



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102016025 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 16

(21) 申请号 200980114565. X

(22) 申请日 2009. 02. 27

(30) 优先权数据

2008-046782 2008. 02. 27 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 10. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2009/053682 2009. 02. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/107775 JA 2009. 09. 03

(73) 专利权人 国立大学法人北海道大学

地址 日本国北海道

专利权人 扶桑药品工业株式会社

(72) 发明人 铃木定彦 山本启一 田原宽

铃木祐介

(74) 专利代理机构 北京三幸商标专利事务所

(普通合伙) 11216

代理人 刘激扬

(51) Int. Cl.

C12N 15/00(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C12N 15/09(2006. 01)

C12P 21/02(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1771324 A, 2006. 05. 10, 权利要求 1-6, 说明书第 2 页第 5-28 行.

CN 1771324 A, 2006. 05. 10, 权利要求 1-6, 说明书第 2 页第 5-28 行.

JP 10179169 A, 1998. 07. 07, 权利要求 1-3、8、13, 说明书 [0008] [0010] [0014] [0028] 段.

JP 10179169 A, 1998. 07. 07, 权利要求 1-3、8、13, 说明书 [0008] [0010] [0014] [0028] 段.

CN 1693467 A, 2005. 11. 09, 全文.

日本组织培养学会. Saibo Baiyo naruhodo Q&A. 《Saibo Baiyo naruhodo Q&A》. 2004, 95-96.

Chang H. Kim et al.. Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells. 《Gene》. 1997, 第 199 卷 293-301.

审查员 吕小蒙

权利要求书1页 说明书18页

序列表11页 附图13页

(54) 发明名称

用于用动物细胞大量生产源自外源基因的蛋白质的表达载体及其应用

(57) 摘要

本发明成功地构建了能够在哺乳动物宿主细胞内以高水平生产源自外源基因的蛋白质的表达载体,其包含:翻译弱化的药物抗性基因顺反子,其表达通过将密码子改为哺乳动物中最不常用的密码子来弱化;和具有克隆位点的基因盒,该克隆位点用于将外源基因整合进高转录活性启动子和高稳定性聚腺苷化信号之间。

1. 一种能够在哺乳动物宿主细胞内高水平生产源自外源基因的蛋白质的表达载体, 其由核苷酸序列 SEQ ID NO:1 中的核苷酸 No. 1784 到 No. 2578 替换为了序列 SEQ ID NO:5 的序列组成。

2. 一种生产能够以高水平生产源自外源基因的蛋白质并且能够耐受新霉素的转化体的方法, 其包括以下步骤: 将外源基因插入到权利要求 1 所述表达载体中, 并用所述表达载体转化哺乳动物宿主细胞。

3. 一种生产源自外源基因的蛋白质的方法, 其包括如下步骤:

- (a) 将外源基因插入到权利要求 1 所述表达载体中;
- (b) 用所述表达载体转化哺乳动物宿主细胞;
- (c) 在添加了新霉素的培养基中培养转化体; 和
- (d) 从培养的转化体中收集源自外源基因的蛋白质。

4. 权利要求 3 的生产方法, 其中将化学成分确定的培养基 (CD 培养基) 或向 CD 培养基中添加了非动物基添加剂的培养基用于权利要求 3 的步骤 (c) 的培养。

5. 一种筛选具有高水平生产源自外源基因的蛋白质的能力的转化体的方法, 其包括如下步骤:

- (a) 将外源基因插入到权利要求 1 所述表达载体中;
- (b) 用所述表达载体转化哺乳动物宿主细胞; 和
- (c) 在添加了新霉素的培养基中培养转化体。

用于用动物细胞大量生产源自外源基因的蛋白质的表达载体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及哺乳动物细胞表达载体,该载体能使哺乳动物宿主细胞生产高水平的源自外源基因的蛋白质。本发明的所述表达载体尤其适用于生产需要哺乳动物独特的糖基化和折叠,而通过大肠杆菌或酵母作为宿主的基因重组来生产时很难具有足够活性的哺乳动物蛋白质。

