

403786

公告本

申請日期	84.7.27
案 號	84107771
類 別	C12P 21/02

年 月 日	修正 88.6.10 補充
-------	------------------

86.5.-5

修正本

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

403786

一、發明 名稱	中 文	重組人類血清白蛋白之製法
	英 文	PROCESS FOR PRODUCING RECOMBINANT HUMAN SERUM ALBUMIN
二、發明 創作人	姓 名	(1)應 田 豐 雄 (2)大 谷 渡 (3)大 屋 智 資 (4)桑 江 忍 (5)友 光 賢 治 (6)小 林 薰 (7)大 村 孝 男
	國 籍	日 本
三、申請人	住、居所	(1)日本國大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1號 株式會社ミドリ十字中央研究所內 (2)同(1) (3)同(1) (4)同(1) (5)同(1) (6)同(1) (7)同(1)
	姓 名 (名稱)	吉富製藥股份有限公司 (吉富製藥株式会社)
三、申請人	國 籍	日 本
	住、居所 (事務所)	日本國大阪市中心區平野町二丁目6番9號
三、申請人	代 表 人 姓 名	鎌倉昭雄

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

403786

公告本

86.5.-5

修正本

申請日期	84.7.27
案 號	84107771
類 別	C12P 2/02

年 月 日	修正 88.6.10 補充
-------	------------------

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

403786

一、發明 名稱	中 文	重組人類血清白蛋白之製法
	英 文	PROCESS FOR PRODUCING RECOMBINANT HUMAN SERUM ALBUMIN
二、發明 創作人	姓 名	(1)應 田 豐 雄 (2)大 谷 渡 (3)大 屋 智 資 (4)桑 江 忍 (5)友 光 賢 治 (6)小 林 薫 (7)大 村 孝 男
	國 籍	日 本
	住、居所	(1)日本國大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1號 株式會社ミドリ十字中央研究所內 (2)同(1) (3)同(1) (4)同(1) (5)同(1) (6)同(1) (7)同(1)
三、申請人	姓 名 (名稱)	吉富製藥股份有限公司 (吉富製藥株式会社)
	國 籍	日 本
	住、居所 (事務所)	日本國大阪市中心區平野町二丁目6番9號
	代 表 人 姓 名	鎌倉昭雄

裝

訂

線

403786

(由本局填寫)

承辦人代碼：

大 類：

I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

日 本 國 (地 區) 申請專利，申請日期：1994-5-18 案號：6-103994 ， ☐ 有 ☒ 無主張優先權

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

1. 食品工業發展
研究所

1995-3-1

CCRC 940067

2. 食品工業發展
研究所

1995-2-14

CCRC 920002

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

發明領域

本發明係經由培養利用基因操縱處理技術轉形之寄主而生產重組人類血清白蛋白(後文稱為"HSA")之方法之改良。

發明背景

HSA為血漿蛋白質之一種主要成分，用於大出血、休克、燒傷、低蛋白血症、胎兒紅血球母細胞瘤病等治療用之醫藥製劑。

目前，HSA主要呈採集血液之部份產物生產。但此種生產方法有經濟缺點，且血液的供應量不足。此外，血液本身也有問題，血液經常含有不期望的物質，如肝炎病毒。

欲解決此得問題，嘗試經由發酵其中引進HSA基因之微生物，因而利用進來開發的重組DNA技術生產HSA。但此種DNA技術，就工業大量生產HSA方面而言，無法獲得滿意的結果。

因此，眾人注意力集中在以低成本大量生產重組HSA之工業方法。

發明之概述

本發明之目的係利用基因工程技術，提高重組HSA製法之生產力，特別藉單純改變HSA-生產寄主之培養條件進行大規模HSA之生產方法。

欲解決前述問題進行徹底調查研究結果，發明人發現當藉基因操縱處理技術製備的HSA-生產寄主於含胺基酸之培養基中培養時，可提高HSA之生產力。

如此，本發明係關於一種生產重組HSA之方法，包括於

五、發明說明(2)

