＩ位置。此連接反應之少量反應物以轉形方式送入大腸桿菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中並塗覆於安比西林（ａｍｐｉｃｉｌｌｉｎ）篩選培養皿上。接著在３７℃培養一整夜，觀察到個別的細菌菌落，挑選之並培養之。由者些培養物中進行少量質體的製備且該得到的ｇＤＮＡ隨即以酵素ＢｇｌＩＩ＋ＨｉｎｄＩＩＩ，及ＳｆｉＩ進行限

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（84）

制酶切割以決定被插入ｄｈｆｒ片段的方向性。來自這些製備物之一的質體ＤＮＡ被發現包含該２Ｋｂ之插入ｄｈｆｒ片段。在此質體中該ｄｈｆｒ基因的轉錄方向被發現與鄰近的ｎｅｏ基因相反。該構築體被命名為ｐＲＥＰＯ４。

在內源性ｈＥＰＯ基因經由相似性重組活化後，質體ｐＲＥＰＯ４被用於在細胞中增幅ｈＥＰＯ基因位置。以此構築體進行之基因活化使得可以針對增加之ＤＨＦＲ表現經由藥物甲胺基蝶呤（ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ，ＭＴＸ）的使用而加以篩選。典型地，增加之ＤＨＦＲ表現應經由藉ＤＮＡ增幅增加拷貝數目而發生。淨結果為被活化之ＥＰＯ基因與ｄｈｆｒ基因同時增幅。該活化之ＥＰＯ基因位置之同時增幅應咳導製ＥＰＯ表現量的增加。

尋標性試驗在ＨＴ１０８０細胞中以ｐＲＥＰＯ４進行。ｈＥＰＯ表現細胞系ＨＴＲＥＰＯ－５２因而被分離出此細胞系針對ＥＰＯ的產量進行定量及經由Ｓｏｕｔｈｅｒｎ氏墨漬法及北方墨漬法的分析。有兩個細胞株被發現只有單一拷貝之ｆｄｈｆｒ／ｎｅｏ／ｍＭＴ－１序列加以尋標進入。在０．８毫克／毫升Ｇ４１８的條件下得到的表現程度為１３００厘單位／百萬細胞／天。因為被尋標之ＥＰＯ基因位置包括一ｄｈｆｒ表現單位，其有可能以抗葉酸藥物，ＭＴＸ，去篩選ＤＨＦＲ之增強性表現。這些細胞株因次進行在０．０２，０．０５，０．１，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（85）

０．２及０．４μＭＭＴＸ中進行逐步的篩選。這些細胞株之大量培養的最初篩選結果險示於表４及圖７。

表４

細胞系	ＭＴＸ（μＭ）	mU／百萬細胞／２４h
５２Ｃ２０－５－０	０	１３６８
５２Ｃ２０－５－・０１	０・０１	１７４４
５２Ｃ２０－５－・０２	０・０２	１１６４３
５２Ｃ２０－５－０・０５	０・０５	２４４４９
５２－３－５－０・１０	０・１	３７０１９
５２－３－２－０・２０	０・２	６７８６７
５２－３－２－０・４Ｂ	０・４	９９９１９

以昇高之ＭＴＸ濃度進行之篩選在細胞系ＨＴＲＥＰ０－５２中成功找到增強之ＥＰＯ表現，其在可抵抗０．４μＭＭＴＸ的細胞系中觀察到ＥＰＯ產量７０倍的增強對於ＥＰＯ基因位置之增幅可以經由在ＭＴＸ抗藥性細胞系中進行Ｓｏｕｔｈｅｒｎ氏墨漬法分析而完全予以確認。其相對於親代（未尋標）ｈＥＰＯ對偶基因，顯示被活化ｈＥＰＯ基因位置之拷貝數目約增強１０倍。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

四、中文發明摘要（發明之名稱：　　）

蛋白質生產及蛋白質傳送

本發明相關於脊椎動物來源，特別是哺乳動物來源之受轉染之初級細胞、二級細胞及不死化細胞，其以編碼一希望（例如，一治療性）產物或其本身即為一希望（例如，一治療性）產物之外源性遺傳物質（ＤＮＡ）予以轉染，相關於轉染初級細胞，二級細胞及不死化細胞以使其包括外源性遺傳物質的方法，包括經由相似性重組作用之基因尋標法，相關於一內源性細胞基因的活化及增幅的方法，相關於藉由此細胞而有利於得到大量蛋白質的方法，相關於產生選殖細胞株或異源性細胞株的方法，及相關於使用受轉染之初級細胞、二級細胞及不死化細胞的基因治療

英文發明摘要（發明之名稱：　　）

PROTEIN PRODUCTION AND PROTEIN DELIVERY

The present invention relates to transfected primary, secondary, and immortalized cells of vertebrate origin particularly mammalian origin, transfected with exogenous genetic material (DNA) which encodes a desired (e.g., a therapeutic) product or is itself a desired (e.g., therapeutic) product, methods by which primary, secondary and immortalized cells are transfected to include exogenous genetic material, including DNA targeting by homologous

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝　訂　線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

四、中文發明摘要（發明之名稱：　　）

法。

本發明包括初級細胞、二級細胞及不死化細胞，如纖維母細胞，角質細胞，上皮細胞，內皮細胞，膠質細胞，神經細胞，血液組成元件，肌肉細胞，及其他可被培養之細胞。

英文發明摘要（發明之名稱：　　）

recombination, methods for the activation and amplification of endogenous cellular genes, methods by which cells useful for large-scale protein production can be obtained, methods of producing clonal cell strains or heterogenous cell strains, and methods of gene therapy in which transfected primary, secondary or immortalized cells are used.

The present invention includes primary, secondary, and immortalized cells, such as fibroblasts, keratinocytes, epithelial cells, endothelial cells, glial cells, neural cells, formed elements of the blood, muscle cells, and other cells which can be cultured.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝　訂　線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

402639 修正補充 89.6.08

公告本

A8 B8 C8 D8 402639

六、申請專利範圍

1.一種改變細胞內一被尋標基因表現之方法，該方法係包含下列步驟：

(a)提供一細胞，其基因組包含：

(i)具有內源性調節區域之被尋標基因；

(ii)一標的位置；

(b)提供一 DNA 構築體，其包含：

(i)一同源於標的位置之尋標序列；

(ii)一外源性調節序列；

(iii)一表現體(exon)；

(iv)一個編碼可增幅標記之序列，其使得可選擇含有多拷貝數目之編碼該可增幅標記的序列之細胞；及

(v)該表現體(exon)的 3'端之一不成對剪切提供者位置，

(c)以 DNA 構築體轉染該細胞，藉此產生一轉染細胞；

(d)將該轉染細胞保持於適合進行同源性重組作用的環境之下，藉此產生一同源性重組細胞，該同源性重組細胞之基因組包括除了被尋標基因之所有表現體外，還含有外源性調節序列，該構築體衍生之表現體(exon)、以及該構築體衍生之剪切提供者位置，