背景技术

[0002] 已经开发了大量用于生产重组蛋白的载体,并且蛋白质的表达水平在使用细菌例如大肠杆菌、真核微生物例如酵母和昆虫细胞作为宿主的表达系统里都很高。然而,当表达哺乳动物独特的蛋白质时,可能不会形成常规的三维结构,并且大多数时候会遇到翻译后修饰例如糖基化的问题。因而,需要建立使用哺乳动物细胞作为宿主的表达系统,但是通常来说,大多数情况下表达水平很低。此外,使用重组病毒载体的表达系统也用于比昆虫细胞更高等的动物细胞,但是从所表达的蛋白质中移除重组病毒载体是一个很麻烦的过程,并且病毒载体自身的危险性也是难以否认的。

[0003] 用哺乳动物细胞作为宿主来生产重组蛋白的实例包括组织血纤维蛋白溶酶原激活因子(专利文献 1)、促红细胞生成素(专利文献 2 和非专利文献 1~3)、IFN- γ (非专利文献 4)和 IFN- β (专利文献 3 和非专利文献 5)。此外,还有很多关于单克隆抗体的重组生产的报道(专利文献 4~6 和非专利文献 6~8)。另外,哺乳动物细胞的高表达载体的一个实例是 pNOW/CMV-AA(专利文献 7)。用该载体表达共凝集素的生产水平在培养 4 天之后达到 11.8 $\mu\text{g/mL}$ 。但是,这些实例中的重组蛋白的生产水平都还不够。

[0004] 与本申请的发明有关的现有技术文献列举如下。

[0005] [专利文献 1] 日本特开昭 59-183693

[0006] [专利文献 2] 日本特开 2002-45191

[0007] [专利文献 3] 日本特开平 07-265084

[0008] [专利文献 4] 日本特开平 07-67648

[0009] [专利文献 5] 日本特开平 06-30788

[0010] [专利文献 6] 日本特开平 06-217786

[0011] [专利文献 7] 日本特开平 10-179169

[0012] [非专利文献 1] Fermentation Bioengineering, (1989) 4 :p. 257

[0013] [非专利文献 2] Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1986) 83 :p. 6465

[0014] [非专利文献 3] Biotechnology, (1988) 6 :p. 67

[0015] [非专利文献 4] Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1983) 80 :p. 4564

[0016] [非专利文献 5] Cytotechnology, (1990) 4 :p. 173

[0017] [非专利文献 6] Biotechnology, (1992) 10 :p. 169

[0018] [非专利文献 7] J. Immunol. Methods, (1989) 125 :p. 191

[0019] [非专利文献 8]Biotechnology, (1992)10 :p. 1455

发明内容

[0020] 哺乳动物细胞,尤其是中国仓鼠卵巢细胞(下文中称为 CHO 细胞)在药物制剂的生产中的应用,已经被证实是安全的并且现在已经成为常规技术。在使用哺乳动物细胞来生产重组蛋白时,提高生产力对降低成本、健康成本控制等等来说都是非常重要的。因此,通过有效基因转移来发展用于生产具有高水平生产能力的转化体的表达载体是必要的。

[0021] 有效基因转移对哺乳动物细胞内重组蛋白的高水平的简易生产是必须的。有效基因转移是指不管克隆的选择是否容易,获得具有高水平生产力的克隆的概率都很高。特别地,其是指活细胞克隆的数量相对于所有转化的细胞在药物选择之后相对较小,从而很容易选择具有高水平生产力的克隆。其也指出现具有高水平生产力的克隆的概率足够高,即使生产目的蛋白质的细胞的数量很少。当可利用细胞的数量变得很大时,则需要更长时间和更多努力用于选择,并将导致低效率以及很可能忽略潜在的具有高水平生产能力的克隆。

[0022] 高水平生产能力是指重组蛋白在通过基因转移获得的转化的细胞克隆内的高表达水平,并且这被认为主要是由于所述表达载体的特征和性能。已经发现基因表达的水平依赖于染色体位置而显著不同(Annu. Rev. Cell Biol., 6, page 679, 1990),并且将目标基因引入到染色体上具有高转录活性的区域(下称转录热点)可能会提高重组蛋白质生产的水平。

[0023] 鉴于上述情况完成了本发明。本发明的一个目的是提供能使得哺乳动物宿主细胞以高水平生产源自外源基因的蛋白质的哺乳动物细胞表达载体。本发明的另一个目的是提供使用上述载体来生产转化体的方法和使用上述载体生产源自外源基因的蛋白质的方法。

