



(21) 申请号 201880079952.3
(22) 申请日 2018.12.11
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111465686 A
(43) 申请公布日 2020.07.28
(30) 优先权数据
 2017-236641 2017.12.11 JP
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.06.11
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2018/045479 2018.12.11
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/117136 JA 2019.06.20
(73) 专利权人 富士胶片株式会社
 地址 日本东京
(72) 发明人 松浦达也 石原司
(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
 72002
 专利代理师 王灵菇

(51) Int.Cl.
 C12N 5/10 (2006.01)
 C12N 15/53 (2006.01)
 C12P 21/02 (2006.01)
(56) 对比文件
 US 2009186358 A1,2009.07.23
 W0 2014022102 A1,2014.02.06
 W0 2017051347 A2,2017.03.30
 Kei Urano等.Molecular defect of
 isovaleryl-CoA dehydrogenase in the skunk
 mutant of silkworm, Bombyx mori.The FEBS
 Journal.2017,第277卷(第277期),第4456页左
 栏最后1段,第4461页左栏第1-2段.
 Kei Urano等.Molecular defect of
 isovaleryl-CoA dehydrogenase in the skunk
 mutant of silkworm, Bombyx mori.The FEBS
 Journal.2017,第277卷(第277期),第4456页左
 栏最后1段,第4461页左栏第1-2段.
 审查员 刘佳

权利要求书2页 说明书18页
序列表6页 附图21页

(54) 发明名称
 动物细胞、动物细胞的制造方法及靶蛋白的
 制造方法
(57) 摘要

 本发明的课题在于提供一种增殖能力及存
 活率得到提高的动物细胞、上述动物细胞的制造
 方法及使用上述动物细胞的靶蛋白的制造方法。
 根据本发明,提供一种具有编码靶蛋白的基因和
 编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因且异戊酰辅
 酶A脱氢酶过表达的动物细胞。

1. 一种动物细胞, 其具有编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因且异戊酰辅酶A脱氢酶过表达, 其中,

动物细胞为CHO细胞,

编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因存在于同一表达载体上,

通过了培养期间的每个细胞的丁酸分泌量为 $30\text{fmol}/\text{细胞}/\text{天}$ 以下,

所述靶蛋白为抗体。

2. 一种动物细胞, 其具有编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因且异戊酰辅酶A脱氢酶过表达, 其中,

动物细胞为CHO细胞,

编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因存在于同一表达载体上,

通过了培养期间的每个细胞的异戊酸分泌量为 $30\text{fmol}/\text{细胞}/\text{天}$ 以下,

所述靶蛋白为抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的动物细胞, 其中,

编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因与启动子连接。

4. 根据权利要求1或2所述的动物细胞, 其中,

异戊酰辅酶A脱氢酶的表达量相对于不具有编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因的所述动物细胞为3倍以上。

5. 一种权利要求1或2所述的动物细胞的制造方法, 其包括如下工序:

使用包含编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因的同—表达载体来对动物细胞导入编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中,

导入编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因的工序通过电穿孔来进行。

7. 一种靶蛋白的制造方法, 其包括如下步骤:

培养权利要求1或2所述的动物细胞。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其中,

动物细胞的培养为补料分批培养或分批培养。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中,

细胞培养的接种细胞密度为 $0.2 \times 10^6 \text{cells/mL}$ 以上且 $5 \times 10^6 \text{cells/mL}$ 以下。

10. 根据权利要求8所述的方法, 其中,

培养期间中的活细胞率在整个期间为60%以上。

11. 根据权利要求8所述的方法, 其中,

通过了培养期间的培养液中的异戊酸的最大浓度为 $3000\mu\text{mol/L}$ 以下。

12. 根据权利要求8所述的方法, 其中,

通过了培养期间的培养液中的丁酸的最大浓度为 $3000\mu\text{mol/L}$ 以下。

13. 根据权利要求7所述的方法, 其中,

动物细胞的培养为灌注培养。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中,

细胞培养的接种细胞密度为 $0.2 \times 10^6 \text{cells/mL}$ 以上且 $3 \times 10^7 \text{cells/mL}$ 以下。

15. 根据权利要求13所述的方法, 其中,

培养期间中的活细胞率在整个期间为90%以上。

16. 根据权利要求13所述的方法, 其中,
培养液中的异戊酸的浓度为3000 $\mu\text{mol/L}$ 以下。

17. 根据权利要求13所述的方法, 其中,
通过了培养期间的培养液中的丁酸的浓度为3000 $\mu\text{mol/L}$ 以下。

动物细胞、动物细胞的制造方法及靶蛋白的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种表达靶蛋白的动物细胞。本发明涉及一种上述动物细胞的制造方法及使用上述动物细胞的靶蛋白的制造方法。

背景技术

[0002] 在抗体等生物药物的制造中,为了提高抗体的生产率,通常使用补料分批培养,在该补料分批培养中通过在培养液中追加添加营养而改善细胞的状态。并且,在抗体等生物药物的制造中,为了提高抗体的生产率,通常使用灌注培养,在该灌注培养中将培养液连续过滤及排出,同时将包含营养成分的新鲜培养基连续供给到培养槽中。

[0003] 作为降低细胞的增殖性、存活性的废物,可以举出有机酸。其中抑制性特别高的异戊酸是通过亮氨酸的代谢而作为中间产物产生的有机酸,一般作为产生臭气的物质而为人所知。在亮氨酸的代谢途径中,亮氨酸在细胞内被酶促转化为异戊酰辅酶A(3-甲基丁酰辅酶A)。异戊酰辅酶A通过其下游酶异戊酰辅酶A脱氢酶(也缩写为IVD)被转化为3-甲基丁-2-酰辅酶A。若IVD活性降低或缺失,则中间体异戊酰辅酶A被非酶降解而产生异戊酸(图1)。在遗传上IVD基因突变或缺失的患者会积聚异戊酸,引起颅神经病症(异戊酸血症)。

[0004] 在非专利文献1中记载有如下:在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中,从细胞分泌的异戊酸对增殖抑制起作用。在非专利文献1中,通过使用低亮氨酸培养基实施补料分批培养来减少异戊酸的分泌量,并提高增殖性。

[0005] 在专利文献1中记载有如下:通过将异戊酰辅酶A脱氢酶基因导入微生物来减少异戊酸生产量,并生产出难闻气味少的食品。

[0006] 在专利文献2中记载有在减少了亮氨酸的培养基中培养CHO细胞。

[0007] 现有技术文献

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:Biotechnology and bioengineering,vol 114,2017,1779-1790

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:日本特开2006-174786号公报

[0012] 专利文献2:W02017051347A

发明内容

[0013] 发明要解决的技术课题

[0014] 在补料分批培养中,与未追加添加营养的情况相比,能够长期间且高浓度培养细胞,但存在由于从细胞分泌的废物积聚而在培养后半期存活性降低的问题。并且,为了在灌注培养法中以高密度进行培养,除了供给营养以外,还将废物排出到系统外,因此需要在每天更换培养体积的1~3倍量的培养基的同时进行培养,因此成本增加成为问题。

[0015] 本发明要解决的课题在于提供一种增殖能力及存活率得到提高的动物细胞。本发明要解决的课题还在于提供一种上述动物细胞的制造方法及使用上述动物细胞的靶蛋白

的制造方法。

[0016] 用于解决技术课题的手段

[0017] 本发明人为了解决上述课题而进行了深入研究,其结果发现了,通过在CHO细胞中强制表达编码促进异戊酸代谢途径的下游反应的酶即异戊酰辅酶A脱氢酶的基因,能够减少异戊酸及丁酸的生产。并且,本发明人等证实了,作为上述结果,细胞的状态得到改善,并且增殖性及存活性得到提高。本发明是根据上述见解而完成的。

[0018] 即,根据本发明,提供以下发明。

[0019] <1>一种动物细胞,其具有编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因且异戊酰辅酶A脱氢酶过表达。

[0020] <2>根据<1>所述的动物细胞,其中,编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因与启动子连接。

[0021] <3>根据<1>或<2>所述的动物细胞,其中,动物细胞为CHO细胞。

[0022] <4>根据<1>至<3>中任一项所述的动物细胞,其中,异戊酰辅酶A脱氢酶的表达量相对于不具有编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因的上述动物细胞为3倍以上。

[0023] <5>根据<1>至<4>中任一项所述的动物细胞,其中,编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因存在于同一表达载体上。

[0024] <6>一种<1>至<5>中任一项所述的动物细胞的制造方法,其包括如下工序:对动物细胞导入编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因。

[0025] <7>根据<6>所述的方法,其中,导入编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因的工序通过电穿孔来进行。

[0026] <8>根据<6>或<7>所述的方法,其中,使用包含编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因的同—表达载体来导入编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因。

[0027] <9>一种靶蛋白的制造方法,其包括如下步骤:培养<1>至<5>中任一项所述的动物细胞。

[0028] <10>根据<9>所述的方法,其中,动物细胞的培养为补料分批培养或分批培养。

[0029] <11>根据<10>所述的方法,其中,细胞培养的接种细胞密度为 0.2×10^6 cells/mL以上且 5×10^6 cells/mL以下。

[0030] <12>根据<10>或<11>所述的方法,其中,培养期间中的活细胞率在整个期间为60%以上。

[0031] <13>根据<10>至<12>中任一项所述的方法,其中,通过了培养期间的培养液中的异戊酸的最大浓度为 $3000 \mu\text{mol/L}$ 以下。

[0032] <14>根据<10>至<13>中任一项所述的方法,其中,通过了培养期间的每个细胞的异戊酸分泌量为 30 fmol/细胞/天 以下。

[0033] <15>根据<10>至<14>中任一项所述的方法,其中,通过了培养期间的培养液中的丁酸的最大浓度为 $3000 \mu\text{mol/L}$ 以下。

[0034] <16>根据<10>至<15>中任一项所述的方法,其中,通过了培养期间的每个细胞的丁酸分泌量为 30 fmol/细胞/天 以下。

- [0035] <17>根据<9>所述的方法,其中,动物细胞的培养为灌注培养。
- [0036] <18>根据<17>所述的方法,其中,细胞培养的接种细胞密度为 0.2×10^6 cells/mL以上且 3×10^7 cells/mL以下。
- [0037] <19>根据<17>或<18>所述的方法,其中,培养期间中的活细胞率在整个期间为90%以上。
- [0038] <20>根据<17>至<19>中任一项所述的方法,其中,培养液中的异戊酸的浓度为 $3000 \mu\text{mol/L}$ 以下。
- [0039] <21>根据<17>至<20>中任一项所述的方法,其中,每个细胞的异戊酸分泌量为 30 fmol/细胞/天 以下。
- [0040] <22>根据<17>至<21>中任一项所述的方法,其中,通过了培养期间的培养液中的丁酸的浓度为 $3000 \mu\text{mol/L}$ 以下。
- [0041] <23>根据<17>至<22>中任一项所述的方法,其中,通过了培养期间的每个细胞的丁酸分泌量为 30 fmol/细胞/天 以下。
- [0042] 发明效果
- [0043] 本发明的动物细胞具有高增殖能力及高存活率。根据本发明的动物细胞,能够以高生产率制造靶蛋白。

附图说明

- [0044] 图1表示细胞中的亮氨酸的代谢途径。chIvd表示CHO细胞内源性异戊酰辅酶A脱氢酶,hIVD表示外源人异戊酰辅酶A脱氢酶。
- [0045] 图2表示包含编码与绿色荧光蛋白(GFP)缀合的人异戊酰辅酶A脱氢酶的基因hIVD-GFP的载体(pCMV6-AC-GFP)的示意图。在pCMV6-AC-GFP中,在GFP的上游的限制性酶部位编入有编码人异戊酰辅酶A脱氢酶的基因hIVD。
- [0046] 图3表示pCMV6-Entry载体的示意图。
- [0047] 图4表示测定基因导入后的细胞的荧光并测定发出荧光信号的细胞的比例的结果。
- [0048] 图5表示对基因导入后的细胞确认了IVD基因的表达的结果。
- [0049] 图6表示基因导入后随时间测定细胞的活细胞密度的结果。
- [0050] 图7表示基因导入后随时间测定细胞的活细胞率(存活率)的结果。
- [0051] 图8表示测定培养开始后第14天的培养液中的IgG1浓度的结果。
- [0052] 图9表示培养开始后第14天的培养液中的每个细胞的IgG1生产量(Q_p)。
- [0053] 图10表示随时间测定培养液中的异戊酸的浓度的结果。
- [0054] 图11表示测定培养液中的每个细胞的异戊酸生产量的结果。
- [0055] 图12表示测定IVD基因的表达的结果。
- [0056] 图13表示随时间测定细胞的活细胞密度的结果。
- [0057] 图14表示随时间测定培养液中的单克隆抗体的浓度的结果。
- [0058] 图15表示每个细胞的单克隆抗体的生产量。
- [0059] 图16表示测定培养液中的有机酸的浓度的结果。
- [0060] 图17表示培养液中的每个细胞的有机酸生产量。

- [0061] 图18表示随时间测定细胞的活细胞密度的结果。
- [0062] 图19表示随时间测定细胞的活细胞率(存活率)的结果。
- [0063] 图20表示随时间测定渗透侧的培养液中的单克隆抗体的浓度的结果。
- [0064] 图21表示测定1天生产的单克隆抗体量的结果。
- [0065] 图22表示随时间测定培养液中的异戊酸的浓度的结果。。
- [0066] 图23表示随时间测定培养液中的丁酸的浓度的结果。

具体实施方式

[0067] 以下,对用于实施本发明的方式进行详细说明。

[0068] 在本说明书中,使用“~”表示的数值范围是指将“~”前后所记载的数值分别作为最小值及最大值而包含的范围。

[0069] [动物细胞]

[0070] 本发明的动物细胞为具有编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因且异戊酰辅酶A脱氢酶过表达的动物细胞。

[0071] 已知异戊酸与许多低分子有机酸同样,通过抑制组蛋白去乙酰化酶来中止细胞周期,并抑制增殖。当培养CHO细胞时,由于上述原因,异戊酸积聚,从而在培养后期细胞停止增殖,存活率降低。由于存活率的降低,每个细胞的蛋白生产量降低。

[0072] 在非专利文献1中,通过使用低亮氨酸培养基实施补料分批培养来减少异戊酸的分泌量。但是,在市售培养基中无法使用亮氨酸的减少处方,因此非专利文献1中所记载的方法缺乏通用性。并且,在非专利文献1中,虽然细胞的增殖性得到提高,但无法保持培养后半期的存活性,并且每个细胞的IgG生产量(Qp)降低,因此总抗体生产量没有变化。相对于此,在本发明中,通过控制细胞本身,能够与培养基种类无关地抑制异戊酸的分泌。并且,本发明的细胞能够将培养后半期的存活性保持为较高,通过在保持每个细胞的抗体生产量的同时提高增殖性,能够提高抗体的总生产量。

[0073] 在专利文献1中,异戊酸的减少以减少食品生产物的臭气为目的,并没有提及异戊酸本身的细胞增殖抑制性。并且,专利文献1的对象为微生物,动物细胞在对象外,并且与靶蛋白的生产无关。相对于此,在本发明中,能够通过减少异戊酸的生产来增大CHO细胞的增殖,从而能够高效率地制造靶蛋白。

[0074] 在本发明中,并不是为了减少亮氨酸的添加量,而是为了激活亮氨酸的代谢途径并消除中间体异戊酰辅酶A的积聚,将异戊酰辅酶A脱氢酶基因导入动物细胞。高表达异戊酰辅酶A脱氢酶的细胞能够通过将异戊酰辅酶A快速转化为3-甲基丁-2-酰辅酶A来与培养基种类无关地抑制异戊酸的分泌量。如上所述,通过提供与培养基种类无关地异戊酸的分泌少的细胞,能够使用本发明的细胞实施增殖性及存活性高的培养。尤其,能够在废物容易积存的培养后期(培养开始后第10天以后)将细胞的存活性保持为较高。在本发明中,通过保持高存活性,能够提高每个细胞的蛋白生产率,与通常的培养法相比能够提高蛋白的总生产量。另外,作为次要效果,能够期待通过减少死细胞来减少下游工序的蛋白质纯化时成为问题的宿主来源蛋白及DNA混入量。另外,在本发明的细胞中,抑制了已知为与异戊酸同样具有增殖抑制活性的丁酸的分泌量。由于异戊酰辅酶A脱氢酶不直接参与生成丁酸的代谢途径,因此在本发明的动物细胞中能够减少丁酸的分泌量是出乎意料的结果。

[0075] 并且,已知有如下:异戊酸及丁酸通过抑制组蛋白去乙酰化酶(HDAC)来抑制细胞分裂,同时由于激活基因的表达来提高靶蛋白的生产率即增加每个细胞的抗体产生量(Q_p)。因此,可以预计,若异戊酸及丁酸的分泌量降低,则每个细胞的抗体产生量(Q_p)也会降低。但是,在本发明中,尽管通过异戊酰辅酶A脱氢酶的高表达减少了异戊酸、丁酸,但不会降低靶蛋白的生产率(每个细胞的抗体产生量(Q_p))而细胞的增殖率得到提高,从而能够提高靶蛋白的生产量。

[0076] 并且,在补料分批培养、分批培养及灌注培养这两者中能够发挥本发明的效果。在灌注培养中,低灌注比培养时废物的积聚成为问题,但通过使用本发明的动物细胞,能够在保持增殖性及存活性的同时进行培养。另外,由于能够抑制废物的分泌/积聚,因此即使在使用灌注培养的高密度培养时也不需要高灌注比。因此,即使在低灌注比状态下也能够保持品质的同时进行培养。并且,由于高存活性而能够在不产生细胞碎片的状态下进行培养,因此能够避免灌注培养时所使用的分离膜的堵塞。

[0077] <靶蛋白>

[0078] 在本发明中,靶蛋白的种类不受特别限定,例如为重组多肽链、重组分泌多肽链、抗原结合蛋白、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、小鼠抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、片段化免疫球蛋白、单链抗体(scFv)。靶蛋白优选为人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或小鼠抗体。作为片段化免疫球蛋白,可以举出Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv等。抗体的种类也不受特别限定,可以为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等IgG、IgA、IgD、IgE、IgM等任一类,但用作医药时,优选IgG及IgM。

[0079] 人抗体包括具有衍生自人免疫球蛋白序列的一个或多个可变区及恒定区的所有抗体。在一实施方式中,可变结构域及恒定结构域全部都衍生自人免疫球蛋白序列(完全人抗体)。

[0080] 人源化抗体具有与通过一个或多个氨基酸取代、缺失、和/或添加衍生自非人物种的抗体的序列不同的序列,以在给药于人对象时,与非人物种抗体相比,人源化抗体诱发免疫应答的可能性降低和/或严重免疫应答的诱发变少。在一实施方式中,非人物种抗体的重链和/或轻链的骨架结构域及恒定结构域内的某一特定的氨基酸发生突变以产生人源化抗体。在另一实施方式中,来自人抗体的恒定结构域与非人物种的可变结构域融合。

[0081] 嵌合抗体是指来源互不相同的可变区与恒定区连接的抗体。例如,由小鼠抗体的重链及轻链的可变区和人抗体的重链及轻链的恒定区组成的抗体为小鼠/人异源嵌合抗体。通过将编码小鼠抗体的可变区的DNA与编码人抗体的恒定区的DNA连接并将其编入表达载体中,能够制作表达嵌合抗体的重组载体。通过培养用上述载体转化的重组细胞并使其表达所编入的DNA,从而能够获取在培养中生产的嵌合抗体。

[0082] 双特异性抗体是指识别两个不同的抗原特异性的、通过化学方法或细胞融合制作出的抗体。作为制作双特异性抗体的方法,报道有如下:使用N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯或S-乙酰巯基琥珀酸酐等交联剂将两个球蛋白分子结合而制作的方法、将球蛋白分子的Fab片段彼此结合而制作的方法等。