(e)在可選擇含有多拷貝數目之編碼該可增幅標記的序列之細胞的條件下，培養該同源性重組細胞；及

(f)將該同源性重組細胞保持在適當於外源性調節序列的轉錄控制的狀況之下，以便產生該構築體衍生之表現體(exon)的轉錄本(transcript)、該被尋標基因、以及任何位於

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

402639 修正補充 89.6.08

公告本

A8 B8 C8 D8 402639

六、申請專利範圍

1.一種改變細胞內一被尋標基因表現之方法，該方法係包含下列步驟：

(a)提供一細胞，其基因組包含：

(i)具有內源性調節區域之被尋標基因；

(ii)一標的位置；

(b)提供一 DNA 構築體，其包含：

(i)一同源於標的位置之尋標序列；

(ii)一外源性調節序列；

(iii)一表現體(exon)；

(iv)一個編碼可增幅標記之序列，其使得可選擇含有多拷貝數目之編碼該可增幅標記的序列之細胞；及

(v)該表現體(exon)的 3'端之一不成對剪切提供者位置，

(c)以 DNA 構築體轉染該細胞，藉此產生一轉染細胞；

(d)將該轉染細胞保持於適合進行同源性重組作用的環境之下，藉此產生一同源性重組細胞，該同源性重組細胞之基因組包括除了被尋標基因之所有表現體外，還含有外源性調節序列，該構築體衍生之表現體(exon)、以及該構築體衍生之剪切提供者位置，

(e)在可選擇含有多拷貝數目之編碼該可增幅標記的序列之細胞的條件下，培養該同源性重組細胞；及

(f)將該同源性重組細胞保持在適當於外源性調節序列的轉錄控制的狀況之下，以便產生該構築體衍生之表現體(exon)的轉錄本(transcript)、該被尋標基因、以及任何位於

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

該構築體衍生之表現體(exon)以及該被尋標基因間的序列，其中對應於構築體衍生之剪切提供者位置之轉錄本RNA 會引導剪切作用於相當於標的基因內位置之轉錄本上的剪切接受者位置。

2.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該可增幅標記係選自二氫葉酸還原酶，腺核苷去胺酶及三官能性酶胺甲醯基磷酸合成酶－天門冬胺酸轉氨甲醯酶-二氫乳清酸酶(CAD)所組成之族群中。

3.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該細胞之來源爲人類。

4.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該細胞之來源爲初級或二級細胞。

5.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該細胞爲不死化細胞。

6.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該細胞爲不死化人類細胞。

7.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該細胞係選自下列組成之一：HT1080 細胞、HeLa 細胞、MCF-7 乳癌細胞、K-562 白血病細胞、KB 腫瘤細胞、2780AD 卵巢腫瘤細胞、Raji 細胞、Jurkat 細胞、Namalwa 細胞、HL-60 細胞、Daudi 細胞、RPMI8226 細胞以及 MOLT-4 細胞，中國大鼠卵巢(CHO)細胞及鼠 L 細胞。

8.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該轉錄本之剪切接受者位置，係相對應於該被尋標基因的第二表現體(exon)

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

之剪切接受者位置。

9.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該構築體衍生之表現體(exon)係包含一 CAP 位置。

10.如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該構築體衍生之表現體(exon)係包含核苷酸序列 ATG。

11.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中在同源性重組細胞中，b(ii)-(v)係位於該被尋標基因的內源性調節區域的上游。

12.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 DNA 構築體進一步包含一第二尋標序列，其係與被尋標基因的內源性調節序列上游之序列同源。

13.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該被尋標基因係編碼一治療性蛋白質。

14.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該被尋標基因係編碼一激素、細胞激素、抗原、抗體、酵素、凝血因子、運輸蛋白質、受體、調節性蛋白質、結構性蛋白、或轉錄因子。

15.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該被尋標基因所編碼之蛋白質係選自下列組成之一者：降血鈣素、胰島素、胰島素調節素、類胰島素的生長因子類、副甲狀腺激素、神經生長因子、白血球間質素、免疫球蛋白、催化性抗體、過氧化物歧異酶、組織凝血酶原活化劑、血液凝集因子 VIII、脫輔基脂蛋白 E、脫輔基脂蛋白 A-I、血球蛋白、低密度脂蛋白受體、IL-2 受體、IL-2 受體拮抗劑、alpha-1 抗

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

胰蛋白酶、以及免疫反應修飾劑。

16.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該被尋標基因係編碼生長激素。

17.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該被尋標基因係編碼一干擾素。

18.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該被尋標基因係編碼血液凝集因子 IX。

19.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該被尋標基因係編碼葡萄糖腦苷脂酶。

20.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該被尋標基因係編碼一集落生成刺激因子。

21.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該被尋標基因係編碼紅血球生成素。

22.如申請專利範圍第 21 項之方法，其中該構築體衍生之表現體(exon)係包含一編碼序列，其與紅血球生成素的第一表現體(exon)的編碼序列相同。

23.如申請專利範圍第 21 項之方法，其中該構築體衍生之表現體(exon)係包含一編碼序列，其與紅血球生成素的第一表現體(exon)的編碼序列不同。

24.如申請專利範圍第 21 項之方法，其中該構築體衍生之表現體(exon)係包含一編碼序列，其與人類生長激素的第一表現體(exon)的編碼序列相同。

25.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該外源性調節序列爲一啓動子、促進子、骨架連接區域(scaffold-attachment

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

402639

六、申請專利範圍

region)、或者一轉錄因子結合位置。

26.如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該 DNA 構築體進一步包含一第二調節序列。

27.如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該外源性調節序列爲一 SV-40 基因之調節序列、細胞巨大病毒基因之調節序列、一老鼠金屬硫肽-I 基因之調節序列。