[0024] 作为致力于解决上述问题的研究的结果,本发明人成功地开发出具有这样的机制的表达载体,其中质粒 DNA 整合进宿主细胞染色体的转录热点中,并根据细胞株对药物(例如,新霉素、吉欧霉素或杀稻瘟菌素)的抗性来选择细胞。转导了的 G418 抗性株的原代克隆的高生产力依赖于 NPT 基因表达机制,吉欧霉素抗性株的原代克隆的高表达力依赖于吉欧霉素抗性基因表达机制,而杀稻瘟菌素抗性株的原代克隆的高生产力依赖于杀稻瘟菌素抗性基因表达机制。因此,本发明人通过构建能够高水平、稳定生产蛋白质的表达载体而完成了本发明。

[0025] 更具体地,本发明提供了下列:

[0026] [1] 能够在哺乳动物宿主细胞内高水平生产源自外源基因的蛋白质的表达载体,其包括:

[0027] (a) 翻译弱化的药物抗性基因盒,其表达通过将密码子改为哺乳动物中最不常用的密码子来削弱;和

[0028] (b) 基因盒,其包含用于将外源基因整合进高转录活性启动子和高稳定性聚腺苷化信号之间的克隆位点;

[0029] [2] [1] 所述的表达载体,其中 [1] (a) 所述翻译弱化的药物抗性基因盒的密码子已被改为在人类中最不常用的密码子;

[0030] [3] [1] 所述的表达载体,其中 [1] (a) 所述翻译弱化的药物抗性基因盒的密码子

对于丙氨酸已被改为 GCA,对于精氨酸已被改为 CGA,对于天冬酰胺已被改为 AAU,对于天冬氨酸已被改为 GAU,对于半胱氨酸已被改为 UGU,对于谷氨酰胺已被改为 CAA,对于谷氨酸已被改为 GAA,对于甘氨酸已被改为 GGU,对于组氨酸已被改为 CAU,对于亮氨酸已被改为 UUA,对于赖氨酸已被改为 AAA,对于脯氨酸已被改为 CCA,对于苯丙氨酸已被改为 UUU,对于丝氨酸已被改为 UCA,对于苏氨酸已被改为 ACU,对于酪氨酸已被改为 UAU,和 / 或对于缬氨酸已被改为 GUA ;

[0031] [4][1] 所述的表达载体,其中 [1] (a) 所述翻译弱化的药物抗性基因盒使用具有低表达诱导活性的启动子作为启动子 ;

[0032] [5][4] 所述的表达载体,其中所使用的低活性启动子是源自在哺乳动物细胞内几乎不表达的基因的启动子,或者是增强子部分已被移除的启动子 ;

[0033] [6][1] 所述的表达载体,其中 [1] (a) 所述翻译弱化的药物抗性基因盒中的密码子改变区域是该基因盒全长的 30%或更多 ;

[0034] [7][1] ~ [6] 任一所述的表达载体,其中 [1] (a) 所述药物抗性基因是新霉素磷酸转移酶基因 (NTP 基因) ;

[0035] [8] 生产能够以高水平生产源自外源基因的蛋白质并且能够耐受新霉素的转化体的方法,其包括以下步骤:将外源基因插入到 [7] 所述表达载体中,并用所述表达载体转化宿主细胞 ;

[0036] [9] 生产源自外源基因的蛋白质的方法,其包括如下步骤 :

[0037] (a) 将外源基因到插入 [7] 所述表达载体中 ;

[0038] (b) 用所述表达载体转化宿主细胞 ;

[0039] (c) 在添加了新霉素的培养基中培养转化体 ;和

[0040] (d) 从培养的转化体中收集源自外源基因的蛋白质 ;

[0041] [10][9] 的生产方法,其中将化学成分确定的培养基 (CD 培养基) 或向 CD 培养基中添加了非动物基添加剂的培养基用于 [9] 的步骤 (c) 的培养 ;

[0042] [11] 筛选具有高水平生产源自外源基因的蛋白质的能力的转化体的方法,其包括如下步骤 :

[0043] (a) 将外源基因插入到 [7] 所述表达载体中 ;

[0044] (b) 用所述表达载体转化宿主细胞 ;和

[0045] (c) 在添加了新霉素的培养基中培养转化体 ;