[0083] Fc融合蛋白表示具有Fc区的蛋白,包括抗体。

[0084] Fab为具有 V_L 、 V_H 、 C_L 及 C_H1 结构域的单价片段。

[0085] $F(ab')_2$ 为具有在铰链区通过二硫醚交联结合的两个Fab片段的二价片段。

[0086] Fv片段具有抗体的单臂的 V_L 及 V_H 结构域。

[0087] 单链抗体(scFv)为V_L区及V_H区经由接头(linker)(例如,氨基酸残基的合成序列)接合而形成连续的蛋白链的抗体,在此,接头具有足以使蛋白链在其自身上折回而形成单价抗原结合部位的长度。

[0088] 编码靶蛋白的基因能够通过本领域技术人员公知的方法来获得。当靶蛋白为抗体时,能够使用编码抗体的L链的DNA及编码H链的DNA。

[0089] 能够以如下方式制备编码抗体的L链的DNA及编码H链的DNA。从具有表达抗体的基因的杂交瘤、细胞、噬菌体、核糖体等提取mRNA。通过使用逆转录酶的逆转录反应,由该mRNA制作cDNA。通过使用具有与L链基因或H链基因互补的碱基序列的引物和cDNA的PCR来扩增L链基因或H链基因,并通过与克隆用质粒结合来获取各基因。

[0090] 能够以如下方式制备编码抗体的L链的片段的DNA及编码H链的片段的DNA。从具有表达抗体的基因的杂交瘤、细胞、噬菌体、核糖体等提取mRNA。通过使用逆转录酶的逆转录反应,由该mRNA制作cDNA。通过使用具有与L链基因片段或H链基因片段互补的碱基序列的引物和cDNA的PCR来扩增L链基因片段或H链基因片段,并通过与克隆用质粒结合来获取各基因片段。

[0091] <异戊酰辅酶A脱氢酶及异戊酰辅酶A脱氢酶基因>

[0092] 在本发明中,异戊酰辅酶A脱氢酶的来源不受特别限定,能够使用来源于人、猴、小鼠、大鼠、仓鼠等哺乳动物的编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因。在本发明中,外源基因是指从外部导入动物细胞中的基因。并且,在扩增内源基因而进行了基因导入的情况下也视为外源基因。

[0093] 将人异戊酰辅酶A脱氢酶的碱基序列和氨基酸序列示于序列表的序列号1及2。

[0094] 作为编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因,能够使用以下:

[0095] (1) 编码由序列号2中所记载的氨基酸序列组成的蛋白质的基因;

[0096] (2) 编码由在序列号2中所记载的氨基酸序列中缺失、取代或添加了一个或多个氨基酸的氨基酸序列组成且具有异戊酰辅酶A脱氢酶活性的蛋白质的基因;或

[0097] (3) 编码由与序列号2中所记载的氨基酸序列具有85%以上(进一步优选为90%以上,尤其优选为95%以上,最优选为98%以上)的序列同源性的氨基酸序列组成且具有异戊酰辅酶A脱氢酶活性的蛋白质的基因。

[0098] 作为编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因,还能够使用以下:

[0099] (4) 由序列号1中所记载的碱基序列组成的基因;

[0100] (5) 编码由在序列号1中所记载的碱基序列中缺失、取代或添加了一个或多个碱基的碱基序列组成且具有异戊酰辅酶A脱氢酶活性的蛋白质的基因;或

[0101] (6) 编码由对序列号1中所记载的碱基序列的互补序列在严格(stringendo)的条件下杂交(hybridize)的碱基序列组成且具有异戊酰辅酶A脱氢酶活性的蛋白质的基因。

[0102] “缺失、取代或添加了一个或多个氨基酸的氨基酸序列”中的“一个或多个”是指优选为1~20个,更优选为1~10个,进一步优选为1~5个,尤其优选为1~3个。

[0103] 本发明中的序列同源性是指用以下式计算的值。

[0104] %序列同源性=[(相同残基数)/(较长的比对长度)]×100

[0105] 两个氨基酸序列中的序列同源性能够利用本领域技术人员公知的任意的方法来确定,能够使用BLAST((Basic Local Alignment Search Tool))程序(J.Mol.Biol.215:

403-410,1990)等来确定。分母的“较长的比对长度”是指当比较了两个比对时,分母使用较长的比对长度。

[0106] “缺失、取代或添加了一个或多个碱基的碱基序列”中的“一个或多个”是指优选为1~20个,更优选为1~10个,进一步优选为1~5个,尤其优选为1~3个。

[0107] “在严格的条件下杂交”中的“在严格的条件下”是指在中度或高度的严格条件下杂交,这些只要是本领域技术人员就能够认识到。作为中度的严格的条件,能够举出 Sambrook等人、Molecular Cloning:A Laboratory Manual、第3版、Vol.1、7.42-7.45 Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001中所记载的条件。中度的严格条件例如能够举出在硝基纤维素过滤器中 $5\times\text{SSC}$ 、 $0.5\%\text{SDS}$ 、 $1.0\text{mmol/L EDTA (pH8.0)}$ 的预洗涤溶液、约 $40\sim 50^\circ\text{C}$ 下的约 50% 甲酰胺、 $2\times\text{SSC}\sim 6\times\text{SSC}$ (或约 42°C 下的约 50% 甲酰胺中的施托克溶液(Stark's solution)等其他同样的杂交溶液)的杂交条件及约 60°C 、 $0.5\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 的洗涤条件。高度严格的条件也能够由本领域技术人员轻松地确定,例如包括比上述中度严格的条件高的温度和/或低的盐浓度下的杂交和/或洗涤。例如,能够举出如上所述的杂交条件及 68°C 、 $0.2\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 下的洗涤。在此, $1\times\text{SSC}$ 的组成为 150mmol/L NaCl 、 15mmol/L 柠檬酸钠、 $\text{pH}7.4$ 。 SDS 为十二烷基硫酸钠,EDTA为乙二胺四乙酸。

[0108] 以下示出除人以外的异戊酰辅酶A脱氢酶的氨基酸序列和碱基序列的信息。以下编号表示NCBI(National Center for Biotechnology Information:国家生物技术信息中心)的基因编号。

[0109] ID:24513大鼠

[0110] ID:56357小鼠

[0111] ID:368775斑马鱼

[0112] ID:510440牛

[0113] ID:423011鸡

[0114] ID:702867恒河猴

[0115] ID:100856316狗

[0116] ID:100156047猪

[0117] ID:100759847中国仓鼠

[0118] 关于除人以外的异戊酰辅酶A脱氢酶,也与人异戊酰辅酶A脱氢酶的情况同样地,可以使用以下:

[0119] (2A) 编码由在规定的氨基酸序列中缺失、取代或添加了一个或多个氨基酸的氨基酸序列组成且具有异戊酰辅酶A脱氢酶活性的蛋白质的基因;

[0120] (3A) 编码由与规定的氨基酸序列具有 85% 以上(进一步优选为 90% 以上,尤其优选为 95% 以上,最优选为 98% 以上)的序列同源性的氨基酸序列组成且具有异戊酰辅酶A脱氢酶活性的蛋白质的基因;

[0121] (5A) 编码由在规定的碱基序列中缺失、取代或添加了一个或多个碱基的碱基序列组成且具有异戊酰辅酶A脱氢酶活性的蛋白质的基因;或

[0122] (6A) 编码由对规定的碱基序列的互补序列在严格的条件下杂交的碱基序列组成且具有异戊酰辅酶A脱氢酶活性的蛋白质的基因。

[0123] 编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因优选与启动子连接。

[0124] 作为启动子,只要能够在宿主的动物细胞中发挥作用而表达异戊酰辅酶A脱氢酶,则不受特别限定。作为启动子,优选CMV启动子(巨细胞病毒启动子)、EF1 α 启动子(人多肽链延伸因子基因的启动子)、SV40启动子(猿猴空泡病毒40启动子)、 β -肌动蛋白启动子、MMLV-LTR启动子(莫洛尼小鼠白血病病毒的长末端重复启动子)或小鼠 β 珠蛋白启动子,更优选CMV启动子。

[0125] 在本发明的动物细胞中,异戊酰辅酶A脱氢酶是过表达的。过表达是指某一基因的表达超过宿主中的通常的表达量。通过将异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因导入宿主并使上述外源基因在宿主中表达,能够获得异戊酰辅酶A脱氢酶过表达的动物细胞。

[0126] 本发明的动物细胞中的异戊酰辅酶A脱氢酶的表达量相对于不具有编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因的动物细胞,优选为3倍以上,更优选为3.5倍以上,更进一步优选为4倍以上,进一步优选为4.5倍以上,再进一步优选为5倍以上,尤其优选为5.5倍以上。可以没有上限,既可以为30000倍以下,也可以为10000倍以下。

[0127] 异戊酰辅酶A脱氢酶的表达量能够通过RT-PCR法(逆转录-聚合酶链反应)等来调查。异戊酰辅酶A脱氢酶的表达量优选通过mRNA的逆转录和实时PCR来实施。异戊酰辅酶A脱氢酶的表达量优选为通过标准化而计算的相对表达量。标准化例如能够通过将 β -肌动蛋白或HPRT1等管家基因的表达量作为内源性对照的比较定量来进行。

[0128] <动物细胞>

[0129] 本发明中的细胞只要是动物细胞,则不受特别限定。作为动物细胞,能够举出中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、BHK细胞、293细胞、骨髓瘤细胞(NS0细胞等)、PerC6细胞、SP2/0细胞、杂交瘤细胞、COS细胞、3T3细胞、HeLa细胞、Vero细胞、MDCK细胞、PC12细胞、WI38细胞等。在上述之中,尤其优选CHO细胞、BHK细胞、293细胞、骨髓瘤细胞(NS0细胞等)、PerC6细胞、SP2/0细胞、杂交瘤细胞,进一步优选CHO细胞。CHO细胞重组蛋白例如被广泛用于细胞因子、凝血因子及抗体的产生。优选使用缺失了二氢叶酸还原酶(DHFR)的CHO细胞,作为DHFR缺陷型CHO细胞,例如能够使用CHO-DG44。

[0130] 在本发明的动物细胞中,编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因可以存在于同一个表达载体上,也可以存在于不同的表达载体中。优选编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因存在于同一个表达载体上。认为通过编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因存在于同一个表达载体上,异戊酰辅酶A脱氢酶通过抑制异戊酸这样的增殖抑制物质来发挥增殖作用,保有异戊酰辅酶A脱氢酶基因的细胞容易增殖。认为通过使编码要表达的靶蛋白的基因存在于具有异戊酰辅酶A脱氢酶基因的载体上,能够获得协同效果(正选)。并且,通过使编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因载置于同一个表达载体上,上述基因的数量的比率成为1:1的关系。由于编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因的导入比率与靶蛋白的表达效率相关,因此有可能发挥本发明的效果。预计若异戊酰辅酶A脱氢酶的表达增高,则靶蛋白的表达与其相应地增高。

[0131] [动物细胞的制造方法]

[0132] 根据本发明,提供一种本发明的动物细胞的制造方法,其包括如下工序:对动物细胞导入编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因。

[0133] 编码靶蛋白的基因及编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因优选分别以编入载体中

的形式导入作为宿主的动物细胞中。

[0134] 作为能够用于将基因导入宿主中的载体,例如能够使用来源于哺乳动物的表达载体,例如可以举出pCMV6-Entry (OriGene公司制造)、pcDNA3 (Invitrogen公司制造)、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18 (17), p5322)、pEF、pCDM8 (Funakoshi公司制造)、INPEP4 (Biogen-IDEA公司制造)等,但不受特别限定。

[0135] 并且,已知有具有聚A的mRNA在细胞内稳定。编码靶蛋白的基因及编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因可以具有用于将聚A添加到基因而所需要的聚A信号,例如小鼠 β 珠蛋白聚A信号、牛成长激素聚A信号、SV40聚A信号等。

[0136] 将编码靶蛋白的基因及编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因导入动物细胞中的方法不受特别限定,能够通过本领域技术人员公知的方法来进行。例如,能够利用电穿孔、脂质转染、磷酸钙法、DEAE葡聚糖法、使用阳离子脂质体DOTAP (Roche Life Science公司制造)的方法或使用病毒载体的方法来进行。在上述之中,优选为电穿孔。

[0137] 当将基因导入动物细胞时,根据所使用的表达载体的种类及基因导入法,将基因仅导入供于基因导入的细胞中的一部分细胞中。为了鉴定及选择已导入基因的细胞,例如可以将编码对抗生素抗性的选择标记的基因与目标基因一起导入宿主细胞内。优选的选择标记包括对药物赋予抗性的那些标记,例如G418、潮霉素及甲氨蝶呤等。

[0138] 在本说明书中,如上所述,在本发明中优选使用包含编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因的同一个表达载体来导入编码靶蛋白的基因和编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因。

[0139] 在本发明的细胞中,编码靶蛋白的基因可以在瞬时表达系统中表达,也可以在组成型表达系统中表达,但优选在组成型表达系统中表达。

[0140] 在本发明的细胞中,编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因可以在瞬时表达系统中表达,也可以在组成型表达系统中表达,但优选在组成型表达系统中表达。

[0141] 瞬时表达系统是指通过磷酸钙法,电穿孔法,脂质转染法等将环状质粒取入细胞内并使其表达的方法。编码靶蛋白的基因及编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因存在于染色体外部的情况较多。

[0142] 组成型表达系统是指通过磷酸钙法、电穿孔法、脂质转染法将环状质粒或通过限制性酶处理等制作的直链上质粒等取入细胞内并将一部分插入细胞的基因组中来表达靶蛋白的方法。编码靶蛋白的基因及编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因的表达能够长期间维持。并且,若将药剂抗性基因导入质粒中,则能够进行药剂挑选,能够高效率地选择编码靶蛋白的基因及编码异戊酰辅酶A脱氢酶的外源基因维持在染色体上的细胞。

[0143] [靶蛋白的制造方法]

[0144] 根据本发明,提供一种靶蛋白的制造方法,其包括如下工序:培养本发明的动物细胞。

[0145] 通过培养本发明的动物细胞,能够制造靶蛋白。培养能够按照公知的方法来进行。

[0146] 作为用于本发明的动物细胞的培养中的培养基,能够使用在通常的动物细胞的培养中使用的培养基。例如,能够使用OptiCHO (Lifetechnologies公司, 12681011) 培养基、Dulbecco改良的Eagle培养基 (DMEM)、Eagle最低必须培养基 (MEM)、RPMI-1640培养基、RPMI-1641培养基、F-12K培养基、Ham F12培养基、Iscob改良Dulbecco培养基 (IMDM)、

McCoy5A培养基、Leibovitz L-15培养基及EX-CELL (商标) 300系列(JRH Biosciences公司)、CHO-S-SFMII (Invitrogen公司)、CHO-SF (Sigma-Aldrich公司)、CD-CHO (Invitrogen公司)、IS CHO-V (Irvine Scientific公司)、PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich公司) 等。

[0147] 培养基中可以添加胎牛血清(FCS)等血清,更优选在无血清培养基中培养,最优选为完全合成培养基。

[0148] 培养基中可以补充氨基酸、盐、糖类、维生素、激素、生长因子、缓冲液、抗生素、脂质、微量元素、植物蛋白的水解物等追加成分。

[0149] 培养基的pH根据所培养的细胞而不同,但一般为pH6.0~8.0,优选为pH6.8~7.6,更优选为pH7.0~7.4。

[0150] 培养温度一般为30℃~40℃,优选为32℃~37℃,更优选为36℃~37℃,并且可以在培养过程中改变培养温度。

[0151] 培养优选在CO₂浓度为0~40%、优选为2~10%的气氛下进行。

[0152] 培养时间不受特别限定,但一般为12小时~90天,优选为24小时~60天,更优选为24小时~30天。

[0153] 在培养中,根据需要能够施加培养基的更换、充气、搅拌。

[0154] 本发明的动物细胞的培养能够在培养装置(也称为生物反应器)或除此以外的合适的容器内进行。作为培养装置,能够使用发酵槽型罐培养装置、气升型培养装置、培养瓶型培养装置、搅拌瓶型培养装置、微载体型培养装置、流化床型培养装置、中空纤维型培养装置、转瓶型培养装置、填充槽型培养装置等来进行培养。

[0155] 培养规模一般为1L~20000L,优选为200L~2000L,更优选为500L~2000L。

[0156] 培养可以使用分批培养(batch culture)、补料分批培养(fed-batch culture;也称为流加培养)、灌注培养(perfusion culture)等中的任意方法,但优选补料分批培养或灌注培养。

[0157] 分批培养是指细胞在固定体积的培养基中短期间生长,然后完全回收的不连续的方法。使用分批法生长的培养物经历细胞密度的增加直至达到最大细胞密度,然后消耗培养基成分,随着代谢副产物(乳酸盐及氨等)的水平积聚而生存细胞密度衰退。回收典型地在实现最大细胞密度(典型地,5~10×10⁶细胞/mL)的时间点发生。分批工艺为最简单的培养方法,然而生存细胞密度受养分利用能力的限制,一旦细胞达到最大密度,则培养衰退,靶蛋白的产生减少。废弃产物的积聚及营养耗尽迅速地导致培养衰退(典型地,约3~7天),因此无法延长靶蛋白的产生期间。

[0158] 补料分批培养为通过供给剂量(Bolus)或连续供给培养基以补充所消耗掉的培养基成分来改善分批工艺的培养方法。即,在补料分批培养中,培养形态为悬浮培养,在培养工艺开始后的一个以上的时间点在培养中提供追加成分。作为追加成分,可以举出在培养工艺中耗尽的细胞用的营养辅助成分,也可以包括其他辅助成分(例如,抑制细胞周期的化合物)。

[0159] 在补料分批培养中,由于在整个培养期间添加追加养分,因此与分批培养相比,有可能实现更高的细胞密度及靶蛋白的高产生量。在补料分批培养中,与分批培养不同,能够通过操作供给时间表及培养基成分来制作及持续二相培养,以将用于实现所期望的细胞密度的细胞生长期间(生长期)与中止的或缓慢的细胞生长期间(产生期)区分。由此,与分批

培养相比,补料分批培养有可能实现靶蛋白的更高产生量。

[0160] 在补料分批培养或分批培养中,细胞培养的接种细胞密度一般为 0.2×10^6 cells/mL以上且 1×10^7 cells/mL以下,优选为 0.2×10^6 cells/mL以上且 5×10^6 cells/mL以下,更优选为 0.5×10^6 cells/mL以上且 2.5×10^6 cells/mL以下,进一步优选为 0.5×10^6 cells/mL以上且 1.5×10^6 cells/mL以下。

[0161] 在补料分批培养或分批培养中,培养期间中的活细胞率在整个期间优选为60%以上且100%以下,更优选为70%以上且100%以下,进一步优选为75%以上且100%以下。

[0162] 在补料分批培养或分批培养中,通过了培养期间的培养液中的异戊酸的最大浓度优选为3000 μ mol/L以下,更优选为1500 μ mol/L以下,进一步优选为1000 μ mol/L以下,尤其优选为500 μ mol/L以下,最优选为300 μ mol/L以下。通过了培养期间的培养液中的异戊酸的最大浓度的下限不受特别限定,但一般为1 μ mol/L以上。

[0163] 在补料分批培养或分批培养中,通过了培养期间的每个细胞的异戊酸分泌量优选为30fmol/细胞/天以下,更优选为15fmol/细胞/天以下,进一步优选为5fmol/细胞/天以下。通过了培养期间的每个细胞的异戊酸分泌量的下限不受特别限定,但一般为0.1fmol/细胞/天以上。

[0164] 在补料分批培养或分批培养中,通过了培养期间的培养液中的丁酸的最大浓度优选为3000 μ mol/L以下,更优选为1500 μ mol/L以下,进一步优选为1000 μ mol/L以下,尤其优选为500 μ mol/L以下,最优选为300 μ mol/L以下。通过了培养期间的培养液中的丁酸的最大浓度的下限不受特别限定,但一般为1 μ mol/L以上。