含胺基酸之培養基中培養藉基因操縱技術製備的HSA-生產寄主。特別，本發明係關於一種生產重組HSA之方法，包括：(1)製備培養基含有至少一種選自下列之胺基酸、丙胺酸(後文稱為"Ala")、天冬胺酸(後文稱為"Asp")、精胺酸(後文稱為"Arg")、半胱胺酸(後文稱為"Cys")、麩胺酸(後文稱為"Glu")、組胺酸(後文稱為"His")、異白胺酸(後文稱為"Ile")、苯基丙胺酸(後文稱為"Phe")、絲胺酸(後文稱為"Ser")、色胺酸(後文稱為"Trp")及纈胺酸(後文稱為"Val")，及(2)於該培養基中培養HSA-生產寄主。

本發明之另一具體例中，培養基含有至少一種選自Ala、Asp、Glu、His、Ser、Phe、Trp及Val之胺基酸。

本發明之又一具體例中，培養基含有至少一種選自Ala、Asp、His、Ser、Trp及Val之胺基酸。

本發明之又一具體例中，培養基含有至少一種選自Ala、Arg、His、Phe、Ser、Trp及Val之胺基酸。

本發明之另一具體例中，培養基含有His。

培養基含有數量由0.08至20w/v%之如前述培養基中所述的胺基酸。

此外，HSA-生產寄主可為酵母種株。

圖式之簡單說明

第1圖顯示表現媒傳者pH0059之營構計劃。

發明之詳細說明

本發明使用之HSA-生產寄主並無特殊限制，但唯藉基因操縱處理技術製備之細胞寄主。任何公開報告中揭示之寄

五、發明說明(3)

主，及未來將開發之寄主皆可使用。寄主之說明例包含生物(大腸桿菌、酵母種株，枯草桿菌等)及動物細胞，其已經利用基因操縱處理技術，轉成HSA-生產細胞。根據本發明，希望使用酵母種株作為寄主，特別屬於酵母菌屬，如啤酒酵母，比奇菌屬(*Pichia*)如巴斯多比奇菌(*Pichia pastoris*)，克維羅菌(*Kluyveromyces*)屬如乳克維羅菌(*Kluyveromyces lactis*)或漢森努拉(*Hansenula*)菌屬如多形漢森努拉菌(*Hansenula polymorpha*)。也可使用營養缺陷種株或抗生素易感性種株。其特例包含G418易感性種株如啤酒酵母 AH22(a, his4, leu2, can1)，巴斯多比奇菌 GTS115(his4)及乳克維羅菌 MW98-8c(α , uraA, arg, lysk⁺, pKD1^o)。較佳使用巴斯多比奇菌，特別巴斯多比奇菌 GTS 115。

HSA-生產寄主之製備，經由培養及由培養膠中分離及回收HSA之HSA之生產，皆係根據已知方法進行，但可略為修改。例如HSA-生產寄主(或HSA生產性種株)之製備可使用天然人類血清白蛋白基因之方法進行(JP-A-58-56684對應於EP-A-73646，JP-A-58-90515對應於EP-A-79739及JP-A-58-150517對應於EP-A-91527)，使用改質人類血清白蛋白基因之方法(JP-A-62-29985及JP-A-1-98486對應於EP-A-206733)，使用合成信號序列之方法(JP-A-1-240191對應於EP-A-329127)，使用血清白蛋白信號序列之方法(JP-A-2-167095對應於EP-A-319641)，重組質體引進染色體之方法(JP-A-3-72889對應於EP-A-399455)，寄主融合之方法(

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(4)

JP-A-3-53877對應於EP-A-409156)，於含甲醇之培養基中產生突變之方法，使用突變的 AOX_2 啟動基因之方法(EP-A-506040)，於枯草桿菌表現HSA之方法(JP-A-62-215393對應於EP-A-229712)，於酵母表現HSA之方法(JP-A-60-41487對應於EP-A-123544，JP-A-63-39576對應於EP-A-248657及JP-A-63-74493對應於EP-A-251744)及於比奇菌表現HSA之方法(JP-A-2-104290對應於EP-A-344459)。(此處使用"JP-A"一詞表示"日本特許公開案")。