[0046] [12][1] ~ [6] 任一所述的表达载体,其中 [1] (a) 所述药物抗性基因是吉欧霉素抗性基因 (Zeocin^r基因) ;

[0047] [13] 生产能够以高水平生产源自外源基因的蛋白质并且能够耐受吉欧霉素的转化体的方法,其包括以下步骤:将外源基因插入到 [12] 所述表达载体中,并用所述表达载体转化宿主细胞 ;

[0048] [14] 生产源自外源基因的蛋白质的方法,其包括如下步骤 :

[0049] (a) 将外源基因插入到 [12] 所述表达载体中 ;

[0050] (b) 用所述表达载体转化宿主细胞 ;

[0051] (c) 在添加了吉欧霉素的培养基中培养转化体 ;和

[0052] (d) 从培养的转化体中收集源自外源基因的蛋白质 ;

[0053] [15][14]的生产方法,其中将化学成分确定的培养基(CD培养基)或向CD培养基中添加了非动物基添加剂的培养基用于[14]的步骤(c)的培养;

[0054] [16]筛选具有高水平生产源自外源基因的蛋白质的能力的转化体的方法,其包括如下步骤:

[0055] (a) 将外源基因插入到[12]所述表达载体中;

[0056] (b) 用所述表达载体转化宿主细胞;和

[0057] (c) 在添加了吉欧霉素的培养基中培养转化体;

[0058] [17][1]~[6]所述的表达载体,其中[1](a)所述药物抗性基因是杀稻瘟菌素抗性基因(杀稻瘟菌素基因);

[0059] [18]生产能够以高水平生产源自外源基因的蛋白质并且能够耐受杀稻瘟菌素的转化体的方法,其包括以下步骤:将外源基因插入[17]所述表达载体,并用所述表达载体转化宿主细胞;

[0060] [19]生产源自外源基因的蛋白质的方法,其包括如下步骤:

[0061] (a) 将外源基因插入到[17]所述表达载体中;

[0062] (b) 用所述表达载体转化宿主细胞;

[0063] (c) 在添加了杀稻瘟菌素的培养基中培养转化体;和

[0064] (d) 从培养的转化体中收集源自外源基因的蛋白质;

[0065] [20][19]的生产方法,其中将化学成分确定的培养基(CD培养基)或向CD培养基中添加了非动物基添加剂的培养基用于[14]的步骤(c)的培养;和

[0066] [21]筛选具有生产高水平源自外源基因的蛋白质的能力的转化体的方法,其包括如下步骤:

[0067] (a) 将外源基因插入到[17]所述表达载体中;

[0068] (b) 用所述表达载体转化宿主细胞;和

[0069] (c) 在添加了杀稻瘟菌素的培养基中培养转化体。

附图说明

[0070] 图1显示了pNC1结构。下列分别表示:PCMV:巨细胞病毒启动子;INRBG:兔生长激素内含子;PABGH:牛生长激素基因polyA添加信号;PdSV:增强子缺失的猿病毒40启动子;NPT:新霉素磷酸转移酶cDNA;PASV:猿病毒40polyA添加信号;和Amp^r:大肠杆菌中的选择标记(氨苄青霉素抗性)。

[0071] 图2显示了pNC2结构。下列分别表示:PCMV:巨细胞病毒启动子;INRBG:兔生长激素内含子;PABGH:牛生长激素基因polyA添加信号;PdSV:增强子缺失的猿病毒40启动子;cdNPT:翻译弱化的NPT基因,通过改变整个NPT核苷酸序列的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得;PASV:猿病毒40polyA添加信号;和Amp^r:大肠杆菌中的选择标记(氨苄青霉素抗性)。

[0072] 图3显示了pNC5结构。下列分别表示:PCMV:巨细胞病毒启动子;INRBG:兔生长激素内含子;PABGH:牛生长激素基因polyA添加信号;PdSV:增强子缺失的猿病毒40启动子;cd90NPT:翻译弱化的NPT基因,通过改变NPT核苷酸序列从5'端起90个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得;PASV:猿病毒40polyA添加信号;和Amp^r:

大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0073] 图 4 显示了 pNC6 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cd180NPT：翻译弱化的 NPT 基因，通过改变 NPT 核苷酸序列从 5' 端起 180 个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0074] 图 5 显示了 pNC7 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cd270NPT：翻译弱化的 NPT 基因，通过改变 NPT 核苷酸序列从 5' 端起 270 个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0075] 图 6 显示了 pNC1/hMBL 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；hMBL：人甘露聚糖结合凝集素 cDNA；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；NPT：新霉素磷酸转移酶 cDNA；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0076] 图 7 显示了 pNC2/hMBL 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；hMBL：人甘露聚糖结合凝集素 cDNA；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cdNPT：翻译弱化的 NPT 基因，通过改变整个 NPT 核苷酸序列的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0077] 图 8 显示了 pNC5/hMBL 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；hMBL：人甘露聚糖结合凝集素 cDNA；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cd90NPT：翻译弱化的 NPT 基因，通过改变 NPT 核苷酸序列从 5' 端起 90 个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0078] 图 9 显示了 pNC6/hMBL 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；hMBL：人甘露聚糖结合凝集素 cDNA；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cd180NPT：翻译弱化的 NPT 基因，通过改变 NPT 核苷酸序列从 5' 端起 180 个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0079] 图 10 显示了 pNC7/hMBL 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；hMBL：人甘露聚糖结合凝集素 cDNA；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cd270NPT：翻译弱化的 NPT 基因，通过改变 NPT 核苷酸序列从 5' 端起 270 个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0080] 图 11 显示了 pZC1 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；Zeo：吉欧霉素抗性基因 (Sh ble 基因) cDNA；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：

大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0081] 图 12 显示了 pZC2 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cdZeo：翻译弱化的吉欧霉素抗性基因（Sh ble 基因），通过改变整个吉欧霉素抗性基因核苷酸序列的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0082] 图 13 显示了 pZC5 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cd90Zeo：翻译弱化的吉欧霉素抗性基因（Sh ble 基因），通过改变吉欧霉素抗性基因核苷酸序列从 5' 端起 90 个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0083] 图 14 显示了 pZC7 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cd180Zeo：翻译弱化的吉欧霉素抗性基因（Sh ble 基因），通过改变吉欧霉素抗性基因核苷酸序列从 5' 端起 180 个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0084] 图 15 显示了 pZC1/hMBL 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；hMBL：人甘露聚糖结合凝集素 cDNA；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；Zeo：吉欧霉素抗性基因（Sh ble 基因）cDNA；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0085] 图 16 显示了 pZC2/hMBL 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；hMBL：人甘露聚糖结合凝集素 cDNA；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cdZeo：翻译弱化的吉欧霉素抗性基因（Sh ble 基因），通过改变整个吉欧霉素抗性基因核苷酸序列的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0086] 图 17 显示了 pZC5/hMBL 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；hMBL：人甘露聚糖结合凝集素 cDNA；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cd90Zeo：翻译弱化的吉欧霉素抗性基因（Sh ble 基因），通过改变吉欧霉素抗性基因核苷酸序列从 5' 端起 90 个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0087] 图 18 显示了 pZC7/hMBL 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长激素内含子；hMBL：人甘露聚糖结合凝集素 cDNA；PABGH：牛生长激素基因 polyA 添加信号；PdSV：增强子缺失的猿病毒 40 启动子；cd180Zeo：翻译弱化的吉欧霉素抗性基因（Sh ble 基因），通过改变吉欧霉素抗性基因核苷酸序列从 5' 端起 1800 个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得；PASV：猿病毒 40polyA 添加信号；和 Amp^r：大肠杆菌中的选择标记（氨苄青霉素抗性）。

[0088] 图 19 显示了 pBC1 结构。下列分别表示：PCMV：巨细胞病毒启动子；INRBG：兔生长

激素内含子 ;PABGH :牛生长激素基因 polyA 添加信号 ;PdSV :增强子缺失的猿病毒 40 启动子 ;Bsd :杀稻瘟菌素抗性基因 (bsd 基因) cDNA ;PASV :猿病毒 40polyA 添加信号 ;和 Amp^r :大肠杆菌中的选择标记 (氨苄青霉素抗性)。

[0089] 图 20 显示了 pBC6 结构。下列分别表示 :PCMV :巨细胞病毒启动子 ;INRBG :兔生长激素内含子 ;PABGH :牛生长激素基因 polyA 添加信号 ;PdSV :增强子缺失的猿病毒 40 启动子 ;cd120Bsd :翻译弱化的杀稻瘟菌素抗性基因 (bsd 基因),通过改变杀稻瘟菌素抗性基因核苷酸序列从 5' 端起 120 个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得 ;PASV :猿病毒 40polyA 添加信号 ;和 Amp^r :大肠杆菌中的选择标记 (氨苄青霉素抗性)。