[0165] 在补料分批培养或分批培养中,通过了培养期间的每个细胞的丁酸分泌量优选为30fmol/细胞/天以下,更优选为15fmol/细胞/天以下,进一步优选为5fmol/细胞/天以下。通过了培养期间的每个细胞的丁酸分泌量的下限不受特别限定,但一般为0.1fmol/细胞/天以上。

[0166] 灌注培养为添加新鲜的培养基,同时去除使用完的培养基的培养法,有可能进一步改善分批培养及补料分批培养。根据灌注培养,能够实现超过 1×10^8 细胞/mL的高细胞密度。典型的灌注培养在持续1天或2天分批培养之后开始启动,然后在培养物中连续、阶段性地和/或间断地添加新鲜的供给培养基,同时去除使用完的培养基。在灌注培养中,使用沉淀、离心分离或过滤等方法,能够在维持细胞密度的同时去除使用完的培养基。

[0167] 灌注培养的优点是,与分批培养法或补料分批培养相比,产生靶蛋白的培养可维持更长期间。但是,为了维持长期的灌注培养、尤其维持高细胞密度的灌注培养,需要制备、使用、保存及废弃培养基。在灌注培养中,需要大量养分,与分批培养及补料分批培养相比,靶蛋白的生产成本趋于增高。并且,通过选择膜孔径,由于能够将抗体回收于系统外部的同时继续培养,因此缩短抗体在培养液中的停留时间并减少化学变化,由此能够将抗体的品质保持为较高。

[0168] 如上所述,在灌注培养中,为了抑制废物的积聚,通过在抽取培养基的同时添加新鲜的培养基进行培养,能够进行高细胞密度培养,但存在由于使用大量的培养基而成本增加的问题。但是,根据本发明的动物细胞,通过减少抑制增殖的原因物质即异戊酸及丁酸,即使是低灌注比也能够进行高细胞密度培养,靶蛋白的生产量及生产率不会降低,因此能够有助于降低成本。

[0169] 也能够进行将补料分批培养及灌注培养组合的培养。作为一例,能够为了维持生长期的细胞的培养而使用伴有剂量供给的补料分批培养,接着,为了产生靶蛋白而使用灌注培养。

[0170] 灌注可以为连续、阶段性、断续或这些的组合中的任意形态。动物细胞被保持于培养物中,且被去除的使用完的培养基实质上不包含细胞或者可以具有远远少于培养物的细胞。通过选择膜孔径,能够将通过细胞培养表达的靶蛋白保持或回收于培养物中。为了防止培养中的细胞密度变得过大,也可以通过将培养液的一部分与细胞一同抽取,并加入相同量的新鲜的培养基来减小细胞密度(细胞渗出)。

[0171] 在灌注培养中,细胞培养的接种细胞密度一般为 0.2×10^6 cells/mL以上且 3×10^7 cells/mL以下,优选为 0.5×10^6 cells/mL以上且 1×10^7 cells/mL以下。

[0172] 在灌注培养中,培养期间中的活细胞率在整个期间优选为80%以上,更优选为85%以上,进一步优选为90%以上。

[0173] 在灌注培养中,最高达到细胞密度优选为 2×10^8 cells/mL以下,更优选为 1.5×10^8 cells/mL以下,进一步优选为 1.0×10^8 cells/mL以下。

[0174] 在灌注培养中,通过了培养期间的培养液中的异戊酸的最大浓度优选为 $3000 \mu\text{mol/L}$ 以下,更优选为 $1500 \mu\text{mol/L}$ 以下,进一步优选为 $1000 \mu\text{mol/L}$ 以下,尤其优选为 $500 \mu\text{mol/L}$ 以下,最优选为 $300 \mu\text{mol/L}$ 以下。通过了培养期间的培养液中的异戊酸的最大浓度的下限不受特别限定,但一般为 $1 \mu\text{mol/L}$ 以上。

[0175] 在灌注培养中,通过了培养期间的每个细胞的异戊酸分泌量优选为 30fmol/细胞/天 以下,更优选为 15fmol/细胞/天 以下,进一步优选为 5fmol/细胞/天 以下。通过了培养期间的每个细胞的异戊酸分泌量的下限不受特别限定,但一般为 0.1fmol/细胞/天 以上。

[0176] 在灌注培养中,通过了培养期间的培养液中的丁酸的最大浓度优选为 $3000 \mu\text{mol/L}$ 以下,更优选为 $1500 \mu\text{mol/L}$ 以下,进一步优选为 $1000 \mu\text{mol/L}$ 以下,尤其优选为 $500 \mu\text{mol/L}$ 以下,最优选为 $300 \mu\text{mol/L}$ 以下。通过了培养期间的培养液中的丁酸的最大浓度的下限不受特别限定,但一般为 $1 \mu\text{mol/L}$ 以上。

[0177] 在灌注培养中,通过了培养期间的每个细胞的丁酸分泌量优选为 30fmol/细胞/天 以下,更优选为 15fmol/细胞/天 以下,进一步优选为 5fmol/细胞/天 以下。通过了培养期间的每个细胞的丁酸分泌量的下限不受特别限定,但一般为 0.1fmol/细胞/天 以上。

[0178] 作为灌注培养中的灌注比,优选为 0.3vvd 以上且 5.0vvd 以下,更优选为 0.3vvd 以上 1.5vvd 以下。其中,vvd表示以下。

[0179] $\text{vvd} = (\text{volume of fresh medium} / \text{working volume of reactor} / \text{day})$,每天的供给培养液量/培养液量)

[0180] 细胞培养的接种细胞密度及培养中的最高达到细胞密度能够通过利用常规方法测定细胞数并将细胞数除以培养液量来求出。

[0181] 培养期间中的活细胞率(存活率)通过将活细胞数除以(活细胞数+死细胞数)来求出。例如,细胞数的测定能够使用Vi-CELL XR(Beckman Coulter公司)来测定。培养液中的异戊酸的浓度能够通过色谱分离(例如,使用DIONEX制造的ICS-2100及Ion Pac AS11-HC柱的色谱分离)来测定。

[0182] 每个细胞的异戊酸分泌量及丁酸分泌量能够根据后面记载的实施例中所记载的

数学式求出。

[0183] 通过上述培养而制造的靶蛋白能够进行纯化。靶蛋白的分离及纯化使用在通常的蛋白中使用的分离及纯化方法即可。例如,能够通过适当地选择及组合亲和色谱等色谱柱、过滤器、超滤、盐析、透析、十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳等电聚焦电泳等来分离及纯化靶蛋白,但不限于这些。上述中所得到的靶蛋白的浓度测定能够通过吸光度测定或酶联免疫吸附测定法(Enzyme-linked immunosorbent assay;ELISA)等来进行。

[0184] 作为用于亲和色谱中的柱,可以举出蛋白A柱、蛋白G柱。作为除亲和色谱以外的色谱,例如可以举出离子交换色谱、疏水性色谱、凝胶过滤、反相色谱、吸附色谱等。这些色谱能够使用HPLC(high performance liquid chromatography;高效液相色谱)或FPLC(fast protein liquid chromatography:快速蛋白液相色谱)等液相色谱来进行。

[0185] 另外,通过在纯化之前或纯化之后使适当的多肽修饰酶作用于靶蛋白,还能够修饰靶蛋白或者局部地去除肽。作为多肽修饰酶,例如使用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、赖氨酰肽链内切酶、蛋白激酶、葡萄糖苷酶等。

[0186] [靶蛋白的利用]

[0187] 当通过本发明的方法制造的靶蛋白具有作为药物有用的生物学活性时,能够通过将靶蛋白与药学上可接受的载体或添加剂混合以进行制剂化来制造药物。

[0188] 作为药学上可接受的载体及添加剂的例子,可以举出水、药学上可接受的有机溶剂、胶原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯胶、酪蛋白、琼脂、聚乙二醇、二甘油、甘油、丙二醇、凡士林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白(HSA)、甘露醇、山梨糖醇、乳糖、药学上可接受的表面活性剂等。

[0189] 例如,当用作注射用制剂时,能够使用将纯化的靶蛋白溶解于溶剂例如生理盐水、缓冲液、葡萄糖溶液等中并向其中加入抗吸附剂例如Tween80、Tween20、明胶、人血清白蛋白等而成的制剂。或者,也可以为了制成使用前溶解重构的剂形而进行冷冻干燥,作为用于冷冻干燥的赋形剂,例如能够使用甘露醇、葡萄糖等糖醇或糖类。

[0190] 靶蛋白的给药方法可以为口服给药或非口服给药中的任意一种,但优选为非口服给药。例如,可以举出注射(例如,基于静脉内注射、肌肉注射、腹腔注射、皮下注射等的全身或局部给药)、经鼻给药、经肺给药或经皮给药等。

[0191] 靶蛋白的给药量可根据靶蛋白的种类、治疗或作为预防对象的疾病的种类、患者的年龄、疾病的严重程度等适当地选择。一般而言,在每次每1kg体重0.001mg至1000mg的范围内,但不受特别限定。

[0192] 利用以下实施例对本发明进行进一步具体的说明,但本发明不受实施例的限定。

[0193] 实施例

[0194] <实施例1>动物细胞的制作

[0195] 构建包含编码嵌合IgG1(利妥昔单抗)的核酸序列的载体,通过将所构建的载体导入CHO-DG44细胞来制作出表达IgG1的CHO-DG44细胞(IgG1细胞)。根据日本特表2016-517691号公报的实施例2进行了载体的构建及向细胞中的导入。

[0196] 购买了包含编码与绿色荧光蛋白(GFP)缀合的人异戊酰辅酶A脱氢酶的基因IVD-GFP的载体(pCMV6-AC-GFP:图2)(OriGene公司)。

[0197] 并且,购买pCMV6-Entry载体(pCMV6-Entry Vector:图3)(OriGene公司),将其用作不表达IVD-GFP的对照组。

[0198] 表达IgG1的CHO-DG44细胞(IgG1细胞)均在37℃、5%CO₂气氛下的培养箱中培养。使用电穿孔法(Lonza公司,4D-Nucleofector)将上述载体导入IgG1细胞1×10⁶cells中,并接种在2mL的OptiCHO(Lifetechnologies公司,12681011)培养基上。1天之后,添加了G418(Lifetechnologies公司),以使终浓度达到200μg/mL。基因导入后第7天,接种在200μL的培养基上,以使在每张96孔板(IWAKI,3860-096)中成为5000cells/孔,并添加了G418(Lifetechnologies公司),以使终浓度达到200μg/mL。

[0199] 基因导入后第18天,将培养液量增大至1mL,并转移到24孔板中。使用流式细胞仪(BD FACSCalibur,BDbiosciences公司)测定IVD-GFP表达细胞的荧光,并筛选了发出荧光信号的细胞。将测定发出荧光信号的细胞(GFP+cells)的比例的结果示于图4。

[0200] 并且,使用RNeasy plus mini kit(Qiagen)处理细胞,并回收了总RNA。使用PrimeScriptTM RT Master Mix(Perfect Real Time,Takara)对所得到的总RNA实施了逆转录。作为与内源性IVD及外源性IVD这两者具有同源性的引物(序列号3及4)及内标,设计对β-肌动蛋白基因的引物(序列号5及6),使用SYBR(注册商标)Premix Ex TaqTM(Tli RNaseH Plus,Takara)实施了实时PCR(聚合酶链反应)。将标准化中使用β-肌动蛋白来确认了IVD基因的表达的结果示于图5。在导入了IVD基因的细胞中,IVD的表达上升至4~6倍左右(图5)。

[0201] 在图4及图5中,Vector表示导入了pCMV6-Entry Vector的细胞,IVD-GFP表示导入了包含IVD-GFP的载体的细胞。Pool1及Pool2表示第1次实验和第2次实验。

[0202] 对中国仓鼠及人IVD的特异性引物:

[0203] 正向引物:AGTTGATGCAGGGGAAGATG(序列号3)

[0204] 反向引物:TCATACAGCTTGGCATCTCG(序列号4)

[0205] 对中国仓鼠β肌动蛋白的特异性引物:

[0206] 正向引物:AGCTGAGAGGGAAATTGTGCG(序列号5)

[0207] 反向引物:GCAACGGAACCGCTCATT(序列号6)

[0208] 根据图4及图5所示的结果确认到IVD在IgG1-hIVD-GFP(CHO-DG44)细胞中的表达。在Pool1及Pool2中,IVD-GFP表达细胞的比例均为50%以上。虽然Pool2的存在比例较高,但qPCR的表达量低。若以GFP表达细胞×表达量比较,则两种细胞均为相同程度,减少异戊酸的效果为相同程度。

[0209] 基因导入后第22天,将培养体积增大至5mL,并使用Tubespin(SIGMA公司)在180rpm、37℃下实施了振荡培养。

[0210] 基因导入后第26天,将培养体积增大至20mL,将其接种在125mL容积的摇瓶(Corning)并以140rpm进行了振荡培养。

[0211] 利用上述方法建立了强制表达人异戊酰辅酶A脱氢酶的IgG1-hIVD-GFP(CHO-DG44)细胞。并且,关于pCMV6-Entry载体,也作为不表达IVD-GFP的对照组实施基因导入来构建了IgG1-Vector(CHO-DG44)细胞。各基因导入细胞分别建立为两种池细胞(Pool Cell)。

[0212] <实施例2>补料分批培养实验

[0213] 分别各使用两种水平的IgG1-Vector(CHO-DG44)细胞及IgG1-hIVD-GFP(CHO-

DG44) 细胞实施了补料分批培养实验。测定方法如下。

[0214] 细胞数测定方法: Vi-CELL (BeckmanCoulter)

[0215] 异戊酸测定方法: 使用DIONEX制造的ICS-2100及Ion Pac AS11-HC柱的色谱分离

[0216] 抗体浓度测定方法: 使用Prominence (Shimadzu) HPLC及POROS 50A4.6×50mm (applied biosystems) 的色谱分离

[0217] 将细胞以 5×10^5 cells/mL的细胞密度悬浮于OptiCHO培养基40mL中, 接种在125mL容积的烧瓶中, 并在37℃、5%CO₂气氛下以140rpm的速度进行了振荡培养。从培养开始后第3天至第13天为止, 每天添加了以初始培养体积比计为2%的补料培养基 (Cellboost7a, 7b, GE healthcare公司)。为了随时间测定细胞密度、培养液成分及抗体浓度, 每隔1~3天实施了采样。对于IgG1-vector (CHO-DG44) 细胞及IgG1-hIVD-GFP (CHO-DG44) 细胞, 在培养开始后第10天及第11天分别观测峰值细胞密度, 在IgG1-hIVD-GFP (CHO-DG44) 细胞中能够以高20%的细胞密度培养 (图6)。另外, 两种细胞的细胞存活率均趋于逐渐降低, 但在培养开始后第14天, IgG1-hIVD-GFP (CHO-DG44) 细胞显示出平均高15%的存活率 (图7)。在培养开始后第14天回收培养液, 并使用0.22μm的深层过滤器 (Merck Millipore) 去除了细胞和细胞碎片。通过液相色谱测定了上清液中的抗体浓度及每个细胞的IgG生产量 (Q_p), 其结果, IgG生产量平均增加了20% (图8)。一般已知当提高了增殖性时Q_p降低, 但在IgG1-hIVD-GFP (CHO-DG44) 细胞中未观察到Q_p的降低 (图9)。

[0218] 通过液相色谱测定了培养开始后第12天的培养上清液中的异戊酸的浓度, 其结果, 在IgG1-hIVD-GFP (CHO-DG44) 细胞中显示出低46.9%的值 (图10)。在对数生长期分泌大量异戊酸, 但根据培养开始后第10天为止的异戊酸量计算了每个细胞的异戊酸生产量 (Q_{IVA}), 其结果, 得知减少了49% (图11)。

[0219] 在图6、图7及图10中, Vector-1及Vector-2表示导入了pCMV6-Entry vector的细胞, IVD-GFP-1及IVD-GFP-2表示导入了包含IVD-GFP的载体的细胞。“-1”及“-2”分别表示不同池的细胞。

[0220] 在图8、图9及图11中, Vector表示导入了pCMV6-Entry Vector的细胞, IVD-GFP及IVD表示导入了包含IVD-GFP的载体的细胞。Pool1及Pool2分别表示不同池的细胞。

[0221] 在实施例中, 用以下式求出了每个细胞的抗体生产量Q_p [pg/cell/day]、每个细胞的异戊酸生产量Q_{IVA} [fmol/cell/day]及每个细胞的丁酸生产率Q_{BA} [fmol/cell/day]。

[0222] [数学式1]

$$[0223] \quad Q_p = \frac{P_{t2} - P_{t1}}{\int_{t1}^{t2} X dt}$$

$$[0224] \quad Q_{IVA} = \frac{A_{t2} - A_{t1}}{\int_{t1}^{t2} X dt}$$

$$[0225] \quad Q_{BA} = \frac{B_{t2} - B_{t1}}{\int_{t1}^{t2} X dt}$$

[0226] P_{ti} [g/L] = 培养日t_i的纯化物的浓度

[0227] A_{ti} [μmol/L] = 培养日t_i的异戊酸的浓度

[0228] $B_{ti}[\mu\text{mol/L}]$ = 培养日 t_i 的丁酸的浓度

[0229] $X_{ti}[\text{cell/day}]$ = 培养日 t_i 的活细胞密度

[0230] 通过求出时间 t_1 至 t_2 的生长曲线下的面积作为梯形的面积来推算了积分的近似值。

[0231] [数学式2]

$$[0232] \int_{t_1}^{t_2} X dt \cong \sum \frac{(t_2 - t_1)(X_{t_2} + X_{t_1})}{2}$$

[0233] 认为通过减少异戊酸,能够在不降低 Q_p 的状态下提高细胞浓度及细胞存活率,因此提高了 IgG 生产量。出乎意料的结果是在每个细胞的 Q_p 未降低的状态下增殖能力得到了提高。

[0234] <实施例3> 动物细胞的制作

[0235] 构建包含编码 Mab2 (抗 MUC-1 抗体) 的核酸序列的载体 (pmab2), 并且构建了在 pmab2 上进一步追加了编码 IVD 基因的核酸序列的载体 (pmab2/IVD)。通过将所构建的载体导入 CHO-DG44 细胞来制作出表达 mab2 的 CHO-DG44 细胞 (mab2 细胞) 以及共表达 mab2 和 IVD 的 CHO-DG44 细胞 (mab2/IVD 细胞)。根据日本特表 2016-517691 号公报的实施例 2 进行了载体的构建及向细胞中的导入。

[0236] mab2 细胞及 mab2/IVD 细胞均在 37°C 、5% CO_2 气氛下的培养箱中培养。使用电穿孔法 (Lonza 公司, 4D-Nucleofector) 将上述载体导入 mab2 细胞及 mab2/IVD 细胞 5×10^6 cells 中, 接种在包含稀释 100 倍的 HT Supplement (100X) (Lifetechnologies 公司, 11067-030) 的 20mL 的 OptiCHO (Lifetechnologies 公司, 12681011) 培养基上。独立实施 8 次转染, 1 天之后, 为了去除 HT Supplement 而将培养基更换为 Opti-CHO 培养基, 并添加了甲氨蝶呤 (Wako Pure Chemical Industries, 139-13571), 以使终浓度达到 175nmol/L 。在基因导入后第 14 天, 将培养体积增大至 20mL, 将其接种在 125mL 容积的摇瓶 (Corning) 并以 140rpm 进行了振荡培养。

[0237] 并且, 使用 RNeasy plus mini kit (Qiagen) 处理细胞, 并回收了总 RNA。使用 PrimeScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time, Takara) 对所得到的总 RNA 实施了逆转录。作为与内源性 IVD 及外源性 IVD 这两者具有同源性的引物 (序列号 3 及 4) 及内标, 设计对 Hprt1 基因的引物 (序列号 7 及 8), 使用 SYBR (注册商标) Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus, Takara) 实施了实时 PCR (聚合酶链反应)。将标准化中使用 Hprt1 来确认了 IVD 基因的表达的结果示于 (图 12)。在导入了 IVD 基因的细胞中, IVD 的表达平均上升至 136 倍左右 (图 12)。与实施例 1 相比, 将 IVD 基因导入与靶蛋白相同的载体中时能够获取 IVD 基因表达更高的细胞。