此等方法中，於含甲醇之培養基誘生突變之方法係以下述方式進行。

適當寄主，較佳為比奇酵母菌例如種株GTS115(NRRL寄存編號Y-15851)，之轉形株係以尋常方式經由將質體(含轉錄單位，藉該轉錄單位HSA於 AOX_1 啟動基因控制下表現)引進寄主之 AOX_1 之基因區(參考JP-A-2-104290)而獲得，此種轉形株幾乎無法於含甲醇之培養基生長。結果，此種轉形株於含甲醇培養基上培養時產生突變，及該可於培養基內生長的種株被分離出。培養基之甲醇濃度例如於0.0001至5%之範圍。培養基可為合成或天然培養基。培養例如於15至40℃溫度進行1至1,000小時。

HSA-生產寄主之培養(亦即HSA之製法)可藉下列方法進行：前述專利案揭示之各種方法，其中生產者，細胞及產物係藉分批進料培養，而以高濃度獲得之方法，該方法係逐漸供應適當小量高濃度葡萄糖溶液，以避免高濃度酶基質對生產者細胞產生抑制作用而進行(JP-A-3-83595)，其

五、發明說明(5)

中HSA生產力係藉添加脂肪酸至培養基而改良之方法(JP-A-4-293495對應於EP-A-504823及美國專利案5,334,512)或其中HSA之著色係藉於二胺類等存在下培養寄主而抑制之方法(JP-A-5-260986對應於EP-A-591605及美國專利案5,369,020)。

本發明之生產方法使用的培養基為含胺基酸培養基，特別含有至少一種選自下列之胺基酸之培養基：中性胺基酸如甘胺酸(後文稱為"Gly")，Ala、Ser、Val，白胺酸(後文稱為"Leu")Ile、Cys、Phe、Trp或脯胺酸(後文稱為"Pro")酸性胺基酸如Asp或Glu，及鹼性胺基酸如Arg或His。用於培養HSA生產性寄主時，可顯著增高HSA生產力之培養基範例為含有至少一種選自Ala、Arg、Asp、Glu、Gly、His、Phe、Ser、Trp、Cys、Ile及Val之胺基酸之培養基，較佳含有至少一種選自Ala、Asp、Glu、His、Phe、Ser、Trp及Val之胺基酸之培養基，更佳含有至少一種選自Ala、Asp、His、Ser、Trp及Val之胺基酸之培養基。他方面，與不含胺基酸之培養基相較，含有至少一種選自Ala、Arg、His、Ser、Trp、Phe及Val之胺基酸之培養基當用於培養寄主時，可有效生產大量HSA而不會使HSA-生產寄主本身生長。可生產大量HSA而不會使寄主細胞本身明顯生長者，於表現系統中HSA分泌入培養上清液之場合特別優異，其原因為培養上清液對培養醪(培養基)數量之比變大，故可以較高產率回收HSA。

含His之培養基為供本發明使用之特佳培養基。此種培

五、發明說明(6)

養基用於改良HSA之生產力特別良好，原因為其可顯著提高HSA之生產產率，而不影響HSA-生產寄主本身的生長。

本發明使用之培養基可單獨含有前述胺基酸，或呈兩種或兩種以上胺基酸之混合物。

培養基之胺基酸含量例如可於0.08至20w/v%，較佳0.1至1w/v%之範圍。

本發明使用之培養基之其它成分並無特殊限制，但培養基必須至少含有一種前述胺基酸。其它成分之範例為此種領域一般使用之已知培養基所含成分。概略而言，使用多種糖類作為碳源，使用尿素、銨鹽、硝酸鹽等作為氮源，及使用各種維生素，核苷酸等作為微量營養素，以及無機鹽類如Mg、Ca、Fe、Na、K、Mn、Co、Cu等。

有用的培養基之說明例包含YNB液態培養基(0.7%酵母氮碱基不含胺基酸(Difco製造)及2%葡萄糖)，MeOH-乙酸銨培養基(組成：參見實例)，YPD液態培養基(1%酵母萃取物(Difco)，2%巴克多-蛋白胨(Bacto-peptone)(Difco)及2%葡萄糖)等。當HSA生產性寄主為甲醇同化種株時，可使用含甲醇之培養基。該種例中，甲醇濃度約於0.01至5%之範圍。

