



(10) 授权公告号 CN 113195712 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 13

(21) 申请号 201980081292.7

(22) 申请日 2019.12.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113195712 A

(43) 申请公布日 2021.07.30

(30) 优先权数据
62/777325 2018.12.10 US
62/925516 2019.10.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.06.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/065129 2019.12.09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/123327 EN 2020.06.18

(73) 专利权人 美国安进公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 N·J·阿拉瓦尔 K·M·达里斯
J·L·斯蒂芬斯 H·T·N·黎
N·B·塔拉文

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 黄登高 黄希贵

(51) Int.Cl.
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 103360464 A, 2013.10.23
EP 3129487 A2, 2017.02.15
US 2014287513 A1, 2014.09.25
WO 2010099296 A1, 2010.09.02
Anonymous.XP_022823959.1 piggyBac
transposable element-derived protein 4-
like [Spodoptera litura].GenBank.2017,1-
3.

Anonymous.XP_013198532.1 PREDICTED:
piggyBac transposable element-derived
protein 4-like [Amyelois transitella]
.GenBank.2015,1-3.

审查员 李谦

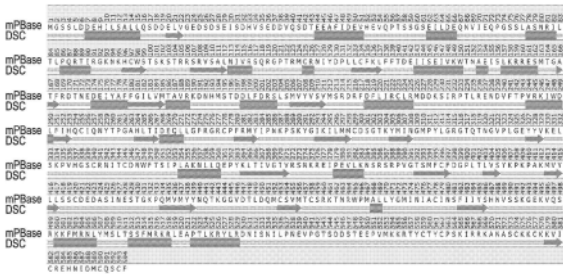
权利要求书4页 说明书65页
序列表23页 附图10页

(54) 发明名称

突变型piggyBac转座酶

(57) 摘要

披露了将PiggyBac转座酶工程化以增加在细胞中的稳定性。这些工程化piggyBac转座酶可用于稳定地转化细胞、细胞系发育、基因组修饰和改善重组蛋白的滴度以及其他用途。



1. 一种piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的247位置处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。

2. 根据权利要求1所述的piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。

3. 根据权利要求2所述的piggyBac转座酶,包含在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。

4. 根据权利要求1所述的piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。

5. 根据权利要求1所述的piggyBac转座酶,其中与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的细胞表达的相同目的蛋白的滴度相比,由用工程化piggyBac转座酶转染的细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。

6. 根据权利要求5所述的piggyBac转座酶,其中该目的重组蛋白是抗原结合蛋白。

7. 一种piggyBac转座酶,其中该piggyBac转座酶的氨基酸序列为SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16。

8. 一种工程化核酸分子,该核酸分子编码根据权利要求1或7中任一项所述的piggyBac转座酶。

9. 一种piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码。

10. 一种载体,该载体包含根据权利要求8所述的编码piggyBac转座酶的核酸分子或编码根据权利要求9所述的piggyBac转座酶的核酸分子。

11. 根据权利要求10所述的包含编码piggyBac转座酶的核酸分子的载体,该载体进一步包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列,所述至少一种核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。

12. 根据权利要求11所述的载体,其中该载体包含编码一种或多种目的蛋白的一种或多种核酸序列。

13. 一种细胞,该细胞用编码根据权利要求9所述的piggyBac转座酶的核酸序列转染。

14. 一种细胞,该细胞用根据权利要求10所述的载体转染。

15. 根据权利要求13或14所述的细胞,其中该细胞是宿主细胞。

16. 根据权利要求13或14所述的细胞,其中该细胞是CHO细胞。

17. 根据权利要求13或14所述的细胞,其中该细胞是免疫细胞。

18. 一种用根据权利要求8所述的工程化核酸分子与包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸分子的载体共转染的细胞,所述至少一种核酸分子的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。

19.一种用根据权利要求10所述的载体与包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸分子的载体共转染的细胞,所述至少一种核酸分子的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

20.一种用根据权利要求10所述的载体与包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸分子共转染的细胞,所述至少一种核酸分子的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

21.根据权利要求13、14、18、19或20中任一项所述的细胞,其中与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的细胞表达的相同目的蛋白的滴度相比,由用该工程化piggyBac转座酶转染的细胞表达的目的蛋白的滴度得到了改善。

22.一种用于改善由宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度的方法,该方法包括

工程化编码根据权利要求1所述的piggyBac转座酶的核酸分子;

用编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子与包含编码目的蛋白的核酸序列的载体共转染该宿主细胞,所述核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件;以及

对这些细胞进行培养以表达该目的重组蛋白,

其中与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由用该工程化piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。

23.根据权利要求22所述的方法,其中用包含该编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的第一载体与包含编码目的蛋白的核酸序列的第二载体转染该宿主细胞,所述核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

24.根据权利要求22所述的方法,其中用包含该编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的单个载体与编码目的蛋白的核酸序列转染该宿主细胞,所述核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

25.一种用于增加表达重组蛋白的哺乳动物细胞培养物中重组蛋白的产生的方法,该方法包括

使用宿主细胞在生物反应器中建立细胞培养物,其中该宿主细胞已经用经工程化的编码根据权利要求1所述的piggyBac转座酶的核酸分子与包含编码目的蛋白的核酸分子的载体共转染,该编码piggyBac转座酶的核酸分子,所述核酸分子的侧翼至少是piggyBac转座子的反向重复元件;以及

表达该目的重组蛋白;

其中与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由用该工程化piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。

26.根据权利要求23所述的方法,其中用包含该编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的第一载体与包含编码目的蛋白的核酸序列的第二载体转染该宿主细胞,所述核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

27.根据权利要求23所述的方法,其中用包含该编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的单个载体与编码目的蛋白的核酸序列转染该宿主细胞,所述核酸序列的侧翼至少是

piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

28.一种用于生产分离、纯化的目的重组蛋白的方法,该方法包括

用表达目的重组蛋白的宿主细胞在生物反应器中建立细胞培养物,其中该细胞系已经用经工程化的编码根据权利要求1所述的piggyBac转座酶的核酸序列与包含编码目的蛋白的核酸序列的载体共转染,所述核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件;

对这些细胞进行培养以表达该目的重组蛋白;

收获该目的重组蛋白,

通过一个或多个单元操作加工该目的重组蛋白,以及

获得分离、纯化的目的重组蛋白。

29.根据权利要求28所述的方法,其中用包含该编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的第一载体与包含编码目的蛋白的核酸序列的第二载体转染该宿主细胞,所述核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

30.根据权利要求28所述的方法,其中用包含该编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的单个载体与编码目的蛋白的核酸序列转染该宿主细胞,所述核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

31.根据权利要求28所述的方法,其中至少一个单元操作是选自亲和色谱、离子交换色谱、阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、多模式色谱、疏水相互作用色谱和羟基磷灰石色谱的捕获色谱步骤。

32.根据权利要求31所述的方法,其中至少一个单元操作是选自离子交换色谱、阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、多模式色谱、疏水相互作用色谱和羟基磷灰石色谱的精制色谱步骤。

33.根据权利要求28所述的方法,其中至少一种单元操作选自病毒灭活、病毒过滤、深度过滤和UF/DF。

34.根据权利要求28所述的方法,其中与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由用该工程化piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。

35.一种用于转染细胞的试剂盒,该试剂盒包含

经工程化的编码根据权利要求1所述的piggyBac转座酶的核酸序列;以及

至少包含piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件的载体,该piggyBac转座子中插入了编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列。

36.一种产生非病毒基因修饰细胞的方法,该方法包括:

(a)建立包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体,所述至少一种核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件;

(b)从供体或受试者中分离天然免疫细胞;

(c)用该载体与经工程化的编码根据权利要求1所述的piggyBac转座酶的核酸序列转染这些细胞;以及

(d)通过细胞培养将这些细胞扩增成更大的非病毒基因修饰细胞群。

37.根据权利要求36所述的方法,其中用包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸

序列的载体与包含经工程化的编码piggyBac转座酶的核酸序列的载体转染这些细胞,所述至少一种核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

38.根据权利要求36所述的方法,其中用包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体与经工程化的编码piggyBac转座酶的核酸序列转染这些细胞,所述至少一种核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

39.非病毒基因修饰细胞、细胞群或细胞培养物,其通过包括以下的方法产生:

(a)建立包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体,所述至少一种核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件;

(b)从受试者或供体中分离天然免疫细胞;

(c)用该载体与经工程化的编码根据权利要求1所述的piggyBac转座酶的核酸序列转染这些细胞;

(d)通过细胞培养将这些细胞扩增成更大的基因修饰细胞群;以及

(e)从该细胞培养物中分离转化的细胞以获得包含这些基因修饰细胞的细胞群。

40.根据权利要求39所述的非病毒基因修饰细胞、细胞群或细胞培养物,其中用包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体与包含经工程化的编码piggyBac转座酶的核酸序列的载体转染这些细胞,所述至少一种核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

41.根据权利要求40所述的非病毒基因修饰细胞、细胞群或细胞培养物,其中用包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体与经工程化的编码piggyBac转座酶的核酸序列转染这些细胞,所述至少一种核酸序列的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

42.根据权利要求40所述的非病毒基因修饰细胞、细胞群或细胞培养物,其中该天然免疫细胞是单核细胞。

43.根据权利要求40所述的非病毒基因修饰细胞、细胞群或细胞培养物,其中该天然免疫细胞是T细胞。

44.根据权利要求40所述的非病毒基因修饰细胞、细胞群或细胞培养物,其中至少一种目的蛋白是抗原受体、T细胞受体或嵌合抗原受体。

45.根据权利要求40所述的非病毒基因修饰细胞、细胞群或细胞培养物,其中该细胞还用编码自杀基因即可诱导开启或加速器开关或者两者的核酸分子转染。

46.一种配制品,该配制品包含根据权利要求40所述的基因修饰细胞或细胞群。

47.有效量的根据权利要求40所述的基因修饰细胞或细胞群在制备用于治疗或预防供体或有需要的受试者中的疾病或障碍的药物中的用途。

突变型piggyBac转座酶

[0001] 本申请要求于2018年12月10日提交的美国临时申请号62/777,325和2019年10月24日提交的美国临时申请号62/925,516的权益,通过引用以整体的形式并出于所有目的将其特此本文,如同在本文中充分阐述一样。

技术领域

[0002] 本发明涉及经工程化以增加在细胞中的稳定性的piggyBac转座酶,以及这些工程化piggyBac转座酶在稳定地转染细胞、细胞系发育、基因组修饰和改善重组蛋白滴度等方面的用途。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含计算机可读形式的序列表(文件名:A-2320-W0-PCT_Sequence.txt,创建于11/5/2019,其大小为64KB),作为本披露内容的一个单独的部分,并且通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0005] 由于其广泛的应用,生物制剂在世界范围内被用于各种应用中,诸如治疗和诊断。目前,约51%的已批准的生物制剂是使用哺乳动物细胞生产的,而中国仓鼠卵巢(CHO)细胞是主要的细胞工厂(Zhou和Kantardjeff, Mammalian cell cultures for biologics manufacturing[用于生物制剂生产的哺乳动物细胞培养物], Springer[施普林格出版社], 纽约州海德堡, 2014)。结果,生物制药工业正在经历快速的范式转变。现在的上市速度和成本效率比以往任何时候都更加重要。生物药物的高昂研发成本和较长的开发提前期(lead time)使得必须消除药物研发以及更重要地,制造中的延误和低效。同时,产品线的复杂性和多样性日益增加,生物制药公司现在需要可适应不同需求的多种模式(从衍生自供体细胞的个性化疗法到每年从几克到几百千克量的生物药物的生产)的基础设施。

[0006] 因此,需要增加来自宿主细胞的重组蛋白产生并改善表达的长期稳定性。实现该目标的一种方法是改善由细胞表达系统表达的蛋白质的滴度。本文所述的发明提供了有助于增加宿主细胞中表达的piggyBac转座酶稳定性的突变。已经发现,与在包含野生型piggyBac转座酶或未用piggyBac转座酶的细胞中表达的重组蛋白的滴度相比,由用此类突变工程化的核酸序列编码的piggyBac转座酶导致包含该工程化piggyBac转座酶的细胞中表达的重组蛋白的滴度得到了改善。

发明内容

[0007] 在一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在一个实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代。在一个实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在一个实施例中,该

piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,和/或包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在另一个相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。在一个实施例中,与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的细胞表达的相同目的蛋白的滴度相比,该piggyBac转座酶使由如本文所述的工程化piggyBac转座酶转染的细胞表达的目的重组蛋白的滴度改善。在一个实施例中,该目的重组蛋白是抗原结合蛋白。

[0008] 在一个方面,本发明提供了经工程化以增加在宿主细胞中的稳定性的piggyBac转座酶,其中该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。

[0009] 在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0010] 在另一个方面,本发明提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方

面,本发明提供了由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:13的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。

[0011] 在另一个方面,本发明提供了包含编码如本文所述的piggyBac转座酶的核酸分子的载体。在一个实施例中,该载体包含编码如本文所述的piggyBac转座酶的核酸分子,进一步包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。在一个实施例中,该载体包含编码一种或多种目的蛋白的一种或多种核酸序列。

[0012] 在另一个方面,本发明提供了用如本文所述的载体转染的细胞。在一个实施例中,该细胞用由SEQ ID NO:17或18的核酸序列编码的piggyBac转座酶转染。在一个实施例中,该细胞是宿主细胞。在一个实施例中,该细胞是CHO细胞。在一个实施例中,该细胞是免疫细胞。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了用由如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子与包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸分子的载体共转染的细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。在另一个实施例中,本发明提供了用由包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体与包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸分子的载体共转染的细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。在另一个实施例中,本发明提供了用由包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子与包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸分子的载体共转染的细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。

[0014] 在另一个方面,本发明提供了如本文所述的细胞,其中与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的细胞表达的相同目的蛋白的滴度相比,由用工程化piggyBac转座酶转染的细胞表达的目的蛋白的滴度得到了改善。在一个实施例中,提供了由该细胞表达的目的重组蛋白。在相关的实施例中是包含该目的重组蛋白的药物组合物。

[0015] 在另一个方面,本发明提供了用于改善宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度的方法,该方法包括对编码piggyBac转座酶的核酸分子进行工程化以增加在宿主细胞中的稳定性;使用编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子与包含编码目的蛋白的核酸序列的载体共转染宿主细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件;以及培养这些细胞以表达目的重组蛋白,其中与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由用工程化piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。在一个实施例中,用包含编码

piggyBac转座酶的工程化核酸分子的第一载体与包含编码目的蛋白的核酸序列的第二载体转染该宿主细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。在一个实施例中,用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的单个载体与编码目的蛋白的核酸序列转染该宿主细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

[0016] 在另一个方面,本发明提供了用于增加表达重组蛋白的哺乳动物细胞培养物中重组蛋白的产生的方法,该方法包括使用宿主细胞在生物反应器中建立细胞培养物,该宿主细胞已经用编码piggyBac转座酶的核酸分子与包含编码目的蛋白的核酸分子的载体共转染,该编码piggyBac转座酶的核酸分子经工程化以增加在该宿主细胞中的稳定性,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的反向重复元件;以及表达目的重组蛋白;其中与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由用工程化piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。在一个实施例中,已经用包含编码piggyBac转座酶的核酸分子的载体与包含编码目的蛋白的核酸分子的载体将该宿主细胞共转染,该编码piggyBac转座酶的核酸分子经工程化以增加在该宿主细胞中的稳定性,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的反向重复元件;在一个实施例中,用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的单个载体与编码目的蛋白的核酸序列转染该宿主细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了用于生产分离、纯化的目的重组蛋白的方法,该方法包括用表达目的重组蛋白的宿主细胞在生物反应器中建立细胞培养物,其中该细胞系已经用编码piggyBac转座酶的核酸序列与包含编码目的蛋白的核酸序列的载体共转染,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在该宿主细胞中的稳定性,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件;对这些细胞进行培养以表达该目的重组蛋白;收获目的重组蛋白,通过一个或多个单元操作加工该目的重组蛋白,并获得分离、纯化的目的重组蛋白。在一个实施例中,已经用包含编码piggyBac转座酶的核酸序列的载体与包含编码目的蛋白的核酸序列的载体将该细胞系共转染,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在该宿主细胞中的稳定性,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。在一个实施例中,用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的单个载体与编码目的蛋白的核酸序列转染该宿主细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。在一个实施例中,至少一个单元操作是选自亲和色谱、离子交换色谱、阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、多模式色谱、疏水相互作用色谱和羟基磷灰石色谱的捕获色谱步骤。在相关的实施例中,至少一个单元操作是选自离子交换色谱、阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、多模式色谱、疏水相互作用色谱和羟基磷灰石色谱的精制色谱(polish chromatography)步骤。在一个实施例中,至少一种单元操作选自病毒灭活、病毒过滤、深度过滤和UF/DF。在一个实施例中,与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由用工程化piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。在一个实施例中是分离、纯化的重组蛋白。在相关的实施例中是包含该分离的目的蛋白的药物组合物。

[0018] 在一个方面,本发明提供了用于转染细胞的试剂盒,该试剂盒包含含有编码

piggyBac转座酶的核酸序列的载体,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在该宿主细胞中的稳定性;以及至少包含piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件的载体,该piggyBac转座子中插入了编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列。

[0019] 在一个方面,本发明提供了产生非病毒基因修饰细胞的方法,该方法包括:(a)建立载体,该载体包含编码piggyBac转座酶的核酸序列,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在细胞中的稳定性,以及编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件;(b)从供体或受试者中分离天然免疫细胞;(b)用该载体与编码piggyBac转座酶的核酸序列转染这些细胞,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在细胞中的稳定性;以及(c)通过细胞培养将这些细胞扩增成更大的非病毒基因修饰细胞群。在一个实施例中,用包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体与包含编码piggyBac转座酶的核酸序列的载体转染这些细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在细胞中的稳定性。在一个实施例中,用包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体与编码piggyBac转座酶的核酸序列转染这些细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在细胞中的稳定性。

[0020] 在一个方面,本发明提供了用非病毒基因修饰细胞治疗受试者的方法,该方法包括:(a)建立包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件;(b)从受试者或供体中分离天然免疫细胞;(c)用该载体与编码piggyBac转座酶的核酸序列转染这些细胞,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在细胞中的稳定性;(d)通过细胞培养将这些细胞扩增成更大的基因修饰细胞群;(e)从该细胞培养物中分离转化的细胞以获得包含这些基因修饰细胞的细胞群;以及(f)将这些非病毒基因修饰细胞重新引入受试者。在一个实施例中,用包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体与包含编码piggyBac转座酶的核酸序列的载体转染这些细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在细胞中的稳定性。在一个实施例中,用包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体与编码piggyBac转座酶的核酸序列转染这些细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在细胞中的稳定性。在一个实施例中,该天然免疫细胞是单核细胞。在一个实施例中,该天然免疫细胞是T细胞。在一个实施例中,至少一种目的蛋白是抗原受体、T细胞受体或嵌合抗原受体。在一个实施例中,还用编码自杀基因即可诱导开启或加速器开关或者两者的核酸分子转染该细胞。在一个实施例中是非病毒基因修饰细胞、细胞群或细胞培养物。在一个实施例中是一种包含基因修饰细胞或细胞群的制品。在另一个实施例中是一种治疗或预防供体或有需要的受试者中的疾病或障碍的方法,该方法包括向该供体或受试者施用有效量的这些基因修饰细胞或细胞群。

附图说明

[0021] 图1:预测的二级结构。横条表示预测的 α -螺旋区域,箭头表示预测的 β 折叠区域。

[0022] 图2:对于单克隆抗体AB1和AB2,工程化piggyBac转座酶细胞系的滴度与WT

piggyBac转座酶或未用piggyBac转座酶对照相比得到了改善或相当。

[0023] 图3:对于表达融合蛋白的细胞系,工程化的piggyBac转座酶细胞系的滴度与WT piggyBac转座酶或未用piggyBac转座酶对照相比得到了改善。

[0024] 图4:对于双特异性T细胞衔接器分子,工程化的piggyBac转座酶细胞系的滴度与WT piggyBac转座酶或未用piggyBac转座酶对照相当。

[0025] 图5:与未接受MSX处理(0 μ M MSX)的那些转座酶池相比,用piggybac转座酶双突变体“ILT”或三突变体“LLT”转座酶转染的池显示出表达增加。对于未添加转座酶(无)的这些池,表达不会随着MSX的添加而增加。测试了BiTE[®]HeteroFc、IgGscFV和mAb。在转染(25)时或恢复最初的DNA转座酶转染池后(0-25)后添加MSX。

[0026] 图6A和6B与使用电穿孔或基于脂质的方法转染的piggyBac转座酶双突变体“ILT”DNA或mRNA相关的池表达水平。

[0027] 6A):基于电穿孔的转染方法,将DNA转座酶和mRNA转座酶相比较。增加mRNA转座酶改善了表达。1) 0 μ g转座酶,20 μ g mAb DNA;2) 双突变体“ILT”DNA:20 μ g mAb DNA,5 μ g转座酶,比率为4:1;3) 双突变体“ILT”mRNA 20 μ g mAb DNA,5 μ g转座酶,比率为4:1;4) 双突变体“ILT”mRNA 20 μ g mAb DNA,10 μ g转座酶,比率为2:1;5) 双突变体“ILT”mRNA 20 μ g mAb DNA,20 μ g转座酶,比率为1:1;11) 双突变体“ILT”mRNA 14 μ g mAb DNA,100 μ g转座酶,比率为7:1;12) 双突变体“ILT”mRNA 28 μ g mAb DNA,200 μ g转座酶,比率为7:1。

[0028] 6B):基于脂质的转染方法,将DNA转座酶和mRNA转座酶相比较。增加mRNA转座酶改善了表达。PiggyBac转座酶双突变体“ILT”DNA 2 μ g mAb DNA,0.5 μ g转座酶,比率为4:1;2 μ g mAb DNA,2 μ g转座酶,比率为1:1;4 μ g mAb DNA,4 μ g转座酶,比率为1:1;PiggyBac转座酶双突变体“ILT”mRNA 2 μ g mAb DNA,0.5 μ g转座酶,比率为4:1;2 μ g mAb DNA,2 μ g转座酶,比率为1:1;4 μ g mAb DNA,4 μ g转座酶,比率为1:1。

[0029] 图7电穿孔转染池中的表达水平。双突变转座酶“ILT”DNA和两个mRNA的转染。合成mRNA(PB syn mRNA)和mRNA(PB mRNA)转染池的滴度与DNA(PB DNA)转座酶池相似,滴度高于无转座酶对照池。向下箭头为最小值。向上箭头是最大值。白色条是中位数。

[0030] 图8A和8B:转染的细胞系池中的DNA和mRNA的基因组和转录水平的整合。

[0031] 8A)用双突变体“ILT”DNA转座酶转染的所有池细胞系均具有基因组水平的整合,而用mRNA转染的那些细胞系没有基因组水平的整合。约1.7kb的条带表示在该细胞系基因组中存在该转座酶。泳道1阶梯。泳道2-4piggyBac转座酶双突变体“ILT”DNA。泳道5无转染。泳道6-11piggyBac转座酶双突变体“ILT”mRNA。泳道12质粒DNA对照。

[0032] 8B)检查RNA水平的转录的RT PCR测定的凝胶图像。用双突变体“ILT”DNA转座酶转染的所有池细胞系均具有RNA水平的转录,而用mRNA转染的那些细胞系没有RNA水平的转录。约1.7kb的条带表示该转座酶转录物存在。泳道1阶梯。泳道2-3piggyBac转座酶双突变体“ILT”mRNA。泳道4piggyBac转座酶双突变体“ILT”DNA。泳道5质粒DNA对照。

[0033] 图9该池具有较低的拷贝数,并且包含没有整合该转座酶的克隆。

[0034] 图10使用非病毒基因递送和piggyBac转座酶产生的TCR-T细胞在体外表现出稳健的功能。(A)使用双突变体ILT对T细胞成功进行工程化以表达TCR。(B)靶细胞裂解和(C)与抗原呈递细胞共同孵育5天后,piggyBac工程化的TCR-T细胞的增殖。

具体实施方式

[0035] DNA转座子或可转座元件是可以从宿主基因组中的一个位置移动到另一个位置的遗传元件。可转座元件典型地分为两类,第1类以反转录转座子为代表,第2类包括“剪切和粘贴”DNA转座子。

[0036] 第2类DNA转座子的特征是由两个部分组成,即包括侧翼为两个末端反向重复序列的DNA区段的转座子,以及催化转座子移动的转座酶。该转座酶通过结合反向重复序列、切除侧翼为末端反向重复序列的DNA区段(剪切片段)并将该区段重新整合到新的位置(粘贴片段)而发挥作用。