[0238] 对中国仓鼠 Hprt1 的特异性引物:

[0239] 正向引物: TCGAGGATTTGGAAGGTTG (序列号 7)

[0240] 反向引物: AATCCAGCAGGTCAGCAAAG (序列号 8)

[0241] <实施例4> 分批培养试验

[0242] 分别使用 mab2 细胞 (8 种) 及 mab2/IVD 细胞 (8 种) 实施了分批培养试验。将细胞以 4×10^5 cells/mL 的细胞密度悬浮于包含 HT Supplement (100X) (Lifetechnologies 公司, 11067-030) 的 20mL 的 OptiCHO (Lifetechnologies 公司, 12681011) 培养基 30mL 中, 接种在

125mL容积的烧瓶中,并在37℃、5%CO₂气氛下以140rpm的速度进行了振荡培养。为了随时测定细胞密度、培养液成分及抗体浓度,在培养开始后第0、2、3、6、7天实施了采样。

[0243] 将mab2 (CHO-DG44) 细胞及mab2/IVD (CHO-DG44) 细胞分别培养7天,在mab2/IVD (CHO-DG44) 细胞中,在培养开始后第7天的时间点能够以高19%的细胞密度培养(图13)。通过CedexBio(Roche Diagnostics)测定了上清液中的mab2浓度,其结果,mab2生产量在培养开始后第7天的时间点平均增加了31% (图14)。一般已知当提高了增殖性时Q_p会降低,但在mab2/IVD (CHO-DG44) 细胞中,观察不到Q_p的降低,反而得到了平均提高11%的结果(图15)。

[0244] 通过液相色谱测定了培养开始后第7天的培养上清液中的异戊酸及丁酸的浓度,其结果,在mab2/IVD (CHO-DG44) 细胞中分别显示出低59%、45%的值(图16)。在对数生长期分泌大量异戊酸、丁酸,但根据培养开始后第10天为止的异戊酸量计算了每个细胞的异戊酸生产量(Q_{IVA})及丁酸生成量(Q_{BA}),其结果,可知分别能够减少70%、61%(图17)。

[0245] 已知丁酸与异戊酸同样具有增殖抑制活性,但出乎意料的结果是尽管IVD与生成丁酸的代谢途径无直接关系,但能够减少分泌量。

[0246] <实施例5>灌注培养实验

[0247] 使用Mab2 (CHO-DG44) 细胞及mab2-IVD (CHO-DG44) 细胞实施了灌注培养实验。

[0248] 将细胞以 25×10^5 cells/mL的细胞密度接种在生物反应器中,并在37℃、5%CO₂气氛下以200rpm的速度进行了搅拌培养。通过用于将细胞保持在培养槽内的以分离途径使用中空纤维膜和ATF泵的灌注,将灌注比从0.3vvd逐渐增加至1.2vvd,在细胞数超过 8×10^7 cells/mL的时间点以一定的水平阶段性地降低灌注比进行了培养(表1)。在细胞数超过 8×10^7 cells/mL的时间点,抽取(细胞渗出)培养液,以使其成为 7.3×10^7 cells/mL,并填补与初始培养基的提取量相应的量,由此调整为不使细胞密度过度增加的同时进行了培养。为了随时测定细胞密度、培养液成分及抗体浓度,每天实施了培养槽内的培养液和渗透侧的培养液的采样。

[0249] 观察到如下:在灌注培养中即使降低灌注比,mab2/IVD (CHO-DG44) 细胞也能够保持活细胞数、高活细胞率,而在mab2 (CHO-DG44) 细胞中,活细胞数、活细胞率逐渐减小(图18及19)。计算了灌注培养中的细胞每天生产的mab2量,其结果,在mab2/IVD细胞中,即使在灌注比减小的情况下,mab2生产率也未减小(图20及21)。在mab2细胞中,从降低灌注比的第6天附近开始,培养上清液中的异戊酸、丁酸积聚,相对于此,在mab2/IVD细胞中,在14天的整个培养期间,观察不到异戊酸及丁酸在培养液中积聚(图22及23)。通过在mab2/IVD细胞中不让增殖抑制物质积聚在培养槽内,即使在低灌注比下也能够保持增殖性,从而能够实现高密度培养。并且,若估算以2000L规模并以低灌注比培养mab2/IVD细胞时的培养基使用量,则可知通过24天的培养能够节约多达28800L的培养基(表2)。

[0250] [表1]

[0251] 表1:灌注培养条件表

[0252]

水平名称	载体	灌注比 (vvd)					
		第0-2天	第3天	第4天	第5-6天	第7-10天	第11-14天
Mab2_H	pmab2	0.3	0.45	0.7	1.2	1.2	1.2
Mab2_L	pmab2	0.3	0.45	0.7	1.2	0.8	0.6
Mab2/IVD_H	pmab2/IVD	0.3	0.45	0.7	1.2	1.2	1.2
Mab2/IVD_L	pmab2/IVD	0.3	0.45	0.7	1.2	0.8	0.6

[0253] 用以下式求出了细胞每天生产的总mab2量 Y_{mab2} 。

[0254] [数学式3]

[0255]
$$Y_{mab2} = (Y_{Bt2} - Y_{Bt1}) + P_{t1} \int_{t1}^{t2} Y_T dt$$

[0256] Y_{Tti} [g/L] = 培养日ti的渗透侧的抗体浓度[0257] $Y_{Tti'}$ [g/L] = 培养日ti的渗出后的渗透侧的抗体浓度[0258] Y_{Bti} [g/L] = 培养日ti的培养槽侧的抗体浓度[0259] P_{ti} [vvd] = 培养日ti至t(i+1)的灌注比

[0260] [表2]

[0261] 表2: 在2000L培养槽中培养时的推算培养基使用量

[0262]

水平	稳定状态 灌注比[vvd]	稳定状态培养基 使用量*1[L/day]	能否培养	在稳定状态下培养24天 时的培养基使用量[L]*2
Mab2_H	1.2	2400	能	57600
Mab2_L	0.6	1200	否	-
Mab2/IVD_H	1.2	2400	能	57600
Mab2/IVD_L	0.6	1200	能	28800

[0263] *1: 细胞渗出时填补的培养基量除外

[0264] *2: 假定稳定状态持续24天

[0001] 序 列 表
 [0002] <110> 富士胶片株式会社
 [0003] <120> 动物细胞、动物细胞的制造方法及靶蛋白的制造方法
 [0004] <130> 17F03369W1
 [0005] <160> 8
 [0006] <170> PatentIn version 3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 1269
 [0009] <212> DNA
 [0010] <213> 人
 [0011] <220>
 [0012] <221> CDS
 [0013] <222> (1) .. (1269)
 [0014] <400> 1
 [0015] atg gcg act gcg act cgg ctg ctg ggg tgt cgt gtg gcg agc tgg agg 48
 [0016] Met Ala Thr Ala Thr Arg Leu Leu Gly Cys Arg Val Ala Ser Trp Arg
 [0017] 1 5 10 15
 [0018] ctg cgg ccg ccg ctt gcc ggc ttc gtt tcc cag cgg gcc cac tcg ctt 96
 [0019] Leu Arg Pro Pro Leu Ala Gly Phe Val Ser Gln Arg Ala His Ser Leu
 [0020] 20 25 30
 [0021] ttg ccc gtg gac gat gca atc aat ggg cta agc gag gag cag agg cag 144
 [0022] Leu Pro Val Asp Asp Ala Ile Asn Gly Leu Ser Glu Glu Gln Arg Gln
 [0023] 35 40 45
 [0024] ctt cgt cag acc atg gct aag ttc ctt cag gag cac ctg gcc ccc aag 192
 [0025] Leu Arg Gln Thr Met Ala Lys Phe Leu Gln Glu His Leu Ala Pro Lys
 [0026] 50 55 60
 [0027] gcc cag gag atc gat cgc agc aat gag ttc aag aac ctg cga gaa ttt 240
 [0028] Ala Gln Glu Ile Asp Arg Ser Asn Glu Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe
 [0029] 65 70 75 80
 [0030] tgg aag cag ctg ggg aac ctg ggc gta ttg ggc atc aca gcc cct gtt 288
 [0031] Trp Lys Gln Leu Gly Asn Leu Gly Val Leu Gly Ile Thr Ala Pro Val
 [0032] 85 90 95
 [0033] cag tat ggc ggc tcc ggc ctg ggc tac ctg gag cat gtg ctg gtg atg 336
 [0034] Gln Tyr Gly Gly Ser Gly Leu Gly Tyr Leu Glu His Val Leu Val Met
 [0035] 100 105 110
 [0036] gag gag ata tcc cga gct tcc gga gca gtg ggg ctc agt tac ggt gcc 384
 [0037] Glu Glu Ile Ser Arg Ala Ser Gly Ala Val Gly Leu Ser Tyr Gly Ala
 [0038] 115 120 125

[0039]	cac tcc aac ctc tgc atc aac cag ctt gta cgc aat ggg aat gag gcc	432
[0040]	His Ser Asn Leu Cys Ile Asn Gln Leu Val Arg Asn Gly Asn Glu Ala	
[0041]	130 135 140	
[0042]	cag aaa gag aag tat ctc ccg aag ctg atc agt ggt gag tac atc gga	480
[0043]	Gln Lys Glu Lys Tyr Leu Pro Lys Leu Ile Ser Gly Glu Tyr Ile Gly	
[0044]	145 150 155 160	
[0045]	gcc ctg gcc atg agt gag ccc aat gca ggc tct gat gtt gtc tct atg	528
[0046]	Ala Leu Ala Met Ser Glu Pro Asn Ala Gly Ser Asp Val Val Ser Met	
[0047]	165 170 175	
[0048]	aag ctc aaa gcg gaa aag aaa gga aat cac tac atc ctg aat ggc aac	576
[0049]	Lys Leu Lys Ala Glu Lys Lys Gly Asn His Tyr Ile Leu Asn Gly Asn	
[0050]	180 185 190	
[0051]	aag ttc tgg atc act aat ggc cct gat gct gac gtc ctg att gtc tat	624
[0052]	Lys Phe Trp Ile Thr Asn Gly Pro Asp Ala Asp Val Leu Ile Val Tyr	
[0053]	195 200 205	
[0054]	gcc aag aca gat ctg gct gct gtg cca gct tct cgg ggc atc aca gcc	672
[0055]	Ala Lys Thr Asp Leu Ala Ala Val Pro Ala Ser Arg Gly Ile Thr Ala	
[0056]	210 215 220	
[0057]	ttc att gtg gag aag ggt atg cct ggc ttt agc acc tct aag aag ctg	720
[0058]	Phe Ile Val Glu Lys Gly Met Pro Gly Phe Ser Thr Ser Lys Lys Leu	
[0059]	225 230 235 240	
[0060]	gac aag ctg ggg atg agg ggc tct aac acc tgt gag cta atc ttt gaa	768
[0061]	Asp Lys Leu Gly Met Arg Gly Ser Asn Thr Cys Glu Leu Ile Phe Glu	
[0062]	245 250 255	
[0063]	gac tgc aag att cct gct gcc aac atc ctg ggc cat gag aat aag ggt	816
[0064]	Asp Cys Lys Ile Pro Ala Ala Asn Ile Leu Gly His Glu Asn Lys Gly	
[0065]	260 265 270	
[0066]	gtc tac gtg ctg atg agt ggg ctg gac ctg gag cgg ctg gtg ctg gcc	864
[0067]	Val Tyr Val Leu Met Ser Gly Leu Asp Leu Glu Arg Leu Val Leu Ala	
[0068]	275 280 285	
[0069]	ggg ggg cct ctt ggg ctc atg caa gcg gtc ctg gac cac acc att ccc	912
[0070]	Gly Gly Pro Leu Gly Leu Met Gln Ala Val Leu Asp His Thr Ile Pro	
[0071]	290 295 300	
[0072]	tac ctg cac gtg agg gaa gcc ttt ggc cag aag atc ggc cac ttc cag	960
[0073]	Tyr Leu His Val Arg Glu Ala Phe Gly Gln Lys Ile Gly His Phe Gln	
[0074]	305 310 315 320	
[0075]	ttg atg cag ggg aag atg gct gac atg tac acc cgc ctc atg gcg tgt	1008
[0076]	Leu Met Gln Gly Lys Met Ala Asp Met Tyr Thr Arg Leu Met Ala Cys	
[0077]	325 330 335	

[0078]	cgg cag tat gtc tac aat gtc gcc aag gcc tgc gat gag ggc cat tgc	1056
[0079]	Arg Gln Tyr Val Tyr Asn Val Ala Lys Ala Cys Asp Glu Gly His Cys	
[0080]	340 345 350	
[0081]	act gct aag gac tgt gca ggt gtg att ctt tac tca gct gag tgt gcc	1104
[0082]	Thr Ala Lys Asp Cys Ala Gly Val Ile Leu Tyr Ser Ala Glu Cys Ala	
[0083]	355 360 365	
[0084]	aca cag gta gcc ctg gac ggc att cag tgt ttt ggt ggc aat ggc tac	1152
[0085]	Thr Gln Val Ala Leu Asp Gly Ile Gln Cys Phe Gly Gly Asn Gly Tyr	
[0086]	370 375 380	
[0087]	atc aat gac ttt ccc atg ggc cgc ttt ctt cga gat gcc aag ctg tat	1200
[0088]	Ile Asn Asp Phe Pro Met Gly Arg Phe Leu Arg Asp Ala Lys Leu Tyr	
[0089]	385 390 395 400	
[0090]	gag ata ggg gct ggg acc agc gag gtg agg cgg ctg gtc atc ggc aga	1248
[0091]	Glu Ile Gly Ala Gly Thr Ser Glu Val Arg Arg Leu Val Ile Gly Arg	
[0092]	405 410 415	
[0093]	gcc ttc aat gca gac ttt cac	1269
[0094]	Ala Phe Asn Ala Asp Phe His	
[0095]	420	
[0096]	<210> 2	
[0097]	<211> 423	
[0098]	<212> PRT	
[0099]	<213> 人	
[0100]	<400> 2	
[0101]	Met Ala Thr Ala Thr Arg Leu Leu Gly Cys Arg Val Ala Ser Trp Arg	
[0102]	1 5 10 15	
[0103]	Leu Arg Pro Pro Leu Ala Gly Phe Val Ser Gln Arg Ala His Ser Leu	
[0104]	20 25 30	
[0105]	Leu Pro Val Asp Asp Ala Ile Asn Gly Leu Ser Glu Glu Gln Arg Gln	
[0106]	35 40 45	
[0107]	Leu Arg Gln Thr Met Ala Lys Phe Leu Gln Glu His Leu Ala Pro Lys	
[0108]	50 55 60	
[0109]	Ala Gln Glu Ile Asp Arg Ser Asn Glu Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe	
[0110]	65 70 75 80	
[0111]	Trp Lys Gln Leu Gly Asn Leu Gly Val Leu Gly Ile Thr Ala Pro Val	
[0112]	85 90 95	
[0113]	Gln Tyr Gly Gly Ser Gly Leu Gly Tyr Leu Glu His Val Leu Val Met	
[0114]	100 105 110	
[0115]	Glu Glu Ile Ser Arg Ala Ser Gly Ala Val Gly Leu Ser Tyr Gly Ala	
[0116]	115 120 125	

[0117]	His Ser Asn Leu Cys Ile Asn Gln Leu Val Arg Asn Gly Asn Glu Ala
[0118]	130 135 140
[0119]	Gln Lys Glu Lys Tyr Leu Pro Lys Leu Ile Ser Gly Glu Tyr Ile Gly
[0120]	145 150 155 160
[0121]	Ala Leu Ala Met Ser Glu Pro Asn Ala Gly Ser Asp Val Val Ser Met
[0122]	165 170 175
[0123]	Lys Leu Lys Ala Glu Lys Lys Gly Asn His Tyr Ile Leu Asn Gly Asn
[0124]	180 185 190
[0125]	Lys Phe Trp Ile Thr Asn Gly Pro Asp Ala Asp Val Leu Ile Val Tyr
[0126]	195 200 205
[0127]	Ala Lys Thr Asp Leu Ala Ala Val Pro Ala Ser Arg Gly Ile Thr Ala
[0128]	210 215 220
[0129]	Phe Ile Val Glu Lys Gly Met Pro Gly Phe Ser Thr Ser Lys Lys Leu
[0130]	225 230 235 240
[0131]	Asp Lys Leu Gly Met Arg Gly Ser Asn Thr Cys Glu Leu Ile Phe Glu
[0132]	245 250 255
[0133]	Asp Cys Lys Ile Pro Ala Ala Asn Ile Leu Gly His Glu Asn Lys Gly
[0134]	260 265 270
[0135]	Val Tyr Val Leu Met Ser Gly Leu Asp Leu Glu Arg Leu Val Leu Ala
[0136]	275 280 285
[0137]	Gly Gly Pro Leu Gly Leu Met Gln Ala Val Leu Asp His Thr Ile Pro
[0138]	290 295 300
[0139]	Tyr Leu His Val Arg Glu Ala Phe Gly Gln Lys Ile Gly His Phe Gln
[0140]	305 310 315 320
[0141]	Leu Met Gln Gly Lys Met Ala Asp Met Tyr Thr Arg Leu Met Ala Cys
[0142]	325 330 335
[0143]	Arg Gln Tyr Val Tyr Asn Val Ala Lys Ala Cys Asp Glu Gly His Cys
[0144]	340 345 350
[0145]	Thr Ala Lys Asp Cys Ala Gly Val Ile Leu Tyr Ser Ala Glu Cys Ala
[0146]	355 360 365
[0147]	Thr Gln Val Ala Leu Asp Gly Ile Gln Cys Phe Gly Gly Asn Gly Tyr
[0148]	370 375 380
[0149]	Ile Asn Asp Phe Pro Met Gly Arg Phe Leu Arg Asp Ala Lys Leu Tyr
[0150]	385 390 395 400
[0151]	Glu Ile Gly Ala Gly Thr Ser Glu Val Arg Arg Leu Val Ile Gly Arg
[0152]	405 410 415
[0153]	Ala Phe Asn Ala Asp Phe His
[0154]	420
[0155]	<210> 3

[0156] <211> 20
[0157] <212> DNA
[0158] <213> 人工序列
[0159] <220>
[0160] <223> 人工序列的描述: 合成的DNA
[0161] <400> 3
[0162] agttgatgca ggggaagatg 20
[0163] <210> 4
[0164] <211> 20
[0165] <212> DNA
[0166] <213> 人工序列
[0167] <220>
[0168] <223> 人工序列的描述: 合成的DNA
[0169] <400> 4
[0170] tcatacagct tggcatctcg 20
[0171] <210> 5
[0172] <211> 21
[0173] <212> DNA
[0174] <213> 人工序列
[0175] <220>
[0176] <223> 人工序列的描述: 合成的DNA
[0177] <400> 5
[0178] agctgagagg gaaattgtgc g 21
[0179] <210> 6
[0180] <211> 18
[0181] <212> DNA
[0182] <213> 人工序列
[0183] <220>
[0184] <223> 人工序列的描述: 合成的DNA
[0185] <400> 6
[0186] gcaacggaac cgctcatt 18
[0187] <210> 7
[0188] <211> 20
[0189] <212> DNA
[0190] <213> 人工序列
[0191] <220>
[0192] <223> 人工序列的描述: 合成的DNA
[0193] <400> 7
[0194] tcgaggattt ggaaaaggtg 20

-
- [0195] <210> 8
[0196] <211> 20
[0197] <212> DNA
[0198] <213> 人工序列
[0199] <220>
[0200] <223> 人工序列的描述：合成的DNA
[0201] <400> 8
[0202] aatccagcag gtcagcaaag 20