[0090] 图 21 显示了 pBC1/hMBL 结构。下列分别表示 :PCMV :巨细胞病毒启动子 ;INRBG :兔生长激素内含子 ;hMBL :人甘露聚糖结合凝集素 cDNA ;PABGH :牛生长激素基因 polyA 添加信号 ;PdSV :增强子缺失的猿病毒 40 启动子 ;Bsd :杀稻瘟菌素抗性基因 (bsd 基因) cDNA ;PASV :猿病毒 40polyA 添加信号 ;和 Amp^r :大肠杆菌中的选择标记 (氨苄青霉素抗性)。

[0091] 图 22 显示了 pBC6/hMB 结构。下列分别表示 :PCMV :巨细胞病毒启动子 ;INRBG :兔生长激素内含子 ;hMBL :人甘露聚糖结合凝集素 cDNA ;PABGH :牛生长激素基因 polyA 添加信号 ;PdSV :增强子缺失的猿病毒 40 启动子 ;cd120Bsd :翻译弱化的杀稻瘟菌素抗性基因 (bsd 基因),通过改变杀稻瘟菌素抗性基因核苷酸序列从 5' 端起 120 个碱基范围内的密码子为在哺乳动物中最不常用的密码子而获得 ;PASV :猿病毒 40polyA 添加信号 ;和 Amp^r :大肠杆菌中的选择标记 (氨苄青霉素抗性)。

具体实施方式

[0092] 本发明人通过将药物抗性基因 (NPT 基因、吉欧霉素抗性基因或杀稻瘟菌素抗性基因) 的密码子改为在哺乳动物中最不常用的密码子从而彻底地弱化所述药物抗性基因的表达,即使是转化体,在培养基中药物的筛选 (新霉素筛选 (例如 G418), 吉欧霉素筛选或杀稻瘟菌素筛选) 下存活也很难,除非将组合的质粒基因整合进染色体具有高表达特性的位置。

[0093] 更具体的,本发明提供了用于在哺乳动物宿主细胞内诱导重组蛋白质的高水平生产的表达载体。

[0094] 本发明的一种表达载体在骨架载体上通过下述来构建:

[0095] (a) 翻译弱化的药物抗性基因盒,其表达通过将密码子改为哺乳动物中最不常用的密码子来削弱;和

[0096] (b) 基因盒,包含用于将外源基因整合进高转录活性启动子和高稳定性聚腺苷化信号之间的克隆位点。

[0097] 本发明通过将药物抗性基因的密码子改为在哺乳动物中最不常用的密码子,并在药物抗性基因盒 (顺反子) 结构中使用具有降低的药物抗性基因的表达诱导特性的启动子,从而显著地弱化了在转化的宿主细胞内药物抗性基因的表达机制。在本发明中,“基因盒”是指具有启动子、结构基因和聚腺苷化信号 (polyA) 的基本构成,并通过转录/翻译而表达蛋白质的单元,它也可以包括作为插入序列的与任意这些序列相关的 DNA 序列或任何可选 DNA 序列。本发明的药物抗性基因盒定义为“翻译弱化的药物抗性基因盒”,这是因为它们不同于仅具有弱化的启动子的那些,特别是允许获得将质粒基因整合进转录热点的

物抗性株。在本发明中,所述药物抗性基因不特别限定,但是优选的实例包括新霉素抗性基因(新霉素磷酸转移酶基因,NTP 基因)、吉欧霉素抗性基因或杀稻瘟菌素抗性基因。

[0098] 在本发明中,“哺乳动物中最不常用的密码子”是指优选,例如,人类中最不常用的密码子。所述人类中最不常用的密码子包括在文献 Kim 等 (Gene, 199, p. 293, 1997) 中公开的密码子。所述密码子的具体实例是,对于丙氨酸为 GCA,对于精氨酸为 CGA,对于天冬酰胺为 AAU,对于天冬氨酸为 GAU,对于半胱氨酸为 UGU,对于谷氨酰胺为 CAA,对于谷氨酸为 GAA,对于甘氨酸为 GGU,对于组氨酸为 CAU,对于亮氨酸为 UUA,对于赖氨酸为 AAA,对于脯氨酸为 CCA,对于苯丙氨酸为 UUU,对于丝氨酸为 UCA,对于苏氨酸为 ACU,对于酪氨酸为 UAU,和 / 或对于缬氨酸为 GUA,但是不限于此。