[0037] 该piggyBac转座子是第2类转座子,虽然最初是从粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*) (卷心菜尺蠖蛾)中分离出来的,但已显示出它可以在哺乳动物细胞中进行主动转座,并优先选择可利用的染色质结构(Li等人,*Molecular and Cellular Biology*[分子与细胞生物学]33(7):1317-1330,2013;Yoshida等人,*Scientific Reports*[科学报告]文章编号43613(2017))。由于能够将外源DNA引入基因组并促进稳定的转基因表达,piggyBac转座子系统是在哺乳动物细胞中进行基因操纵的有用工具,并已被用于促进哺乳动物细胞的稳定转染,以产生稳定且高产的哺乳动物细胞的多克隆培养,从转染细胞的异种群体快速产生重组蛋白以及为细胞系发育培养克隆体,这是由于其识别基序通常与开放染色质区域和活跃转录区域相关(已发表美国专利申请号:US 2010/0311116;Ding等人,*Cell*[细胞]122(3):473-483,2005;Wu等人,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*[美国国家科学院院刊]103(4)15008-13,2006;Matasci等人,*Biotechnology&Bioengineering*[生物技术与生物工程]108(9):2141-50,2011;Matasci等人,*BMC Proceedings*[英国医学委员会会刊]5(SUPPL.8)p.34,2011;Balasubramanian等人,*J.Biotechnology*[生物技术杂志]200:61-9,2015;Balasubramanian等人,*Biotechnology Progress*[生物技术进展]32(5):1308-1317,2016;Balasubramanian等人,*Biotechnology&Bioengineering*[生物技术与生物工程]113(6):1234-43,2016;Ahmadi等人,*PLoS ONE*[公共科学图书馆·综合]12(6):e0179902,2017;Rajendra等人,*Biotechnology Progress*[生物技术进展]33(2):534-540,2017;以及Rajendra等人,*Biotechnology Progress*[生物技术进展]33(6):1436-1448,2017.)。

[0038] 使用展示文库方法和/或与来自其他物种的同源染色体进行序列比较并产生过高活性的转座酶,通过修饰转座酶以增加切除频率,努力改善基于摩尔的piggyBac效率(例如,参见美国专利号8,399,643;美国专利号9,670,503;美国专利号9,783,790;美国专利号9,546,382;以及Yusa等人,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*[美国国家科学院院刊]108(4):1531-36,2011)。

[0039] 关于piggyBac转座酶的结构知之甚少。对piggyBac转座酶氨基酸序列的分析表明,它主要是 α 螺旋蛋白。在试图改善引入细胞中的piggyBac转座酶的稳定性时,在 α 螺旋和推定的N联糖基化位点(即NXS/t基序)内进行了突变,并如本文所述发现可改善滴度。将工程化版的piggyBac转座酶(包括单个突变或多个突变的组合)与目的蛋白(侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件)一起转染到细胞中,并评估与用来自粉纹夜蛾的野生型未突变的piggyBac转座酶(SEQ ID NO:2)转染的相似细胞和不包含piggyBac转座酶的细胞相比目的蛋白的表达。发现与由包含野生型piggyBac转座酶或未用piggyBac转座酶的细胞中表达的重组蛋白的滴度相比,由经工程化以增加稳定性的核酸序列编码的

piggyBac转座酶改善了在包含该工程化piggyBac转座酶的细胞中表达的重组蛋白的滴度。

[0040] 如本文所用,术语“piggyBac转座子”或“piggyBac可转座元件”是指可从供体多核苷酸(例如,载体)切下并整合到靶位点(例如,细胞的基因组或染色体外DNA)中的多核苷酸序列。例如,来自粉纹夜蛾的piggyBac可转座元件的长度为2472bp,具有短的反向重复序列,包括不对称的末端重复序列结构,在5' 13-bp末端重复序列和5' 19-bp内部重复序列之间有3-bp的间隔子,并且在3' 13-bp末端重复序列和3' 19-bp内部重复序列之间有31-bp间隔子,以及编码功能性转座酶的单个2.1-kp开放阅读框。(Li等人,Mol.Genet.Genomics[分子遗传学与基因组学](2001) 266:190-198;Cary等人,Virology[病毒学](1989) 172:156-169)。

[0041] 如本文所用,piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件是指T的5' 和3' 区段,包括靶TTAA位点、piggyBac转座子的末端重复序列间隔子和内部重复序列,对于粉纹夜蛾,这些包括靶TTAA位点、5' 13-bp末端重复序列和5' 19-bp内部重复序列以及之间的3-bp间隔子、3' 13-bp末端重复序列和3' 19-bp内部重复序列以及之间的31-bp间隔子。

[0042] 如本文所用,术语“piggyBac转座酶”是指催化从供体多核苷酸(例如,载体)切除piggyBac转座子并随后将该piggyBac转座子整合到靶细胞的基因组或染色体外DNA中的多肽。该piggyBac转座酶利用剪切和粘贴机制,插入TTAA靶位点,该位点在插入时复制并在插入后精确切除,将供体位点恢复到其转座子前状态。(Elick等人,Genetica[遗传学]98:33-41,1996.Fraser等人,Insect Mol.Biol.[昆虫分子生物学]5:141-151,1996.Wang和Fraser,Insect Mol.Biol.[昆虫分子生物学]1:109-116,1993)。该piggyBac转座酶可以作为多肽存在。可替代地,该piggyBac转座酶可呈递包含编码piggyBac转座酶的编码序列的核酸分子。在本发明的一些实施例中,当该piggyBac转座酶作为编码工程化piggyBac转座酶的工程化核酸分子存在时,该工程化核酸分子可以存在于包含该piggyBac转座子的相同载体上,即顺式存在。在本发明的其他实施例中,该工程化核酸分子可以存在于与该转座子分开的第二载体上,即反式存在。本文所述的工程化piggyBac转座酶的独特之处在于,与由包含野生型piggyBac转座酶或未用piggyBac转座酶的细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由包含该工程化piggyBac转座酶的细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。

[0043] 术语“多肽(polypeptide)”或“蛋白质(protein)”在全文中可互换使用,并且是指包括通过肽键彼此连结的两个或更多个氨基酸残基的分子。多肽和蛋白质还包括具有天然序列的氨基酸残基的一个或多个缺失、插入和/或取代的大分子,即包括由天然存在的非重组细胞产生的多肽或蛋白质;或通过基因工程细胞或重组细胞产生,并且包括具有天然蛋白质的氨基酸序列的氨基酸残基的一个或多个缺失、插入和/或取代的分子。多肽和蛋白质还包括如下氨基酸聚合物,其中一种或多种氨基酸为相应天然存在的氨基酸和聚合物的化学类似物。多肽和蛋白质还包括修饰,所述修饰包括但不限于糖基化、脂质附着、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧化、羟基化和ADP核糖基化。

[0044] 本文所述的piggyBac转座酶旨在包括与野生型粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*) (卷心菜尺蠖蛾) piggyBac转座酶(SEQ ID NO:2)相比,具有一个或多个氨基酸残基的插入、缺失、或取代或其任何组合以及氨基酸残基的插入、缺失或取代以外的修饰的多肽。如本文所用,“在一个或多个位置处的氨基酸取代”意指在所述位置中1、2、3、4、5、6或7处的取代。在一些实施例中,“在一个或多个位置处的氨基酸取代”意指在所述位置中1、2、3、4、5或6处的

取代。在一些实施例中，“在一个或多个位置处的氨基酸取代”意指在所述位置中1、2、3、4或5处的取代。在一些实施例中，“在一个或多个位置处的氨基酸取代”意指在所述位置中1、2、3或4处的取代。在一些实施例中，“在一个或多个位置处的氨基酸取代”意指在所述位置中1、2或3处的取代。在一些实施例中，“在一个或多个位置处的氨基酸取代”意指在所述位置中1或2处的取代。

[0045] 本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在一个实施例中,该转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代。在一个实施例中,该转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在一个实施例中,该转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,和/或包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在另一个相关的实施例中,该转座酶包含SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。在一个实施例中,与由野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的细胞表达的相同目的蛋白的滴度相比,由工程化piggyBac转座酶转染的细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。

[0046] 本发明还提供了经工程化以增加在宿主细胞中稳定性的piggyBac转座酶,其中该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有

SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0047] 表1野生型和突变型piggyBac转座酶的氨基酸序列

[0048]

SEQ ID NO:	ID	序列
2	WT	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SEIVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDLF DRSLSMVYVSVMSRDRFDFLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKIWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGT MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMKRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ

[0049]

		SCF
4	I147L	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SELVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDLF DRSLSMVYVSVMSRDRFDFLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKIWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGTS MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTL QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
6	I247L	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SEIVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDLF DRSLSMVYVSVMSRDRFDFLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKLWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGTS MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTL QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
8	S533T	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST

[0050]

		SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SEIVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDRLF DRSLSMVYVSVMSRDRFDFLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKIWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRNKRLEIPEVLKNSRSPVGT MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPMVMYNNQ TKGGVDTLD QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRLNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNITNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
10	LLT (I247L I147L S533T)	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SELVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDRLF DRSLSMVYVSVMSRDRFDFLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKLWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRNKRLEIPEVLKNSRSPVGT MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPMVMYNNQ TKGGVDTLD QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRLNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNITNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
12	ILT (I247L I147L S533T)	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SEIVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDRLF DRSLSMVYVSVMSRDRFDFLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT

[0051]

		PVRKLWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGT MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNITNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
14	LIT (I247L I147 S533T)	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFTDEII SELVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRFDFLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKIWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGT MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNITNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
16	LLS (I247L I147L S533)	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFTDEII SELVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRFDFLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKLWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT

[0052]

	SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGTS MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTL QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCP SKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
--	--

[0053] 术语“多核苷酸”、“核酸分子”或“工程化核酸分子”在全文中可互换使用,并且包括单链和双链核酸,并包括基因组DNA、RNA、mRNA、cDNA或合成来源或与自然界通常存在的序列无关的一些组合。术语“分离的多核苷酸”、“分离的核酸分子”或“分离的工程化核酸分子”具体是指合成来源的序列或自然界中通常不存在的序列。包含规定序列的分离的核酸分子除这些规定序列以外还可以包括针对多达十种或甚至多达二十种其他蛋白质或其部分的编码序列,或可以包括控制所叙述核酸序列的编码区的表达的可操作地连接的调节序列,及/或可以包括载体序列。构成这些核酸分子的核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或者任一类型核苷酸的经修饰形式。这些修饰包括碱基修饰,诸如溴尿苷及肌苷衍生物;核糖修饰,诸如2',3'-二脱氧核糖;及核苷酸间键修饰,诸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯氨基硫代磷酸酯、苯氨基磷酸酯及氨基磷酸酯。

[0054] 如本文所用,术语“分离的”意指(i)不含至少一些通常与其一起被发现的蛋白质或多核苷酸,(ii)基本上不含来自相同来源的其他蛋白质或多核苷酸,例如来自相同物种,(iii)与至少约50%的在自然界与其相关的多核苷酸、脂质、碳水化合物或其他物质分离,(iv)可操作地与在自然界与其不相关的多肽相关(通过共价或非共价相互作用),或(v)在自然界中不存在。

[0055] 在一个实施例中,本发明提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。本发明还提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:13的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:18的核酸序列编码的

piggyBac转座酶。

[0056] 表2.野生型和突变型piggyBac转座酶的核酸序列

[0057]

SEQ ID NO:	ID	核酸序列
1	WT	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT

[0058]

GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA
 CTGCTGGTCCA
 CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA
 CATCGTGCGG
 AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC
 GACCCCCTGCT
 GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG
 ATCGTGAAGT
 GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA
 TGACCGGCGCC
 ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT
 TCGGCATCCT
 GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC
 CGACGACCTGT
 TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG
 CAGAGACAGA
 TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA
 GCATCAGACC
 CACCCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG
 ATCTGGGACC
 TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC
 CCACCTGACC
 ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT
 TCAGAATGTA
 CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG
 ATGATGTGCG
 ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT
 GGGCAGAGGC
 ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA
 AAGAACTGAG
 CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC
 AACTGGTTCA
 CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA
 CAAGCTGACC
 ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA
 GAGGTGCTGAA
 GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC
 TTCGACGGCC
 CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT
 GGTGTACCTG
 CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC
 ACCGGCAAGCC
 CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG
 GACACCCTGG
 ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA
 ACAGATGGCCC
 ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA
 ACAGCTTCAT
 CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT
 GCAGAGCCGGA
 AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG
 CTTTCATGAGA
 AAGAGACTGGAAGCCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG

[0059]

		GACAACATCAG CAACATCCTGCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
3	I147L	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG CTGGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG ATCTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA

		GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAG CAACATCCTGCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
[0060]	5	I247L ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTACCGACGAGATCATCAGCGAG ATCGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA

[0061]

		GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG CTGTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT TCAGAAATGTA CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGTGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAG CAACATCCTGCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
7	S533T	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA

[0062]

ACAGAATCCT
 GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA
 CTGCTGGTCCA
 CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA
 CATCGTGCGG
 AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC
 GACCCCCTGCT
 GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG
 ATCGTGAAGT
 GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA
 TGACCGGCGCC
 ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT
 TCGGCATCCT
 GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC
 CGACGACCTGT
 TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG
 CAGAGACAGA
 TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA
 GCATCAGACC
 CACCCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG
 ATCTGGGACC
 TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC
 CCACCTGACC
 ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT
 TCAGAATGTA
 CATCCCCAACAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG
 ATGATGTGCG
 ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT
 GGGCAGAGGC
 ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA
 AAGAACTGAG
 CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC
 AACTGGTTCA
 CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA
 CAAGCTGACC
 ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA
 GAGGTGCTGAA
 GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC
 TTCGACGGCC
 CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT
 GGTGTACCTG
 CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC
 ACCGGCAAGCC
 CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG
 GACACCCTGG
 ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA
 ACAGATGGCCC
 ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA
 ACAGCTTCAT
 CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT
 GCAGAGCCGGA
 AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG
 CTCATGAGA

[0063]

		AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAC CAACATCCTGCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
9	LLT (I247L I147L S533T)	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG CTGGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG CTGTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAGCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC

[0064]

		ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAC CAACATCCTGCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
11	ILT (I147 I247L S533T)	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTACCGACGAGATCATCAGCGAG ATCGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA

[0065]

		TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG CTGTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT TCAGAAATGTA CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGTGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAC CAACATCCTGCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
13	LIT (I147L I247 S533T)	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT

[0066]

CCTGGACGAG
 CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA
 ACAGAATCCT
 GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA
 CTGCTGGTCCA
 CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA
 CATCGTGCGG
 AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC
 GACCCCTGCT
 GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG
 CTGGTGAAGT
 GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA
 TGACCGGCGCC
 ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT
 TCGGCATCCT
 GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC
 CGACGACCTGT
 TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG
 CAGAGACAGA
 TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA
 GCATCAGACC
 CACCCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG
 ATCTGGGACC
 TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC
 CCACCTGACC
 ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCTT
 TCAGAAATGTA
 CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG
 ATGATGTGCG
 ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT
 GGGCAGAGGC
 ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA
 AAGAACTGAG
 CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC
 AACTGGTTCA
 CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA
 CAAGCTGACC
 ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA
 GAGGTGCTGAA
 GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC
 TTCGACGGCC
 CCCTGACCCTGGTGTCTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT
 GGTGTACCTG
 CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC
 ACCGGCAAGCC
 CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG
 GACACCCTGG
 ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA
 ACAGATGGCCC
 ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA
 ACAGCTTCAT
 CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT
 GCAGAGCCGGA

[0067]

		AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAC CAACATCCTGCCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
15	LLS (I147L I247L S533S)	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG CTGGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG CTGTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA

[0068]

		CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAG CAACATCCTGCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
17	ILT (I147I I247L S533T) RNA	AUGGGCUCUAGCCUGGACGACGAGCACAUCCUGAGCGCC CUGCUGCAG AGCGACGACGAACUGGUGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG AUCAGCGACCA CGUGUCCGAGGACGACGUGCAGUCCGACACCGAGGAAGC CUUCAUCGACG AGGUGCACGAAGUGCAGCCUACCAGCAGCGGCUCCGAGA UCCUGGACGAG CAGAACGUGAUCGAGCAGCCUGGCAGCUCCCUGGCCAGC AACAGAAUCCU GACCCUGCCCCAGAGAACCAUCAGAGGCAAGAACAAGCA CUGCUGGUCCA CCUCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGUGUCCGCCUGA ACAUCGUGCGG AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAAUGUGCAGAAACAUCUAC GACCCCUUGCU GUGCUUCAAGCUGUUCUUCACCGACGAGAUCAUCAGCGA GAUCGUGAAGU GGACCAACGCCGAGAUAGCCUGAAGAGGCGGGAGAGCA UGACCGGCGCC ACCUUCAGAGACACCAACGAGGACGAGAUUCUACGCCUUC UUCGGCAUCCU GGUGAUGACCGCCGUGAGAAAGGACAACCACAUGAGCAC CGACGACCUGU

[0069]

		UCGACAGAUCCCUGAGCAUGGUGUACGUGUCCGUGAUGA GCAGAGACAGA UUCGACUCCUGAUCAGAUGCCUGAGAAUGGACGACAAG AGCAUCAGACC CACCCUGCGGGAGAACGACGUGUUCACCCCCGUGCGGAA GCUGUGGGACC UGUUCAUCCACCAGUGCAUCCAGAACUACACCCCUGGCG CCCACCUGACC AUCGAUGAGCAGCUGCUGGGCUUCAGAGGCAGAUGCCCC UUCAGAAUGUA CAUCCCCAACAAAGCCCAGCAAGUACGGCAUCAAGAUCU GAUGAUGUGCG ACAGCGGCACCAAGUACAUGAUCAACGGCAUGCCCUACC UGGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGUGCCCCUGGGCGAGUACUACGUG AAAGAACUGAG CAAGCCUGUGCAUGGCAGCUGCAGGAACAUCACCUGCGA CAACUGGUUCA CCAGCAUCCCCUGGCCAAGAACCUGCUGCAGGAACCCU ACAAGCUGACC AUCGUGGGCACCGUGCGGAGCAACAAGCGGGAGAUCCCA GAGGUGCUGAA GAACAGCAGAUCCAGACCUGUGGGAACAAGCAUGUUCUG CUUCGACGGCC CCCUGACCCUGGUGUCCUACAAGCCCAAGCCCGCCAAGA UGGUGUACCUG CUGUCCAGCUGCGACGAGGACGCCAGCAUCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGAUGGUGAUGUACUACAACCAGACCAAGGGCGGGCGU GGACACCCUGG ACCAGAUGUGCAGCGUGAUGACCUGCAGCAGAAAGACCA ACAGAUGGCCC AUGGCCCUGCUGUACGGCAUGAUCAAUAUCGCCUGCAUC AACAGCUUCAU CAUCUACAGCCACAACGUGUCCAGCAAGGGCGAGAAGGU GCAGAGCCGGA AGAAAUUCAUGCGGAACCUGUACAUGAGCCUGACCUCCA GCUUCAUGAGA AAGAGACUGGAAGCCCCCACCUGAAGAGAUACCUGCGG GACAACAUCAC CAACAUCCUGCCCAACGAAGUGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGUGAUGAAGAAGAGGACCUACUGCACCUACUGUC CCAGCAAGAUC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCUGCAAGAAUGCAAAAA AGUGAUCUGCCG GGAGCACAACAUCGACAUGUGCCAGAGCUGUUUCUAGC
18	LLT (I147L I247L S533T) RNA	AUGGGCUCUAGCCUGGACGACGAGCACAUCCUGAGCGCC CUGCUGCAG AGCGACGACGAACUGGUGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG AUCAGCGACCA CGUGUCCGAGGACGACGUGCAGUCCGACACCGAGGAAGC CUUCAUCGACG

[0070]

AGGUGCACGAAGUGCAGCCUACCAGCAGCGGCUCCGAGA
 UCCUGGACGAG
 CAGAACGUGAUCGAGCAGCCUGGCAGCUCUCCUGGCCAGC
 AACAGAAUCCU
 GACCCUGCCCCAGAGAACCAUCAGAGGCAAGAACAAGCA
 CUGCUGGUCCA
 CCUCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGUGUCCGCCCUGA
 ACAUCGUGCGG
 AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAAUGUGCAGAAACAUCUAC
 GACCCCCUGCU
 GUGCUUCAAGCUGUUCUUCACCGACGAGAUCAUCAGCGA
 GCUGGUGAAGU
 GGACCAACGCCGAGAUCAAGAGGCGGGAGAGCA
 UGACCGGCGCC
 ACCUUCAGAGACACCAACGAGGACGAGAUUCACGCCUUC
 UUCGGCAUCCU
 GGUGAUGACCGCCGUGAGAAAGGACAACCACAUGAGCAC
 CGACGACCUGU
 UCGACAGAUCCCUGAGCAUGGUGUACGUGUCCGUGAUGA
 GCAGAGACAGA
 UUCGACUUCUGAUCAGAUCCUGAGAAUGGACGACAAG
 AGCAUCAGACC
 CACCCUGCGGGAGAACGACGUGUUCACCCCCGUGCGGAA
 GCUGUGGGACC
 UGUUCAUCCACCAGUGCAUCCAGAACUACACCCCUGGCG
 CCCACCUGACC
 AUCGAUGAGCAGCUGCUGGGCUUCAGAGGCAGAUCCCC
 UUCAGAAUGUA
 CAUCCCCAACAAAGCCCAGCAAGUACGGCAUCAAGAUCU
 GAUGAUGUGCG
 ACAGCGGCACCAAGUACAUGAUCAACGGCAUGCCCUACC
 UGGGCAGAGGC
 ACCCAGACAAACGGCGUGCCCCUGGGCGAGUACUACGUG
 AAAGAACUGAG
 CAAGCCUGUGCAUGGCAGCUGCAGGAACAUCACCUGCGA
 CAACUGGUUCA
 CCAGCAUCCCCCUGGCCAAGAACCUGCUGCAGGAACCCU
 ACAAGCUGACC
 AUCGUGGGCACCGUGCGGAGCAACAAGCGGGAGAUCCA
 GAGGUGCUGAA
 GAACAGCAGAUCCAGACCUGUGGGAACAAGCAUGUUCUG
 CUUCGACGGCC
 CCCUGACCCUGGUGUCCUACAAGCCCAAGCCCGCCAAGA
 UGGUGUACCUG
 CUGUCCAGCUGCGACGAGGACGCCAGCAUCAACGAGAGC
 ACCGGCAAGCC
 CCAGAUGGUGAUGUACUACAACCAGACCAAGGGCGGCGU
 GGACACCCUGG
 ACCAGAUGUGCAGCGUGAUGACCUGCAGCAGAAAGACCA
 ACAGAUGGCCC
 AUGGCCUGCUGUACGGCAUGAUCAAUAUCGCCUGCAUC
 AACAGCUUCAU
 CAUCUACAGCCACAACGUGUCCAGCAAGGGCGAGAAGGU

[0071]

GCAGAGCCGGA
AGAAAUUCAUGCGGAACCUGUACAUGAGCCUGACCUCCA
GCUUCAUGAGA
AAGAGACUGGAAGCCCCACCCUGAAGAGAUACCUGCGG
GACAACAUCAC
CAACAUCCUGCCCAACGAAGUGCCAGGAACAAGCGACGA
CAGCACCGAGG
AACCCGUGAUGAAGAAGAGGACCUACUGCACCUACUGUC
CCAGCAAGAUC
AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCUGCAAGAAAUGCAAAAA
AGUGAUCUGCCG
GGAGCACAACAUCGACAUGUGCCAGAGCUGUUUCUAGC

[0072] 目的多肽和蛋白质可能具有科学意义或商业意义,包括基于蛋白质的治疗法。目的蛋白尤其包括分泌型蛋白质、非分泌型蛋白质、胞内蛋白质或膜结合蛋白质。目的多肽和蛋白质可以使用细胞培养方法通过重组动物细胞系产生,并且可以被称为“重组蛋白质”。所表达的(一种或多种)蛋白质可以在细胞内产生或被分泌到培养基中,从培养基中可以回收和/或收集所述蛋白质。术语“分离的蛋白质”或“分离的重组蛋白质”是指目的多肽或蛋白质,该目的多肽或蛋白质从会干扰其治疗、诊断、预防、研究或其他用途的蛋白质或多肽或其他污染物中纯化出来。目的蛋白包括通过结合靶、特别是下面列出的那些中的靶而发挥治疗作用的蛋白质,包括从其衍生的靶、与其相关的靶及其修饰。

[0073] 目的蛋白包括“抗原结合蛋白”。“抗原结合蛋白”是指包括抗原结合区或抗原结合部分的蛋白质或多肽,该抗原结合区或抗原结合部分对与其结合的另一分子(抗原)具有亲和力。抗原结合蛋白涵盖抗体、肽体、抗体片段、抗体衍生物、抗体类似物、融合蛋白(包括单链可变片段(scFv)和双链(双价)scFv、突变蛋白和Xmab)。还包括双特异性T细胞衔接器(BiTE[®])、具有延长(诸如半衰期延长)的双特异性T细胞衔接器(例如HLE BiTE、HeteroIg BITE以及其他)、嵌合抗原受体(CAR、CAR T)和T细胞受体(TCR)。

[0074] scFv是单链抗体片段,它具有连接在一起的抗体重链和轻链的可变区。参见美国专利号7,741,465、和6,319,494以及Eshhar等人,Cancer Immunol Immunotherapy[癌症免疫学免疫疗法](1997)45:131-136。scFv保留了亲本抗体与靶抗原特异性相互作用的能力。