28.如申請專利範圍第 1 項之方法，其進一步包含下列步驟：

(g)將該同源性重組細胞保持在適當於該轉錄本剪切以及轉譯的條件之下；以及

(h)確認該轉錄本的轉譯產物已被產生。

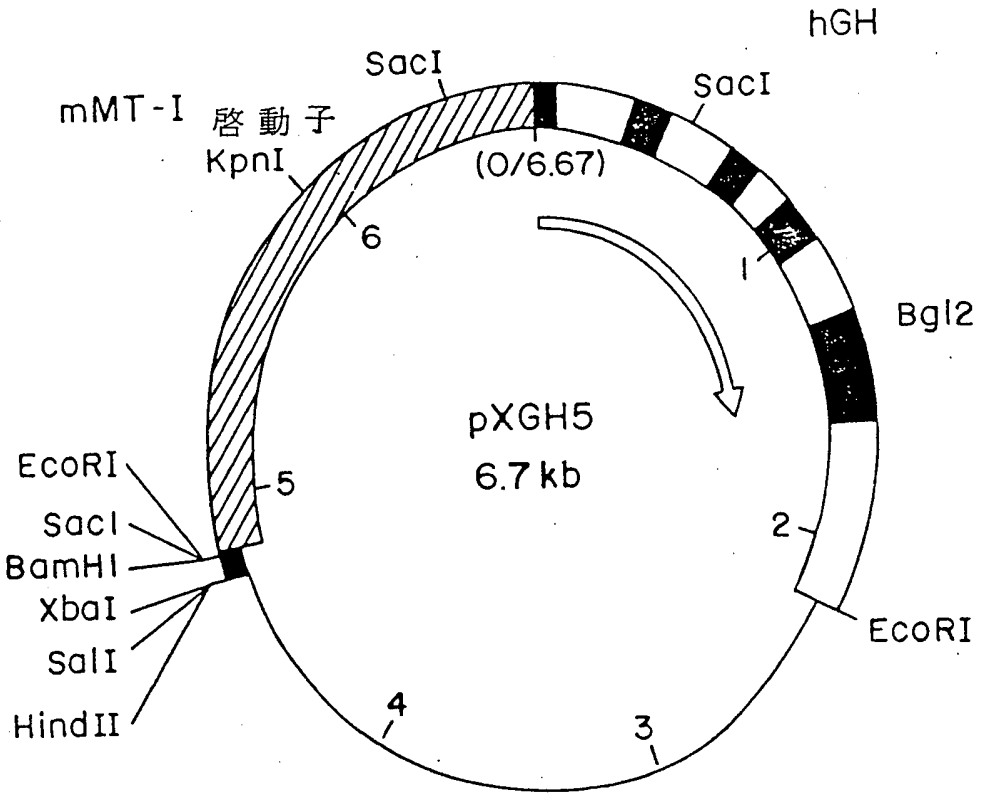
29.如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該被尋標基因係編碼紅血球生成素。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