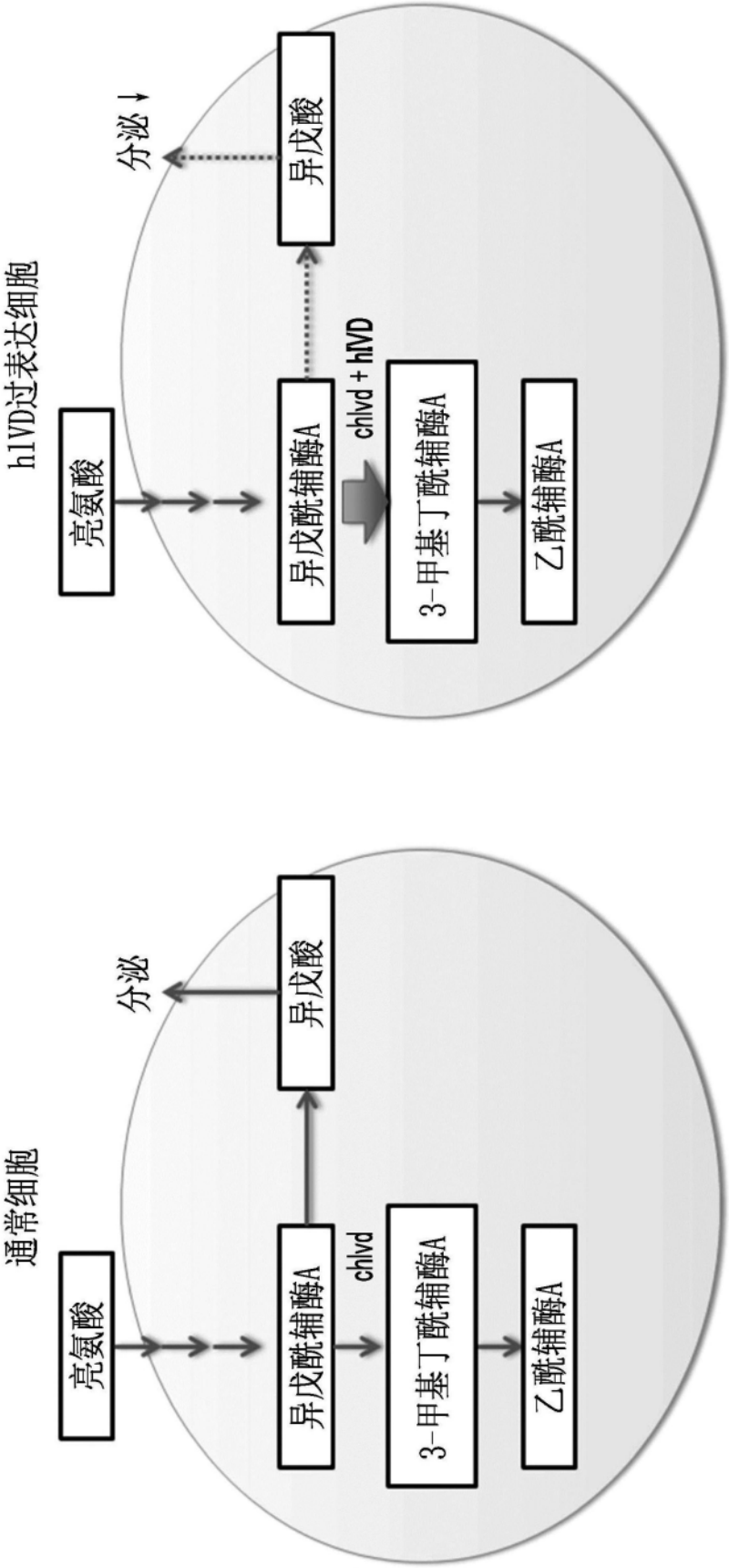


图1

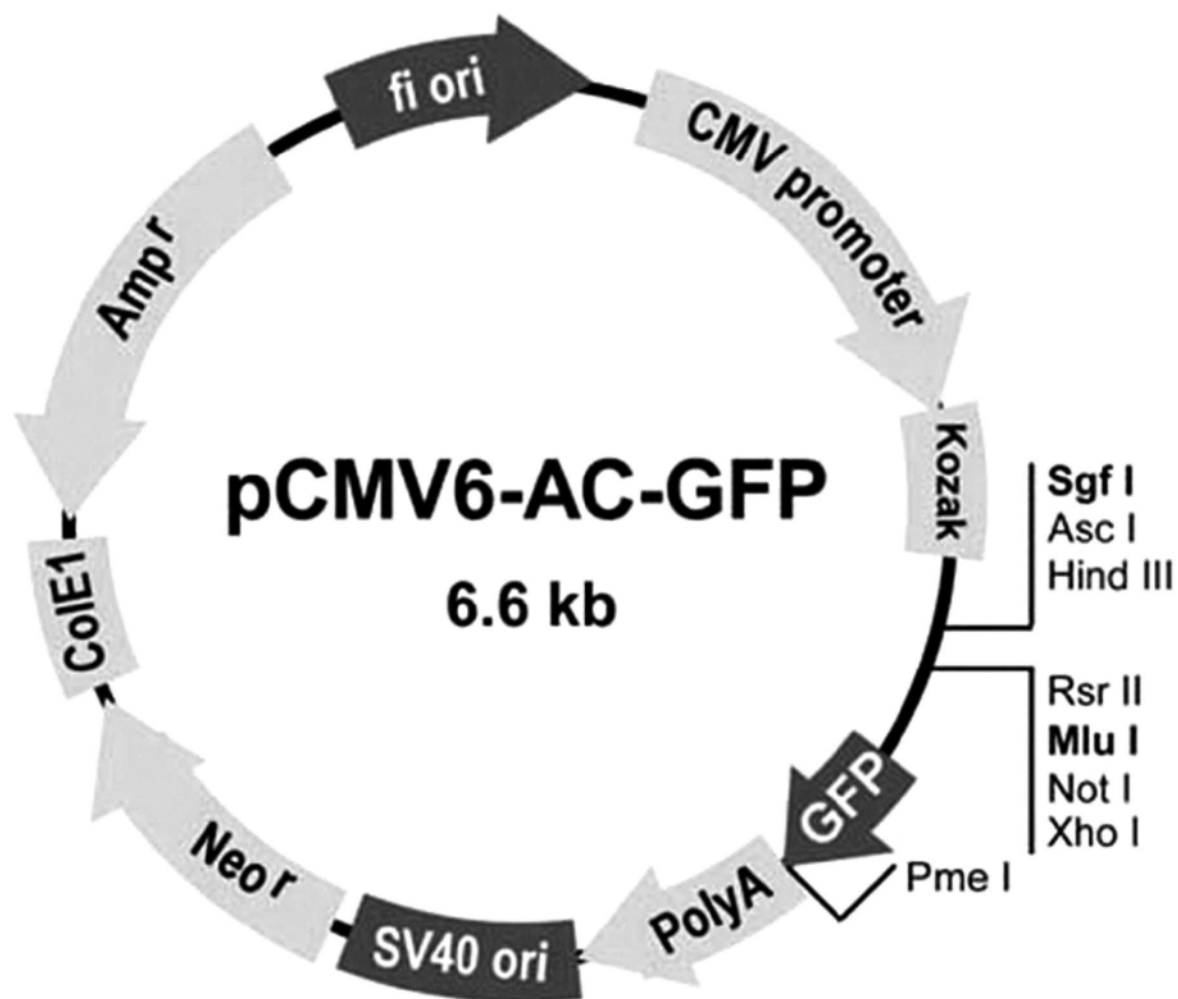


图2

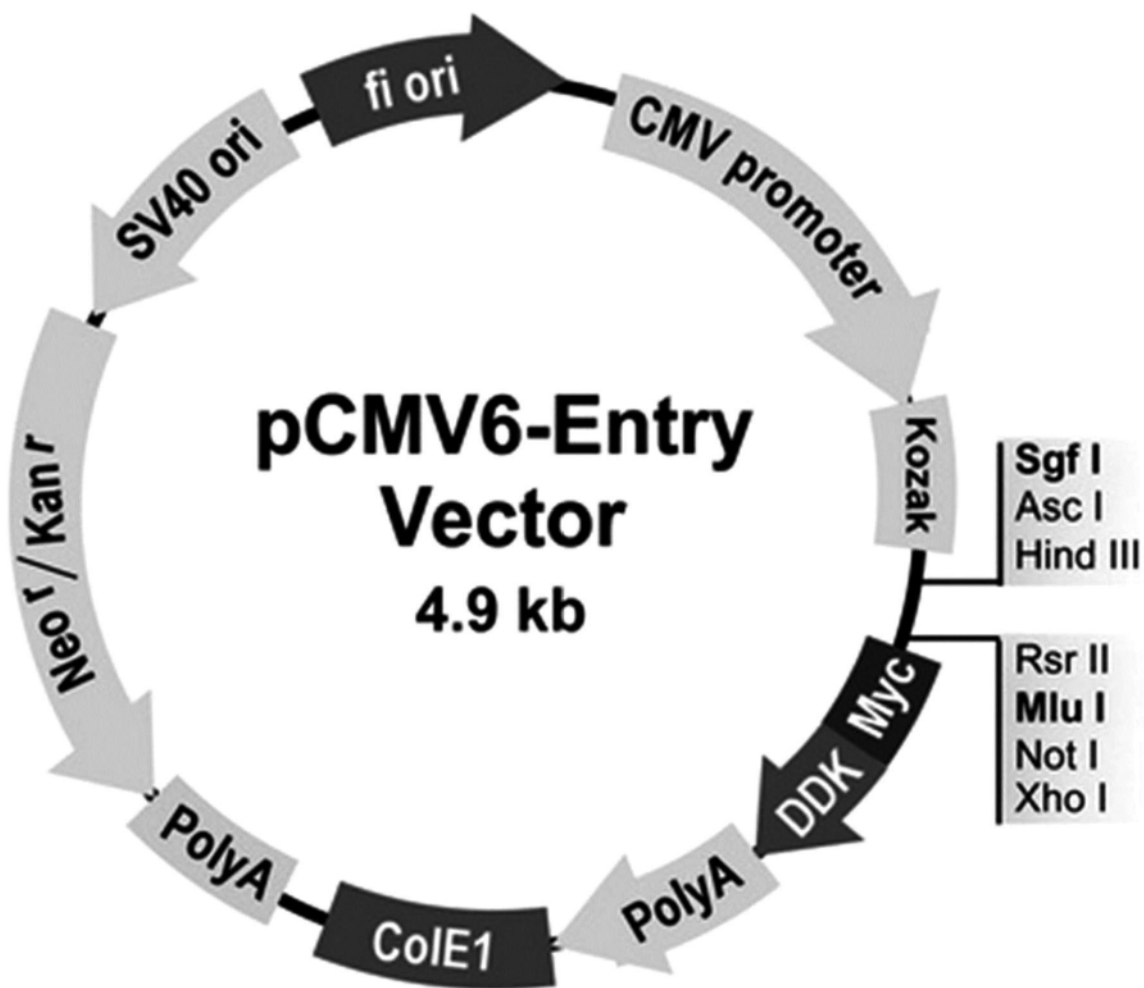


图3

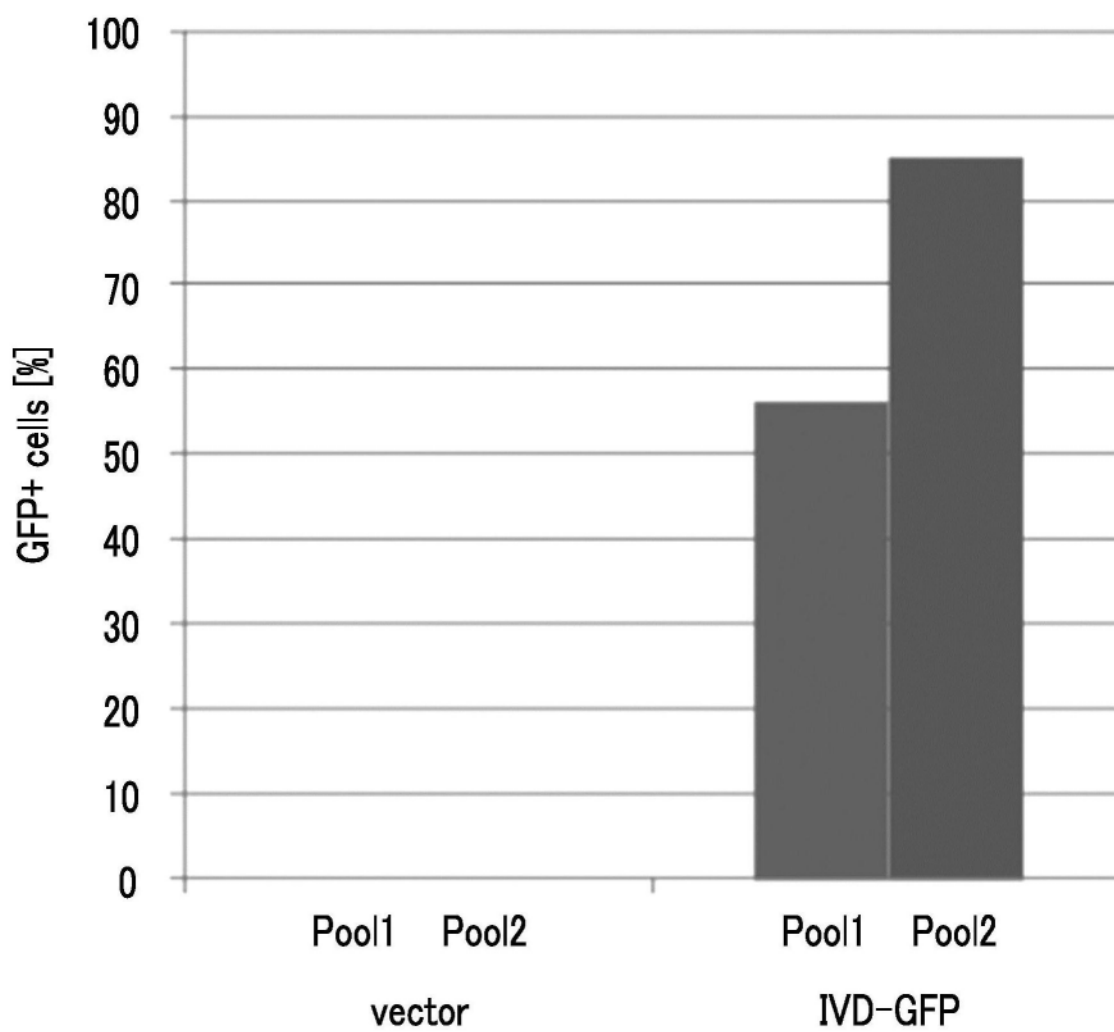


图4

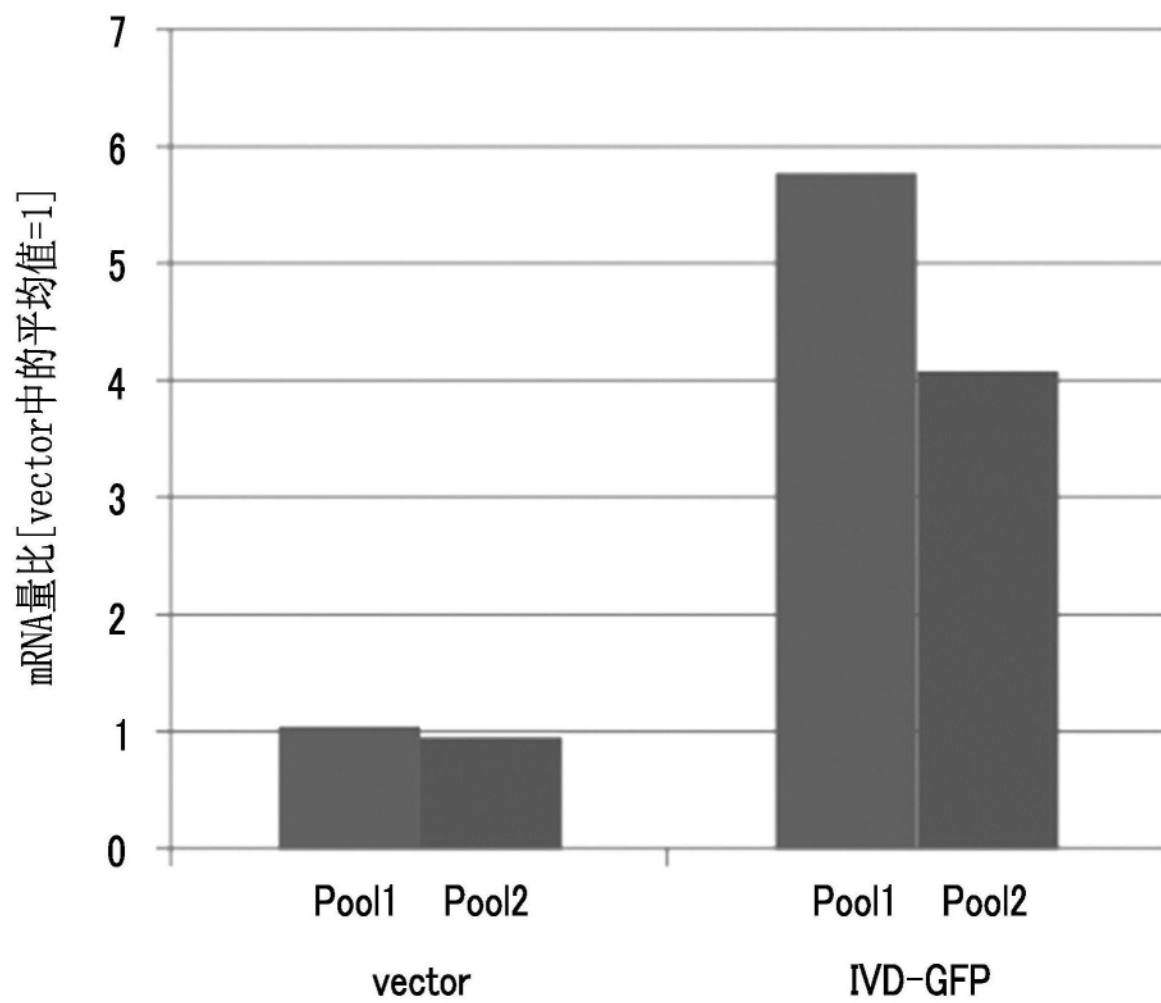


图5

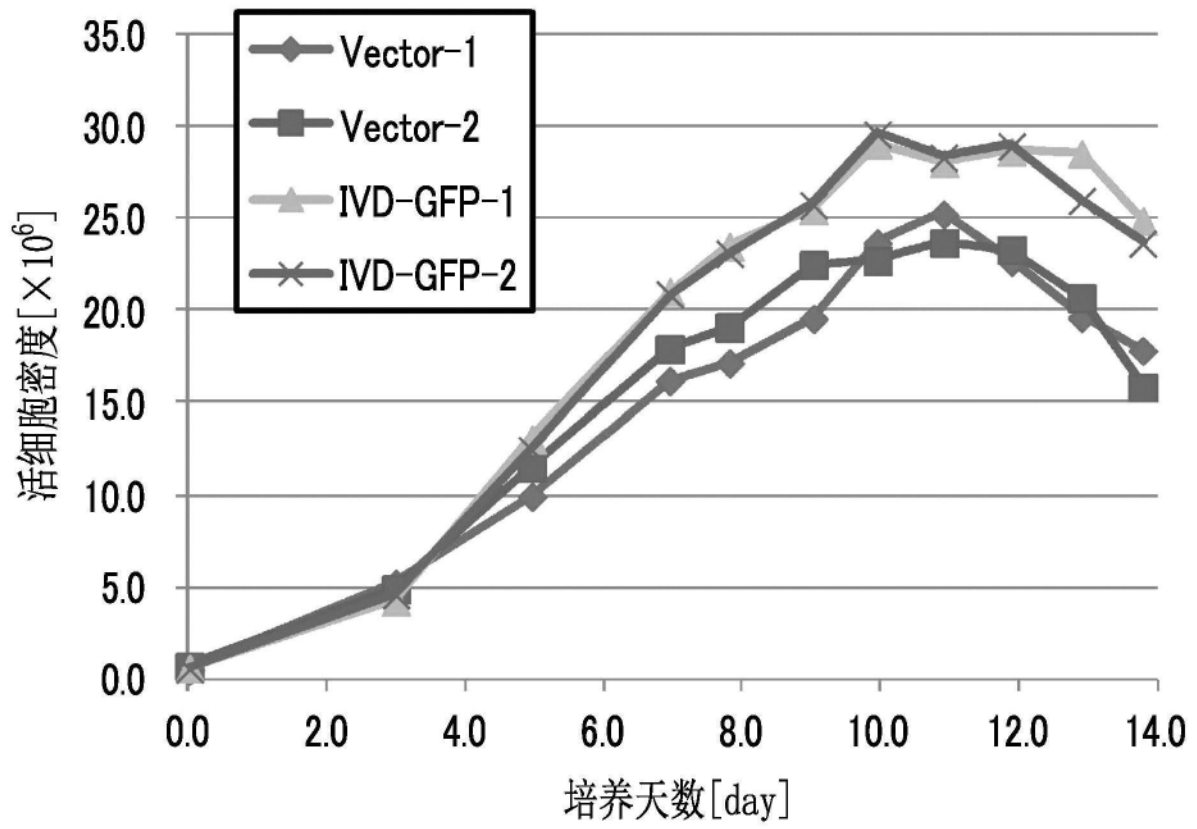