[0075] 术语“抗体”包括任何同种型或亚类的糖基化免疫球蛋白和非糖基化免疫球蛋白,或者其与完整抗体竞争特异性结合的抗原结合区。除非另有说明,否则抗体包括人类的、人源化的、嵌合的、多特异性的、单克隆的、多克隆的、heteroIgG、双特异性的抗体、及其寡聚物或抗原结合片段。抗体包括IgG1型、IgG2型、IgG3型或IgG4型。还包括具有抗原结合片段或抗原结合区的蛋白质,诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、双抗体、Fd、dAb、最大抗体(maxibody)、单链抗体分子、单结构域V_H、互补决定区(CDR)片段、scFv、双抗体、三抗体、四抗体和至少包含足以使特异性抗原与靶多肽结合的免疫球蛋白的一部分的多肽。

[0076] 还包括人类的、人源化的和其他抗原结合蛋白,诸如人类抗体和人源化抗体,这些抗原结合蛋白当施用于人类时不会产生明显有害的免疫反应。

[0077] 还包括经修饰的蛋白质,诸如经非共价键、共价键或者共价键和非共价键两者化学修饰的蛋白质。还包括进一步包含一种或多种译后修饰的蛋白质,其可以通过细胞修饰系统或由酶和/或化学方法离体引入或以其他方式引入的修饰制得。

[0078] 目的蛋白还可以包括重组融合蛋白,该重组融合蛋白包括例如多聚化结构域,诸

如亮氨酸拉链、卷曲螺旋、免疫球蛋白的Fc部分等。还包括包含分化抗原的全部或部分氨基酸序列的蛋白质(称为CD蛋白质)或其配体或与这些中的任一个实质上相似的蛋白质。

[0079] 在一些实施例中,目的蛋白可以包括集落刺激因子,诸如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。此类G-CSF试剂包括但不限于**Neupogen®**(非格司亭)和**Neulasta®**(培非格司亭)。还包括红细胞生成刺激剂(ESA),诸如**Epogen®**(依伯汀 α),**Aranesp®**(达贝泊汀 α),**Dynepo®**(依伯汀 δ),**Mircera®**(甲氧基聚乙二醇-依伯汀 β),**Hematide®**,MRK-2578,INS-22,**Retacrit®**(依伯汀 ζ),**Neorecormon®**(依伯汀 β),**Silapo®**(依伯汀 ζ),**Binocrit®**(依伯汀 α),epoetin alfa Hexal,**Abseamed®**(依伯汀 α),**Ratioepo®**(依伯汀 θ),**Eporatio®**(依伯汀 θ),**Biopoin®**(依伯汀 θ),依伯汀 α ,依伯汀 β ,依伯汀 ζ ,依伯汀 θ 和依伯汀 δ ,依伯汀 ω ,依伯汀 ι ,组织纤溶酶原激活剂,GLP-1受体激动剂,以及前述任何内容的分子或其变体或类似物和生物仿制药。

[0080] 在一些实施例中,目的蛋白可以包括与一种或多种CD蛋白质、HER受体家族蛋白质、细胞粘附分子、生长因子、神经生长因子、成纤维细胞生长因子、转化生长因子(TGF)、胰岛素样生长因子、骨诱导因子、胰岛素和胰岛素相关蛋白、凝血和凝血相关蛋白、集落刺激因子(CSF)、其他血液和血清蛋白血型抗原特异性结合的蛋白质;受体、受体相关蛋白、生长激素、生长激素受体、T细胞受体;神经营养因子、神经营养蛋白、松弛素(relaxin)、干扰素、白介素、病毒抗原、脂蛋白、整合素、类风湿因子、免疫毒素、表面膜蛋白、转运蛋白、归巢受体、地址素、调节蛋白和免疫粘附素。

[0081] 在一些实施例中,目的蛋白单独或以任何组合结合以下一种或多种蛋白质的蛋白质:CD蛋白质(包括但不限于CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD70、CD123、CD133、CD138、CD171和CD174)、HER受体家族蛋白质(包括例如HER2、HER3、HER4和EGF受体)、EGFRvIII、细胞粘附分子(例如LFA-1、Mol、p150、95、VLA-4、ICAM-1、VCAM和 $\alpha v/\beta 3$ 整合素)、生长因子(包括但不限于例如血管内皮生长因子(“VEGF”));VEGFR2、生长激素、甲状腺刺激素、卵泡刺激素、黄体生成激素、生长激素释放因子、甲状旁腺激素、米勒管抑制物质(mullerian-inhibiting substance)、人类巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α)、促红细胞生成素(EPO)、神经生长因子(诸如NGF- β)、血小板源性生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(包括例如aFGF和bFGF)、表皮生长因子(EGF)、Cripto、转化生长因子(TGF)(其中包括TGF- α 和TGF- β (包括TGF- $\beta 1$ 、TGF- $\beta 2$ 、TGF- $\beta 3$ 、TGF- $\beta 4$ 或TGF- $\beta 5$))、胰岛素样生长因子-I和胰岛素样生长因子-II(IGF-I和IGF-II)、des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)和骨诱导因子、胰岛素和胰岛素相关蛋白(包括但不限于胰岛素、胰岛素A链、胰岛素B链、胰岛素原和类胰岛素生长因子结合蛋白);(凝血蛋白和凝血相关蛋白,尤其诸如,VIII因子、组织因子、范威尔邦德(von Willebrand)因子、蛋白质C、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、纤溶酶原激活剂(诸如尿激酶和组织纤溶酶原激活剂(“t-PA”))、邦巴辛(bombazine)、凝血酶、血小板生成素和血小板生成素受体、集落刺激因子(CSF)(尤其包括以下物质:M-CSF、GM-CSF和G-CSF)、其他血液和血清蛋白(包括但不限于白蛋白、IgE和血型抗原)、受体和受体相关蛋白(包括例如f1k2/f1t3受体、肥胖(OB)受体、生长激素受体和T细胞受体);神经营养因子,包括但不限于骨源性神经营养因子(BDNF)和神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、神经营养蛋白-5或

神经营养蛋白-6 (NT-3、NT-4、NT-5或NT-6) ; 松弛素A链、松弛素B链和松弛素原、干扰素(包括例如干扰素 α 、干扰素 β 和干扰素 γ)、白介素(IL) (例如IL-1至IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-23、IL-12/IL-23、IL-2Ra、IL1-R1、IL-6受体、IL-4受体和/或IL-13受体、IL-13RA2或IL-17受体、IL-1RAP; 病毒抗原, 包括但不限于AIDS包膜病毒抗原、脂蛋白、降钙素、胰高血糖素、心钠素、肺表面活性剂、肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子- β 、脑啡肽酶、BCMA、IgKappa、ROR-1、ERBB2、间皮素、RANTES (受激活调节的正常T细胞表达与分泌因子)、小鼠促性腺激素相关肽、DNA酶、FR- α 、抑制素和激活素、整合素、蛋白质A或D、类风湿因子、免疫毒素、骨形态发生蛋白质(BMP)、超氧化物歧化酶、表面膜蛋白、衰变加速因子(DAF)、AIDS包膜、转运蛋白、归巢受体、MIC (MIC-a、MIC-B)、ULBP 1-6、EPCAM、地址素、调节蛋白、免疫粘附素、抗原结合蛋白、生长激素、CTGF、CTLA4、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)-1、MUC1、CEA、c-MET、密蛋白(Claudin)-18、GPC-3、EPA2、FPA、LMP1、MG7、NY-ESO-1、PSCA、神经节苷脂GD2、神经节苷脂GM2、BAFF、OPGL (RANKL)、肌生成抑制素、Dickkopf-1 (DKK-1)、Ang2、NGF、IGF-1受体、肝细胞生长因子(HGF)、TRAIL-R2、c-Kit、B7RP-1、PSMA、NKG2D-1、程序性细胞死亡蛋白1和配体、PD1和PDL1、甘露糖受体/hCG β 、丙型肝炎病毒、间皮素dsFv [PE38缀合物、嗜肺军团菌(11y)、IFN γ 、 γ 干扰素诱导蛋白10 (IP10)、IFNAR、TALL-1、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)、前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/Kexin 9型(PCSK9)、干细胞因子、Flt-3、降钙素基因相关肽(CGRP)、OX40L、 $\alpha 4\beta 7$ 、血小板特异性(血小板糖蛋白Iib/IIb (PAC-1)、转化生长因子 β (TFG β)、透明带精子结合蛋白3 (ZP-3)、TWEAK、血小板衍生的生长因子受体 α (PDGFR α)、硬化蛋白(sclerostin)以及任何前述内容的生物活性片段或变体。

[0082] 在另一个实施例中, 目的蛋白包括阿昔单抗、阿达木单抗、阿德木单抗、阿柏西普、阿仑单抗、阿利库单抗、阿那白滞素、阿塞西普、巴利昔单抗、贝利木单抗、贝伐单抗、生物素单抗(biosozumab)、博纳吐单抗、本妥昔单抗、布罗达单抗、莫坎妥珠单抗、康纳单抗、西妥昔单抗、塞妥珠单抗、可那木单抗、达利珠单抗、迪诺舒单抗(denosumab)、依库丽单抗、依决洛单抗、依法利珠单抗、依帕珠单抗、依那西普、依伏库单抗、加利昔单抗、盖尼塔单抗、吉妥珠单抗、戈利木单抗、替伊莫单抗、英夫利昔单抗、易普利姆玛、乐地单抗、鲁昔单抗、左旋单抗(1xdkizumab)、马帕木单抗、磷酸莫特沙尼(motesanib diphosphate)、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奈西立肽、尼妥珠单抗、纳武单抗、奥瑞珠单抗、奥法木单抗、奥马珠单抗、奥普瑞白介素、帕利珠单抗、帕尼单抗、派姆单抗、帕妥珠单抗、培克珠单抗、兰尼单抗、利妥木单抗、利妥昔单抗、罗米司亭、洛莫索珠单抗、沙格司亭、托珠单抗、托西莫单抗、曲妥单抗、优特克单抗、维多珠单抗、维西珠单抗、伏洛昔单抗、扎木单抗、扎鲁木单抗、以及前述任何内容的生物仿制药。

[0083] 根据本发明所述的目的蛋白涵盖所有前述内容, 并且进一步包括包含上述任何抗体的1、2、3、4、5或6个互补决定区(CDR)的抗体。还包括这样的变体, 其包括与目的蛋白的参考氨基酸序列具有70%或更高、特别是80%或更高、更特别是90%或更高、再更特别是95%或更高、具体是97%或更高、更具体是98%或更高、再更具体是99%或更高同一性的氨基酸序列的区。在这方面的同一性可以使用多种众所周知的且容易获得的氨基酸序列分析软件来确定。优选软件包括实施史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)算法的那些软件, 该软件被认为是搜索和比对序列问题的令人满意的解决方案。还可以采用其他算法, 特别是在速度是重要考虑因素的情况下。可以用于此方面的用于DNA、RNA和多肽的比对和同源性匹配的常

用程序包括FASTA、TFASTA、BLASTN、BLASTP、BLASTX、TBLASTN、PROSRCH、BLAZE和MPSRCH,后者是用于在MasPar制造的大规模并行处理器上执行的史密斯-沃特曼算法的实施方式。

[0084] 目的蛋白还可以包括基因工程化受体,诸如嵌合抗原受体(CAR或CAR-T)和T细胞受体(TCR),以及包含与该靶向抗原相互作用的抗原结合分子的其他蛋白质。通过掺入与靶抗原相互作用的抗原结合分子,CAR可以被工程化以结合抗原(诸如细胞表面抗原)。CAR典型地将抗原结合结构域(诸如scFv)与一个或多个共刺激(“信号传导”)结构域和一个或多个激活结构域串联在一起。

[0085] 优选地,该抗原结合分子是其抗体片段,并且更优选地是一个或多个单链抗体片段(“scFv”)。scFv优选用于在嵌合抗原受体中使用,因为它们可以被工程化以作为单链的部分与其他CAR组分被表达。参见Krause等人,J. Exp. Med., [实验医学杂志] 188 (4) : 619-626, 1998; Finney等人, Journal of Immunology [免疫学杂志], 161: 2791-2797, 1998。

[0086] 嵌合抗原受体掺入一个或多个共刺激(信号传导)结构域以增加其效力。参见美国专利号7,741,465和6,319,494,以及Krause等人和芬尼等人(前述), Song等人, Blood [血液] 119: 696-706 (2012); Kalos等人, Sci Transl. Med. [科学·转化医学] 3: 95 (2011); Porter等人, N. Engl. J. Med. [新英格兰医学杂志] 365: 725-33 (2011), 以及Gross等人, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. [药理学与毒理学年度评论] 56: 59-83 (2016)。适合的共刺激结构域可以来自(除其他来源外) CD28、CD28T、OX40、4-1BB/CD137、CD2、CD3(α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 γ 、 ξ)、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD27、CD30、CD 33、CD37、CD40、CD 45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1 (CD1 1a/CD18)、CD247、CD276 (B7-H3)、LIGHT (肿瘤坏死因子超家族成员14; TNFSF14)、NKG2C、Ig α (CD79a)、DAP-10、Fc γ 受体、MHC I类分子、TNF、TNFr、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子、BTLA、Toll配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、Nkp80 (KLRP1)、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD1-1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD1-1a、LFA-1、ITGAM、CD1-1b、ITGAX、CD1-1c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPGL (CD162)、LTBR、LAT、41-BB、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83配体、或其片段或组合。共刺激结构域可包含细胞外部分、跨膜部分和细胞内部分的一个或多个。

[0087] CAR还包括一个或多个激活结构域。CD3 ζ 是天然T细胞上T细胞受体的元件并且已显示是CAR内重要的细胞内激活元件。

[0088] CAR是跨膜蛋白,包含细胞外结构域,典型地包含能够识别并结合目的抗原的抗原结合蛋白,并且还包括“铰链”区域。另外是跨膜结构域和细胞内(胞质)结构域。

[0089] 细胞外结构域有利于信号传导和淋巴细胞对抗原的有效应答。来自本文所述的任何蛋白质或其任何组合。细胞外结构域可以衍生自合成或天然来源,诸如本文所述的蛋白质。细胞外结构域通常包含铰链部分。这是细胞外结构域的一部分,有时称为“间隔子”区。铰链可衍生自如本文所述的这些蛋白质,特别是上述共刺激蛋白质,以及免疫球蛋白(Ig)序列或其他合适的分子,以实现距靶细胞所需的特殊距离。

[0090] 跨膜结构域可以与该CAR的细胞外结构域融合。它可以类似地融合到CAR的细胞内结构域。该跨膜结构域可以衍生自合成或天然来源,诸如本文所述的蛋白质,特别是上述共刺激蛋白质。

[0091] 细胞内(胞质)结构域可以与跨膜结构域融合,并且可以提供免疫细胞的正常效应子功能中的至少一种的激活。T细胞的效应子功能例如可以是包括细胞因子的分泌的细胞溶解活性或辅助活性。细胞内结构域可以衍生自本文所述的蛋白质,特别是衍生自CD3。

[0092] 可以使用多种已知技术制备根据本发明的多核苷酸、多肽、载体、宿主细胞、免疫细胞、组合物等。

[0093] 本文中还提供包含如上文所述的至少一种核酸分子的呈质粒、表达载体、转录盒或表达盒形式的表达系统和构建体,以及包含这些表达系统或构建体的宿主细胞。如本文所用,“载体”意指适合用于将信息编码蛋白转移和/或转运至宿主细胞和/或特定位置和/或宿主细胞内的区室的任何分子或实体(例如,核酸、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒衣壳、病毒体、裸DNA、复合DNA等)。载体可以包括病毒和非病毒载体、非附加型哺乳动物载体。载体通常被称为表达载体,例如,重组表达载体和克隆载体。可以将载体引入宿主细胞以允许载体自身的复制,并从而扩增其中包含的多核苷酸的拷贝。克隆载体可含有序列组分,这些序列组分通常包括但不限于复制起点、启动子序列、转录起始序列、增强子序列和选择性标记物。这些元件可以由本领域普通技术人员适当选择。

[0094] 载体可用于对宿主细胞进行转化且含有指导及/或控制(连同宿主细胞一起)与其可操作地连接的一个或多个异源编码区的表达的核酸序列的载体。表达构建体可以包括但不限于影响或控制转录、翻译且在存在内含子时影响与其可操作地连接的编码区的RNA剪接的序列。“可操作地连接”意指该术语所适用的组分呈允许其执行其固有功能的关系。例如,在与蛋白质编码序列“可操作地连接”的载体中的控制序列(例如启动子)的排列使得该控制序列的正常活性导致该蛋白质编码序列的转录,从而导致所编码的蛋白质的重组表达。

[0095] 可选择在所采用的特定宿主细胞中具有功能性的载体(即,该载体与宿主细胞机构相容,从而允许可发生基因的扩增及/或表达)。在一些实施例中,所使用的载体采用使用诸如二氢叶酸还原酶的蛋白质报导序列的蛋白质片段互补测定(参见例如美国专利号6,270,964)。合适的表达载体是本领域已知的,并且也是可商购的。

[0096] 典型地,用于任何宿主细胞中的载体均将含有用于质粒维持及用于克隆及表达外源核苷酸序列的序列。此类序列典型地将包含以下核苷酸序列中的一个或多个:启动子、一个或多个增强子序列、复制起点、转录和翻译控制序列、转录终止序列、包含供体和受体剪接位点的完整内含子序列、各种改善糖基化或产量的前序列(pre-sequence/pro-sequence)、用于多肽分泌的天然或异源信号序列(前导序列或信号肽)、核糖体结合位点、聚腺苷酸序列、内部核糖体进入位点(IRES)序列、表达增强序列元件(EASE)、来自腺病毒2的三联体前导序列(TPA)和VA基因RNA、用于插入编码待表达多肽的多核苷酸的多接头区域以及选择性标记元件。可以从起始载体(诸如市售的载体)构建载体,可以单独获得其他元件并将其连接到载体中。用于获得各组分的方法是本领域技术人员众所周知的。

[0097] 载体组分可以是同源的(即,来自于与宿主细胞相同的物种及/或品系)、异源的(即,来自于除宿主细胞物种或品系以外的物种)、杂合的(即,来自于多于一个来源的侧接

序列的组合)、合成的或天然的。可通过本领域熟知的方法获得这些载体中有用的组分的序列,诸如先前通过作图和/或通过限制性核酸内切酶鉴定的那些。另外,它们可以通过聚合酶链式反应(PCR)和/或通过用合适的探针筛选基因组文库来获得。

[0098] 核糖体结合位点对于mRNA翻译起始而言通常为必需的且以Shine-Dalgarno序列(原核生物)或Kozak序列(真核生物)为特征。该元件典型地位于启动子的3'且在待表达的多肽的编码序列的5'。

[0099] 复制的起点有助于宿主细胞中载体的扩增。它们可以作为市售原核载体的一部分包括在内,也可以基于已知序列化学合成并连接到载体中。各种病毒来源(例如,SV40、多瘤病毒、腺病毒、水泡性口炎病毒(VSV)或乳头瘤病毒(诸如HPV或BPV))可用于在哺乳动物细胞中克隆载体。

[0100] 哺乳动物宿主细胞表达载体的转录和翻译控制序列可以从病毒基因组中切除。常用的启动子和增强子序列衍生自多瘤病毒、腺病毒2、猿猴病毒40(SV40)和人巨细胞病毒(CMV)。例如,可以使用即时早期基因1的人CMV启动子/增强子。参见,例如,Patterson等人(1994),*Applied Microbiol. Biotechnol.* [应用微生物学与生物技术] 40:691-98。衍生自SV40病毒基因组的DNA序列,例如,SV40来源、早期和晚期启动子、增强子、剪接序列和聚腺苷酸位点可用于提供其他遗传元件,用于在哺乳动物宿主细胞中表达结构基因序列。病毒早期和晚期启动子是特别有用的,因为它们都容易从病毒基因组中作为片段获得,也可以包含病毒复制起点(Fiers等人,(1978),*Nature* [自然] 273:113;Kaufman(1990),*Meth. in Enzymol.* [酶方法学] 185:487-511)。也可以使用更小或更大的SV40片段,前提是包括了从Hind III位点向位于SV40病毒复制起点的Bgl I位点延伸的约250bp序列。

[0101] 转录终止序列典型地位于多肽编码区的3'端且用于终止转录。通常,原核细胞中的转录终止序列为富G-C片段,继之以聚T序列。虽然序列可自文库中容易地克隆或甚至作为载体的一部分而购自市面,但其还可使用本领域技术人员已知的那些核酸合成方法容易地合成。

[0102] 选择性标记基因编码在选择性培养基中生长的宿主细胞的存活及生长所必需的蛋白质。典型的选择标记基因编码如下蛋白质:(a)赋予针对抗生素或其他毒素(例如,对于原核宿主细胞,胺苄青霉素、四环素或卡那霉素)的抗性;(b)补充细胞的营养缺陷;或(c)提供不可得自复杂培养基或限定培养基的重要营养物。特定选择性标记物为卡那霉素抗性基因、胺苄青霉素抗性基因及四环素抗性基因。有利地,新霉素抗性基因还可用于在原核及真核宿主细胞中进行选择。

[0103] 其他可选择基因可用于扩增将表达的基因。扩增为如下的过程:其中使产生对生长或细胞存活非常重要的蛋白质所需的基因在重组细胞连续世代的染色体串联重复。哺乳动物细胞的合适的选择性标记的实例包括谷氨酰胺合酶(GS)/蛋氨酸亚砷亚胺(MSX)系统、二氢叶酸还原酶(DHFR)和无启动子的胸苷激酶基因。使哺乳动物细胞转化株处于选择压力下,其中由于载体中存在可选择基因,故仅转化株唯一适于存活。通过在连续增加培养基中选择剂的浓度的条件下培养经转化细胞,由此使可选择基因和编码目的蛋白的DNA扩增来施加选择压力。因此,由经扩增的DNA合成增加量的目的多肽。

[0104] 在一些情况下,诸如在真核宿主细胞表达系统中需要糖基化时,可操纵各种前序列或前序列以改善糖基化或产率。举例而言,可改变特定信号肽的肽酶裂解位点,或添加还

可影响糖基化的前序列。最终蛋白质产物可以在-1位(相对于成熟蛋白质的第一个氨基酸)具有一个或多个易于表达的另外的氨基酸,这些氨基酸可能未完全移除。举例而言,最终蛋白质产物可具有一或两个与氨基末端附接的在肽酶裂解位点发现的氨基酸残基。可替代地,若酶在成熟多肽内的酶裂解位点区域进行切割,则一些酶裂解位点的使用可产生所要多肽的稍微截短形式。

[0105] 表达和克隆典型地将含有被宿主生物体识别且可操作地连接至编码目的蛋白的分子的启动子。启动子为位于控制结构基因转录的结构基因起始密码子(一般在约100至1000bp内)上游(即,5')的非转录序列。启动子通常分组为两种类别:诱导型启动子及组成型启动子。诱导型启动子起始处于其控制下的DNA响应于培养条件的某种变化(诸如营养素的存在或不存在,或者温度变化)以提高的水平转录。另一方面,组成型启动子一致地转录其可操作地连接的基因,即,对基因表达具有极小控制或无控制。许多由多种潜在宿主细胞识别的启动子是众所周知的。

[0106] 用于酵母宿主的适合启动子在本领域中也是众所周知的。酵母增强子宜与酵母启动子一起使用。用于哺乳动物宿主细胞的适合启动子是众所周知的,且包括但不限于获自病毒基因组的那些启动子,这些病毒为诸如多形瘤病毒、传染性上皮瘤病毒、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头状瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、B型肝炎病毒及猿猴病毒40(SV40)。其他适合哺乳动物启动子包括异源哺乳动物启动子,例如热休克启动子及肌动蛋白启动子。

[0107] 可能有意义的其他启动子包括但不限于:SV40早期启动子(Benoist和Chambon, 1981, Nature [自然] 290:304-310);CMV启动子(Thornsen等人, 1984, Proc.Natl.Acad.U.S.A.[美国国家科学院院刊]81:659-663);劳斯氏肉瘤病毒3'长末端重复序列中包含的启动子(Yamamoto等人, 1980, Cell [细胞] 22:787-797);疱疹病毒胸苷激酶启动子(Wagner等人, 1981, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]78:1444-1445);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);来自金属硫蛋白基因的启动子和调节序列(Prinster等人, 1982, Nature [自然] 296:39-42);以及原核启动子,诸如 β -内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff等人, 1978, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]75:3727-3731);或tac启动子(DeBoer等人, 1983, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]80:21-25)。有意义的还有以下动物转录控制区,它们表现出组织特异性并已用于转基因动物中:在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶I基因控制区(Swift等人, 1984, Cell [细胞] 38:639-646;Ornitz等人, 1986, Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.[冷泉港定量生物学研讨会]50:399-409;MacDonald, 1987, Hepatology [肝脏病学] 7:425-515);在胰腺 β 细胞中有活性的胰岛素基因控制区(Hanahan, 1985, Nature [自然] 315:115-122);在淋巴样细胞中有活性的免疫球蛋白基因控制区(Grosschedl等人, 1984, Cell [细胞] 38:647-658;Adames等人, 1985, Nature [自然] 318:533-538;Alexander等人, 1987, Mol.Cell.Biol.[分子细胞生物学] 7:1436-1444);在睾丸细胞、乳腺细胞、淋巴样细胞和肥大细胞中有活性的小鼠乳腺肿瘤病毒控制区(Leder等人, 1986, Cell [细胞] 45:485-495);在肝脏中有活性的白蛋白基因控制区(Pinkert等人, 1987, Genes and Devel.[基因与发育] 1:268-276);在肝脏中有活性的甲胎蛋白基因控制区(Krumlauf等人, 1985, Mol.Cell.Biol.[分子细胞生物学] 5:1639-1648;Hammer等人, 1987, Science [科学] 253:

53-58);在肝脏中有活性的 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶基因控制区(Kelsey等人,1987,Genes and Devel.[基因与发育]1:161-171);在髓样细胞中有活性的 β -珠蛋白基因控制区(Mogram等人.,1985,Nature[自然]315:338-340;Kollias等人.,1986,Cell[细胞]46:89-94);在大脑的少突胶质细胞中有活性的髓磷脂碱性蛋白基因控制区(Readhead等人,1987,Cell[细胞]48:703-712);在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链-2基因控制区(Sani,1985,Nature[自然]314:283-286);以及在下丘脑中有活性的促性腺激素释放激素基因控制区(Mason等人,1986,Science[科学]234:1372-1378)。

[0108] 可将增强子序列插入该载体中以增加高等真核生物的转录。增强子为DNA的顺式作用元件,长度通常为约10-300bp,作用于启动子以增加转录。增强子在方向及位置方面为相对独立的,已见于转录单元的5'及3'位置。已知可得自哺乳动物基因的若干增强子序列(例如,球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白及胰岛素)。然而,典型地使用来自于病毒的增强子。本领域中已知的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒增强子和腺病毒增强子是用于激活真核启动子的例示性强化元件。尽管增强子可以定位于载体中编码序列的5'或3',但其典型地位于启动子5'的位点处。

[0109] 可将编码适当天然或异源信号序列(前导序列或信号肽)的序列并入表达载体中,以促进目的蛋白的细胞外分泌。信号肽或前导序列的选择取决于待产生目的蛋白的宿主细胞的类型,且异源信号序列可替换天然信号序列。在哺乳动物宿主细胞中具有功能性的信号肽的实例包括以下:美国专利号4,965,195中所描述的内分泌素-7的信号序列;Cosman等人,1984,Nature[自然]312:768中所描述的内分泌素-2受体的信号序列;欧洲专利号0367 566中所描述的内分泌素-4受体信号肽;美国专利号4,968,607中所描述的内分泌素-1受体信号肽;欧洲专利号0 460 846中所描述的内分泌素-1受体信号肽。

[0110] 显示出改善来自哺乳动物表达载体的异源基因表达的其他控制序列包括诸如以下的元件:衍生自CHO细胞的表达增强序列元件(EASE)(Morris等人,Animal Cell Technology[动物细胞技术],第529-534页(1997);美国专利号6,312,951 B1、6,027,915和6,309,841 B1)以及来自腺病毒2的三联体前导序列(TPL)和VA基因RNA(Gingeras等人(1982),J.Biol.Chem.[生物化学杂志]257:13475-13491)。病毒来源的内部核糖体进入位点(IRES)序列使双顺反子mRNA得以有效翻译(Oh和Sarnow(1993)Current Opinion in Genetics and Development[遗传学与发育新见]3:295-300;Ramesh等人(1996),Nucleic Acids Research[核酸研究]24:2697-2700)。

[0111] 在一个实施例中,本发明提供了载体,其包含编码如本文所述的piggyBac转座酶的核酸分子。在一个实施例中,该载体还包括piggyBac转座子,该piggyBac转座子包含编码至少一种目的蛋白的至少一种外源核酸分子序列的插入位点。在一个实施例中,该一种或多种外源核酸分子表达多种目的蛋白。在一个实施例中,该载体包括双顺反子或多顺反子构建体,这些构建体编码多种目的蛋白。在一个实施例中,该转座子至少包含piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。在一个实施例中,提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中,提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID

NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:13的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。

[0112] 在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,和/或在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在另一个相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该

piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0113] 在一个实施例中,可以将单个载体转染到细胞中,该单个载体包含如本文所述的piggyBac转座酶和包含编码至少一种目的蛋白的至少一种外源核酸序列的插入位点的转座子。在一个实施例中,本发明提供了编码如本文所述的piggyBac转座酶的核酸分子,进一步包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸分子,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。在一实施例中,该一种或多种外源核酸分子表达多种目的蛋白。在一个实施例中,该载体包括双顺反子或多顺反子构建体,这些构建体编码多种目的蛋白。

[0114] 在另一个实施例中,本发明提供了包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体和包含piggyBac转座子的第二载体,该piggyBac转座子包含编码至少一种目的蛋白的一种或多种外源核酸分子的插入位点,其中这两个载体可以共转染到细胞中。在相关的实施例中,该转座子至少包含piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。在一个实施例中,该一种或多种外源核酸分子表达多种目的蛋白。在一个实施例中,该载体包括双顺反子或多顺反子构建体,这些构建体编码多种目的蛋白。

[0115] 构建后,可将一种或多种载体插入合适的细胞中以进行扩增和/或多肽表达。表达载体向所选细胞的转化可以通过熟知的方法完成,包括转染、感染、磷酸钙共沉淀、电穿孔、核转染、显微注射、DEAE-右旋糖酐介导的转染、阳离子脂质介导的递送、脂质体介导的转染、微弹轰击、受体介导的基因递送,聚赖氨酸、组蛋白、壳聚糖和肽介导的递送。所选方法将部分随待使用的宿主细胞类型而变化。这些方法和其他合适的方法是本领域技术人员熟知的,并且在手册和其他技术出版物中进行了阐述,例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,[分子克隆:实验室手册],第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],纽约州冷泉港(2001)。

[0116] 如本文所用,术语“转化”是指细胞遗传特性的改变,当细胞被修饰以含有新的DNA或RNA时,该细胞就被转化。例如,细胞经由转染、转导或其他技术引入新的遗传材料,由其原始状态进行基因修饰,则该细胞就被转化了。转染或转导后,转化DNA可以通过物理整合进入细胞染色体与细胞的DNA重组,或者可以作为一个不被复制的游离元件被暂时维持,或者可以作为质粒独立复制。当转化的DNA随着细胞的分裂而复制时,细胞被认为已经“稳定地转化”了。

[0117] 如本文所用,术语“转染”是指通过细胞吸收外来或外源性DNA。许多转染技术在本领域中是熟知的,并在本文中披露。参见,例如,Graham等人,1973,Virology[病毒学]52:456;Sambrook等人,2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],同上;Davis等人,1986,Basic Methods in Molecular Biology[分子生物学基本方法],爱思唯尔;Chu等人,1981,Gene[基因]13:197。

[0118] 如本文所用,术语“转导”是指外来DNA经由病毒载体被引入细胞的过程。参见Jones等人,(1998).Genetics:principles and analysis.[遗传学:原理与分析].Boston:Jones&Bartlett Publ.[波士顿:琼斯和巴特利特出版社]。

[0119] 一种或多种“细胞”包括任何原核或真核细胞。细胞可以是离体细胞、体外细胞或

体内细胞,可以是单独的或作为高级结构(诸如组织或器官)的一部分。细胞包括“宿主细胞”,也称为“细胞系”,它们经基因工程化以表达具有商业或科学意义的多肽。宿主细胞典型地源自来自原代培养物的谱系,其可在培养中维持无限时间。基因工程化宿主细胞涉及用重组多核苷酸分子转染、转化或转导细胞,和/或以其他方式改变(例如,通过同源重组和基因激活或重组细胞与非重组细胞的融合)以引起宿主细胞表达所需的重组多肽。用于遗传工程细胞和/或细胞系以表达目的多肽的方法和载体是本领域技术人员熟知的;例如,各种技术在Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法],Ausubel等人编辑(Wiley&Sons,纽约,1990,以及季度更新);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册](冷泉实验室出版社,1989);Kaufman,R.J., Large Scale Mammalian Cell Culture[大规模哺乳动物细胞培养],1990,第15-69页。

[0120] 宿主细胞可以是任何原核细胞(例如大肠杆菌)或真核细胞(例如酵母、昆虫或动物细胞(例如CHO细胞))。可经由常规转化或转染技术将载体DNA引入原核或真核细胞中。原核宿主细胞包括真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如,肠杆菌科(Enterobacteriaceae)诸如埃希氏杆菌属(*Escherichia*)例如大肠杆菌(*E.coli*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷白氏杆菌属(*Klebsiella*)、变形杆菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)诸如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)、和志贺氏杆菌(*Shigella*)、还有芽孢杆菌属(*Bacillus*)例如枯草杆菌(*B.subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、以及链霉菌属(*Streptomyces*)。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。但是,许多其他属、种和菌株在本文中通常是可得到的和有用的,诸如毕赤酵母属(*Pichia*),例如巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*),粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*),耶氏酵母属(*Yarrowia*);假丝酵母属(*Candida*);瑞氏木霉(*Trichoderma reesia*);粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*),诸如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);以及丝状真菌,诸如脉孢菌属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*)和曲霉属(*Aspergillus*)宿主,诸如构巢曲霉(*A.nidulans*)和黑曲霉(*A.niger*)。

[0121] 动物细胞系衍生自其祖细胞来源于多细胞动物的细胞。一种动物细胞系是哺乳动物细胞系。适用于在培养中生长的多种哺乳动物细胞系可从美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection)(弗吉尼亚州马纳萨斯)和商业供应商处获得。行业中通常使用的细胞系的实例包括由SV40(COS-7、ATCC CRL 1651)转化的猴肾CV1系;人胚胎肾系(293细胞或亚克隆用于在悬浮培养中生长的293细胞,(Graham等人,J.Gen Virol.[普通病毒学杂志]36:59,1977);幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);小鼠塞托利细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.[生殖生物学]23:243-251,1980);猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝癌细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人,Annals N.Y Acad.Sci.[纽约科学院年报]383:44-68,1982);MRC 5细胞或FS4细胞;哺乳动物骨髓瘤细胞,以及许多其他细胞系和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。CHO细胞

广泛用于生产复合重组蛋白。二氢叶酸还原酶 (DHFR) 缺陷突变细胞系 (Urlaub等人 (1980), Proc Natl Acad Sci USA [美国国家科学院院刊] 77:4216-4220) DXB11和DG-44是理想的 CHO宿主细胞系,因为有效的DHFR可选择和可扩增基因表达系统允许在这些细胞中高水平表达重组蛋白 (Kaufman R.J. (1990), Meth Enzymol [酶方法学] 185:537-566)。还包括利用基于谷氨酰胺合成酶 (GS) 的甲硫氨酸亚砷亚胺 (MSX) 选择的谷氨酰胺合成酶 (GS) -敲除 CHOK1SV细胞系。还包括CHOK1细胞 (ATCC CCL61)。此外,这些细胞易于作为贴壁培养或悬浮培养操作,并表现出相对良好的遗传稳定性。CHO细胞和在其中重组表达的蛋白质已被广泛表征,并已被批准用于监管机构的临床商业制造。

[0122] 细胞还可包括单核细胞、外周血单核细胞、骨髓衍生的单核细胞、脐带血衍生的单核细胞、淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞、巨噬细胞、T细胞、幼稚T细胞、记忆T细胞、CD28⁺细胞、CD4⁺细胞CD8⁺细胞、CD45RA⁺细胞、CD45RO⁺细胞、自然杀伤细胞、造血干细胞、多能胚胎干细胞、诱导性多能干细胞或其组合。特别地,可以从供体或受试者中收集这些细胞,用以将这些细胞进行基因修饰并重新引入至供体或受试者的目的。

[0123] 在一个实施例中,提供了用由如本文所述核酸序列编码的piggyBac转座酶转染的细胞。在一个实施例中,本发明提供了用由SEQ ID NO:17或18的核酸序列编码的piggyBac转座酶转染的细胞。在一个实施例中,本发明提供了用载体转染的细胞,该载体包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中,本发明提供了用如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子与包含编码目的蛋白的核酸分子的载体转染的细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。在另一个实施例中,本发明提供了用包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体与包含编码目的蛋白的核酸序列的载体共转染的细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。在一个实施例中,本发明提供了用包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体与编码目的蛋白的核酸分子转染的细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。在相关的实施例中,该细胞是细胞系。在相关的实施例中,该细胞是宿主细胞。在相关的实施例中,该细胞是CHO细胞。在相关的实施例中,该细胞是免疫细胞。在相关的实施例中,与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由工程化piggyBac转座酶转染的细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。在一个实施例中,提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中,提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。

[0124] 在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:13的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。

[0125] 在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,和/或在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在另一个相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0126] 在一个实施例中,本发明提供了对编码piggyBac转座酶的核酸分子进行工程化以增加其在细胞中的稳定性,并用包含编码该工程化piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体与编码目的蛋白的核酸分子(该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重

复元件)转染该细胞,其中与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由用工程化piggyBac转座酶转染的细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。在一个实施例中,提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中,提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:13的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。

[0127] 在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,和/或在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在另一个相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID

N0:12、SEQ ID N0:14、或SEQ ID N0:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID N0:10或SEQ ID N0:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID N0:4的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID N0:6的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID N0:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID N0:10的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID N0:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID N0:14的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID N0:16的氨基酸序列。

[0128] 在一个实施例中,本发明提供了对编码piggyBac转座酶的核酸分子进行工程化以增加其在细胞中的稳定性,并用包含编码该工程化piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体与包含编码目的蛋白的核酸分子(该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件)的载体转染该细胞,其中与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由用工程化piggyBac转座酶转染的细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。

[0129] 还提供了用载体转染的宿主细胞,该载体包括编码目的蛋白且在适当条件下培养时表达目的蛋白的核酸。随后可以从培养基中收集表达的蛋白质(如果宿主细胞将其分泌到培养基中),或者直接从产生蛋白质的宿主细胞中收集(如果没有分泌)。适当宿主细胞的选择将取决于多种因素折叠,诸如所要表达水平、活性所需要或必需的多肽修饰(诸如糖基化或磷酸化)以及折叠成生物活性分子的容易性。

[0130] 在一个实施例中,本发明提供了由用载体转染的细胞表达的目的重组蛋白,该载体包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中,本发明提供了用包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体转染的细胞,该载体进一步包含编码目的蛋白的核酸序列,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。在一个实施例中,本发明提供了用包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体与包含编码目的蛋白的核酸分子(该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件)的载体共转染的细胞表达的目的重组蛋白。

[0131] 在一个实施例中,本发明提供了药物组合物,该药物组合物包含由用载体转染的细胞宿主表达的目的重组蛋白,该载体包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中,本发明提供了用包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体转染的宿主细胞,该载体进一步包含编码目的蛋白的核酸序列,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。在一个实施例中,本发明提供了药物组合物,该药物组合物包括用包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体与包含编码目的蛋白的核酸分子的载体共转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

[0132] “培养”(“culture”或“culturing”)是指细胞在多细胞生物体或组织外部的生长和繁殖。哺乳动物细胞的合适培养条件是本领域已知的。细胞培养基和组织培养基可互换地用于指在体外细胞培养期间适合宿主细胞生长的培养基。典型地,细胞培养基包含缓冲

液、盐、能源、氨基酸、维生素和痕量必需元素。可以使用能够支持适当宿主细胞在培养中生长的任何培养基。可以将细胞培养基进一步补充其他组分以最大化特定培养的宿主细胞中的细胞生长、细胞活力和/或重组蛋白生产,这样的细胞培养基是可商购的,并且包括RPMI-1640培养基、RPMI-1641培养基、杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)、伊格尔最低必需培养基、F-12K培养基、哈姆F12培养基、伊思考夫改良的杜尔贝科培养基、麦考伊5A培养基、Leibovitz L-15培养基以及无血清培养基,诸如EX-CELL™300系列等,这些培养基可以从美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection)或SAFC生物科学公司(SAFC Biosciences)以及其他供应商处获得。细胞培养基可以是无血清、无蛋白质、无生长因子和/或无蛋白胨的培养基。还可以通过添加营养来富集细胞培养物,并以高于其通常的、推荐的浓度使用。

[0133] 在培养过程中可以使用各种培养基配方,例如,以促进从一个阶段(例如,生长阶段或生长期)过渡到另一阶段(例如,生产阶段或生产期)和/或优化细胞培养期间的条件(例如在灌注培养过程中提供的浓缩培养基)。生长培养基配方可用于促进细胞生长并使蛋白质表达最小化。生产培养基配方可用于促进目的蛋白的生产和细胞的维持,同时使新细胞的生长减至最少。饲料培养基,典型地是包含在细胞培养物生产过程中消耗的较高浓度组分(诸如营养素和氨基酸)的培养基,可用于补充和维持活性培养物,特别是分批进料、半灌注或灌注模式的培养物。这种浓缩的饲料培养基可以包含大多数细胞培养基组分,例如,其正常量的约 $5\times$ 、 $6\times$ 、 $7\times$ 、 $8\times$ 、 $9\times$ 、 $10\times$ 、 $12\times$ 、 $14\times$ 、 $16\times$ 、 $20\times$ 、 $30\times$ 、 $50\times$ 、 $100\times$ 、 $200\times$ 、 $400\times$ 、 $600\times$ 、 $800\times$ 或甚至约 $1000\times$ 。

[0134] 生长期可以在比生产期更高的温度下进行。例如,生长期可以在约 35°C 至约 38°C 的第一温度下进行,并且生产期可以在约 29°C 至约 37°C ,任选地约 30°C 至约 36°C 或约 30°C 至约 34°C 的第二温度下进行。可以在温度变化之前和/或之后,或代替温度变化的同时添加蛋白质产生的化学诱导剂,诸如像咖啡因、丁酸酯和六亚甲基双乙酰胺(HMBA)。如果在温度变化后添加诱导剂,则可以在温度变化后1小时至5天,任选地在温度变化后1至2天添加诱导剂。

[0135] 宿主细胞可以悬浮或粘附形式培养,附着在固体基质上。可以在带有或不带有微载体的流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶、摇瓶或搅拌式生物反应器中建立细胞培养

[0136] 细胞培养可以分批、补料、连续、半连续或灌注模式进行。哺乳动物细胞(诸如CHO细胞)可以在生物反应器中以小于100ml至小于1000ml的小规模培养,容量达2,000升以上的较中等范围规模培养,和以容量超过20,000升的更大规模培养。中等和大规模细胞培养,诸如用于蛋白质治疗剂的临床和/或商业规模生物制造的细胞培养,可维持数周甚至数月,在此期间细胞产生所需的一种或多种蛋白质。

[0137] 然后可以从细胞培养基中收获所产生的表达的重组蛋白。从悬浮细胞中收获蛋白质的方法是本领域已知的,并且包括但不限于酸沉淀、加速沉降(诸如絮凝)、使用重力分离、离心、声波分离、过滤(包括使用超滤器、微滤器、切向流过滤器、替代切向流过滤器、深度过滤器和冲积过滤器的膜过滤)。通过包含本领域已知的氧化还原折叠过程的方法,从细胞质中的包涵体中回收由原核生物表达的重组蛋白。

[0138] 然后,可以使用一个或多个单元操作从任何杂质,诸如剩余的细胞培养基、细胞提

取物、不需要的组分、宿主细胞蛋白、表达不正确的蛋白等中纯化或部分纯化收获的蛋白。术语“单元操作”是指作为纯化目的重组蛋白的过程的一部分而执行的功能步骤。例如,单元操作可包括,诸如但不限于捕获、纯化、精制、病毒灭活、病毒过滤、浓缩和/或配制目的重组蛋白的步骤。可以将单元操作设计为实现单个目标或多个目标,诸如捕获和病毒灭活步骤。单元操作还可以包括加工步骤之间的保持或存储步骤。

[0139] 捕获单元操作可包括利用树脂和/或含有与目的重组蛋白结合的试剂的膜进行捕获色谱,例如亲和色谱、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、疏水相互作用色谱(HIC)、固相金属亲和色谱(IMAC)等。这样的材料是本领域已知的并且可以是商购的。亲和色谱,例如可以利用抗体或抗体片段结合的捕获机制,诸如蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L结合。目的重组蛋白可以用聚组氨酸标签标记随后使用咪唑通过IMAC纯化,或者使用表位(诸如FLAG[®])标记随后使用针对该表位的特异性抗体进行纯化。

[0140] 包括灭活、减少和/或消除病毒污染物的单元操作可以包括操纵环境和/或过滤的过程。实现病毒灭活的一种方法是在低pH(例如,pH<4)或其他溶液条件(诸如温度或化学组成)下孵育,以实现病毒灭活。在低pH病毒灭活之后,可以进行中和单元操作,该操作将重新调节经过病毒灭活的溶液至更符合后续单元操作要求的pH值。随后还可以进行过滤,诸如深度过滤,以除去任何产生的浑浊或沉淀。可以使用微滤器或纳滤器进行病毒过滤,诸如可以从旭化成株式会社(Plavona[®])和EDM Millipore(VPro[®])获得的那些。

[0141] 精制单元操作可以利用各种色谱方法来纯化目的蛋白并清除污染物和杂质,诸如DNA,宿主细胞蛋白;去除产物特异性杂质、变体产物和聚集体、病毒吸附等。精制色谱仪单元操作使用的树脂和/或膜含有可以以“流通模式”(其中目的蛋白包含在洗脱液中并且污染物和杂质结合到色谱介质上)或“结合并洗脱模式”使用的试剂,其中目的蛋白结合到色谱介质上并且在污染物和杂质流过色谱介质或从色谱介质上洗掉后洗脱。这样的色谱方法的实例包括离子交换色谱(IEX),诸如阴离子交换色谱(AEX)和阳离子交换色谱(CEX);疏水相互作用色谱(HIC);混合模式或多模式色谱(MM)、羟基磷灰石色谱(HA);反相色谱和凝胶过滤,仅举几例来说。

[0142] 可以通过超滤和渗滤来实现目的蛋白的产物浓缩和缓冲液交换成所需的配制品缓冲液以用于原料药的大量储存。

[0143] 可以测量关键属性和性能参数,以更好地指导有关制造过程中每个步骤性能的决策。这些关键属性和参数可以实时监测、近实时监测和/或事后监测。可以测量主要的关键参数,诸如消耗的培养基组分(诸如葡萄糖)、累积的代谢副产物(诸如乳酸和氨)的水平、以及与细胞维持和存活相关的参数,诸如溶解氧含量。关键属性,诸如比生产率、活细胞密度、pH、摩尔渗透压浓度、外观、颜色、聚集、产率百分比和滴度,可在过程中和过程后进行监测。可以使用已知技术和可商购的设备进行监测和测量。

[0144] 滴度可以使用本领域已知的方法来测量。例如,滴度可以通过使用亲和色谱的反相HPLC分析来测量,其中蛋白A被固定在柱载体上。在中性pH值下,抗体分子通过Fc区与蛋白A结合,而宿主细胞蛋白、条件培养基组分和缓冲液则在流通中从色谱柱中洗脱出来。捕获的抗体在酸性pH下洗脱,并通过280nm处的UV吸收进行检测。可以使用线性回归分析从通用抗体标准品和相应的峰面积获得校准曲线。然后,根据校准曲线以及通用抗体标准品和所测试抗体的消光系数之比,计算出测试样品中抗体的浓度。

[0145] 其他方法包括但不限于ELISA;HTRF (均相时差式荧光) (美国浣思公司(Cisbio US), 马萨诸塞州贝德福德);和Berkley Lights Beacon平台 (加利福尼亚州埃默里维尔)。

[0146] 还提供了包含由细胞宿主表达的目的重组蛋白的药物组合物, 该宿主细胞用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体转染。此类药物组合物包括目的蛋白或表达目的蛋白的细胞, 诸如表达CAR和TCR的免疫细胞, 以及一种或多种药学或生理上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。此类组合物可以包含缓冲剂, 诸如中性缓冲盐溶液、磷酸盐缓冲盐溶液等; 碳水化合物, 诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇; 蛋白质; 多肽或氨基酸, 诸如甘氨酸; 抗氧化剂; 螯合剂, 诸如EDTA或谷胱甘肽; 佐剂 (例如, 氢氧化铝); 以及防腐剂。