402639

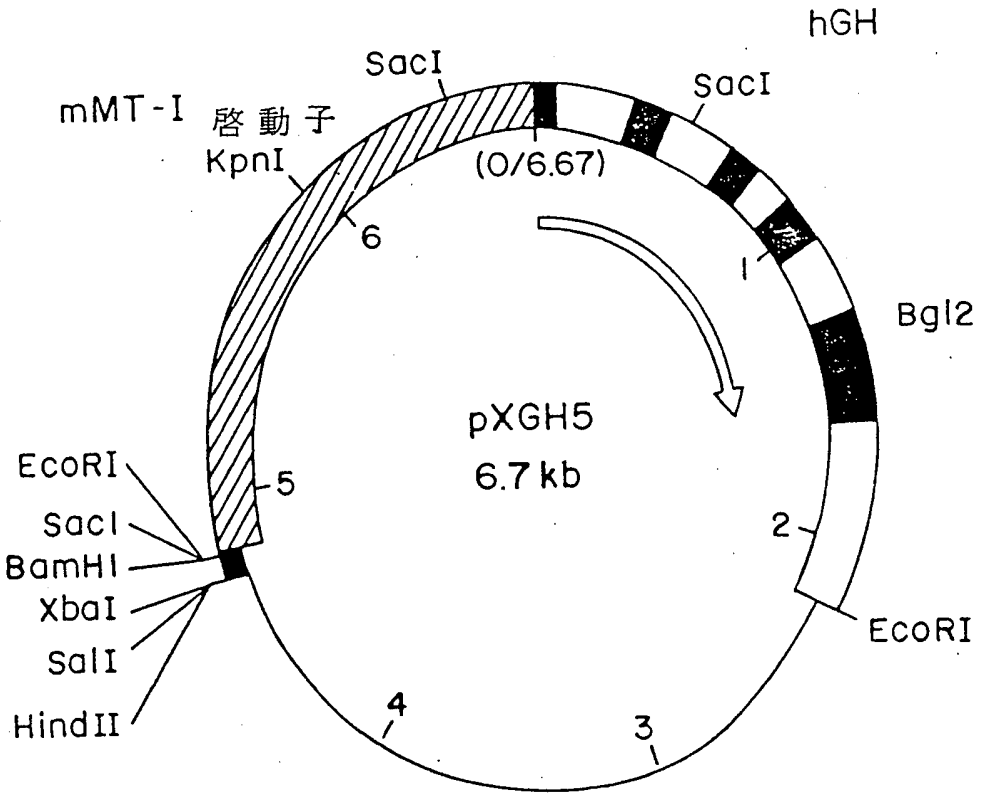
年 月 日 修正 補充
88. 2. 05



第 1 圖

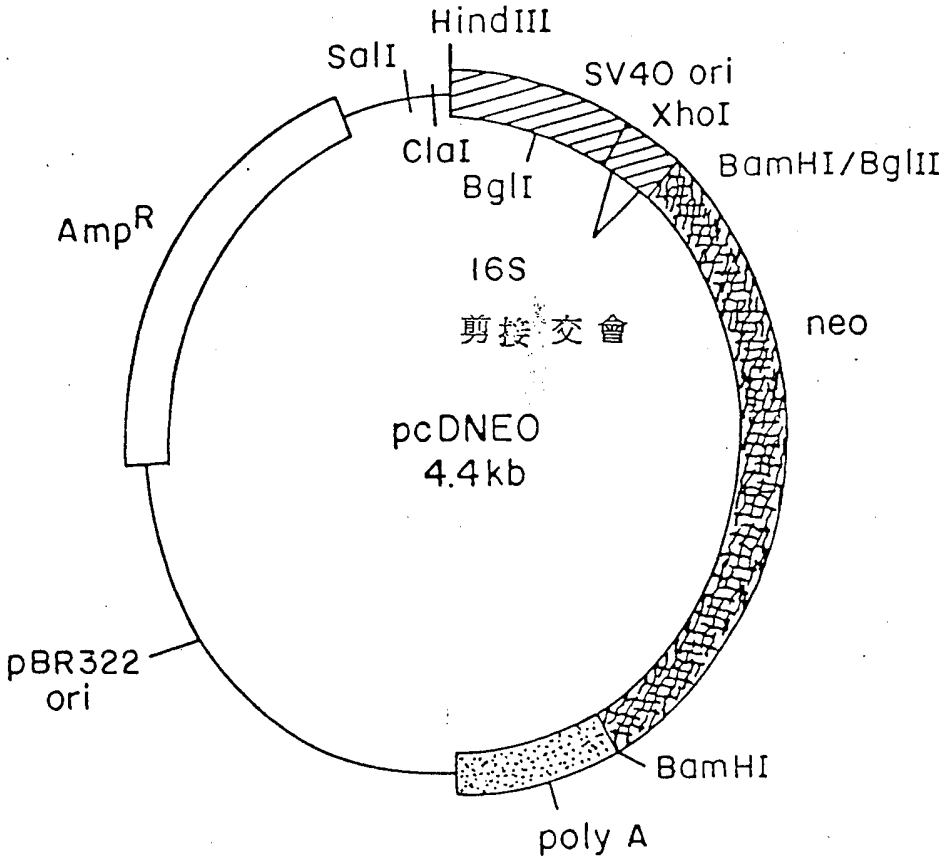
402639

年 月 日 修正 補充
88. 2. 05



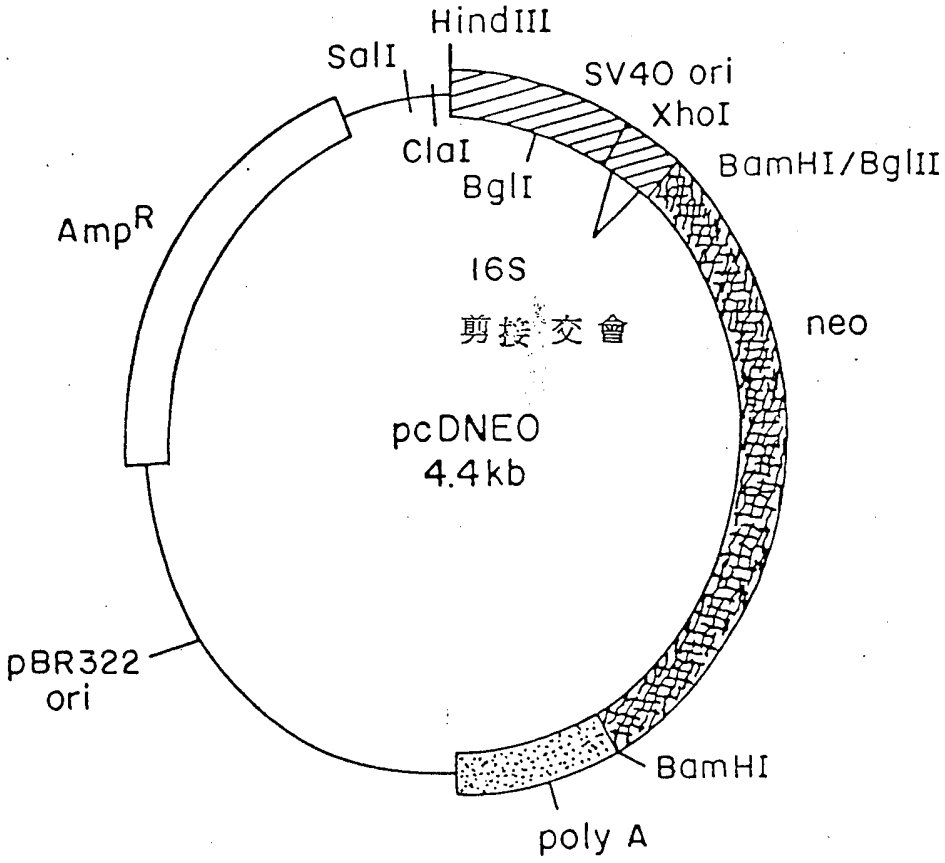
第 1 圖

修正
年 月 日
88. 2. 05補充



第 2 圖