图6

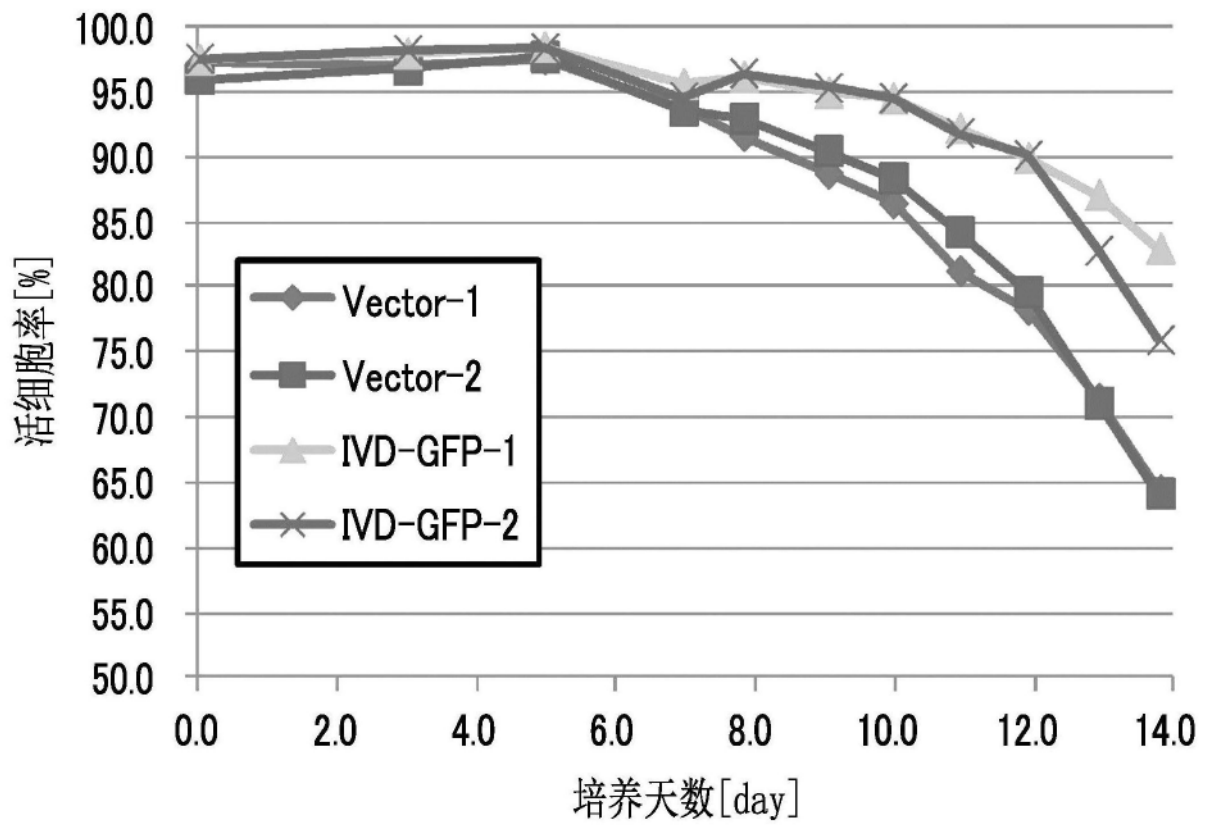


图7

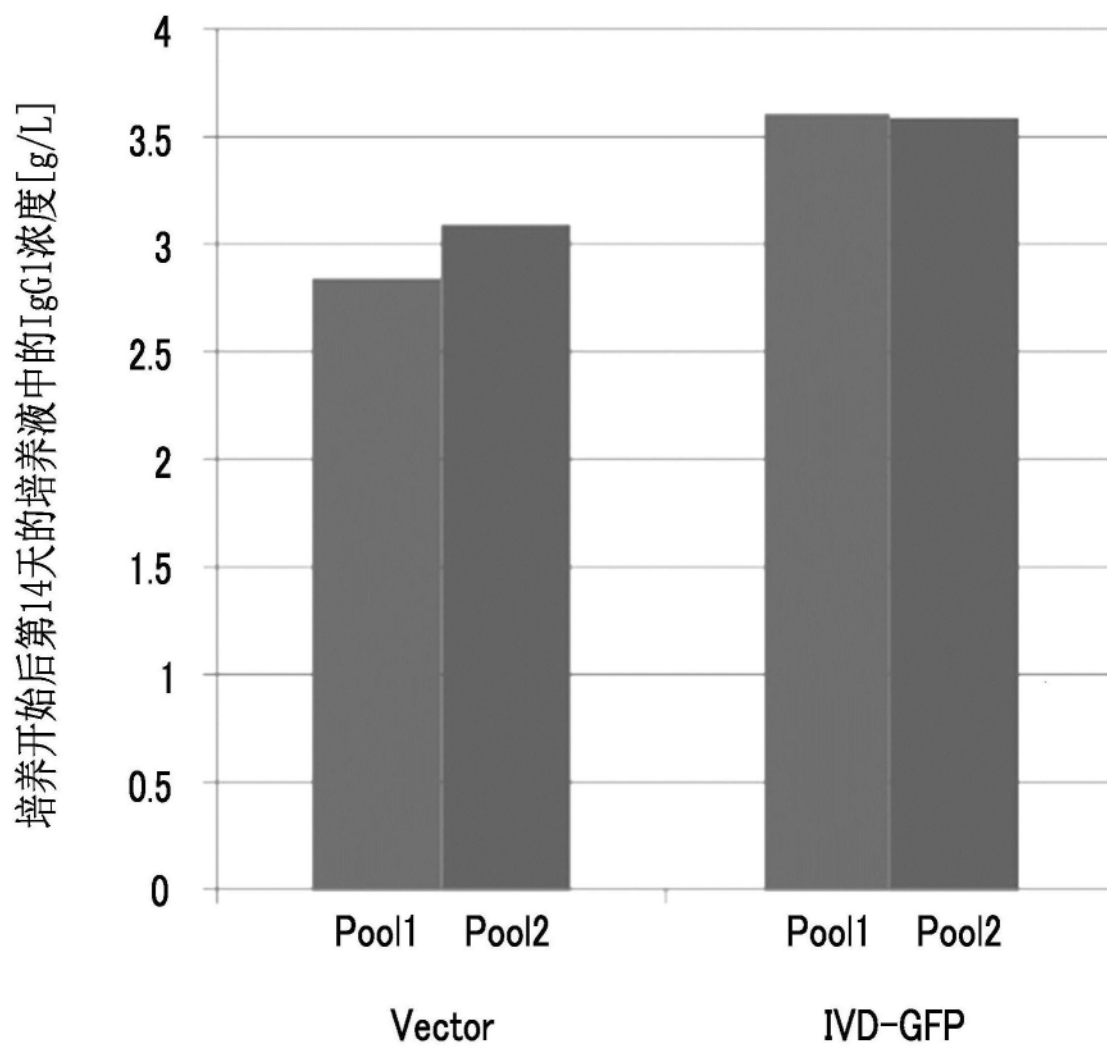


图8

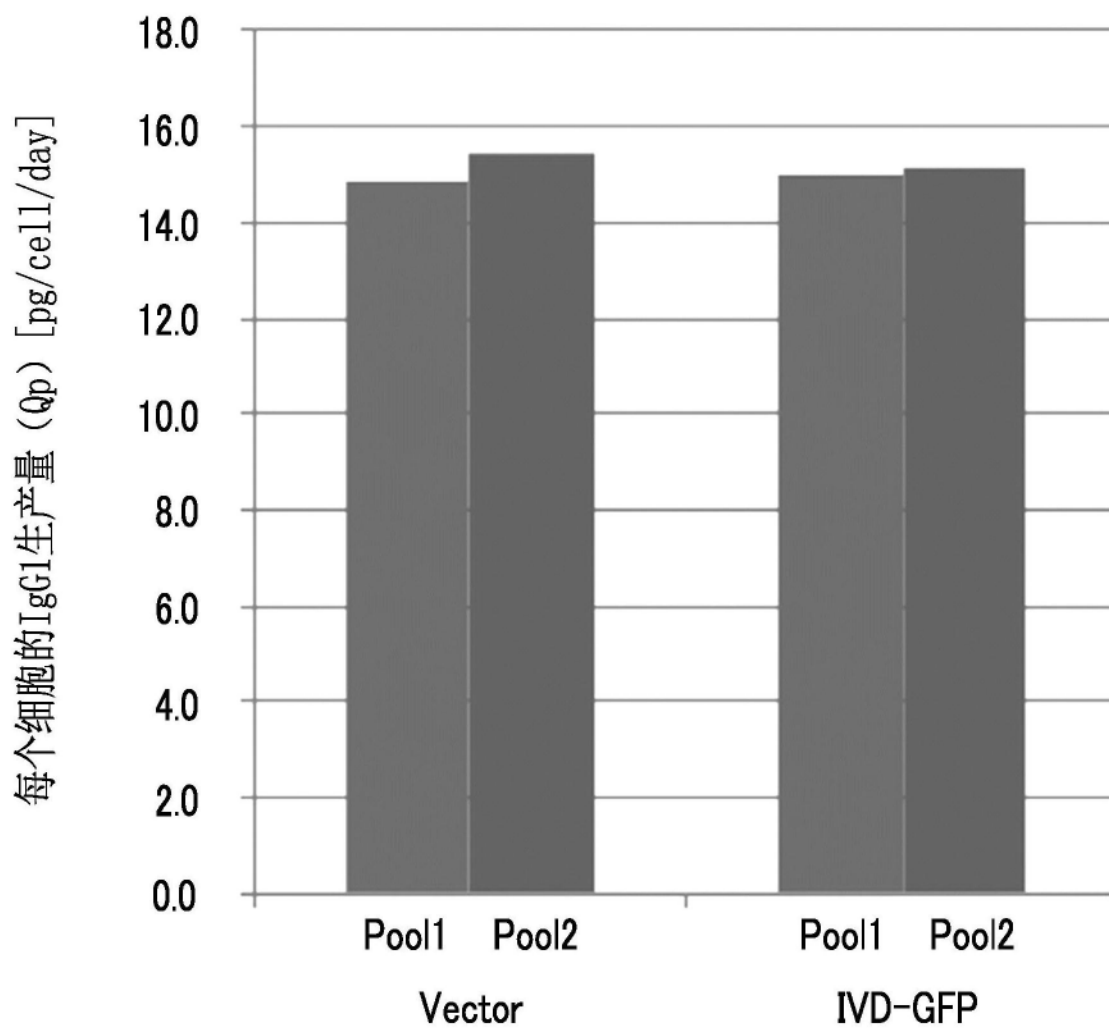


图9

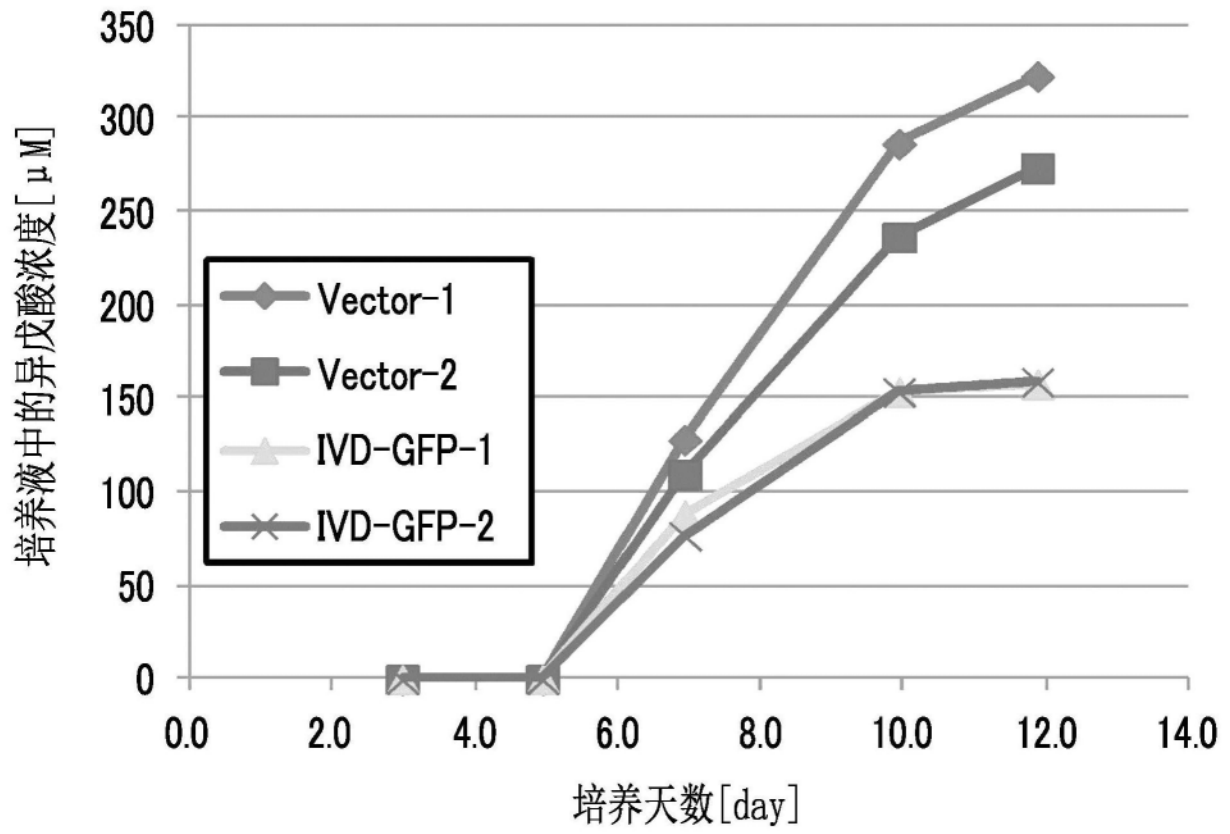


图10

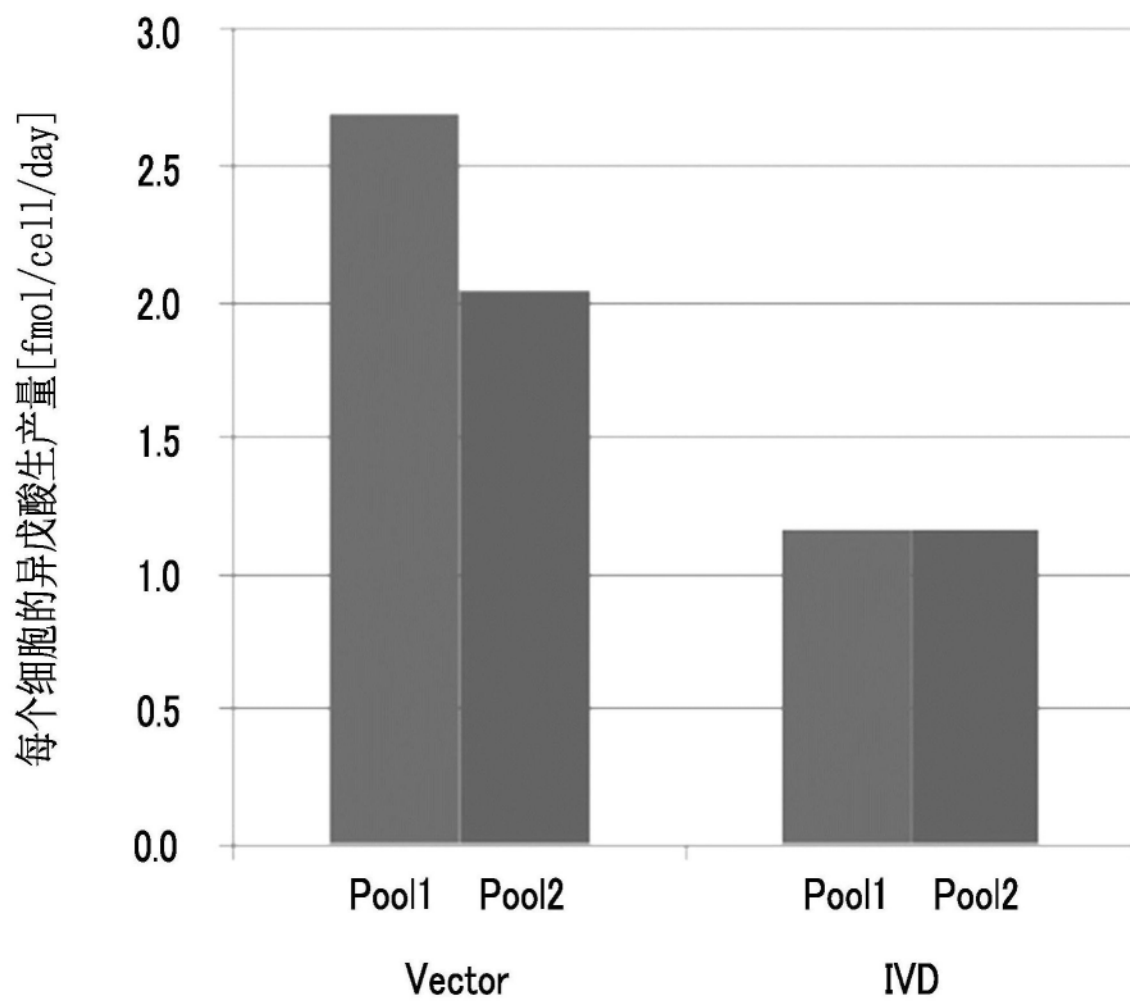


图11

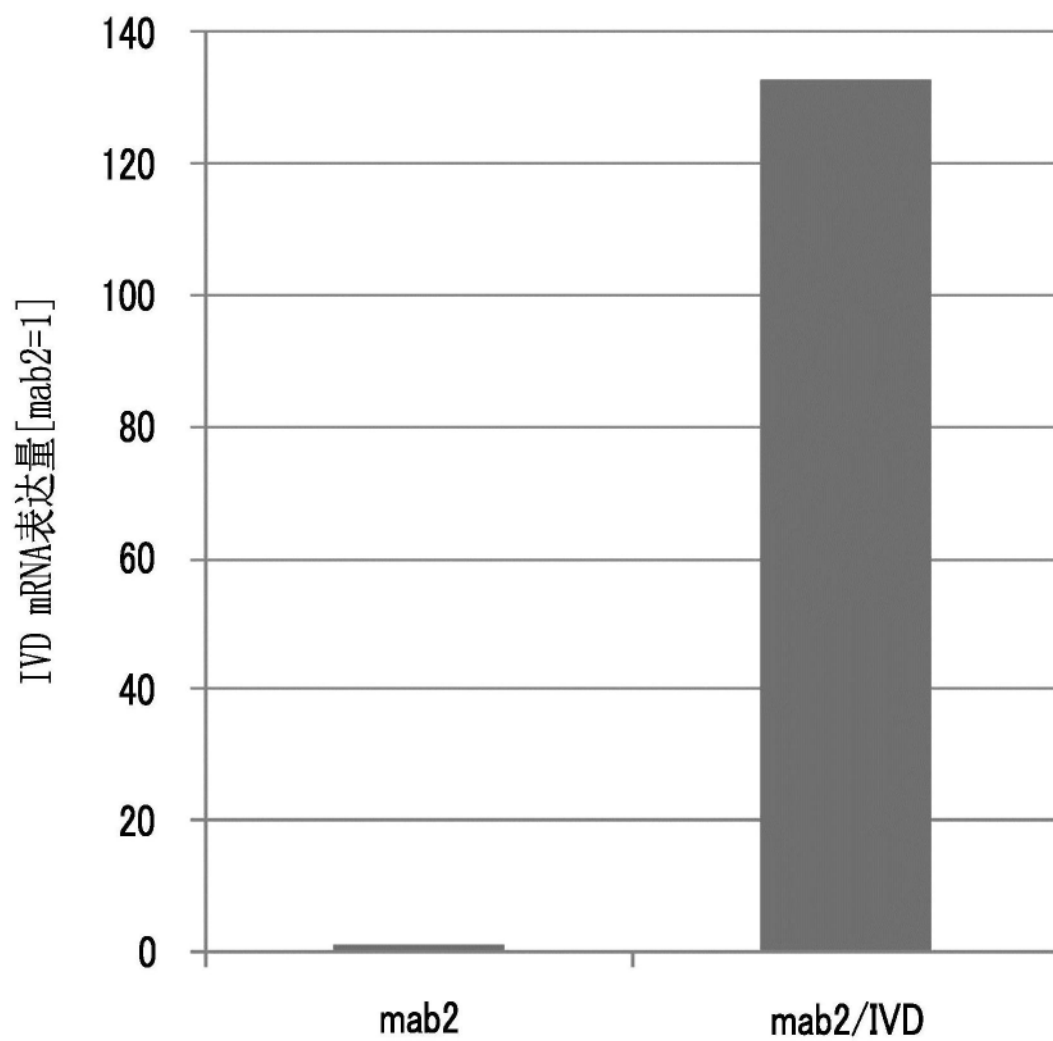