[0147] 这些药物组合物 (溶液、悬浮液等) 可包含以下一种或多种: 无菌稀释剂, 诸如注射用水、盐溶液, 优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠, 固定油, 诸如可用作溶剂或悬浮介质的合成的单甘油酯或二甘油酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇, 或其他溶剂; 抗菌剂, 诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯; 抗氧化剂, 诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠; 螯合剂, 诸如乙二胺四乙酸; 缓冲剂, 诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐; 以及用于调节张力的试剂, 诸如氯化钠或葡萄糖。胃肠外制剂可以被封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0148] 在一个实施例中, 本发明提供了用于改善由宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度的方法, 该方法包括对编码piggyBac转座酶的核酸分子进行工程化以增加在宿主细胞中的稳定性, 用编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子与包含编码目的蛋白的核酸序列 (该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件) 的载体共转染宿主细胞, 以及培养这些细胞以表达目的重组蛋白质, 其中与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比, 由用工程化piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。在相关的实施例中, 用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的第一载体与包含编码目的蛋白的核酸序列的第二载体转染该宿主细胞, 该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。在相关的实施例中, 用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的单个载体与编码目的蛋白的核酸序列转染该宿主细胞, 该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。在一个实施例中, 提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中, 提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面, 本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面, 本发明提供了由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面, 本发明提供了由SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面, 本发明提供了由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面, 本发明提供了由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面, 本发明提供了由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面, 本发明提供了由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面, 本发明提供了由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面, 本发明提供了由SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面, 本发明提供了由SEQ ID NO:13的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面, 本发明提供了由SEQ ID NO:15的核酸序

列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。

[0149] 在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,和/或在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在另一个相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0150] 在一个实施例中,本发明提供了用于增加表达重组蛋白的哺乳动物细胞培养物中重组蛋白的产生的方法,该方法包括使用宿主细胞在生物反应器中建立细胞培养物,该宿主细胞已经用经工程化以增加在该宿主细胞中的稳定性的核酸分子与包含编码目的蛋白的核酸分子的载体共转染,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的反向重复元件;以及表达目的重组蛋白;其中与由野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由工程化piggyBac转座酶转染的宿主细胞

表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。在相关的实施例中,用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的第一载体与包含编码目的蛋白的核酸序列的第二载体转染该宿主细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。在相关的实施例中,用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的单个载体与编码目的蛋白的核酸序列转染该宿主细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。在一个实施例中,提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中,提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:13的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。

[0151] 在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,和/或在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在另一个相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ

ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0152] 在一个实施例中,本发明提供了用于生产分离、纯化的目的重组蛋白的方法,该方法包括用表达目的重组蛋白的宿主细胞在生物反应器中建立细胞培养物,其中该细胞系已经用编码piggyBac转座酶的核酸序列与包含编码目的蛋白的核酸序列的载体共转染,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在该宿主细胞中的稳定性,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件;对这些细胞进行培养以表达该目的重组蛋白;收获目的重组蛋白,通过一个或多个单元操作加工该目的重组蛋白,并获得分离、纯化的目的重组蛋白。在相关的实施例中,用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的第一载体与包含编码目的蛋白的核酸序列的第二载体转染该宿主细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。在相关的实施例中,用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的单个载体与编码目的蛋白的核酸序列转染该宿主细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。在相关的实施例中,至少一个单元操作是选自亲和色谱、离子交换色谱、阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、多模式色谱、疏水相互作用色谱和羟基磷灰石色谱的捕获色谱步骤。在另一个实施例中,至少一个单元操作是选自离子交换色谱、阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、多模式色谱、疏水相互作用色谱和羟基磷灰石色谱的精制色谱步骤。在另一个实施例中,至少一种单元操作选自病毒灭活、病毒过滤、深度过滤和UF/DF。在相关的实施例中,与由用野生型piggyBac转座酶转染或未用piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度相比,由用工程化piggyBac转座酶转染的宿主细胞表达的目的重组蛋白的滴度得到了改善。在另一个实施例中,提供了通过该方法产生的分离、纯化的目的重组蛋白。在另一个实施例中,提供了包含分离的目的蛋白的药物组合物。在一个实施例中,提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中,提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座

酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:13的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。

[0153] 在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,和/或在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在另一个相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了

piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0154] 在一个实施例中,本发明提供了用于转染细胞的试剂盒,该试剂盒包含含有编码piggyBac转座酶的核酸序列的载体,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在该宿主细胞中的稳定性;以及至少包含piggyBac转座子的最小反向重复元件的载体,该piggyBac转座子中插入了编码目的蛋白的核酸序列。在一个实施例中,提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中,提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:13的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。

[0155] 在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,和/或在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在另一个相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了

piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0156] 本文所述的piggyBac转座酶可以用作piggyBac转座子系统的一部分用于基因转移;生产细胞系;与基因工程有关的应用,诸如基因修饰细胞、产生基因组修饰;用于种系或体细胞诱变;用于介导基因转移;表征基因;确定基因功能;致癌基因筛选;基因治疗;多能干细胞的产生;以及非人类转基因动物(参见,例如US 2013/0209426;US 2010/0311116;Vanden Driessche等人,Blood[血液]114(8):1461-1468,2009;Yusa K,等人,Nat.Methods.[自然方法]6(5):363-369,2009;Wilson等人,Mol.Ther.[分子疗法]15(1):139-145,2007;Landrette等人,PLoS ONE[公共科学图书馆·综合]6(10):1-12,2011;Nakanishi等人,Molecular Therapy[分子疗法]18(4):707-714,2010;Zhao等人,Transl Lung Cancer Res.[肺癌转化研究],5(1):120-125,2016;Wilson等人,Molecular Therapy[分子疗法]15(1):139-145,2007)。

[0157] 本文所述的piggyBac转座酶可用于基因组编辑。本文所述的piggyBac转座酶可以用作piggyBac转座子/转座酶系统的一部分,其益处在于它提供了有效的非病毒递送以整合入原代细胞类型或干细胞。本文所述的piggyBac转座酶可用于非病毒递送编码嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR) α 和 β 链的基因,以及编码蛋白质(诸如细胞因子、检查点抑制剂和其他蛋白质)的其他基因以工程化细胞。多个基因可以在单个基因构建体中递送。与病毒转导相比的优势在于可以容纳更大的基因运载量,并且该转座酶可提高非病毒转染中整合的效率。这种系统还可以与其他非病毒基因组编辑技术结合使用,诸如锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)、规律间隔成簇短回文重复序列-(CRISPR-)相关蛋白9(Cas9)、整合酶(诸如PhiC3相整合酶)、转录激活因子样效应物(TALES)、序列特异性重组酶和其他转座子/转座酶系统(诸如Sleeping Beauty),以实现在多种细胞中的转导(US 2015/0031132;WO 2018/098671;Ivics等人,Cell[细胞]91(4):501-510,1997;Boch等人,Science[科学]326(5959):1509-1512,2009;Christian等人,Genetics[遗传学]186(2):757-761,2010;Wilber等人,Stem Cells Int[国际干细胞研究];卷:2011:文章编号717069,2011;Yusa等人,Nature[自然]478,10月20日,391-396,2011;Silva等人,Curr Gene Ther[当今基因疗法]11(1):11-27,2011;Cong等人,Science[科学]339(6121):819-823,2013;Mali等人,Science[科学]339(6121):823-826,2013.Li等人,Molecular Therapy:Nucleic Acids[分子疗法:核酸]第8卷9月,64-76,2017;以及Ishida等人,

www.nature/Scientific Reports 8,文章编号310,2018)。

[0158] 本文所述的piggyBac转座酶可以用作piggyBac转座子系统的一部分,以稳定地以非病毒方式用编码CAR、TCR和/或其他蛋白质的基因构建体转染细胞。天然T细胞可以(i)从患者(受试者)或供体中除去,(ii)使用包含本文所述的piggyBac转座酶的piggyBac转座子/转座酶系统进行基因工程化,以表达一种或多种嵌合抗原受体、T细胞受体和/或与至少一种目的抗原结合的其他蛋白质,(iii)通过细胞培养扩展为更多的工程化T细胞群体,以及(iv)重新引入患者体内。在将工程化的T细胞重新引入患者体内后,它们介导针对表达该抗原的细胞的免疫应答。参见,例如美国专利号7,741,465和6,319,494;美国专利公开号2017/0355957;Nakazawa等人,J. Immunotherapy[免疫治疗杂志]32(8):826-836;2009;Nakazawa等人,Molecular Therapy[分子疗法]19(12):2133-2143,2011;Eshhar等人,Cancer Immunol Immunotherapy[癌症免疫学免疫疗法](1997)45:131-136;Finney等人,Journal of Immunology[免疫学杂志],161:2791-2797,1998;Krause等人,J. Exp. Med.[实验医学杂志],188(4):619-626,1998;该免疫应答包括T细胞分泌IL-2和其他细胞因子,识别该抗原的T细胞的克隆扩增,以及T细胞介导的阳性靶细胞的特异性杀伤。参见Hombach等人,Journal of Immunol.[免疫学杂志]167:6123-6131(2001)。

[0159] 免疫细胞可从受试者中获得。在一些实施例中,免疫细胞包含T细胞。T细胞可以从许多来源获得,包括外周血单核细胞(PBMC)、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在某些实施例中,T细胞可以使用本领域技术人员已知的任何数量的技术(诸如FICOLL™分离)从受试者收集的血液单位获得。细胞可优选地通过单采从个体的循环血液中获得。单采产物典型地含有淋巴细胞(包括T细胞)、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞、和血小板。在某些实施例中,可以洗涤通过单采收集的细胞以除去血浆级分,并将其置于合适的缓冲液或培养基中用于后续处理。可以用PBS洗涤细胞。应当认识到的是,可以使用洗涤步骤,诸如通过使用半自动流式离心机-例如Cobe™2991细胞处理器,Baxter CytoMate™等。洗涤后,可将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液或含有或不含缓冲液的其他盐水溶液中。在某些实施例中,可以去除单采样品的不希望的组分。

[0160] 在某些实施例中,通过裂解红细胞和耗尽单核细胞从PBMC分离T细胞,例如,使用通过PERCOLL™梯度的离心。可以通过本领域已知的阳性或阴性选择技术进一步分离T细胞的特定子群,诸如CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺T细胞。例如,通过阴性选择富集T细胞群可以用针对阴性选择的细胞特有的表面标志物的抗体组合来实现。本文使用的一种方法是经由阴性磁免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,其使用针对阴性选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物典型地包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。流式细胞术和细胞分选也可用于分离用于本发明的目的细胞群。

[0161] 可以直接使用PBMC用于使用如本文所述的方法采用基因构建体(诸如CAR或TCR)进行基因修饰。在某些实施例中,在分离PBMC后,可以进一步分离T淋巴细胞,并且可以在遗传修饰和/或扩增之前或之后将细胞毒性和辅助性T淋巴细胞分选为初始、记忆和效应T细胞亚群。

[0162] 在一些实施例中,通过鉴定与这些类型的CD8⁺细胞中的每一种相关的细胞表面抗

原,将CD8⁺细胞进一步分选为初始、中枢记忆和效应细胞。在一些实施例中,中枢记忆T细胞的表型标志物的表达包括CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和CD127,并且对于颗粒酶B是阴性的。在一些实施例中,中枢记忆T细胞为CD45RO⁺、CD62L⁺、CD8⁺T细胞。在一些实施例中,效应T细胞对CD62L、CCR7、CD28和CD127是阴性的,对于颗粒酶B和穿孔素是阳性的。在某些实施例中,CD4⁺T细胞进一步分选为亚群。例如,通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,可以将CD4⁺T辅助性细胞分选为初始、中枢记忆和效应细胞。

[0163] 这些免疫细胞,诸如T细胞,可以在分离后使用一种或多种载体进行基因修饰,该一种或多种载体包含编码一种或多种CAR和本文所述的piggyBac转座酶的一种或多种核苷酸序列,作为piggyBac转座子/转座酶系统的一部分。非病毒基因修饰免疫细胞可以通过用包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体与编码至少一种CAR、TCR和/或其他目的蛋白(其侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件)的至少一种核酸序列转染细胞而获得。基因修饰免疫细胞也可以通过用包含如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的第一载体和包含编码至少一种CAR、TCR和/或其他目的蛋白(其侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件)的至少一种核酸序列的第二载体共转染免疫细胞而获得。可以使用本领域已知的任何合适方法将这些载体引入宿主细胞,诸如通过电穿孔或核转染。在另外的一个实施例中,不同表达载体的混合物可用于基因修饰供体免疫效应细胞群,其中每个载体编码不同CAR、TCR或其他目的蛋白。得到的转化的免疫效应细胞形成混合的工程化的细胞群,其中一部分工程化的细胞表达多于一种不同的CAR、TCR和/或其他目的蛋白。

[0164] 还包括通过编码导致功能性活性有毒产物的酶来允许在前药施用后选择性消除经修饰的细胞的自杀基因,该功能性活性有毒产物有利于细胞凋亡的激活或抑制细胞增殖,从而使不良事件减到最少。还可以包括可诱导“开启”或“加速器”开关。合适的技术包括用CAR或TCR构建体转染细胞之前、之后或同时使用诱导型胱天蛋白酶-9(美国公开申请2011/0286980)或胸苷激酶。用于引入自杀基因和/或“开启”开关的另外的方法包括TALENs、锌指、RNAi、siRNA、shRNA、反义技术和本领域已知的其他技术。

[0165] 在进行基因修饰之前,可以在体外激活和扩增免疫细胞(或者如果是祖细胞的情况则进行分化)。激活和扩增T细胞的方法是本领域已知的,并且描述于,例如美国专利号6,905,874;美国专利号6,867,041;美国专利号6,797,514;以及PCT WO 2012/079000。通常,此类方法包括在具有适当细胞因子诸如IL-2的培养基中使PBMC或分离的T细胞与刺激剂和共刺激剂接触,诸如抗CD3和抗CD28抗体,通常附着于珠子或其他表面。附着于相同珠子的抗CD3和抗CD28抗体充当“替代”抗原呈递细胞(APC)。一个实例是Dynabeads[®]系统,一种用于人T细胞生理激活的CD3/CD28激活剂/刺激系统。

[0166] 在其他实施例中,可以用饲养细胞和适当的抗体和细胞因子使用诸如如下所述的那些的方法激活和刺激T细胞增殖:美国专利号6,040,177;美国专利号5,827,642;和WO 2012129514,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0167] PBMC可进一步包括其他细胞毒性淋巴细胞,诸如NK细胞、NKT细胞或造血干细胞。携带如本文披露的嵌合受体的编码序列的表达载体可以引入人供体T细胞、NK细胞、NKT细胞、单核细胞或造血干细胞的群中。

[0168] 使用标准程序用于冷藏保存表达CAR或TCT的细胞,用于储存和/或制备用于在人

受试者中使用。这涉及冷藏保存免疫细胞,使细胞在解冻后保持活力。表达CAR的一部分免疫细胞可以通过本领域已知的方法冷藏保存,以提供此类细胞的永久来源,用于将来治疗患有恶性肿瘤的患者。需要时,冷藏保存的转化免疫细胞可以解冻、生长和扩增以获得更多此类细胞。

[0169] 如本文所用,“冷藏保存”是指通过冷却至零下的温度来保存细胞,诸如(典型地)77开尔文或-196°C。低温保护剂通常在零下的温度下使用,以保护细胞免受因低温冷冻或升温至室温而受到损坏。冷冻保存剂和最佳的冷却速率可以防止细胞损伤,并且是本领域已知的。防冻剂包括但不限于二甲基亚砜(DMSO)(Lovelock&Bishop,Nature[自然](1959);183:1394-1395;Ashwood-Smith,Nature[自然](1961);190:1204-1205)、甘油、聚维酮(Rinfret,Ann.N.Y.Acad.Sci.[纽约科学院年报](1960);85:576)和聚乙二醇(Sloviter&Ravdin,Nature[自然](1962);196:48)。

[0170] 然后配制细胞以重新引入受试者。通过首先从细胞培养基中收获细胞,然后将细胞洗涤并浓缩在适于给药的培养基和容器系统(“药学上可接受的”载体)中以治疗有效量来配制细胞。合适的输注介质可以是任何等渗培养基配制品,典型地是生理盐水,Normosol™R(Abbott)或Plasma-Lyte™A(Baxter),但也可以使用5%葡萄糖水溶液或林格氏乳酸盐。输注介质可以补充人血清白蛋白。

[0171] 组合物中所希望的治疗量的细胞通常为至少2个细胞(例如,至少1个CD8⁺中枢记忆T细胞和至少1个CD4⁺辅助性T细胞亚群)或更典型地大于10²个细胞,并且高达10⁶个,多达并且包括10⁸或10⁹个细胞,并且可以超过10¹⁰个细胞。细胞数量取决于组合物所希望的用途,以及其中包含的细胞类型。对于在进行治疗的患者,该细胞可以是自体、同种异体或异源的。

[0172] 表达CAR、TCR和/或其他目的蛋白的细胞群可以单独施用,或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分如IL-2或其他细胞因子或细胞群组合施用。

[0173] 提供了使用这些工程化细胞治疗病症、疾病或障碍的方法。此类病症、疾病或障碍包括癌症、肿瘤、实体瘤、血液疾病、白血病、淋巴瘤、病毒感染、炎症性疾病或障碍和/或自身免疫性疾病或障碍。在一些实施例中,本发明涉及在受试者中产生T细胞介导的免疫应答,包括向受试者施用有效量的本申请的工程化的免疫细胞。在一些实施例中,T细胞介导的免疫应答直接针对靶细胞或细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞包含表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)和/或其他目的蛋白的基因构建体。在一些实施例中,该靶细胞是肿瘤细胞。在一些方面,本发明包括治疗或预防恶性肿瘤的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的至少一种本文所述的分离的抗原结合分子。在一些实施例中,本发明包括用于治疗或预防恶性肿瘤的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的至少一种免疫细胞,其中该免疫细胞包含编码至少一种如本文所述的嵌合抗原受体、T细胞受体和/或分离的抗原结合分子的基因构建体。在一些方面,本发明包括用于治疗或预防炎症和/或自身免疫性疾病的方法。本发明还提供了使用支持移植程序的方法,诸如针对移植组织/器官上错配的HLA分子的细胞疗法。在一些实施例中,该靶细胞是胰岛。

[0174] 在一个实施例中,本发明提供了产生非病毒基因修饰细胞的方法,该方法包括:(a)建立包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件;(b)从供体或受试者中分离天然免疫细胞;(b)

使用编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子与包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体共转染这些宿主细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件;以及(c)通过细胞培养将这些细胞扩增成更大的非病毒基因修饰细胞群。在一个实施例中,用包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体与包含编码piggyBac转座酶的核酸序列的载体转染这些细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在细胞中的稳定性。在一个实施例中,提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中,用包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体与编码piggyBac转座酶的核酸序列转染这些细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件,该编码piggyBac转座酶的核酸序列经工程化以增加在细胞中的稳定性。在一个实施例中,提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。在一个实施例中,提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:13的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。

[0175] 在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,和/或在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置

247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在另一个相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0176] 在一个实施例中,本发明提供了用非病毒基因修饰细胞治疗受试者的方法,该方法包括:(a)工程化编码piggyBac转座酶的核酸分子以增加在细胞中的稳定性并将其插入载体中;(b)从受试者或供体中分离天然免疫细胞;(c)使用编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子与包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体共转染这些宿主细胞,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件;(d)通过细胞培养将细胞扩增成更大的基因修饰细胞群;(e)从细胞培养物中分离转化的细胞以获得包含基因修饰细胞的细胞群;以及(f)将这些非病毒基因修饰细胞重新引入受试者。在一个实施例中,提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:7的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:11的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:13的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:15的核酸序列编码的piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:17的核酸序列编码的

piggyBac转座酶。在另一个方面,本发明提供了由SEQ ID NO:18的核酸序列编码的piggyBac转座酶。

[0177] 在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221、247、429、533和573中一个或多个处的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含在SEQ ID NO:2的位置147、176、221和247中一个或多个处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,和/或在SEQ ID NO:2的位置429、533和573中一个或多个处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少一个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含以下氨基酸取代中的至少两个:在SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的氨基酸取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的氨基酸取代。在另一个相关的实施例中,该piggyBac转座酶包含SEQ ID NO:2的位置147处亮氨酸对异亮氨酸的取代,在SEQ ID NO:2的位置247处亮氨酸对异亮氨酸的取代,以及在SEQ ID NO:2的位置533处苏氨酸对丝氨酸的取代。在一个实施例中,提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、或SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在另一个方面,本发明提供了piggyBac转座酶,该piggyBac转座酶具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0178] 在相关的实施例中,该天然免疫细胞是单核细胞。在相关的实施例中,该天然免疫细胞是T细胞。在另一个实施例中,该目的蛋白是抗原受体、T细胞受体或嵌合抗原受体。在另一个实施例中,还用编码自杀基因即可诱导开启或加速器开关或者两者的核酸分子转染该细胞。在一个实施例中,提供了如本文所述的编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子。

[0179] 在一个实施例中,这些天然免疫细胞用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的载体与包含编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列的载体转染,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。

[0180] 在一个实施例中,这些天然免疫细胞用包含编码piggyBac转座酶的工程化核酸分子的单个载体与编码至少一种目的蛋白的至少一种核酸序列转染,该目的蛋白的侧翼至少是piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件。

[0181] 在一个实施例中,该载体包括双顺反子或多顺反子构建体,这些构建体编码多种目的蛋白。

[0182] 本发明还提供了根据本文所述方法制备的非病毒基因修饰细胞、细胞群或细胞培养物。还提供了包含通过本文描述的方法制备的基因修饰细胞或细胞群的配制品。

[0183] 还提供了治疗或预防供体或有需要的受试者中的疾病或障碍的方法,该方法包括向该供体或受试者施用有效量的通过本文描述的方法制备的基因修饰细胞或细胞群。在另一个实施例中,提供了药物组合物,该药物组合物包含根据本文所述的方法制备的分离、纯化的目的蛋白。

[0184] 尽管在本申请中使用的术语是本领域中的标准术语,但是本文提供了某些术语的定义以确保权利要求的含义的清楚性和确定性。单位、前缀和符号可能会用它们的国际单位制(SI)接受形式表示。本文列举的数字范围包括定义范围的数字,并且包括并支持所定义范围内的每个整数。除非另外指示,否则本文所述的方法及技术可根据本领域中众所周知的常规方法且如贯穿本说明书所引用及论述的各种通用及更特定参考文献中所描述来进行。参见,例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版,冷泉港实验室出版社,纽约州冷泉港(2001)和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学实验指南],格林出版公司(1992),以及Harlow和Lane Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册]Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],纽约州冷泉港(1990)。在本申请中所引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、论文、书籍、和专著,都通过引用清楚地并入本文。在本发明的一个方面或实施例中描述的内容可以与本发明的其他方面和/或实施例组合。

[0185] 本发明在范围上不受本文所述的特定实施例的限制,这些特定实施例旨在作为本发明各个方面的单个说明,并且功能上等效的方法和组分也在本发明的范围内。实际上,除了本文中显示和描述的那些之外,根据前述描述和附图,本发明的各种修改对于本领域技术人员将变得显而易见。这类修改旨在包含在所附权利要求的范围内。

[0186] 实例

[0187] 实例1突变的鉴定和测试

[0188] 尚不清楚piggyBac转座酶和其他相关转座酶的结构。我们使用称为DSC的计算机方法(King, RD等人,Protein Sci.[蛋白质科学]5(11):2298-2310,1996)预测了野生型粉纹夜蛾piggyBac转座酶(SEQ ID NO:2)的二级结构基序。参见图1。我们发现该piggyBac转座酶主要是 α 螺旋蛋白。我们设计了可能稳定 α 螺旋的突变,这些突变可以改善该转座酶的整体稳定性,进而可以对该转座酶的表达产生积极影响。我们将I147、I176、I221、I247鉴定为可以潜在突变以改善piggyBac转座酶的 α 螺旋稳定性的残基。

[0189] 我们还在转座酶序列中鉴定出了推定的N联糖基化位点(即NXS/T基序)。由于通常而言,与NXS基序相比,NXT基序会进行更完全的糖基化,因此我们假设将NXS基序突变为NXT基序可能会改善piggyBac上的整体糖基化,进而可能改善转座酶的稳定性。设计了以下N联

糖基化位点的Ser到Thr突变:N427ES、N531IS和N571AS。N531IS位点存在于疏水段中,因此在改善糖基化作用后可能会带来最大的稳定性改善。目前尚不清楚piggyBac转座酶是否被糖基化或其激活是否需要糖基化。

[0190] 总共产生了八个质粒,其中包括编码野生型piggyBac转座酶与具有编码单突变、双重突变或三重突变的核酸序列的七种转座酶的核酸序列(参见表3)。除突变的序列外,这些克隆的转座酶质粒共有相同的DNA密码子。将这些转座酶质粒转化到一个细胞系中,挑选菌落,扩大规模培养并确认序列。

[0191] 表3

SEQ ID NO		突变
DNA	蛋白质	
1	2	野生型 (WT) 粉纹夜蛾 piggyBac转座酶
3	4	I147L异亮氨酸到亮氨酸
5	6	I247L异亮氨酸到亮氨酸
7	8	S533T丝氨酸到苏氨酸
9	10	LLT (I247L I147L S533T)
11	12	ILT (I247 I147L S533T)
13	14	LIT (I247L I147 S533T)
15	16	LLS (I247L I147L S533)