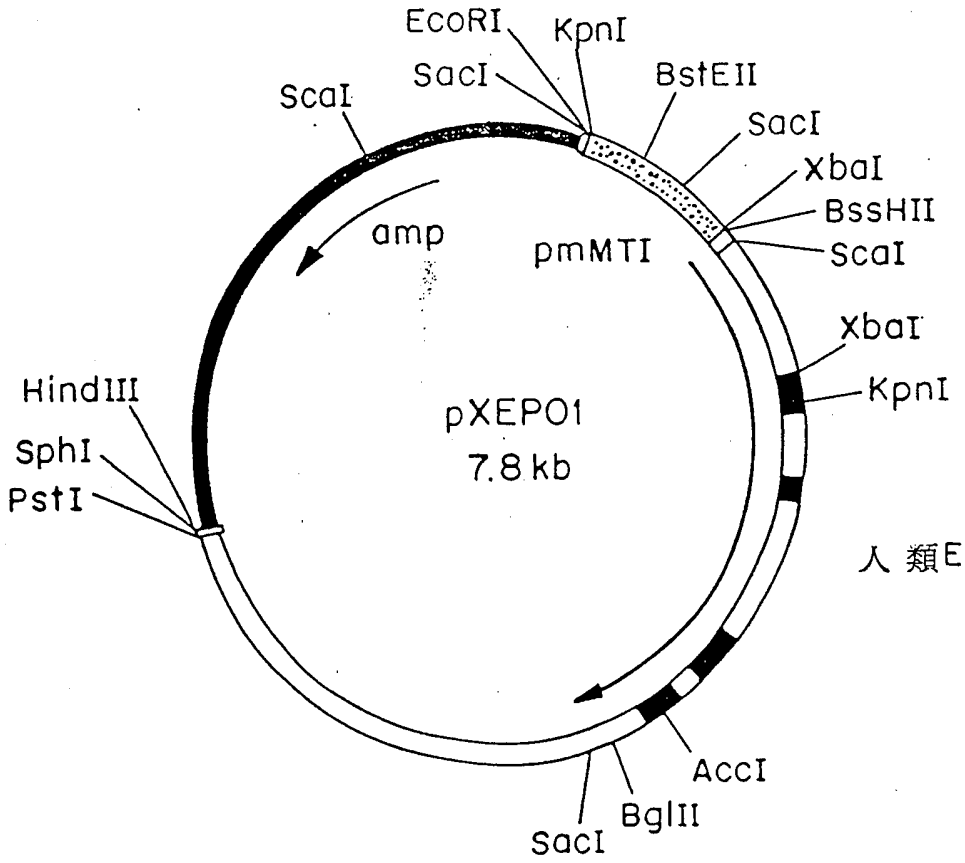
修正
年 月 日
88. 2. 05補充



第 2 圖

402639

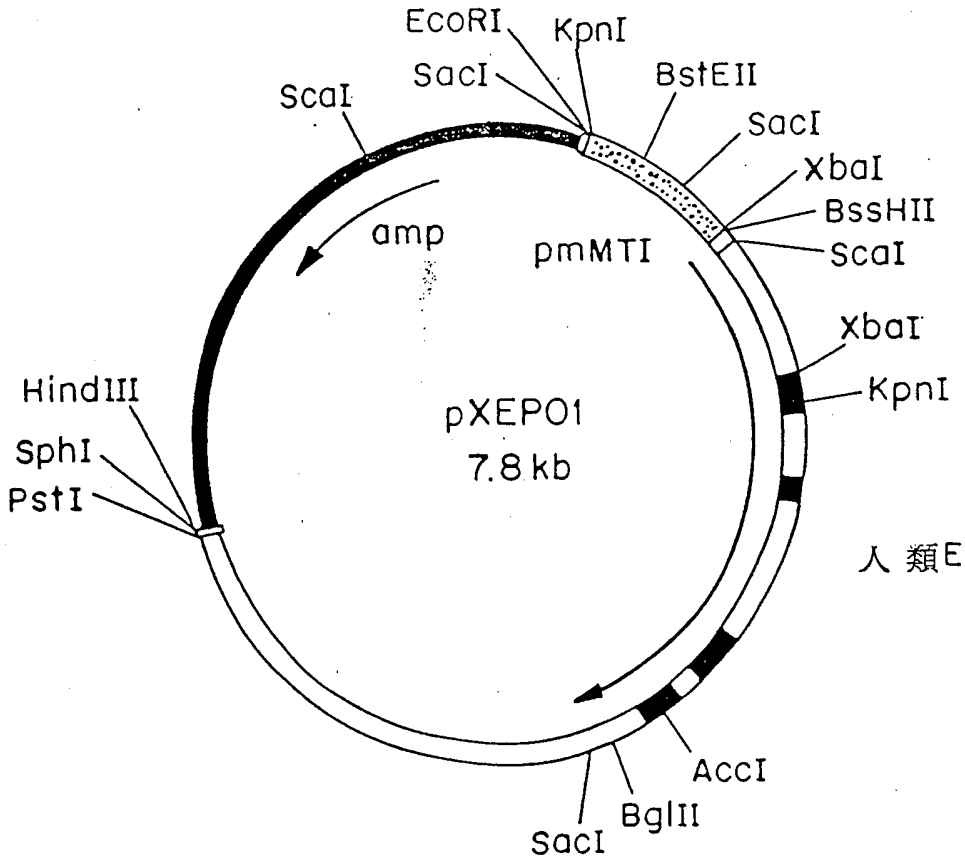
年 月 日 修正 補充
88. 2. 05



第 3 圖

402639

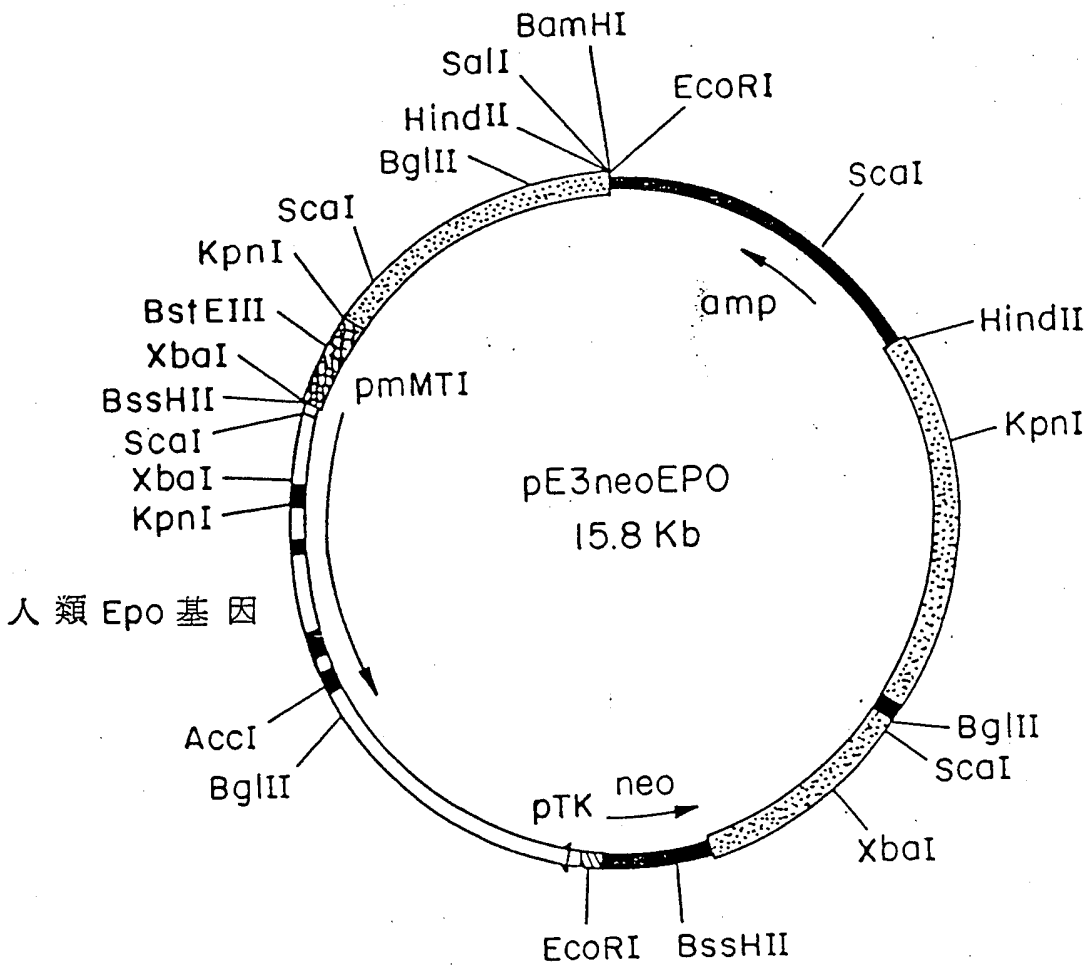
年 月 日 修正 補充
88. 2. 05



第 3 圖

402639