图12

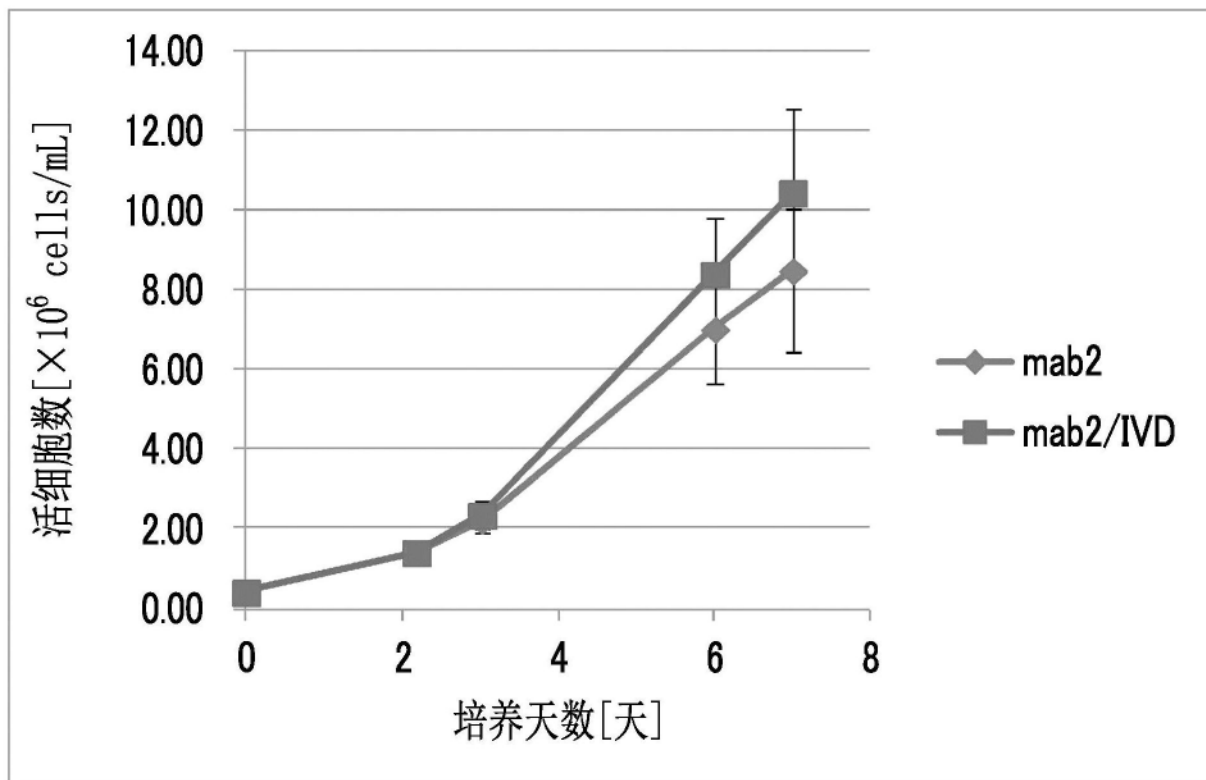


图13

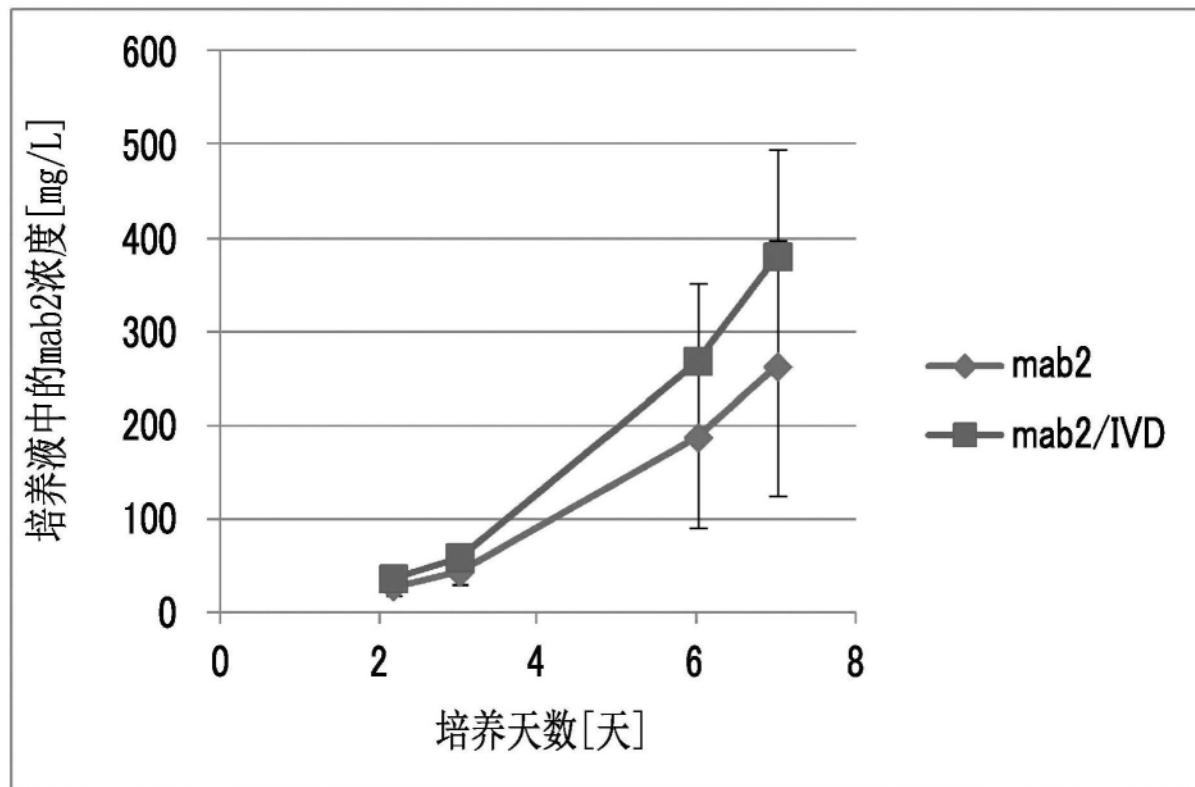


图14

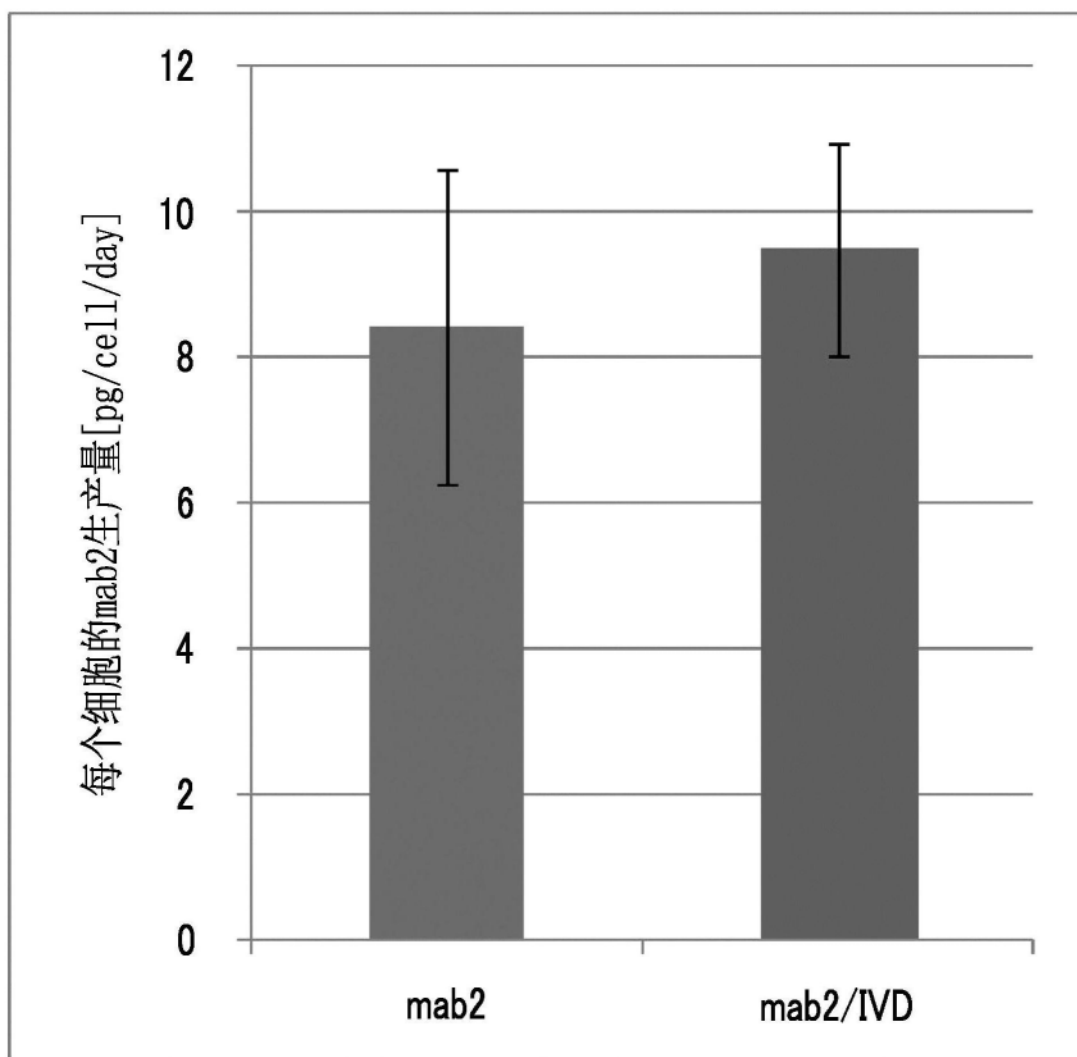


图15

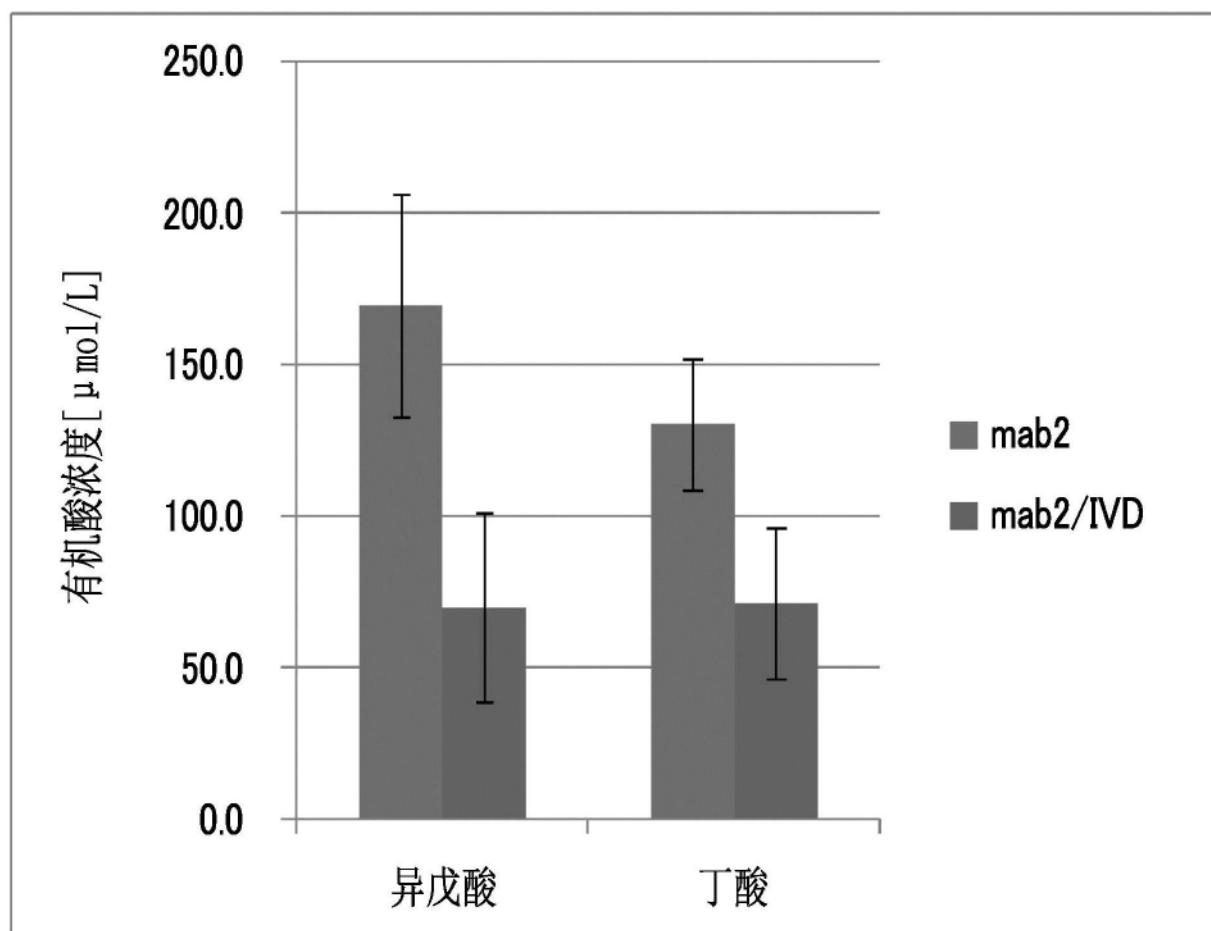


图16

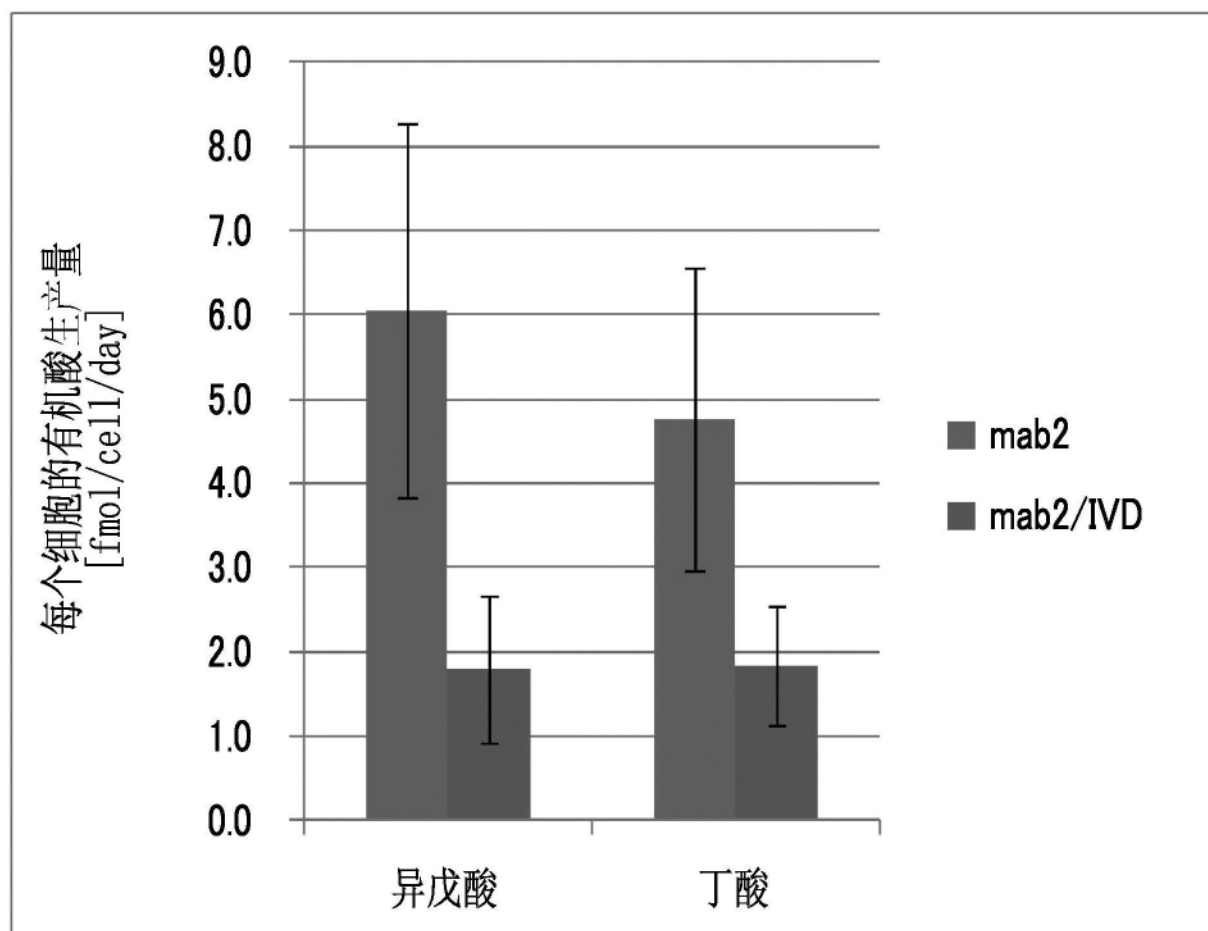


图17