[0193] 测试了四种目的蛋白、两种单克隆抗体 (AB1和AB2)、一种融合蛋白和一种双特异性T细胞衔接器。将每个编码目的蛋白的基因克隆到一个单独的质粒中,该质粒至少包含piggyBac转座子的5' 和3' 反向重复元件。将这四个质粒按比例放大并确认序列。

[0194] 使用电穿孔将环状突变型转座酶质粒与包含编码四种蛋白质之一的基因的环状质粒之一一起共转染到谷氨酰胺合酶敲除CHO细胞中。转座酶与目的蛋白质粒的比率为1:4。让这些细胞在补充有谷氨酰胺的培养基中在36°C和5%CO₂的条件下恢复三天,然后更换为不含谷氨酰胺的选择性培养基。将这些细胞每3至4天在36°C和5%CO₂的选择性培养基中传代直至恢复至>90%的活率。

[0195] 在24个深孔板中进行补料分批生产,以评估来自稳定细胞系的表达蛋白的表达。将培养物以1x10⁶细胞/mL的浓度接种在不含谷氨酰胺的基础生产培养基中,并在第3、6和8天补充营养物。在第10天收获培养物,并分析上清液的滴度。

[0196] 通过亲和UPLC色谱测量滴度,其中将蛋白A以20ug的目标负载固定在柱载体上。在中性pH值下,测试样品中的蛋白质通过Fc区与蛋白质A结合,而宿主细胞蛋白质、条件培养基组分和缓冲液则在流通中从色谱柱中洗脱出来。将捕获的蛋白质在酸性pH 1.9的1X DPBS上洗脱,并通过280nm处的UV吸收进行检测。使用线性回归分析从通用抗体标准品和相应的峰面积获得校准曲线。然后,根据校准曲线以及通用抗体标准品和测试样品的消光系数之比,计算出测试样品中该蛋白质的浓度。

[0197] 突变型转座酶的使用显示出与WT转座酶或缺少针对所测试的单克隆抗体和融合

蛋白的转座酶的对照相比更高或相似的滴度。通常,双特异性T细胞衔接器的滴度低于单克隆抗体,并且在该系统中使用时通常也不会以高水平表达。对于此特定分子,表达瓶颈可能与转录或基因整合位点无关,而可能与蛋白质分泌瓶颈有关。如果其他双特异性T细胞衔接器在表达上没有相同的挑战,它们可能会产生不同的结果,因此,将不同的支架与双特异性T细胞衔接子分子一起使用可能会产生更好的滴度。

[0198] 实例2添加MSX的GS K0宿主细胞中双重和三重转座酶突变体的表达

[0199] 使用电穿孔法(伯乐实验室(Bio-Rad),加利福尼亚州赫拉克勒斯)用编码1)双突变体“ILT”DNA piggyBac转座酶(ITR,SEQ ID NO:11),2)三重突变体“LLT”DNA piggyBac转座酶(LLT,SEQ ID NO:9)和3)不编码piggyBac转座酶(无)的环状质粒转染谷氨酰胺合酶敲除CHO细胞(GSK0细胞),所有情况下均与包含目的基因和粉纹夜蛾piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件的环状质粒结合。测试了三个目的基因,双特异性T细胞衔接器异源性Fc(T cell engager heteroFc)、IgG-scFv和单克隆抗体(mAb)。

[0200] 转染后第3天(25),在初始池恢复至>90%的活率(0-25)或根本不恢复(0)后,添加25 μ M的蛋氨酸亚砷酰亚胺(MSX)(EDM密理博公司(EDM Millipore),马萨诸塞州柏林顿)。谷氨酰胺合成酶的抑制剂蛋氨酸亚砷酰亚胺(MSX)的添加用于增加GSK0 CHO细胞系中目的基因的表达。

[0201] 在MSX处理的细胞恢复后,将它们在24个深孔板或旋转管中进行小规模批量补料生产,以评估来自稳定细胞系的表达蛋白的表达。将培养物以 1×10^6 细胞/mL的浓度接种在不含谷氨酰胺的基础生产培养基中,并在第3、6和8天补充营养物。如实例1所述,在第10天收获培养物,并分析上清液的滴度。

[0202] 与未接受MSX处理(0 μ M MSX)的那些转座酶池相比,用突变转座酶(ILT或LLT)转染的那些池显示出表达增加。对于未添加转座酶(无)的这些池,表达不会随着MSX的添加而增加。

[0203] 转座子赋予半靶向转染机制,该机制靶向开放的染色质,这些染色质是基因组中活性转录的区域。当转座子与转座酶结合整合时,就会整合该转座子的5'和3'反向重复元件之间的完整载体序列。无转座酶的转座子的转染会导致随机整合到染色体中,并且作为结果,转座子5'和3'反向重复元件之间的完整载体序列可能不会整合到活性位点中。此外,如果没有转座酶,则不能保证完全整合,这可能会导致目的基因和选择标记(在这种情况下为谷氨酰胺合酶)之间的连接断开,并且因此MSX不会影响目的基因的表达。

[0204] 在所测试的载体系统的背景下,与无转座酶的对照相比,经工程化的转座酶具有在添加和不添加MSX的情况下均增加表达的额外优势。(图5)。来自piggyBac的拷贝数增加也可能有助于改善MSX的选择。

[0205] 实例3使用DNA或mRNA piggyBac转座酶的转染。

[0206] 用于整合目的基因的转座酶可以是基于DNA或mRNA的。使用DNA转录的转座酶的一个问题是转座酶基因整合到基因组中的潜在可能,这可能导致转座酶在转染的细胞系中活跃转录/翻译。由于潜在的隐性转座酶识别位点的转座酶活性,这可能导致基因组不稳定。一种替代方案是使用mRNA进行转染,因为它不会整合到基因组中。

[0207] 针对双突变体“ILT”和三重突变体“LLT”的piggyBac转座酶,制备了使用野生型碱基的未修饰mRNA转录物以及具有25%的伪U和5-甲基-C封端取代的修饰合成mRNA转录物。

[0208] 进行了两组实验以评估转染中的mRNA翻译转座酶。在第一个实验中,测试了piggyBac转座酶双突变体(ILT,SEQ ID NO:17)和三重突变体(LLT,SEQ ID NO:18)的mRNA转录物。在第二个实验中,除了该mRNA转录物外,还测试了具有25%的伪U和5-甲基C封端取代的双突变体“ILT”的合成mRNA转录物。

[0209] 使用电穿孔法或基于脂质的转染方法将mRNA和合成的mRNA转录物以及包含粉纹夜蛾piggyBac转座子的5'和3'反向重复元件和编码单克隆抗体的基因的环状质粒一起转染到GSKO细胞系中。

[0210] 对于电穿孔法,将等重量的线性化转座酶和转座子载体DNA添加到悬浮在比色皿中的培养基中的 2×10^7 个细胞中。使用Bio-Rad电穿孔仪(伯乐实验室)对DNA细胞混合物进行电穿孔。然后将这些电穿孔的细胞添加到温生长培养基中,并在37°C和5%CO₂下孵育3天,之后将这些细胞重悬于选择性培养基中以建立稳定的池。对于脂质转染法,使用的试剂是脂染胺LTX(吉博科公司(Gibco)/赛默飞世尔公司(ThermoFisher),马萨诸塞州沃尔瑟姆)。转染前一天,将细胞以1e6细胞/mL的速度接种,于悬浮中振荡。转染当天,将细胞接种在转染培养基中至6孔板中。制备Mab DNA/转座酶/脂染胺LTX复合物并孵育。然后将复合物添加到这些细胞中并孵育5-8小时。孵育后,添加生长培养基,并让这些细胞恢复2-3天。如果存在粘附,则使用胰蛋白酶去除这些细胞,将这些细胞离心并重悬于选择性培养基中以建立稳定的池。

[0211] 将mRNA转染与对照条件进行比较,该对照条件是用编码转座酶的相应DNA转染的GSKO细胞系。将包含编码双突变体(ILT,SEQ ID NO:11)或三重突变体(LLT,SEQ ID NO:9)的DNA的环状质粒,以及包含粉纹夜蛾piggyBac转座子的5'和3'反向末端重复元件的环状质粒在与该mRNA相同的条件下转染,该粉纹夜蛾piggyBac转座子含有单克隆抗体。

[0212] 改变mRNA和DNA转座酶的量、目的基因、目的基因DNA或RNA与转座酶的比率以及转染的细胞数量以测试最佳条件,见表4。

[0213] 表4电穿孔和脂质转染的条件。

转座酶	Mab DNA (μg)	转座酶DNA或 mRNA (μg)	Mab与转座酶 比率
实验1 电穿孔2e7个宿主细胞			
DNA对照	20	5	4 : 1
无	20	0	
mRNA	20	5	4 : 1
mRNA	20	10	2 : 1
mRNA	20	20	1 : 1
mRNA	14	100	1 : 7
mRNA	28	200	1 : 7
实验2 脂染胺LXT 1.2e6个宿主细胞			
DNA对照	2	0.5	4 : 1
DNA对照	2	2	1 : 1
DNA对照	4	4	1 : 1
mRNA	2	0.5	4 : 1
mRNA	2	2	1 : 1
mRNA	4	4	1 : 1
实验3 电穿孔2e7个宿主细胞			
DNA对照	30	15	2 : 1
mRNA	30	15	2 : 1
合成mRNA	30	15	2 : 1

[0216] 让这些转染的细胞在补充有谷氨酰胺的培养基中在36℃和5%CO₂的条件下恢复三天,然后更换为不含谷氨酰胺的选择性培养基。将这些细胞每3至4天在36℃和5%CO₂的选择性培养基中传代直至恢复至>90%的活率,并按实例1所述测定滴度。

[0217] 使用基于电穿孔或基于脂质的转染方法,采用mRNA的转染达到了与采用piggyBac转座酶双突变体“ILT”的DNA的转染相比相当的表达水平。图6显示了使用电穿孔或基于脂质的方法,来自用双突变体“ILT”转座酶DNA或mRNA转染的细胞中的单克隆抗体的表达水平。图6A显示了使用电穿孔转染的结果。与DNA对照相比,表达增加了,因为mRNA的量增加了。三重突变体“LLT”给出了相似的结果,数据未显示。图6B显示了使用基于脂质的方法转染的结果。该单克隆抗体的表达水平更好或至少与DNA对照相当。

[0218] 将合成版mRNA的结果与使用电穿孔的mRNA进行比较。两种形式的表达均高于未用转座酶(-)转染的对照。

[0219] 图7显示了与来自电穿孔的双突变体转座酶“ILT”DNA以及两个mRNA转染池的表达相关的单克隆抗体的表达水平。合成的mRNA和mRNA转染池的滴度与基于DNA的转座酶池的滴度相似,并且滴度高于没有转座酶对照池。

[0220] 转座酶基因的基因组DNA水平整合的分析。

[0221] 还分析了piggyBac转座酶双突变体“ILT”和三重突变体“LLT”基因的基因组DNA水平整合。使用了该转座酶核苷酸序列5'和3'末端的寡核苷酸引物,这些引物扩增了约1.7kb

的片段,以检查转座酶是否存在。使用血液和细胞培养DNA Maxi试剂盒(凯杰公司(Qiagen),加利福尼亚州瓦伦西亚)从在用mRNA或DNA转染的恢复细胞系中收集的1e7个细胞的细胞团块中提取基因组DNA。质粒DNA被用作阳性对照。使用NanoDrop分光光度计(赛默飞世尔公司,马萨诸塞州沃尔瑟姆)通过260/280吸光度比率对该基因组DNA进行定量和质量检查(≥ 1.8 为良好质量)。使用来自新英格兰生物实验室(New England Biolab)(马萨诸塞州伊普斯维奇)的Q5高保真聚合酶在ProFlex PCR系统(生命技术公司(Life Technologies),加利福尼亚州嘉士伯)上进行PCR扩增。该反应在琼脂糖凝胶上进行以便于观察。

[0222] 转座酶基因的cDNA水平整合的分析

[0223] 还分析了piggyBac转座酶双突变体“ILT”基因的转录水平整合。再次使用上述寡核苷酸引物扩增约1.7kb的片段,以检查该转座酶转录物是否存在于细胞中。使用RNeasy minikit(凯杰公司)从在添加了mRNA或DNA转座酶转染的恢复细胞系中收集的1e7个细胞的细胞团块中提取mRNA。质粒DNA被用作对照。定量mRNA,并使用NanoDrop分光光度计通过260/280吸光度比率检查其质量。使用带有Platinum Taq高保真DNA聚合酶的SuperScript III一步式RT-PCR系统(赛默飞世尔公司)在转录水平上检查转座酶,在该系统上进行cDNA合成并随后根据制造商的建议在ProFlex PCR系统(生命技术公司)上扩增靶序列(即转座酶)。该反应在琼脂糖凝胶上进行以便于观察。

[0224] 检查了DNA和mRNA转染的细胞系池的基因组和转录水平整合,见图8。约1.7kb带的存在表明转座酶在该细胞系的基因组中存在,见图8A。用双突变体“ILT”DNA转座酶转染的所有池细胞系均具有转录水平整合,而用mRNA转染的那些细胞系没有在基因组或转录水平整合,见图8B。

[0225] 拷贝数的ddPCR测定

[0226] 为了测定拷贝数,使用DNeasy血液和组织试剂盒(凯杰公司)从每个克隆和池的 5×10^6 个细胞中提取基因组DNA。根据制造商的建议,使用ddPCR Supermix for Probes(无dUTP)试剂盒(伯乐)进行数字液滴PCR。每个反应包含1个单位的HindIII、10ng的模板DNA以及900nm正向和反向引物,以及250nm荧光探针,设计用于靶标双突变体“ILT”编码序列和内源CH0参考基因Gcg。使用AutoDG系统(伯乐)产生液滴,并在ProFlex PCR系统(生命技术公司)上以95°C下10分钟的热循环条件进行PCR扩增,随后进行94°C下30s和60°C下1分钟的40个循环,然后在98°C下进行10分钟。在QX200 Droplet Reader系统(伯乐)上读取液滴,并使用QuantaSoft软件(伯乐)进行拷贝数数据分析。

[0227] 为了确定池中的所有克隆是否都整合了转座酶,将用DNA转座酶转染的池进行单细胞克隆,并检查基因组DNA(gDNA)水平整合。还使用ddPCR测定该库和这些克隆的转座酶拷贝数。

[0228] 该池具有较低的拷贝数,并且包含没有整合该转座酶的克隆。如上所述,通过使用基于PCR的方法筛选克隆来鉴定无转座酶整合的克隆。池群中存在无转座酶整合的克隆,见图9。

[0229] 实例4使用piggyBac转座酶产生TCR-T细胞

[0230] 使用双突变型piggyBac转座酶“ILT”成功修饰了原代T细胞以表达T细胞受体(TCR),见图10A。由PiggyBac产生的TCR-T细胞表现出稳健的靶标杀伤力以及抗原特异性增

殖(图10B和10C)。

[0231] 首先通过Ficoll-Paque (通用电气医疗集团 (GE Healthcare), 伊利诺伊州芝加哥) 分离从健康供体白细胞单采物 (leukopak) 中分离出外周血单核细胞 (PBMC), 随后使用 EasySep 人T细胞分离试剂盒 (干细胞技术公司 (Stemcell Technologies), 加拿大温哥华) 从PBMC中分离T细胞。然后激活T细胞, 并在激活后两天, 使用4-D核转染系统 (龙沙公司 (Lonza), 南卡罗来纳州格林伍德) 将这些T细胞与质粒共同电穿孔, 其中该质粒包含含有编码TCR-IRES-EGFP的基因和编码双突变体“ILT”转座酶 (SEQ ID NO:18) 的mRNA的piggyBac转座子的5' 和3' 反向末端重复元件。每2-3天给细胞补充IL2细胞因子。

[0232] TCR整合的确定

[0233] 激活后第7天, 通过使用识别TCR的右旋抗体 (Immudex, 丹麦哥本哈根) 以及CD3、CD4和CD8荧光团缀合的抗体 (百进公司 (Biolegend), 加利福尼亚州圣地亚哥) 对细胞进行表面染色, 评估T细胞的TCR表达和细胞表型。通过在BD LSRII流式细胞仪上运行来分析样品的表达。

[0234] 功能测定

[0235] 在激活后第9-14天, 对T细胞计数并进行收集以用于功能测定。

[0236] 细胞裂解和增殖测定

[0237] 于96孔U形底板中, 将1E5 CellTrace Violet (赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific), 马萨诸塞州沃尔瑟姆) 染色的T细胞与5e4个靶细胞在150 μ L培养基中共同孵育5天。通过CellTrace Violet评估靶细胞的裂解和T细胞增殖, 通过在BD LSRFortessa流式细胞仪 (华盛顿州利伯蒂湖) 上运行样品对稀释液进行定量。

序列表

<110> 美国安进公司

<120> 突变型 piggyBac 转座酶

<130> A-2320-W0-PCT

<150> US62/777, 325

<151> 2018-12-10

<150> US62/925, 516

<151> 2019-10-24

<160> 18

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 1786

<212> DNA

<213> 粉纹夜蛾

<400> 1

[0001]

```

atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa      60
ctggtgggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag      120
tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc      180
tccgagatcc tggacgagca gaacgtgatc gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac      240
agaatcctga ccctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc      300
tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc      360
cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac ccctgtctgt gcttcaagct gttcttcacc      420
gacgagatca tcagcgagat cgtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg      480
gagagcatga cggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc      540
ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc      600
gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttctctg      660
atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagacca ccctgcggga gaacgacgtg      720
ttcacccccg tgcggaagat ctgggacctg ttcatccacc agtgcattca gaactacacc      780
cctggcgccc acctgaccat cgatgagcag ctgctgggct tcagaggcag atgccccttc      840
agaatgtaca tccccaaaaa gcccagcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac      900
agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac      960
ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc      1020
aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatcccc tggccaagaa cctgctgcag      1080
gaacctaca agctgaccat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag      1140
gtgctgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc      1200
ctgacctggg tgtcctacaa gcccagccc gccaaagatgg tgtacctgct gtccagctgc      1260
gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac      1320
cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga      1380
aagaccaaca gatggcccat ggccctgtctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac      1440
agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaaggcgc agaagggtgca gagccggaag      1500
aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa      1560
gccccacccc tgaagagata cctgcgggac aacatcagca acatcctgcc caacgaagtg      1620
ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc      1680

```

```

tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg      1740
atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctgtt tctage                        1786
<210> 2
<211> 594
<212> PRT
<213> 粉纹夜蛾
<400> 2
Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
1          5          10          15
Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp
          20          25          30
His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile
          35          40          45
Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
          50          55          60
Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn
65          70          75          80
Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His
          85          90          95
Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu
          100          105          110
Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile
[0002]      115          120          125
Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile
          130          135          140
Ser Glu Ile Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg
145          150          155          160
Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile
          165          170          175
Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn
          180          185          190
His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr
          195          200          205
Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu
          210          215          220
Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val
225          230          235          240
Phe Thr Pro Val Arg Lys Ile Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile
          245          250          255
Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu
          260          265          270
Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro
          275          280          285
Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys

```

290 295 300
 Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn
 305 310 315 320
 Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val
 325 330 335
 His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
 340 345 350
 Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
 355 360 365
 Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
 370 375 380
 Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
 385 390 395 400
 Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
 405 410 415
 Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
 420 425 430
 Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
 435 440 445
 Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
 450 455 460
 Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
 465 470 475 480
 Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
 485 490 495
 Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
 500 505 510
 Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
 515 520 525
 Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
 530 535 540
 Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
 545 550 555 560
 Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
 565 570 575
 Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
 580 585 590
 Cys Phe

[0003]

<210> 3
 <211> 1786
 <212> DNA
 <213> 粉纹夜蛾
 <400> 3

	atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa	60
	ctgggtggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag	120
	tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc	180
	tccgagatcc tggacgagca gaacgtgatc gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac	240
	agaatcctga ccctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctgggtccacc	300
	tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc	360
	cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac cccctgtgtg gcttcaagct gttcttcacc	420
	gacgagatca tcagcgagct ggtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
	gagagcatga cggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgctttcttc	540
	ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
	gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttcctg	660
	atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagacca ccctgcggga gaacgacgtg	720
	ttcacccccg tgcggaagat ctgggacctg ttcattccacc agtgcattcca gaactacacc	780
	cctggcgccc acctgacctat cgatgagcag ctgtctgggt tcagaggcag atgccccctc	840
	agaatgtaca tccccaaaa gcccgcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac	900
	agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac	960
	ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc	1020
	aggaacatca cctgcgacaa ctgggttcacc agcatccccc tggccaagaa cctgctgcag	1080
	gaaccttaca agctgacctat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag	1140
	gtgtgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc	1200
[0004]	ctgacctggt tgtctacaa gcccagccc gccaaagtgg tgtacctgct gtccagctgc	1260
	gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac	1320
	cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga	1380
	aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac	1440
	agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaaggtgca gagccggaag	1500
	aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa	1560
	gccccaccc tgaagagata cctgcgggac aacatcagca acatcctgcc caacgaagtg	1620
	ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc	1680
	tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg	1740
	atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctgtt tctagc	1786
	<210> 4	
	<211> 594	
	<212> PRT	
	<213> 粉纹夜蛾	
	<400> 4	
	Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln	
	1 5 10 15	
	Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp	
	20 25 30	
	His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile	
	35 40 45	
	Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu	
	50 55 60	

[0005]

Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn			
65	70	75	80
Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His			
	85	90	95
Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu			
	100	105	110
Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile			
	115	120	125
Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile			
	130	135	140
Ser Glu Leu Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg			
	145	150	155
Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile			
	165	170	175
Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn			
	180	185	190
His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr			
	195	200	205
Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu			
	210	215	220
Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val			
	225	230	235
Phe Thr Pro Val Arg Lys Ile Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile			
	245	250	255
Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu			
	260	265	270
Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro			
	275	280	285
Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys			
	290	295	300
Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn			
	305	310	315
Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val			
	325	330	335
His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile			
	340	345	350
Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val			
	355	360	365
Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn			
	370	375	380
Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro			
	385	390	395
Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu			
	405	410	415

Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
 420 425 430
 Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
 435 440 445
 Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
 450 455 460
 Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
 465 470 475 480
 Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
 485 490 495
 Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
 500 505 510
 Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
 515 520 525
 Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
 530 535 540
 Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
 545 550 555 560
 Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
 565 570 575
 Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
 580 585 590
 [0006] Cys Phe

<210> 5

<211> 1786

<212> DNA

<213> 粉纹夜蛾

<400> 5

atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa	60
ctggtgggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgctccagga cgacgtgcag	120
tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc	180
tccgagatcc tggacgagca gaacgtgatc gacgagcctg gcagctccct ggccagcaac	240
agaatcctga ccctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc	300
tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc	360
cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac cccctgtgtg gcttcaagct gttcttcacc	420
gacgagatca tcagcgagat cgtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
gagagcatga cggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc	540
ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaa gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttcctg	660
atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagacca ccctgcggga gaacgacgtg	720
ttaccccccg tgcggaagct gtgggacctg ttcatccacc agtgcattca gaactacacc	780
cctggcgccc acctgaccat cgatgagcag ctgctgggct tcagaggcag atgcccttc	840
agaatgtaca tccccacaa gccagcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac	900

```

agcggcacca agtacctgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac      960
ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc      1020
aggaacatca cctgcgacaa ctgggttcacc agcatccccc tggccaagaa cctgctgcag      1080
gaaccttaca agctgacctat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag      1140
gtgctgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc      1200
ctgaccttgg tgtcctacaa gcccagccc gccaaagtgg tgtacctgct gtccagctgc      1260
gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac      1320
cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga      1380
aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac      1440
agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaaggtgca gagccggaag      1500
aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa      1560
gccccacccc tgaagagata cctgcgggac aacatcagca acatcctgcc caacgaagtg      1620
ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc      1680
tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg      1740
atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctgtt tctagc      1786

```

<210> 6

<211> 594

<212> PRT

<213> 粉纹夜蛾

<400> 6

[0007]

```

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
1              5              10              15
Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp
              20              25              30
His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile
              35              40              45
Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
              50              55              60
Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn
65              70              75              80
Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His
              85              90              95
Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu
              100             105             110
Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile
              115             120             125
Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile
              130             135             140
Ser Glu Ile Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg
145             150             155             160
Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile
              165             170             175
Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn
              180             185             190

```

[0008]

His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr		
195	200	205
Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu		
210	215	220
Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val		
225	230	235 240
Phe Thr Pro Val Arg Lys Leu Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile		
245	250	255
Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu		
260	265	270
Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro		
275	280	285
Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys		
290	295	300
Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn		
305	310	315 320
Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val		
325	330	335
His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile		
340	345	350
Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val		
355	360	365
Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn		
370	375	380
Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro		
385	390	395 400
Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu		
405	410	415
Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys		
420	425	430
Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr		
435	440	445
Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg		
450	455	460
Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn		
465	470	475 480
Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val		
485	490	495
Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser		
500	505	510
Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu		
515	520	525
Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser		
530	535	540

Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
 545 550 555 560
 Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
 565 570 575
 Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
 580 585 590
 Cys Phe