換言之，本發明使用之培養基容易經由將前述胺基酸加至已知培養基製備。

培養基之pH可為中性，弱鹼性或弱酸性。較佳，培養基具有pH值由約5.7至6.5。

培養條件可以尋常方式選擇。

五、發明說明(7)

培養溫度例如通常由約15至43℃之範圍。當寄主為細菌時，係於由20至37℃之範圍。當寄主為酵母菌時，係於約20至30℃之範圍。特別，酵母菌寄主可一般於21至29℃，較佳21至28℃，更佳23至28℃，最佳25至27℃之溫度培養。培養期約由1至1000小時。

希望使用例如前述YNB或YPD液態培養基進行主培養前進行種子培養。較佳，種子培養例如於酵母種株之例於約30℃，或於細菌種株之例於約37℃，進行約10至100小時。前述胺基酸也可用於種子培養。

培養完成後，藉常用分離及純化手段，由培養上清液(濾液)或細胞收集HSA。此等手段之說明例包含一種方法，其中培養上清液(濾液)以超濾、熱處理、酸處理及超濾之順序，隨後，使用陽離子交換劑、疏水層析及陰離子交換劑進行個別處理而純化之方法(JP-A-5-317079對應於EP-A-570916)，及其中HSA藉螯合劑樹脂處理脫色之方法(JP-A-5-328991對應於EP-A-570916)。

提供下列實例供進一步舉例說明本發明，但絕非意圖局限本發明之範圍。

實例 1(1) 使用種株之製備

根據JP-A-2-104290之方法經由使用質體pPGP1(含有轉錄單位，藉此轉錄單位可於AOX₁啟動基因控制之下表現HSA之經Not I-消化片段取代巴斯多比奇菌 GTS115(his4)之AOX₁基因區，獲得巴斯多比奇菌種株PC 4130。由於不

五、發明說明(8)

存在有 AOX₁ 基因，此種種株於含有甲醇作碳源之培養基上，生長的能力減低(甲醇同化陰性種株；後文稱為 "Mut⁻" 種株)。

種株 PC 4130 接種於 3ml YPD 培養基 (1% 酵母萃取物，2% 巴克多蛋白胨及 2% 葡萄糖)。培養 24 小時後，細胞接種於 50ml YPD 培養基，而將細胞密度調整為初濁度 OD₅₄₀ 0.10 於 30℃ 培養 3 日後，所得細胞再度以初細胞濁度為 OD₅₄₀ = 0.1 接種於 50ml YPD 培養基。隨後，每隔 3 日以相同方式進行次培養。各次培養後，細胞於無菌水稀釋，並以 10⁷ 細胞/平板之接種量倒至 2% MeOH-YNBw/oa.a. 平板 (不含胺基酸之 0.7% 酵母氮鹼基，2% 甲醇及 1.5% 瓊脂粉) 上，接著於 30℃ 培養 5 日，以判定是否存在有群落。連續次培養 12 日後，於 2% MeOH-YNBw/oa.a. 平板上發現 20 個群落，Mut⁻ 種株幾乎無法於 2% MeOH-YNBw/oa.a. 培養基上生長，而 Mut⁺ 種株 (甲醇同化陽性種株) 則生長良好。亦即，存在有群落表示種株獲得甲醇同化能力增高，如此獲得 Mut⁺ 種株。如此所得群落之一使用無菌水適當稀釋，並展布於 2% MeOH-YNBw/oa.a. 平板上，而分離單一群落。所得單一群落之一定名為 SHG 4105-4 巴斯多比奇菌 SHG 4105-4，1995 年 1 月 13 日以存取編號 920002 寄存於台灣食品工業研究所。

所得突變株 SHG 4105-4 之 AOX₂ 啟動基因利用 PCR 方法選殖。亦即，PCR 係使用於 5' 端具有 BamHI 位置之 DNA 片段 (5'-CCGGATCCACTAAGCGAGTCATCATC-3') 作為正股引子，及使用於 5'-端具有 EcoRI 位置之下列 DNA 片段作為反股引子