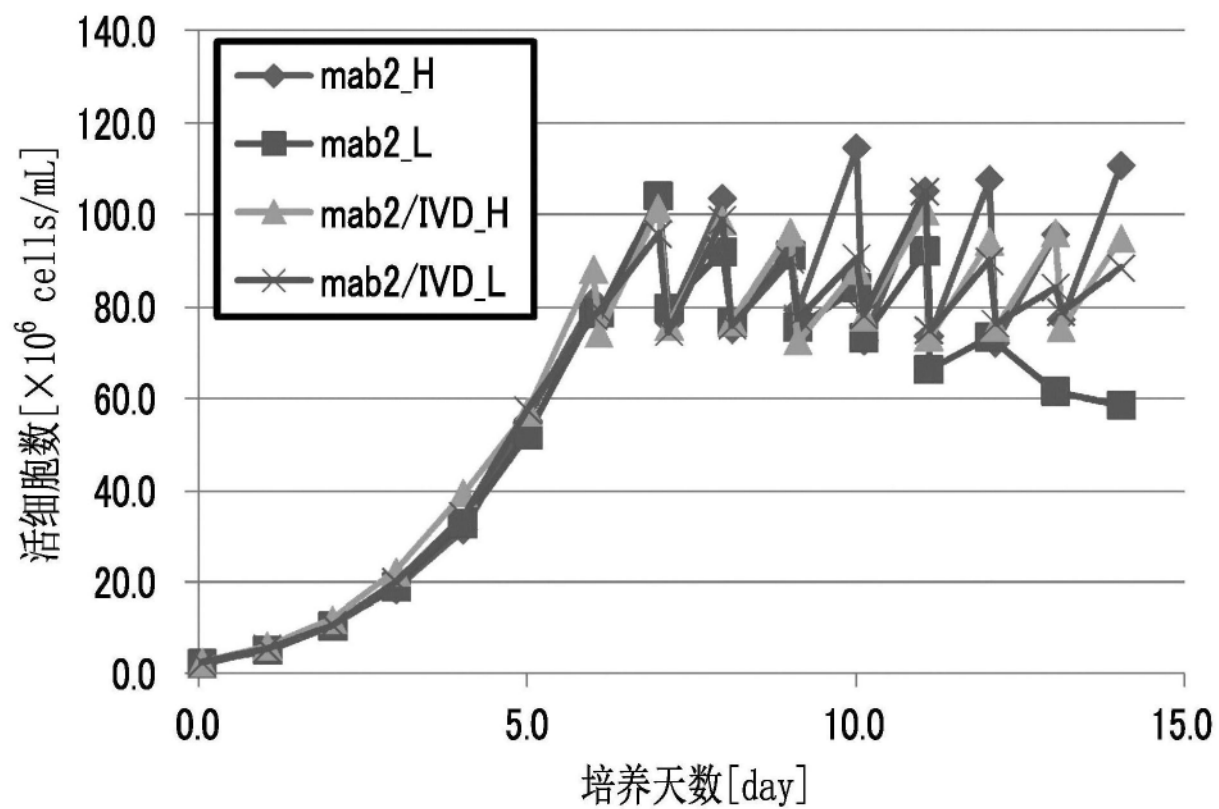


图18

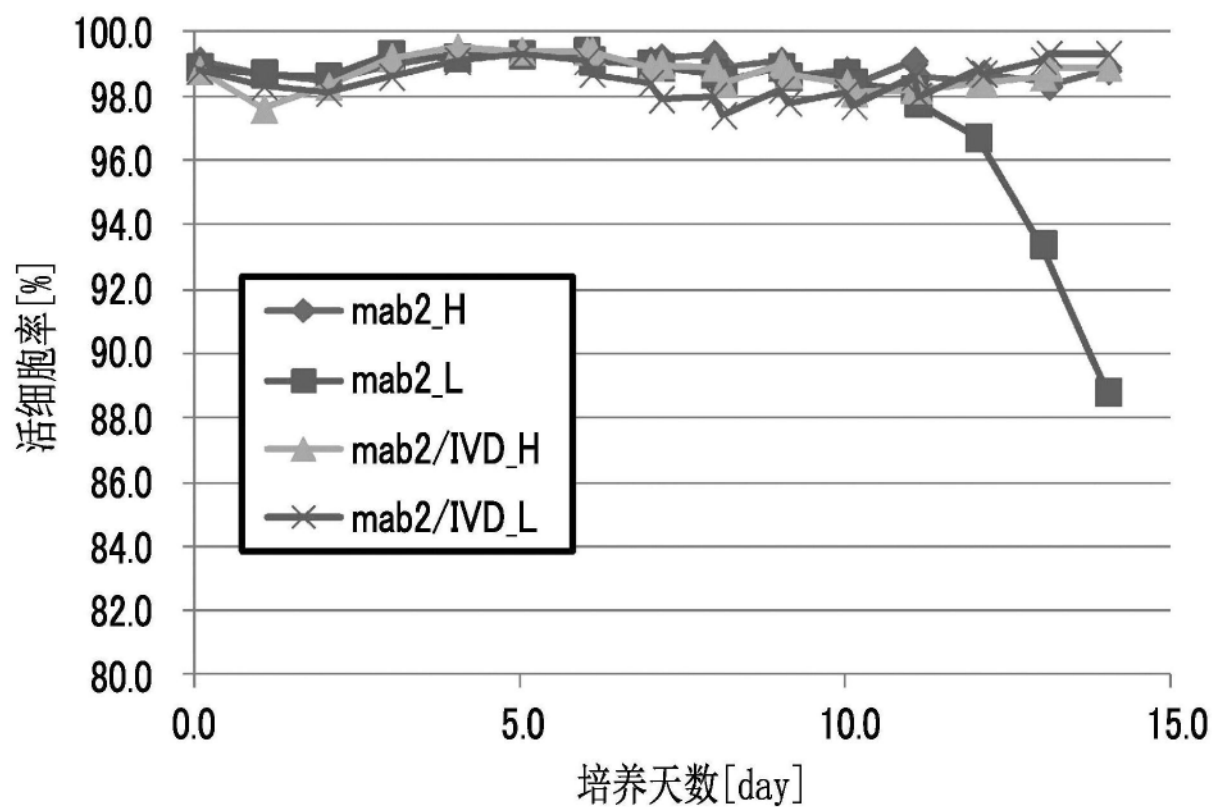


图19

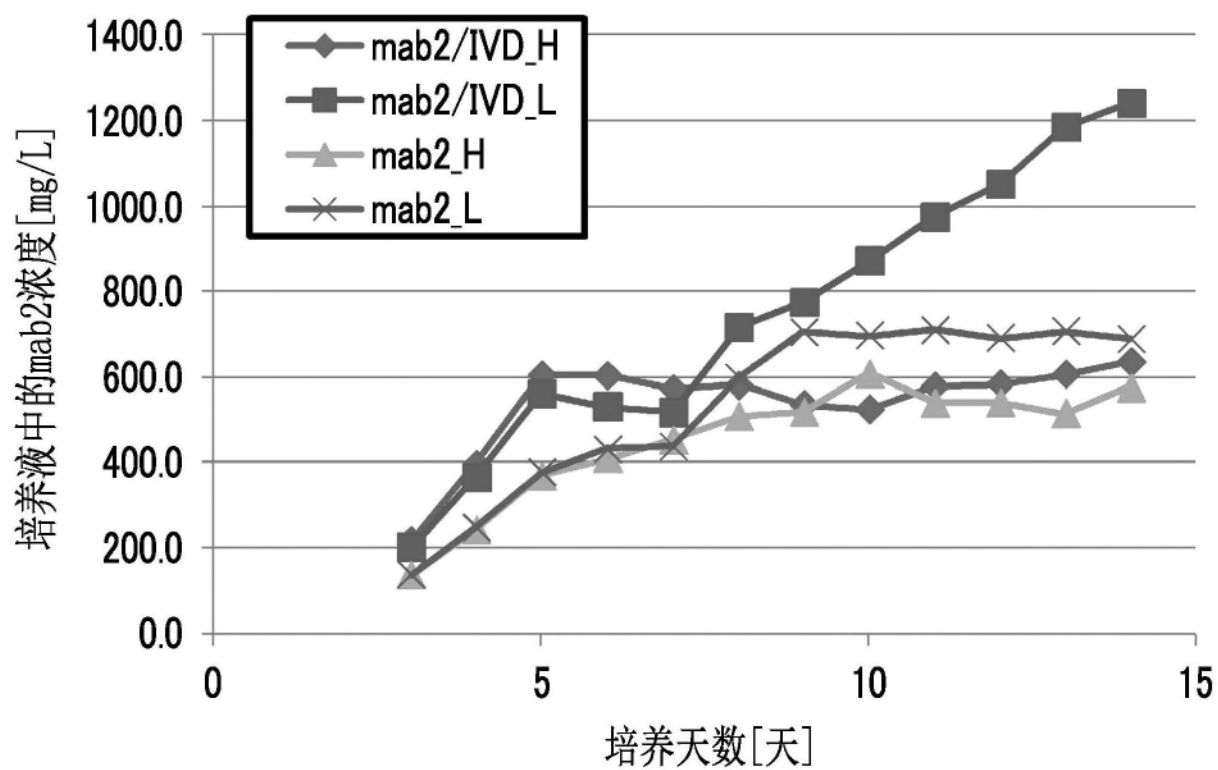


图20

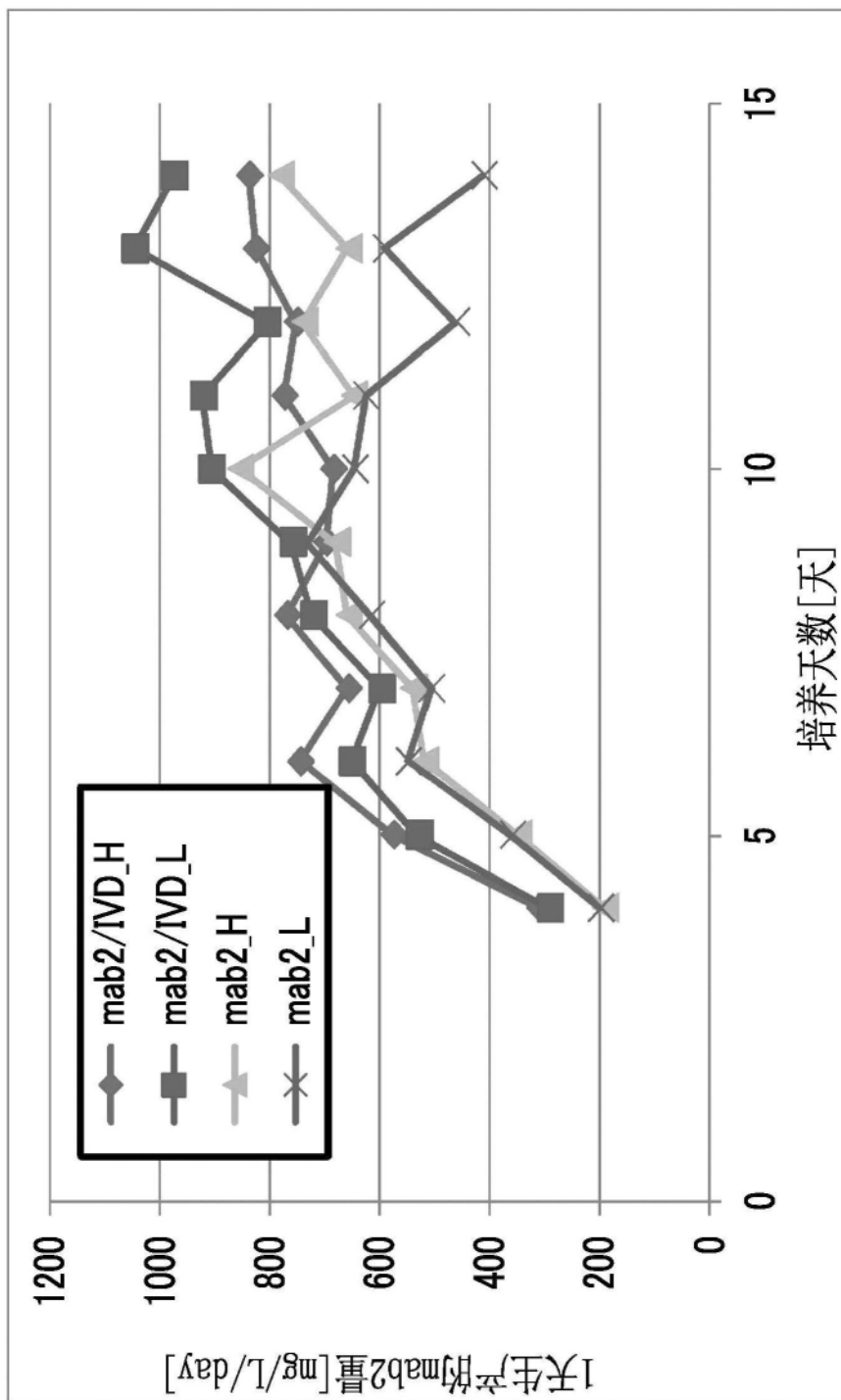


图21

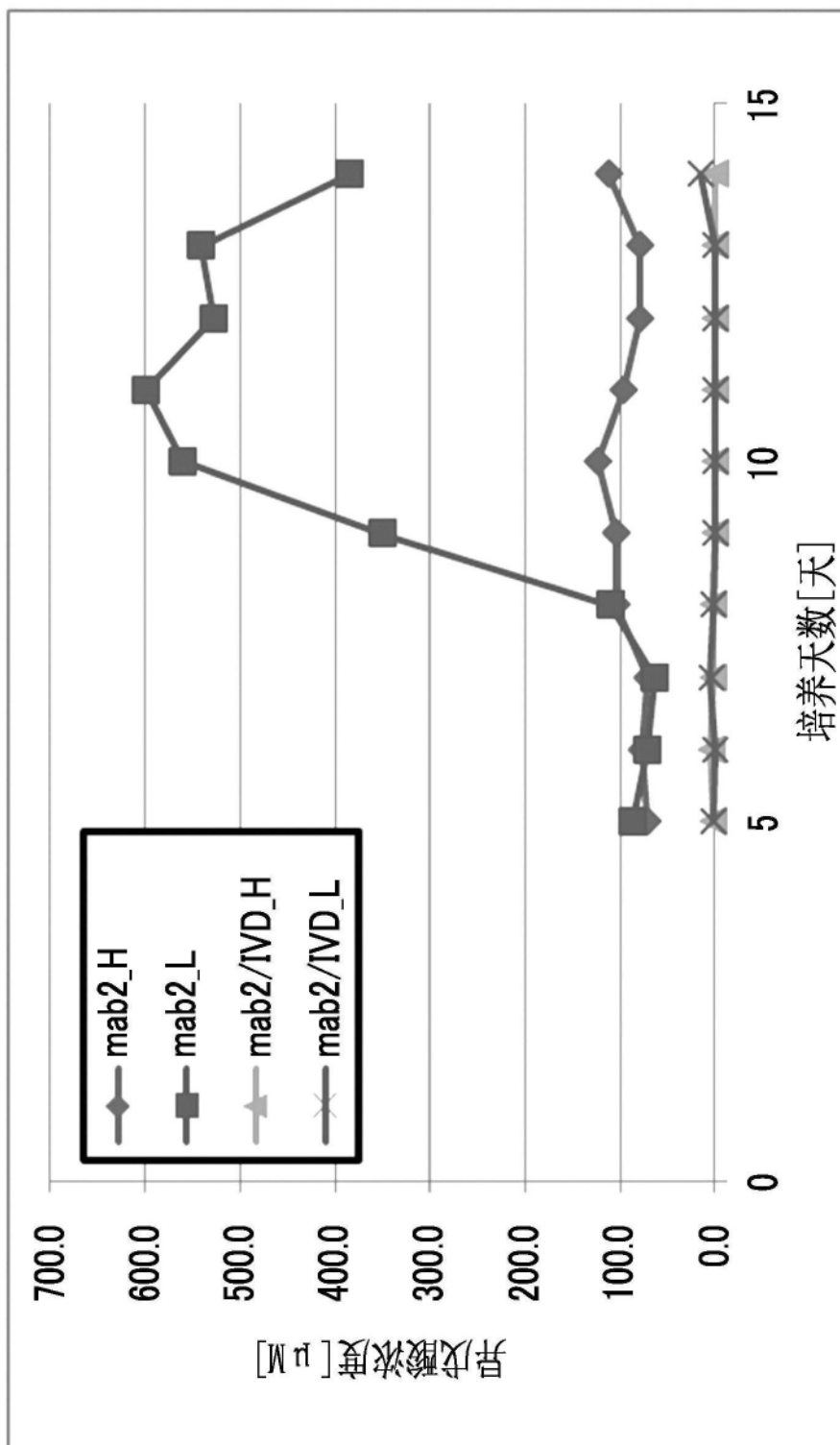


图22

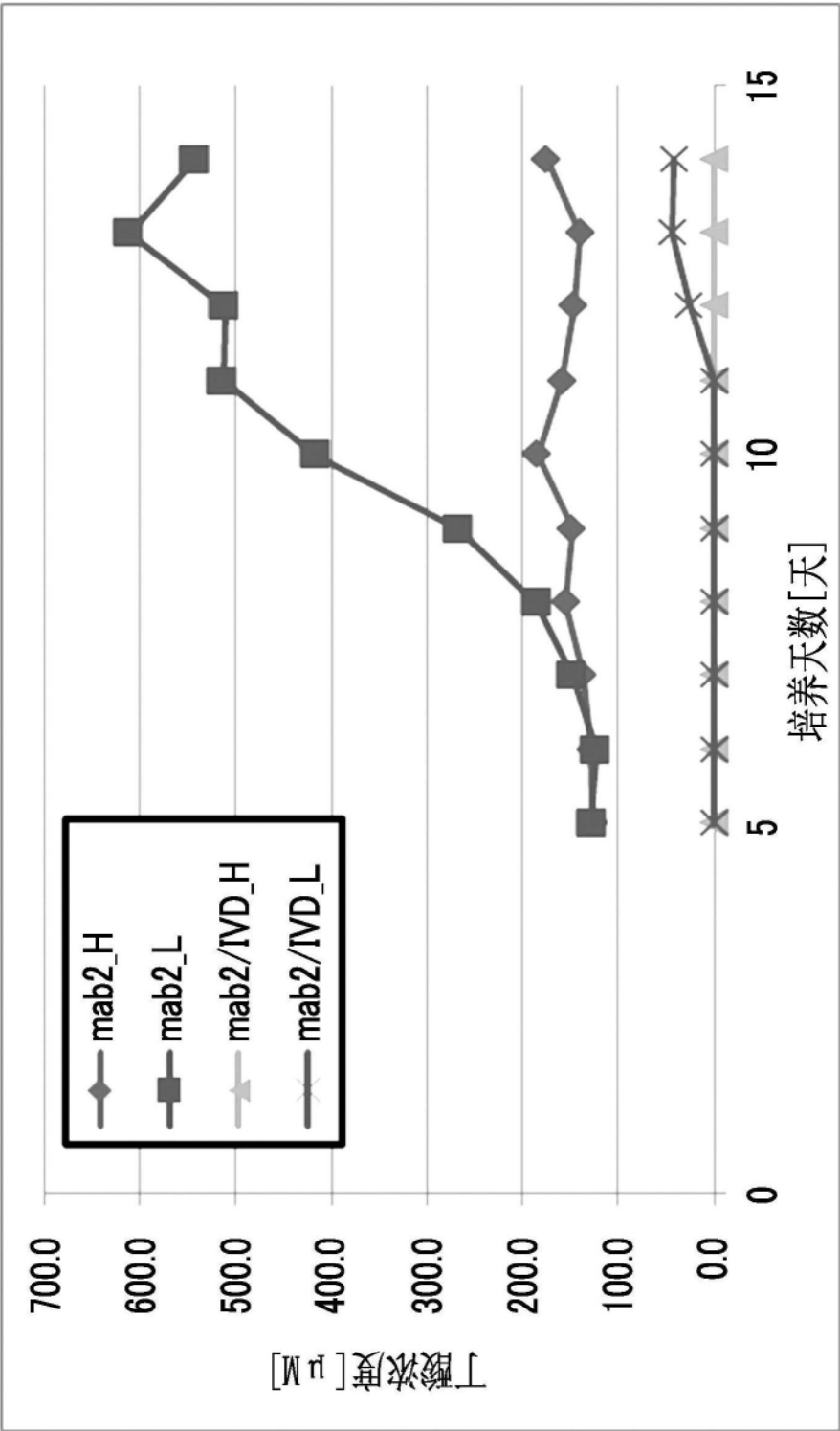


图23