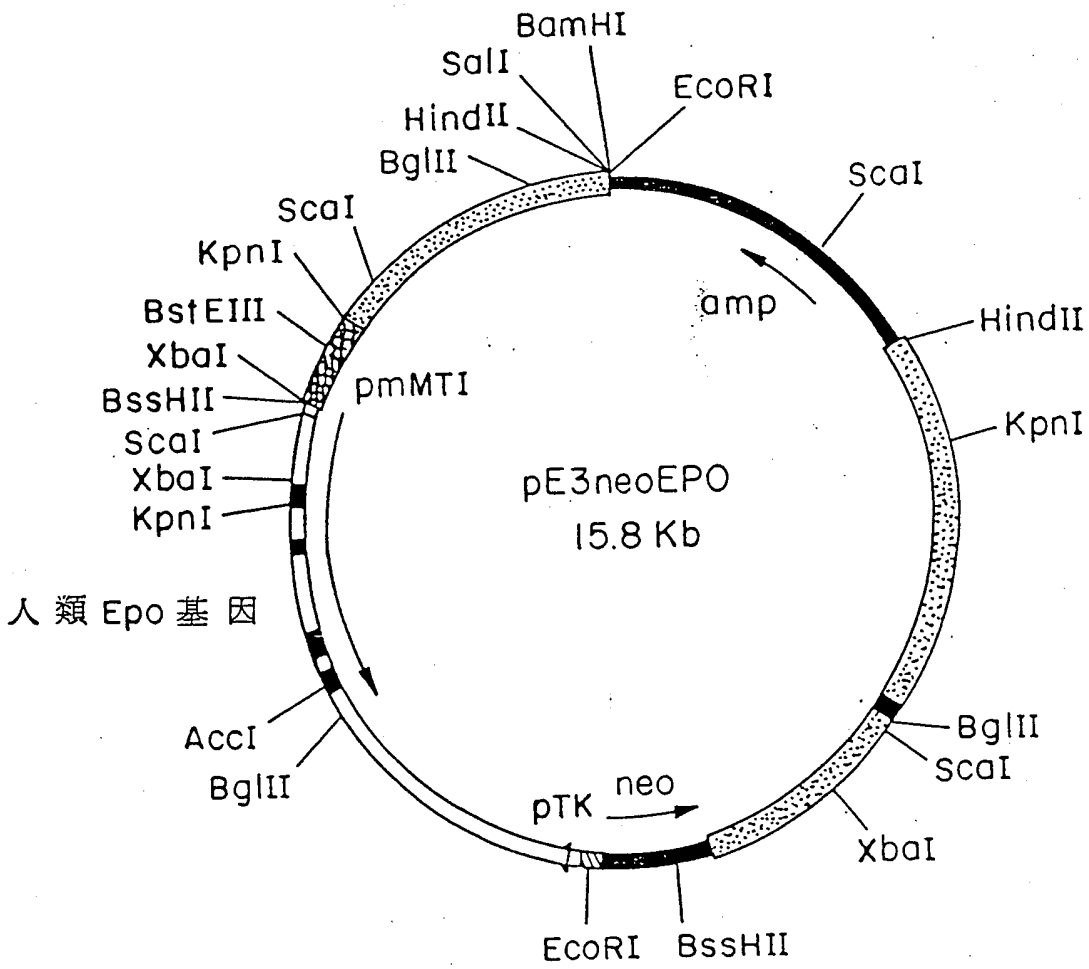
修正
年 月 日 補充
88. 2. 05



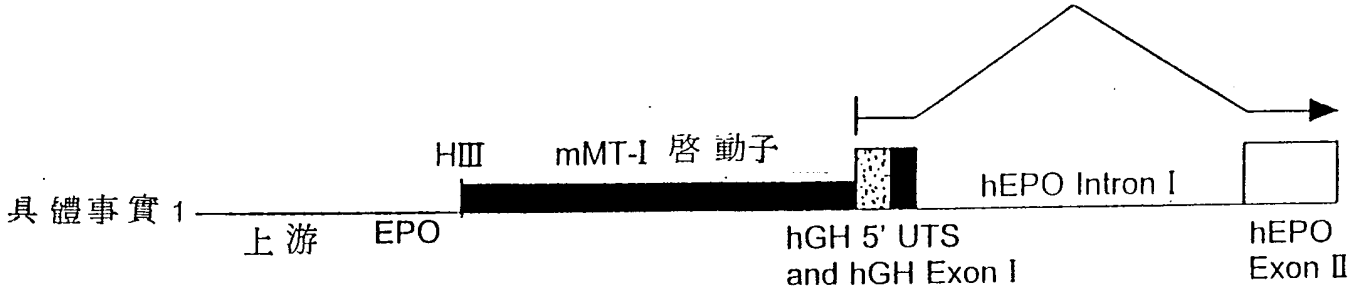
第 4 圖

402639

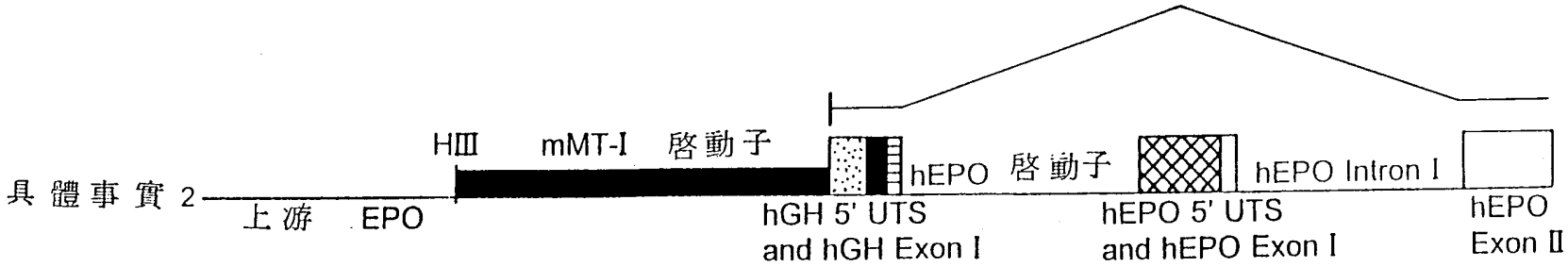
修正
年 月 日 補充
88. 2. 05



第 4 圖

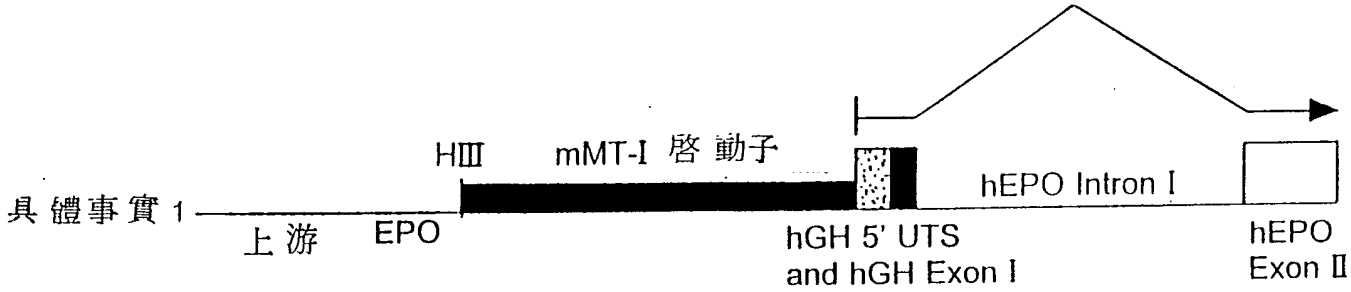


第 5 圖