裝

訂

五、發明說明(9)

: 5'-CCGAATTCGACAATATTCTTTGATGC-3', 而使用突變種株 SHG4105-4染色體 DNA進行。

如所述擴大的 AOX₂啟動基因片段選殖入 pUC19之 BamHI/EcoRI位置。

然後, 測定於選殖載體之 AOX₂啟動基因片段之核苷酸序列。由種株 SHG4105-4分離之 AOX₂啟動基因中, 天然 AOX₂啟動基因之開始密碼子上游第 255 鹼基 (YEAST, 5, 167-177, 1988; Mol. Cell Biol., 9, 1316-1323, 1989) 由 T 改成 C。

營構可於選殖突變株 AOX₂啟動基因控制下, 表現 HSA 的載體。首先, 於突變株 AOX₂啟動基因 5'端之 BamHI 位置轉成 EcoRI 位置, 及使用 EcoRI-SspI 分離突變之 AOX₂啟動基因片段。然後, 於 HSA 表現載體 pMM041 (EP-A-506040) 之天然 AOX₂啟動基因, 以突變 AOX₂啟動基因替代, 獲得可於突變之 AOX₂啟動基因控制下表現 HSA 的載體 pH0059 (點突變) (第 1 圖)。質體 pMM041 於 1995 年 1 月 13 日以存取編號 940067 託存於台灣食品工業研究所。

營構妥之 HSA 表現載體 pH0059 以 StuI 消化而調整至 1 μ g/ μ l, 然後整合至寄主 巴斯多比奇菌 GTS 115 之 HIS4 區, 及使用鹼化酵母菌轉形套件組 (Bio 101) 及乙酸鋰方法製備轉形株 GTS115/pH0059。

(2) 培養基組成

YPD 培養基 (2% 巴克多-蛋白朊, 1% 酵母萃取物及 2% 葡萄糖) 用於種籽培養。表 1 所示之 MeOH-乙酸鉍培養基用於主

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(10)

培養。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(11)

表 1

MeOH-乙酸鉍培養基組成

成 分	濃 度 (mg/l)
甲 醇	40ml
甘 油	1,000
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	5,000
KH_2PO_4	10,000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100
KCl	2,000
NaCl	100
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100
生 物 素	0.1
維 生 素 B_1	10
維 生 素 B_6	1
泛 酸 鈉	10
肌 糖 醇	50

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(12)

(3) 培養方法

i) 種子培養

凍乾廢料小瓶所含1份1ml種株接種於含50ml YPD培養基之300ml有擋板錐形瓶，並於30℃振搖培養24小時。

ii) 主培養

1份1ml種子培養基接種於300ml有擋板錐形瓶，瓶內含有50ml MeOH-乙酸銨培養基，且補充各種胺基酸，獲得終濃度0.1%，並調整至pH6.0，及於30℃振搖培養89小時。

參考例 1

細胞密度之測量

於實例1 (3) ii)進行之主培養過程中，以選擇性間隔採樣培養醪，如此收集之樣品個別以蒸餾水稀釋，於測量時獲得OD₅₄₀值為0.3或以下，然後使用分光光度計(UV200，Shimadzu Corp.製造)測量於540nm之稀釋樣品吸光率。

參考例 2

rHSA生產力之評估

培養完成後，整份培養醪回收，並接受3000rpm離心20分鐘。所得上清液通過MILLEX-HV(Millipore Corp.; 0.45 μ m)過濾，15ml濾液使用Amicon Centriprep 10(分子量截留10,000，Amicon Corp.製造)離心約20倍(4℃，3000rpm，約6小時)，然後於下述條件下，接受HPLC凝膠過濾分析，評估HSA生產力。

柱：TSK凝膠G3000SWx₁(Tosoh Corp.)