<210> 7

<211> 1786

<212> DNA

<213> 粉纹夜蛾

<400> 7

[0009]

atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa 60
 ctggtgggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag 120
 tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc 180
 tccgagatcc tggacgagca gaacgtgatc gagcagcctg gcagctccct gccagcaac 240
 agaatcctga ccttgcctca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctgggtccacc 300
 tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc 360
 cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac cccctgtctgt gcttcaagct gttcttcacc 420
 gacgagatca tcagcgagat cgtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg 480
 gagagcatga ccggcgccac ctccagagac accaacgagg acgagatcta cgctttcttc 540
 ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc 600
 gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttcttg 660
 atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagaccca ccctgcggga gaacgacgtg 720
 ttcacccccg tgcggaagat ctgggacctg ttcattccacc agtgcattcca gaactacacc 780
 cctggcgccc acctgacctat cgatgagcag ctgtctgggt tcagaggcag atgccccttc 840
 agaattgata tccccaaaca gcccgcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac 900
 agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac 960
 ggctgtcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc 1020
 aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatcccc tggccaagaa cctgctgcag 1080
 gaacctata agctgacctat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag 1140
 gtgtgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc 1200
 ctgacctggt tgtcctacaa gcccagccc gccaatggtg tgtacctgct gtccagctgc 1260
 gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac 1320
 cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga 1380
 aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac 1440
 agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaaggtgca gagccggaag 1500
 aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa 1560
 gccccacccc tgaagagata cctgcgggac aacatcacca acatcctgcc caacgaagtg 1620
 ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc 1680
 tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg 1740
 atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctgtt tctagc 1786
 <210> 8

<211> 594
 <212> PRT
 <213> 粉纹夜蛾
 <400> 8
 Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp
 20 25 30
 His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile
 35 40 45
 Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
 50 55 60
 Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn
 65 70 75 80
 Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His
 85 90 95
 Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu
 100 105 110
 Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile
 115 120 125
 Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile
 130 135 140
 Ser Glu Ile Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg
 145 150 155 160
 Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile
 165 170 175
 Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn
 180 185 190
 His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr
 195 200 205
 Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu
 210 215 220
 Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val
 225 230 235 240
 Phe Thr Pro Val Arg Lys Ile Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile
 245 250 255
 Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu
 260 265 270
 Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro
 275 280 285
 Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys
 290 295 300
 Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn
 305 310 315 320

[0010]

[0011]

Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val
 325 330 335
 His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
 340 345 350
 Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
 355 360 365
 Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
 370 375 380
 Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
 385 390 395 400
 Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
 405 410 415
 Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
 420 425 430
 Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
 435 440 445
 Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
 450 455 460
 Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
 465 470 475 480
 Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
 485 490 495
 Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
 500 505 510
 Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
 515 520 525
 Arg Asp Asn Ile Thr Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
 530 535 540
 Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
 545 550 555 560
 Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
 565 570 575
 Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
 580 585 590
 Cys Phe

<210> 9

<211> 1786

<212> DNA

<213> 粉纹夜蛾

<400> 9

atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa 60
 ctggtgggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag 120
 tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc 180

	tccgagatcc tggacgagca gaacgtgatc gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac	240
	agaatcctga cctgccccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc	300
	tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc	360
	cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac cccctgctgt gcttcaagct gttcttcacc	420
	gacgagatca tcagcgagct ggtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
	gagagcatga cggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc	540
	ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
	gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttcctg	660
	atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagacca ccctgcggga gaacgacgtg	720
	ttcacccccg tgcggaagct gtgggacctg ttcatccacc agtgcaccca gaactacacc	780
	cctggcgccc acctgacctat cgatgagcag ctgctgggct tcagaggcag atgccccctc	840
	agaatgtaca tccccaaaca gcccagcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac	900
	agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac	960
	ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc	1020
	aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatccccc tggccaagaa cctgctgcag	1080
	gaacctata agctgacctat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag	1140
	gtgtgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc	1200
	ctgacctggt tgtctataaa gcccagccc gccaaagtgg tgtacctgct gtccagctgc	1260
	gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac	1320
	cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga	1380
	aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac	1440
[0012]	agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaaggtgca gagccggaag	1500
	aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa	1560
	gccccacccc tgaagagata cctgcgggac aacatcacca acatcctgcc caacgaagtg	1620
	ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc	1680
	tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg	1740
	atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctgtt tctagc	1786
	<210> 10	
	<211> 594	
	<212> PRT	
	<213> 粉纹夜蛾	
	<400> 10	
	Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln	
	1 5 10 15	
	Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp	
	20 25 30	
	His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile	
	35 40 45	
	Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu	
	50 55 60	
	Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn	
	65 70 75 80	
	Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His	
	85 90 95	

[0013]

Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu		
100	105	110
Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile		
115	120	125
Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile		
130	135	140
Ser Glu Leu Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg		
145	150	155
Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile		
165	170	175
Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn		
180	185	190
His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr		
195	200	205
Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu		
210	215	220
Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val		
225	230	235
Phe Thr Pro Val Arg Lys Leu Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile		
245	250	255
Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu		
260	265	270
Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro		
275	280	285
Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys		
290	295	300
Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn		
305	310	315
Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val		
325	330	335
His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile		
340	345	350
Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val		
355	360	365
Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn		
370	375	380
Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro		
385	390	395
Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu		
405	410	415
Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys		
420	425	430
Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr		
435	440	445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
 450 455 460
 Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
 465 470 475 480
 Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
 485 490 495
 Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
 500 505 510
 Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
 515 520 525
 Arg Asp Asn Ile Thr Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
 530 535 540
 Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
 545 550 555 560
 Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
 565 570 575
 Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
 580 585 590
 Cys Phe

[0014]

<210> 11

<211> 1786

<212> DNA

<213> 粉纹夜蛾

<400> 11

```

atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa      60
ctgggtgggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag      120
tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc      180
tccgagatcc tggacagcga gaacgtgatc gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac      240
agaatcctga ccctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc      300
tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcgagg ccagaggggc      360
cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac cccctgctgt gcttcaagct gttcttcacc      420
gacgagatca tcagcgagat cgtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg      480
gagagcatga cggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc      540
ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc      600
gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttcctg      660
atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagacca cctgcggga gaacgacgtg      720
ttaccccccg tgcggaagct gtgggacctg ttcattccacc agtgcattcca gaactacacc      780
cctggcgccc acctgaccat cgatgagcag ctgctgggct tcagaggcag atgccccttc      840
agaatgtaca tccccacaa gcccagcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac      900
agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac      960
ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc     1020
aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatcccc tggccaagaa cctgctgcag     1080
gaacctaca agctgaccat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag     1140

```

```

gtgctgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc 1200
ctgaccctgg tgtcctacaa gccaagccc gccaatgg tgtacctgct gtccagctgc 1260
gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac 1320
cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga 1380
aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac 1440
agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaaggtgca gagccggaag 1500
aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa 1560
gccccacccc tgaagagata cctgcgggac aacatcacca acatcctgcc caacgaagtg 1620
ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc 1680
tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg 1740
atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctgtt tctagc 1786

```

<210> 12

<211> 594

<212> PRT

<213> 粉纹夜蛾

<400> 12

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln

1 5 10 15

Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp

20 25 30

His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile

35 40 45

[0015]

Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu

50 55 60

Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn

65 70 75 80

Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His

85 90 95

Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu

100 105 110

Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile

115 120 125

Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile

130 135 140

Ser Glu Ile Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg

145 150 155 160

Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile

165 170 175

Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn

180 185 190

His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr

195 200 205

Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu

210 215 220

[0016]

Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val			
225	230	235	240
Phe Thr Pro Val Arg Lys Leu Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile			
245	250	255	
Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu			
260	265	270	
Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro			
275	280	285	
Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys			
290	295	300	
Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn			
305	310	315	320
Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val			
325	330	335	
His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile			
340	345	350	
Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val			
355	360	365	
Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn			
370	375	380	
Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro			
385	390	395	400
Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu			
405	410	415	
Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys			
420	425	430	
Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr			
435	440	445	
Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg			
450	455	460	
Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn			
465	470	475	480
Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val			
485	490	495	
Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser			
500	505	510	
Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu			
515	520	525	
Arg Asp Asn Ile Thr Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser			
530	535	540	
Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr			
545	550	555	560
Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys			
565	570	575	

		Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser	
		580	585
			590
Cys Phe			
<210>		13	
<211>		1786	
<212>		DNA	
<213>		粉纹夜蛾	
<400>		13	
[0017]	atgggctcta	gcctggacga	cgagcacatc
	ctgagcgccc	tgctgcagag	cgacgacgaa
			60
	ctggtgggcg	aggacagcga	cagcgagatc
	agcgaccacg	tgtccgagga	cgacgtgcag
			120
	tccgacaccg	aggaagcctt	catcgacgag
	gtgcacgaag	tgcagcctac	cagcagcggc
			180
	tccgagatcc	tggacgagca	gaacgtgata
	gagcagcctg	gcagctccct	ggccagcaac
			240
	agaatcctga	ccctgcccc	gagaaccatc
	agaggcaaga	acaagcactg	ctggteccacc
			300
	tccaagagca	ccaggcggag	cagagtgtcc
	gccctgaaca	tcgtgcggag	ccagaggggc
			360
	cccaccagaa	tgtgcagaaa	catctacgac
	cccctgtctg	gtttcaagct	gttcttcacc
			420
	gacgagatca	tcagcgagct	ggtgaagtgg
	accaacgccg	agatcagcct	gaagaggcgg
			480
	gagagcatga	ccggcgccac	cttcagagac
	accaacgagg	acgagatcta	cgctttcttc
			540
	ggcatcctgg	tgatgaccgc	cgtgagaaag
	gacaaccaca	tgagcaccga	cgacctgttc
			600
	gacagatccc	tgagcatggt	gtacgtgtcc
	gtgatgagca	gagacagatt	cgacttcctg
			660
	atcagatgcc	tgagaatgga	cgacaagagc
	atcagaccca	ccctgcggga	gaacgacgtg
			720
	ttcacccccg	tgcggaagat	ctgggacctg
	ttcatccacc	agtgcaccca	gaactacacc
			780
	cctggcgccc	acctgaccat	cgatgagcag
	ctgctgggct	tcagaggcag	atgccccctc
			840
	agaatgtaca	tccccaaaca	gcccagcaag
	tacggcatca	agatcctgat	gatgtgcgac
			900
	agcggcacca	agtacatgat	caacggcatg
	ccctacctgg	gcagaggcac	ccagacaaac
			960
	ggcgtgcccc	tgggcgagta	ctacgtgaaa
	gaactgagca	agcctgtgca	tggcagctgc
			1020
	aggaacatca	cctgcgacaa	ctggttcacc
	agcatcccc	tggccaagaa	cctgctgcag
			1080
	gaacctaca	agctgaccat	cgtgggcacc
	gtgcggagca	acaagcggga	gatcccagag
			1140
	gtgtgaaga	acagcagatc	cagacctgtg
	ggaacaagca	tgttctgctt	cgacggcccc
			1200
	ctgacctggt	tgtcctacaa	gcccagcccc
	gccaagatgg	tgtacctgct	gtccagctgc
			1260
	gacgaggacg	ccagcatcaa	cgagagcacc
	ggcaagcccc	agatggtgat	gtactacaac
			1320
	cagaccaagg	gcggcggtga	caccctggac
	cagatgtgca	gcgtgatgac	ctgcagcaga
			1380
	aagaccaaca	gatggcccat	ggccctgctg
	tacggcatga	tcaatatcgc	ctgcatcaac
			1440
	agcttcatca	tctacagcca	caacgtgtcc
	agcaaggcgc	agaagggtga	gagccggaag
			1500
	aaattcatgc	ggaacctgta	catgagcctg
	acctccagct	tcatgagaaa	gagactggaa
			1560
	gccccacccc	tgaagagata	cctgcgggac
	aacatcacca	acatcctgcc	caacgaagtg
			1620
	ccaggaacaa	gcgacgacag	caccgaggaa
	cccgtgatga	agaagaggac	ctactgcacc
			1680
	tactgtccca	gcaagatcag	aagaaaaggcc
	aacgccagct	gcaagaaatg	caaaaaagtg
			1740
	atctgccggg	agcacaacat	cgacatgtgc
	cagagctgtt	tctagc	
			1786
<210>		14	
<211>		594	
<212>		PRT	
<213>		粉纹夜蛾	
<400>		14	

[0018]

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln			
1	5	10	15
Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp			
20	25	30	
His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile			
35	40	45	
Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu			
50	55	60	
Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn			
65	70	75	80
Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His			
85	90	95	
Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu			
100	105	110	
Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile			
115	120	125	
Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile			
130	135	140	
Ser Glu Leu Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg			
145	150	155	160
Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile			
165	170	175	
Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn			
180	185	190	
His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr			
195	200	205	
Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu			
210	215	220	
Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val			
225	230	235	240
Phe Thr Pro Val Arg Lys Ile Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile			
245	250	255	
Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu			
260	265	270	
Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro			
275	280	285	
Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys			
290	295	300	
Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn			
305	310	315	320
Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val			
325	330	335	
His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile			
340	345	350	

[0019]

Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
 355 360 365
 Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
 370 375 380
 Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
 385 390 395 400
 Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
 405 410 415
 Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
 420 425 430
 Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
 435 440 445
 Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
 450 455 460
 Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
 465 470 475 480
 Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
 485 490 495
 Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
 500 505 510
 Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
 515 520 525
 Arg Asp Asn Ile Thr Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
 530 535 540
 Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
 545 550 555 560
 Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
 565 570 575
 Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
 580 585 590
 Cys Phe

<210> 15

<211> 1786

<212> DNA

<213> 粉纹夜蛾

<400> 15

atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa 60
 ctggtgggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag 120
 tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc 180
 tccgagatcc tggacgagca gaacgtgatc gaggcagcctg gcagctccct ggccagcaac 240
 agaatcctga ccctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc 300
 tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc 360
 cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac ccctgtgtgt gcttcaagct gttcttcacc 420

	gacgagatca tcagcgagct ggtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
	gagagcatga cgggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc	540
	ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
	gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttcctg	660
	atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagacca ccctgcggga gaacgacgtg	720
	ttcacccccg tgcggaagct gtgggacctg ttcattccacc agtgcattcca gaactacacc	780
	cctggcgccc acctgacctat cgatgagcag ctgtctgggct tcagaggcag atgccccctc	840
	agaatgtaca tccccaaaca gcccgcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac	900
	agcggcacca agtacctgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac	960
	ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc	1020
	aggaacatca cctgcgacaa ctgggttcacc agcatccccc tggccaagaa cctgctgcag	1080
	gaaccttaca agctgacctat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag	1140
	gtgtctgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc	1200
	ctgaccttgg tgtcttaciaa gcccagccc gccaaagtgg tgtacctgct gtccagctgc	1260
	gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac	1320
	cagaccaagg gcggcgctga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga	1380
	aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac	1440
	agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaaggtgca gagccggaag	1500
	aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa	1560
	gccccacccc tgaagagata cctgcgggac aacatcagca acatcctgcc caacgaagtg	1620
	ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc	1680
[0020]	tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg	1740
	atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctgtt tctagc	1786
	<210> 16	
	<211> 594	
	<212> PRT	
	<213> 粉纹夜蛾	
	<400> 16	
	Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln	
	1 5 10 15	
	Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp	
	20 25 30	
	His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile	
	35 40 45	
	Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu	
	50 55 60	
	Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn	
	65 70 75 80	
	Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His	
	85 90 95	
	Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu	
	100 105 110	
	Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile	
	115 120 125	

[0021]

```

Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile
 130                      135                      140
Ser Glu Leu Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg
145                      150                      155                      160
Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile
                      165                      170                      175
Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn
                      180                      185                      190
His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr
                      195                      200                      205
Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu
210                      215                      220
Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val
225                      230                      235                      240
Phe Thr Pro Val Arg Lys Leu Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile
                      245                      250                      255
Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu
260                      265                      270
Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro
275                      280                      285
Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys
290                      295                      300
Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn
305                      310                      315                      320
Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val
                      325                      330                      335
His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
340                      345                      350
Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
355                      360                      365
Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
370                      375                      380
Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
385                      390                      395                      400
Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
405                      410                      415
Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
420                      425                      430
Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
435                      440                      445
Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450                      455                      460
Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465                      470                      475                      480

```

Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
 485 490 495
 Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
 500 505 510
 Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
 515 520 525
 Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
 530 535 540
 Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
 545 550 555 560
 Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
 565 570 575
 Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
 580 585 590
 Cys Phe

<210> 17
 <211> 1786
 <212> RNA
 <213> 粉纹夜蛾
 <400> 17

[0022]

augggcucua gccuggacga cgagcacau cugagcgccc ugcugcagag cgacgacgaa 60
 cuggugggcg aggacagcga cagcgagauc agcgaccacg uguccgagga cgacgucgag 120
 uccgacaccg aggaagccuu caucgacgag gugcacgaag ugcagccuac cagcagcggc 180
 uccgagauc uggacgagca gaacgugauc gagcagccug gcagcuccu ggccagcaac 240
 agaauccuga ccugcccca gagaaccauc agaggcaaga acaagcacug cugguccacc 300
 uccaagagca ccaggcggag cagagugucc gccugaaca ucgugcggag ccagaggggc 360
 cccaccagaa ugugcagaaa caucucgac cccugcugu gcuucaagcu guucucacc 420
 gacgagauca ucagcgagau cgugaagugg accaacgccg agaucagccu gaagagcgcg 480
 gagagcauga ccggcgccac cuucagagac accaacgagg acgagauca cgccuucuc 540
 ggcauccugg ugaugaccgc cgugagaaag gacaaccaca ugagcaccga cgaccuguc 600
 gacagauc uagcauggu guacgugucc gugaugagca gagacagauu cgacuuccug 660
 aucagaugcc ugagaaugga cgacaagagc aucagacca cccugcggga gaacgacgug 720
 uucacccccg ugcggaagcu gugggaccug uucauccacc agugcaucca gaacuacacc 780
 ccugcgccc accugaccu cgauagagc cugcugggcu ucagaggcag augcccuuc 840
 agaauaguaca ucccaacaa gccagcaag uacggcauca agauccugau gaugugcgac 900
 agcggcacca aguacauau caacggcaug ccuaccugg gcagaggcac ccagacaaac 960
 ggcgugcccc uggcgagaa cuacgugaaa gaacugagca agccugugca uggcagcugc 1020
 aggaacauca ccugcgacaa cugguucacc agcaucuccc uggccaagaa ccugcugcag 1080
 gaaccuaca agcugaccu cgugggcacc gucggagca acaagcggga gaucacagag 1140
 gucgugaaga acagcagau cagaccugug ggaacaagca uguucugcu cgacggcccc 1200
 cugaccugg ugucuaaca gcccaagccc gccaaugg uguaccugcu guccagcugc 1260
 gacgaggacg ccagcauca cgagagcacc ggcaagcccc agauggugau guacuacaac 1320
 cagaccaagg gcggcgugga caccucggac cagaugugca gcgugaugac cugcagcaga 1380

	aagaccaaca gauggcccau ggcccugcug uacggcauga ucaauaucgc cugcaucaac	1440
	agcuucauca ucuacagcca caacgugucc agcaaggcg agaaggugca gagccggaag	1500
	aaauucaugc ggaaccugua caugagccug accuccagcu ucaugagaaa gagacuggaa	1560
	gccccaccc ugaagagaua ccugcgggac aacauacca acauccugcc caacgaagug	1620
	ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgugauga agaaggagac cuacugcacc	1680
	uacuguccca gcaagaucag aagaaaggcc aacgccagcu gcaagaaug caaaaaagug	1740
	aucugccggg agcacaacau cgacaugugc cagagcuguu ucuagc	1786
	<210> 18	
	<211> 1786	
	<212> RNA	
	<213> 粉纹夜蛾	
	<400> 18	
[0023]	augggcucua gccuggacga cgagcacauc cugagcggcc ugcugcagag cgacgacgaa	60
	cuggugggcg aggacagcga cagcgagauc agcgaccacg uguccgagga cgacgugcag	120
	uccgacaccg aggaagccuu caucgacgag gugcacgaag ugcagccuac cagcagcggc	180
	uccgagauc uggacgagca gaacgugauc gagcagccug gcagcuccu ggccagcaac	240
	agaauccuga cccugccca gagaaccauc agaggcaaga acaagcacug cugguccacc	300
	uccaagagca ccaggcggag cagagugucc gccugaaca ucgugcggag ccagaggggc	360
	cccaccagaa ugugcagaaa caucuacgac cccugcugu gcuucaagcu guucuucacc	420
	gacgagauc uacgagcgu ggugaagugg accaacgccg agaucagccu gaagaggcgg	480
	gagagcauga ccggcgccac cuucagagac accaacgagg acgagauca cgccuucuc	540
	ggcauccugg ugaugaccgc cgugagaaag gacaaccaca ugagcaccga cgaccuguuc	600
	gacagauc uagcauggu guacgugucc gugaugagca gagacagau cgacuuccug	660
	aucagaugc ugagaaugga cgacaagagc aucagaccca cccugcggga gaacgacgug	720
	uucaccccg ugcggaagcu gugggaccug uucauccacc agugcaucca gaacuacacc	780
	ccuggcggc accugaccau cgaugagcag cugcugggcu ucagaggcag augcccuuc	840
	agaauugua ucccaacaa gccagcaag uacggcauca agauccugau gaugugcgac	900
	agcggcacca aguacaugau caacggcaug cccuaccugg gcagaggcac ccagacaaac	960
	ggcgugcccc uggcgagua cuacugaaa gaacugagca agccugugca uggcagcugc	1020
	aggaacaua ccugcgaca cugguucacc agcauccccc uggccaagaa ccugcugcag	1080
	gaaccuaca agcugaccau cgugggcacc gugcggagca acaagcggga gauccagag	1140
	gugcugaaga acagcagau cagaccugug ggaacaagca uguucugcu cgacggcccc	1200
	cugaccugg uguccuacaa gcccagccc gccaagaug uguaccugcu guccagcugc	1260
	gacgaggac ccagcauca cgagagcacc ggcaagcccc agauggugau guacuacaac	1320
	cagaccaagg gcggcgugga caccugggac cagaugugca gcgugaugac cugcagcaga	1380
	aagaccaaca gauggcccau ggcccugcug uacggcauga ucaauaucgc cugcaucaac	1440
	agcuucauca ucuacagcca caacgugucc agcaaggcg agaaggugca gagccggaag	1500
	aaauucaugc ggaaccugua caugagccug accuccagcu ucaugagaaa gagacuggaa	1560
	gccccaccc ugaagagaua ccugcgggac aacauacca acauccugcc caacgaagug	1620
	ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgugauga agaaggagac cuacugcacc	1680
	uacuguccca gcaagaucag aagaaaggcc aacgccagcu gcaagaaug caaaaaagug	1740
	aucugccggg agcacaacau cgacaugugc cagagcuguu ucuagc	1786

[illegible]