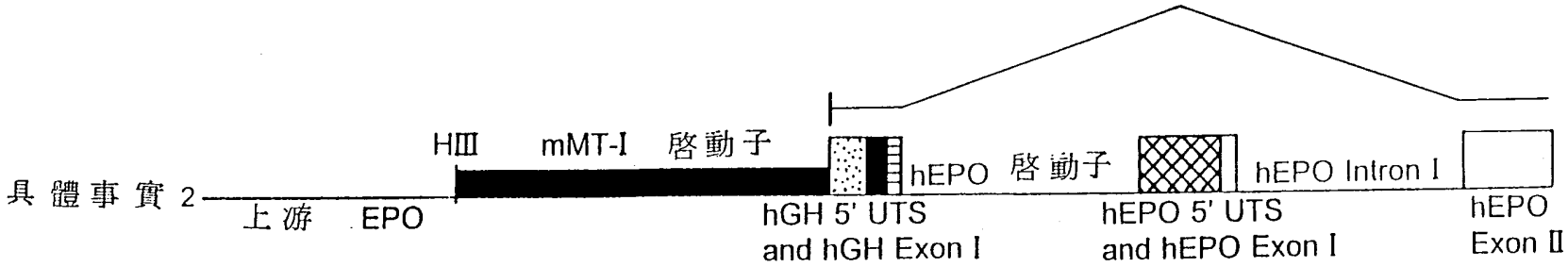


第 6 圖

修正補充
年 月 日
88. 2. 05



第 5 圖

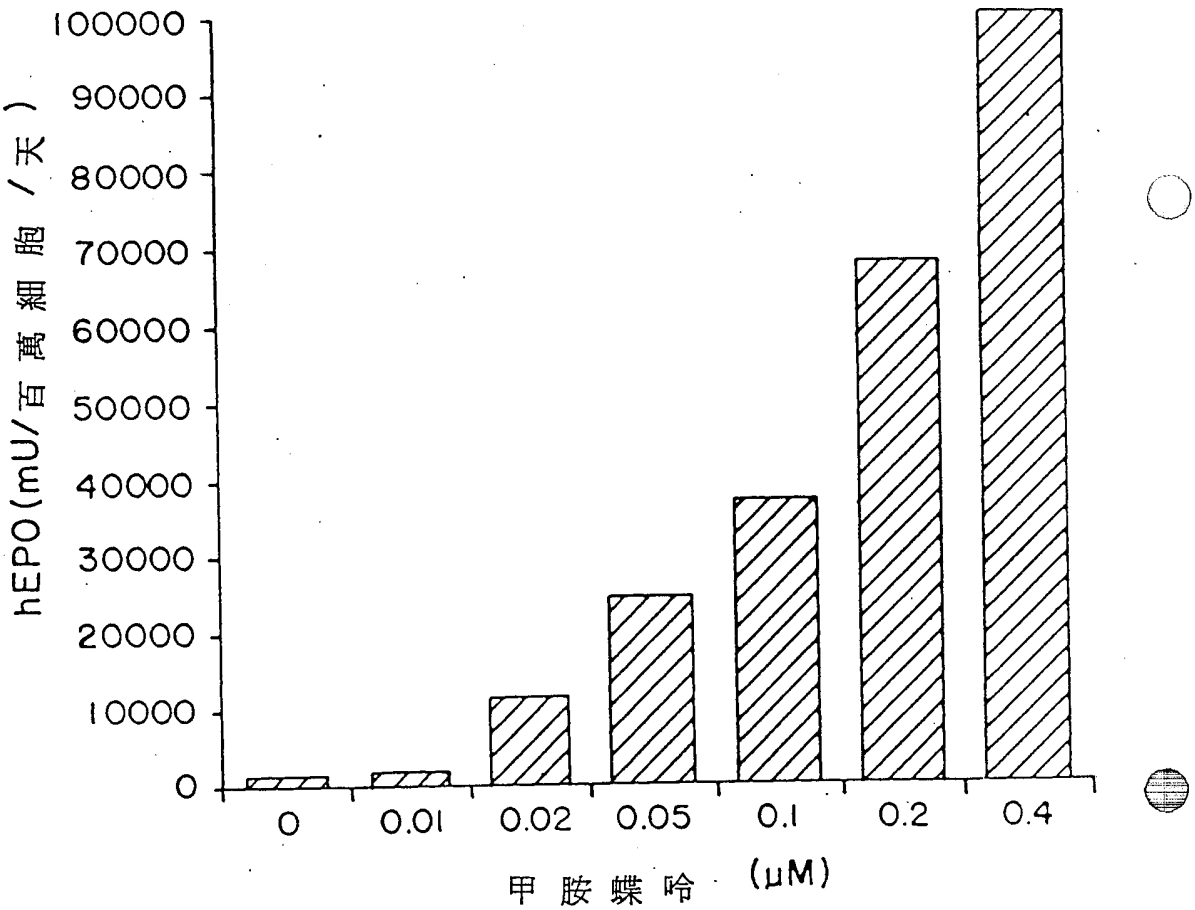


第 6 圖

修正補充
年 月 日
88. 2. 05

年 月 日 修正 補充
88. 2. 05

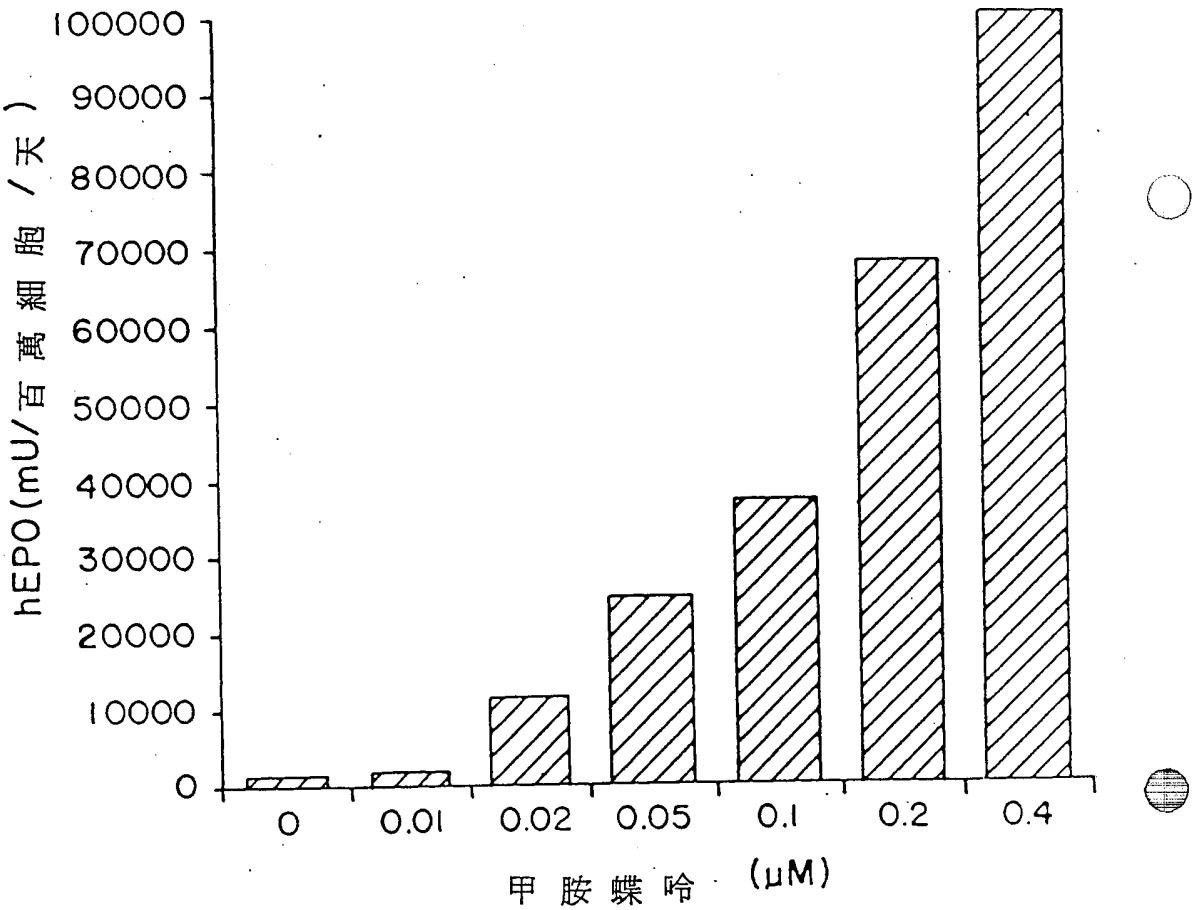
於MTX篩選下之破尋標HT*1080*細胞系*52*中EPO產量