動相：0.3M NaCl，50mM磷酸鈉，0.1% NaN₃，pH6.5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(13)

流速 : 0.7ml/min

注入 : 50 μ l

檢測 : A_{280} , A_{350} (雙重波長)

參考例 3

生產的 HSA 著色程度之評估

使用對 HSA 生產力評估，進行 HPLC 凝膠過濾分析結果，計算 A_{350}/A_{280} 值，此等值用於評估本發明方法生產之 HSA 之著色程度。

試驗例 1

檢視培養基所含各種胺基酸之效果。培養基之胺基酸含量固定於 0.1w/v%。其它條件包含培養條件述於實例 1。結果示於表 2 至 4。基於未添加胺基酸之例作為 100%，分別顯示 HSA 之生產力，細胞數量及著色程度。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(14)

表 2

胺基酸及其它成分	產率(%)	細胞產率(%)	著色程度(%)
對 照	100	100	100
酵 母 萃 取 物	157	118	127
蛋 白 胰	122	120	122
Gly	127	123	145
Ala	220	99	112
Asp	258	111	135
Arg	132	98	125
Glu	173	109	145
His	410	76	96
Ile	144	105	118
Lys	42	83	104
Met	28	24	124

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(15)

表 3

胺基酸及其它成分		細胞產率	著色程度
		產率(%)	(%)
對	照		
		100	100
His		439	65
Lys		21	44
Ala		146	103
Asp		221	107
Trp		238	91
Val		235	87
Leu		117	102
Ser		200	91
Thr		105	103
Asn		119	121
Gln		78	113
Pro		114	115
泛酸鈣		72	106

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(16)

表 4

胺 基 酸	產 率 (%)	細 胞 產 率 (%)	著 色 程 度 (%)
對 照	100%	100%	100%
Phe	165	89	112
Cys	134	98	161

試驗例 2

檢查培養基中各種胺基酸濃度(0.01至1w/v%)之作用。組胺酸(His)用作胺基酸。其它條件含培養條件係如實例1所述。結果示於表5。

表 5

胺 基 酸	濃 度 % (w/v)	產 率 (%)	細 胞 產 率 (%)	著 色 程 度 (%)
對 照		100	100	100
His	0.1	326	82	112
His	0.2	214	67	88
His	0.3	188	86	71
His	0.4	185	89	71
His	0.6	159	71	76
His	1.0	133	85	71

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(17)

由前述試驗結果顯然易知，當HSA-生產寄主於含胺基酸，特別Ala、Asp、Glu、His、Phe、Trp、Val或Ser之培養基中培養時，HSA產率顯著增高。當與不含胺基酸之培養系統比較時，發現含有Ala、His、Phe、Trp、Val或Ser之培養基，或含有Arg或Cys培養基之提高HSA產率之作用，並非因細胞產率增高所致。

根據本發明，經由基因操縱處理技術製備的HSA-生產寄主產生HSA之產率。可使用下述方法提高，該方法可單純經由改變培養條件容易以相當低成本進行。特別，當使用含有至少一種選自Ala、Asp、Glu、His、Phe、Trp、Val及Ser之胺基酸之培養基培養時，HSA產率與未補充胺基酸培養之例相較，可提高1.5至5倍。此外，根據使用補充至少一種選自Ala、His、Phe、Trp、Val、Ser、Arg及Cys之胺基酸之培養基之方法，HSA產率可提高1.3至5倍，而不影響細胞生長。此種效果於含His之培養基特別顯著。又即使使用相對小量胺基酸含量0.08至1w/v%，也可獲得HSA生產力提高之效果。

此外，若干前述胺基酸可減少生產HSA之著色。

基於此等效果，本發明之HSA生產方法可視為具有實際用途。

雖然已經參照特定具體例詳細說明本發明，但業界人士可於未悖離其精髓及範圍下做出多種變化與修改。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱： 重組人類血清白蛋白之製法)

揭示一種生產重組人類血清白蛋白之方法，包括培養人類血清白蛋白-生產寄主，該寄主係藉基因操縱處理技術於培養基製造，該培養基含有一種胺基酸，較佳至少一種選自甘胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、組胺酸、絲胺酸、色胺酸、纈胺酸、異白胺酸、苯基丙胺酸、半胱胺酸及精胺酸之胺基酸，更佳為組胺酸。該方法可比已知方法顯著提高人類血清白蛋白產率。