图1

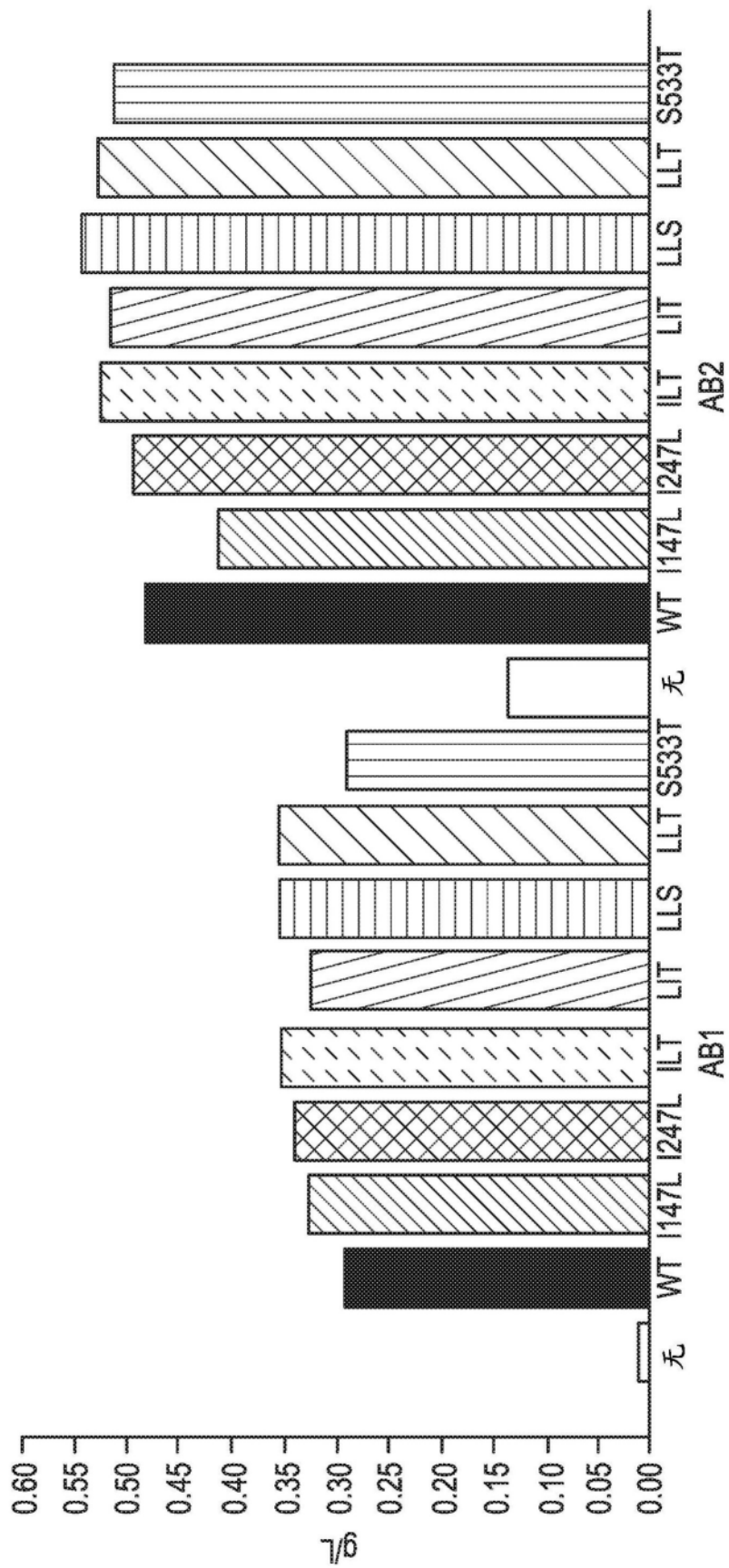


图2

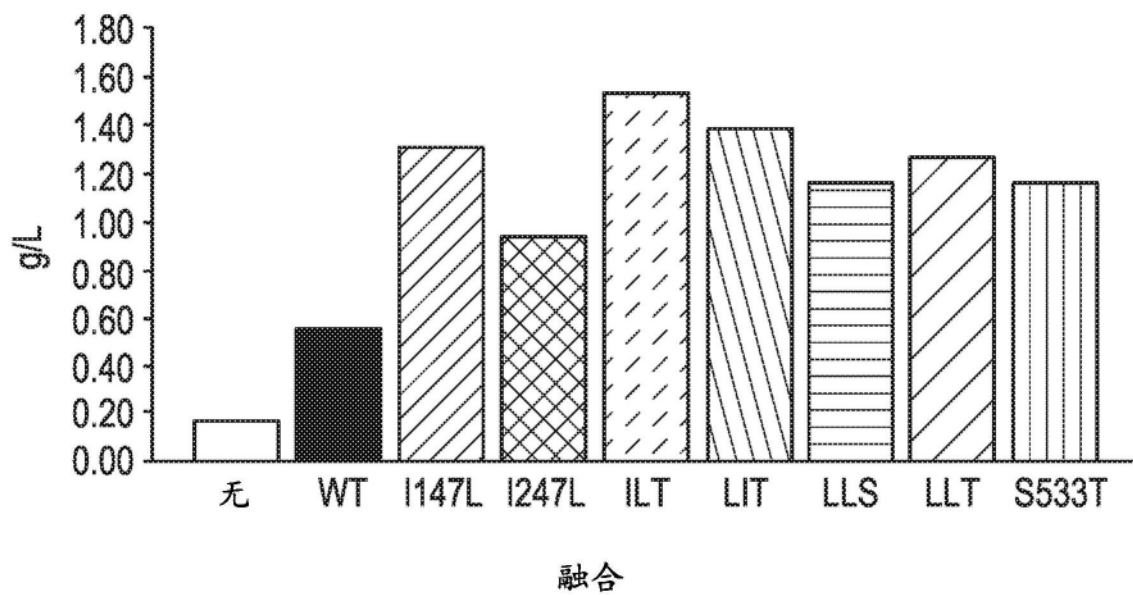


图3

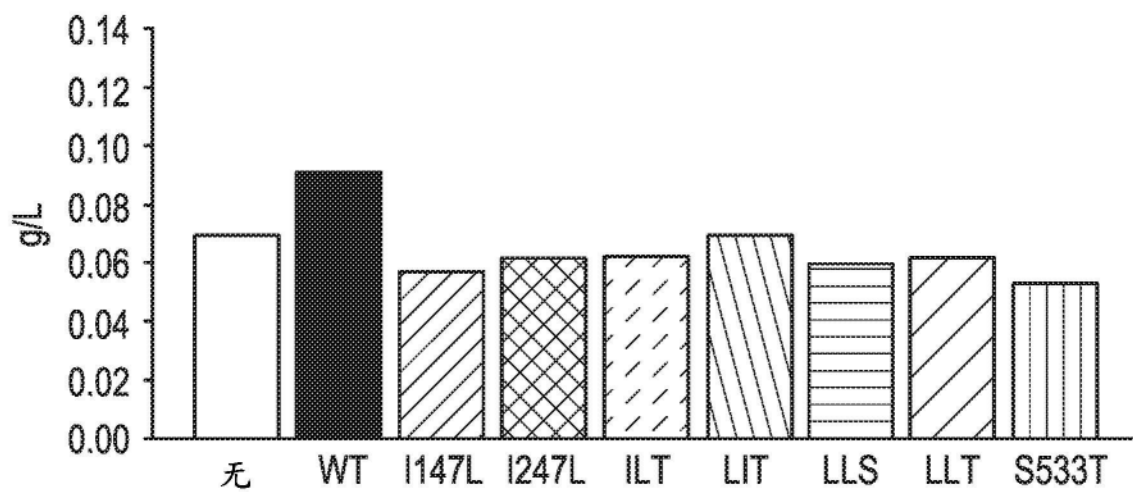


图4

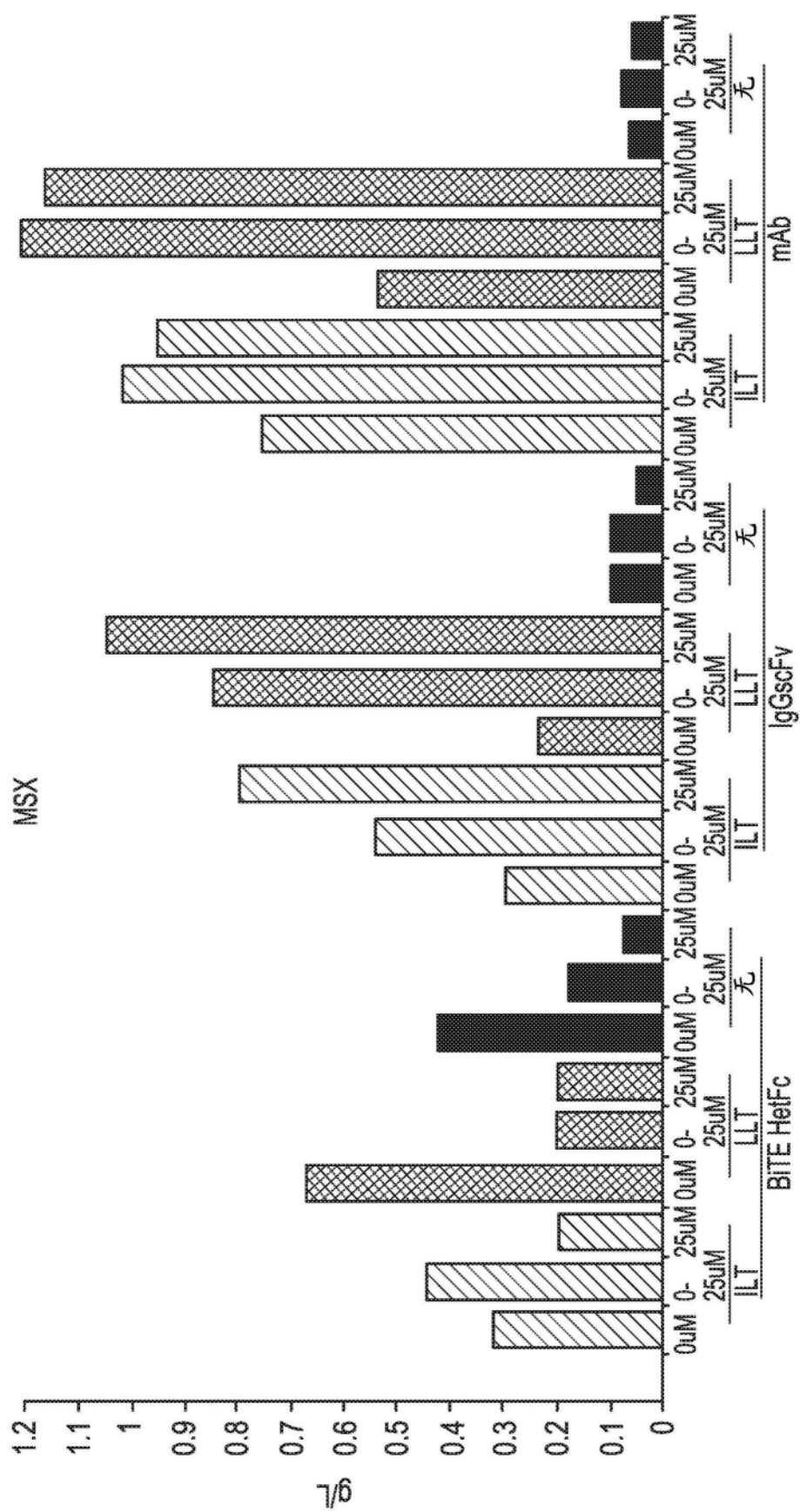


图5

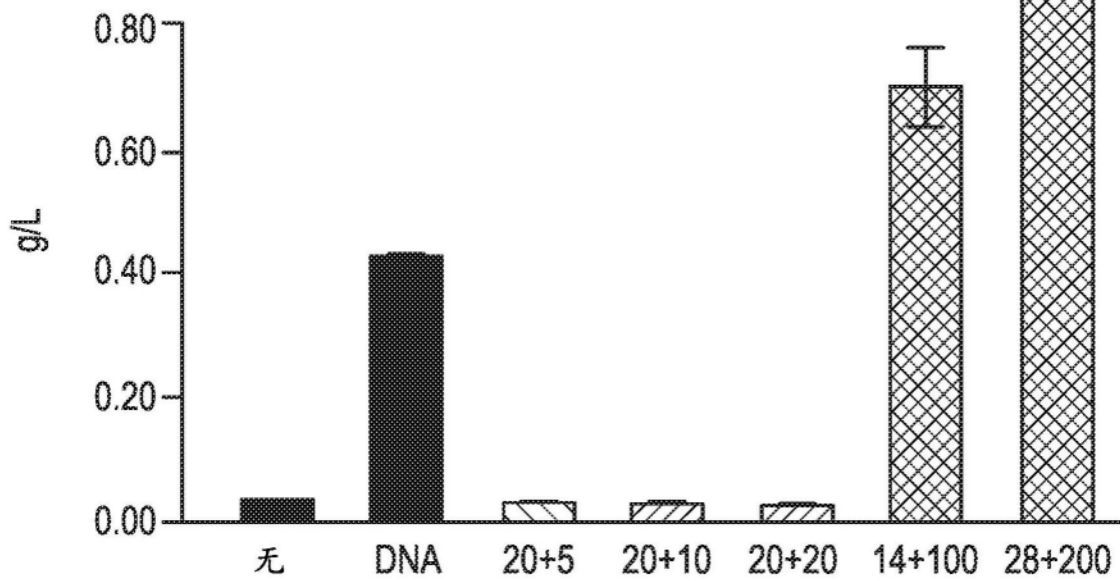


图6A

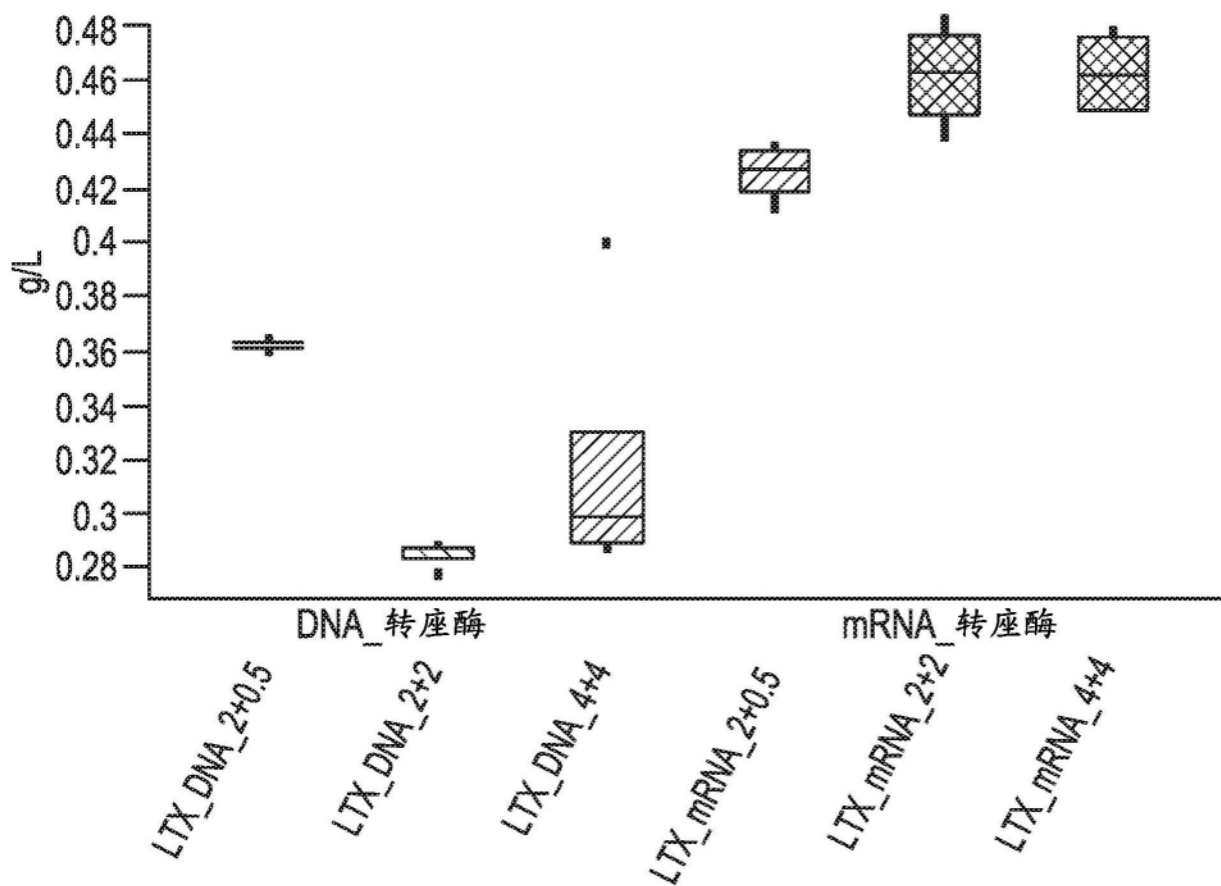


图6B

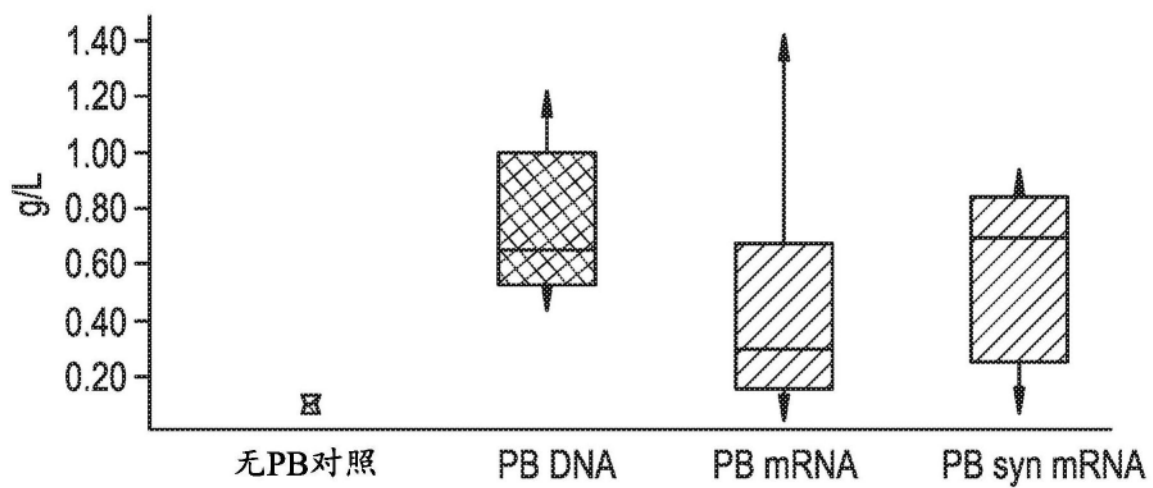


图7



图8A

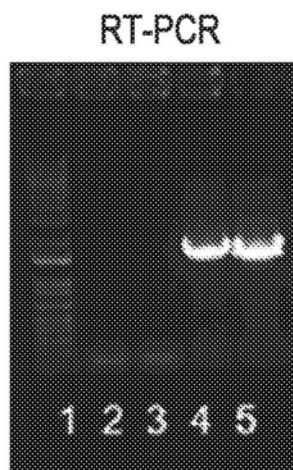


图8B

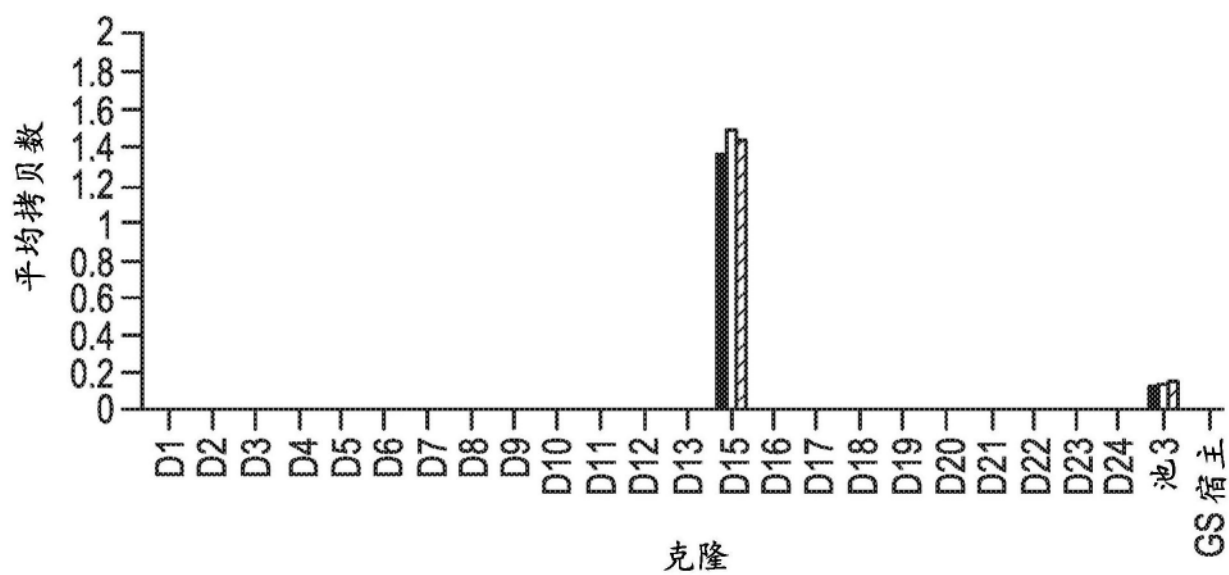


图9

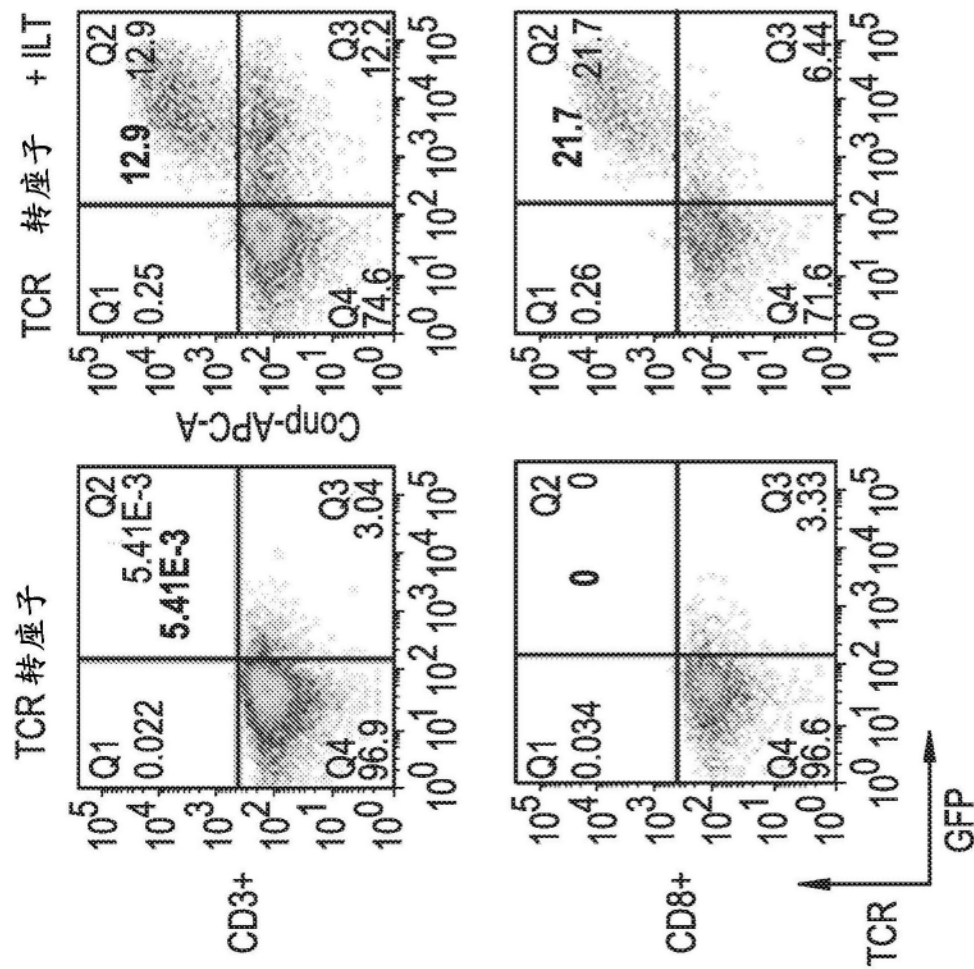


图10A

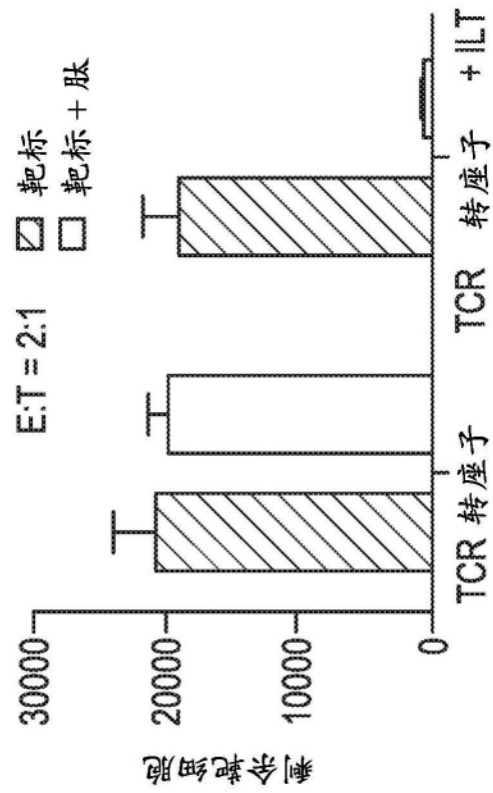


图10B

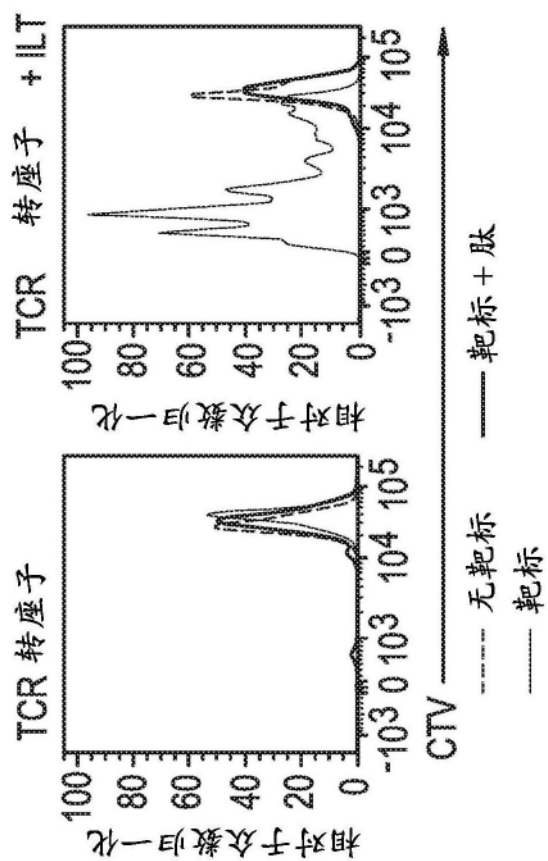


图10C