第 7 圖

年 月 日 修正 補充
88. 2. 05

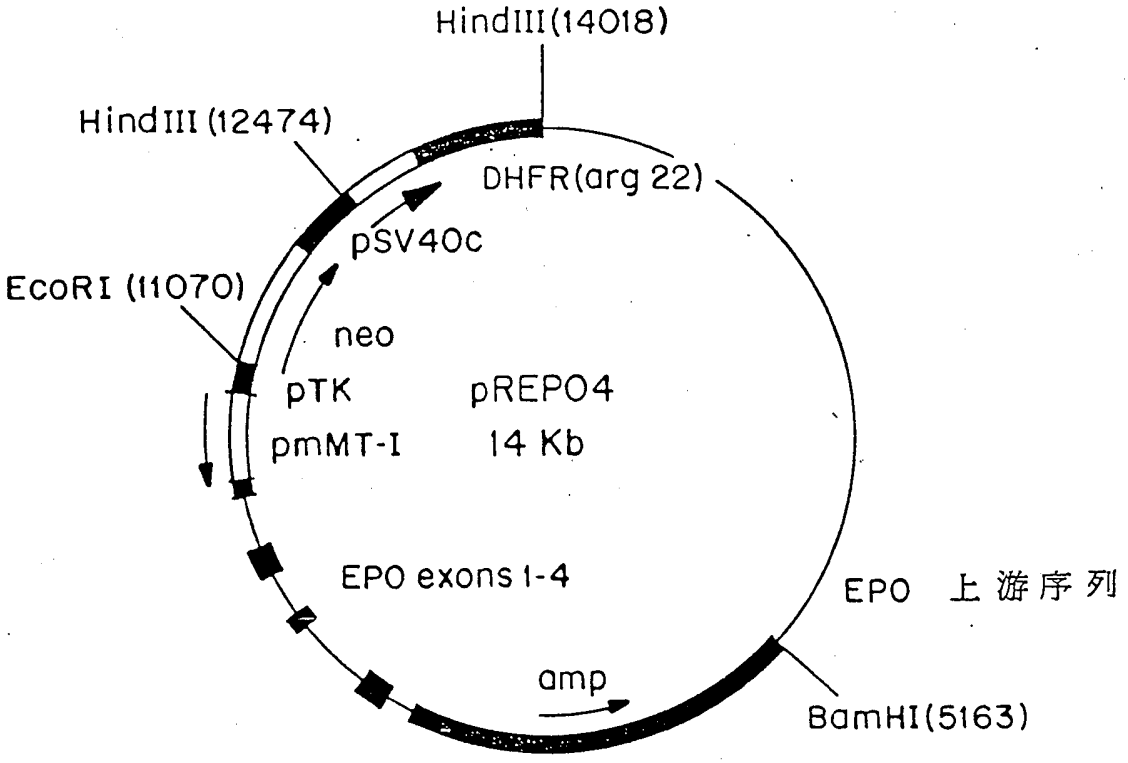
於MTX篩選下之破尋標HT*1080*細胞系*52*中EPO產量



第 7 圖

402639

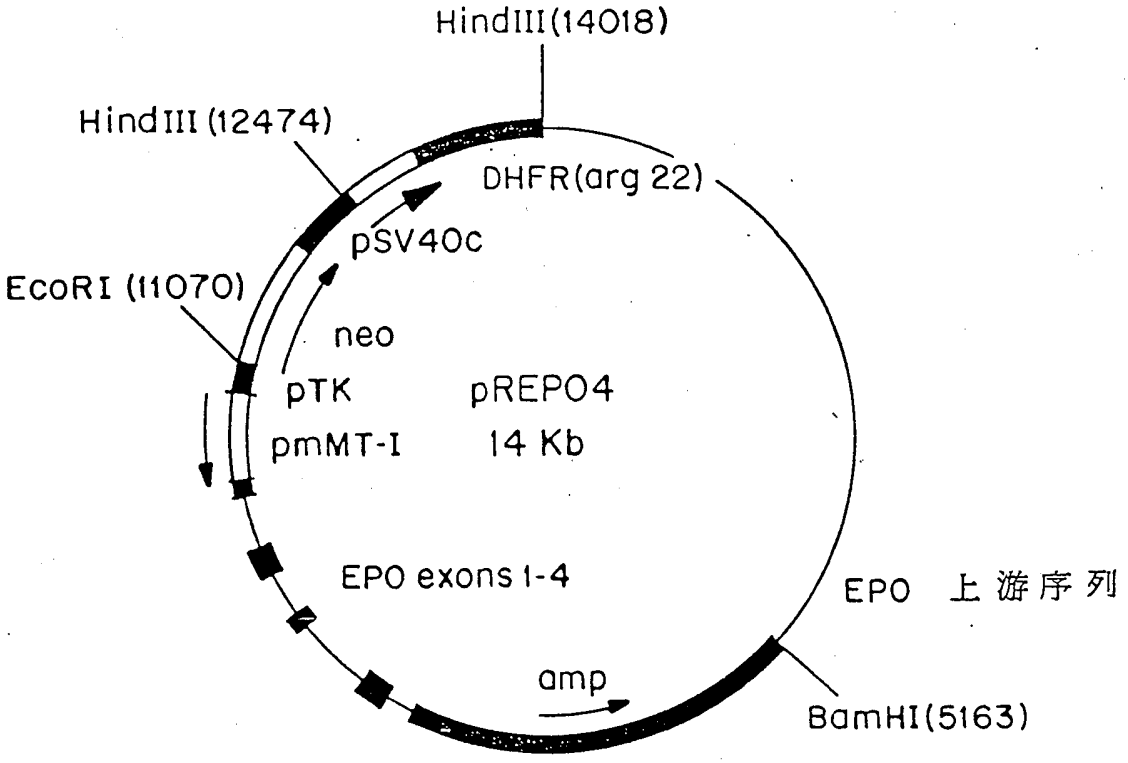
年 月 日 修正
88. 2. 05 補充



第 8 圖

402639

年 月 日 修正
88. 2. 05 補充



第 8 圖