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

A process for producing recombinant human serum albumin is disclosed, which comprises culturing a human serum albumin-producing host, prepared by gene manipulation techniques in a medium that contains an amino acid, preferably at least one amino acid selected from the group consisting of alanine, aspartic acid, glutamic acid, histidine, serine, tryptophan, valine, isoleucine, phenylalanine, cysteine and arginine, more preferably histidine. The process can significantly increase the yield of human serum albumin over that produced by known processes.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

公 告 本

1. 一種生產重組人類血清白蛋白之方法，包括於含胺基酸之培養基中培養人類血清白蛋白-生產酵母菌，其中該培養基含有至少一種選自丙胺酸、天冬胺酸、精胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、組胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸、絲胺酸、色胺酸、纈胺酸所組成族群中之胺基酸，且其量為0.08-20w/v%，

其中該酵母菌為酵母菌屬 (*Saccharomyces*)，比奇菌屬 (*Pichia*)及漢森努拉菌屬 (*Hansenula*)中之一員，並被一質體轉形，該質體包含(1)在酵母內能作用之啟動基因，(2)可使從寄主細胞分泌出之信號序列，(3)成熟化之編碼人類血清白蛋白之核酸序列，(4)轉錄終止序列及(5)同源於一部分寄主細胞序列之序列。

2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該胺基酸之量為0.1-1.0w/v%。

3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中除了申請專利範圍第1項所指定之胺基酸外，沒有其他胺基酸存在於培養基中。

4. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之方法，其中該培養基含有組胺酸。

5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中酵母菌屬之一員為啤酒酵母 *AH₂₂* (*Saccharomyces cerevisiae* *AH₂₂*)。

6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中比奇菌屬之一員為巴斯多比其菌 *GTS* (*Pichia pastoris* *GTS 115*)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

後面

1. 一種生產重組人類血清白蛋白之方法，包括於含胺基酸之培養基中培養人類血清白蛋白-生產酵母菌，其中該培養基含有至少一種選自丙胺酸、天冬胺酸、精胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、組胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸、絲胺酸、色胺酸、纈胺酸所組成族群中之胺基酸，且其量為0.08-20w/v%。

2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該胺基酸之量為0.1-1.0w/v%。

3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中除了申請專利範圍第1項所指定之胺基酸外，沒有其他胺基酸存在於培養基中。

4. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之方法，其中該培養基含有組胺酸。

5. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之方法，其中該酵母菌為酵母菌屬 (Saccharomyces)，比奇菌屬 (Pichia)及漢森努拉菌屬 (Hansenula)中之一員。

6. 如申請專利範圍第5項之方法，其中酵母菌屬之一員為啤酒酵母 AH₂₂ (Saccharomyces cerevisiae AH₂₂)。

7. 如申請專利範圍第5項之方法，其中比奇菌屬之一員為巴斯多比其菌 GTS (Pichia pastoris GTS 115)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

公 告 本

1. 一種生產重組人類血清白蛋白之方法，包括於含胺基酸之培養基中培養人類血清白蛋白-生產酵母菌，其中該培養基含有至少一種選自丙胺酸、天冬胺酸、精胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、組胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸、絲胺酸、色胺酸、纈胺酸所組成族群中之胺基酸，且其量為0.08-20w/v%，

其中該酵母菌為酵母菌屬 (*Saccharomyces*)，比奇菌屬 (*Pichia*)及漢森努拉菌屬 (*Hansenula*)中之一員，並被一質體轉形，該質體包含(1)在酵母內能作用之啟動基因，(2)可使從寄主細胞分泌出之信號序列，(3)成熟化之編碼人類血清白蛋白之核酸序列，(4)轉錄終止序列及(5)同源於一部分寄主細胞序列之序列。

2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該胺基酸之量為0.1-1.0w/v%。

3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中除了申請專利範圍第1項所指定之胺基酸外，沒有其他胺基酸存在於培養基中。

4. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之方法，其中該培養基含有組胺酸。

5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中酵母菌屬之一員為啤酒酵母 *AH₂₂* (*Saccharomyces cerevisiae* *AH₂₂*)。

6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中比奇菌屬之一員為巴斯多比其菌 *GTS* (*Pichia pastoris* *GTS 115*)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

圖 1