[0099] 在本发明中,“弱化表达”表示在转录和 / 或翻译水平上减少基因表达,并且特别是,这可以通过将密码子改为上述“哺乳动物中最不常用的密码子”来实现。

[0100] 在上述“翻译弱化的药物基因盒”中,密码子被改变的区域并不特别限定,但是优选,所述基因盒的全长的 30% 或更多(例如,40% 或更多,50% 或更多,60% 或更多,70% 或更多,80% 或更多,90% 或更多,95% 或更多,或 100%) 的区域内的密码子被改变。密码子改变区域的范围可以通过考虑所述载体的其它条件来随意地确定。

[0101] 对于上述“翻译弱化的药物抗性基因盒”的启动子,可以使用来自在哺乳动物细胞内很难表达的蛋白质基因的启动子,或者由常规启动子通过缺失增强子而获得的启动子。更特别的,优选使用由 SV40 病毒抗原启动子缺失了增强子区域的启动子 (Mol. Cell Biol., 6, p. 2593, 1986), 或具有相对非常低的表达特性的启动子。

[0102] 质粒 DNA 进入宿主细胞染色体的转录热点的整合可以通过根据所述药物抗性基因盒的特性而用新霉素 (G418)、吉欧霉素、杀稻瘟菌素或其它进行选择来完成,但是必须对在染色体的转录热点的源自外源基因的蛋白质自身的表达进行强诱导。因此,在插入所述蛋白质基因的多克隆位点(在下文中,指 MCS) 中的启动子和聚腺苷化信号(在下文中,称为 polyA) 将从具有最强力的表达诱导特性的那些之中选择。启动子的实例包括人巨细胞病毒直接早期 (hCMV MIE :Cell, 41, p. 521, 1985) 启动子,人巨细胞病毒启动子和腺病毒启动子融合的 CMV5 启动子 (Nucleic Acid Research, 30, p. 2, 2002), 和 β -肌动蛋白启动子 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, p. 4831, 1987); polyA 的实例包括源自牛生长激素的 polyA 序列 (DNA 5, p. 115, 1986)。本文中,含有可以插入目的蛋白质的基因的多克隆位点的 DNA 片段被称为“基因表达盒”。

[0103] 本发明的表达载体可以通过实施例中描述的表达载体来示例,但不限于此。

[0104] 另外,本发明提供了生产具有高水平生产源自外源基因的蛋白质的能力和耐受药物的能力的转化体的方法,包括如下步骤:将外源基因插入上述表达载体,并用所述表达载体转化宿主细胞。

[0105] 特别的实例包括获得具有高蛋白质生产能力的转化体的方法,其中包括将编码需要表达的蛋白质的外源基因插入到本发明的表达载体的多克隆位点(在下文中,称为 MCS) 中,然后用所述表达载体通过转染方法转化宿主细胞(转染方法的实例在本文中是指包括本领域技术人员公知的方法,例如脂质体法、电穿孔法、磷酸钙法和微注射法),然后通过药物(新霉素、吉欧霉素或杀稻瘟菌素)抗性进行选择。

[0106] 在本发明中,宿主细胞并不特定地限定,只要它们是适合于表达源自外源基因的

蛋白质的细胞即可,但是优选包括,例如,哺乳动物细胞,更优选中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)。

[0107] 很多在药物选择中存活的转化的细胞已经达到了相对高的蛋白质表达水平,但是为了从这些细胞中选择具有更高水平的生产能力的转化体细胞,应确定蛋白质表达的水平。

[0108] 另外,本发明提供了生产源自外源基因的蛋白质的方法,包括如下步骤:

[0109] (a) 将外源基因插入到本发明的表达载体中;

[0110] (b) 用所述表达载体转化宿主细胞;

[0111] (c) 在添加了药物(新霉素、吉欧霉素或杀稻瘟菌素)的培养基中培养转化体;和

[0112] (d) 从培养的转化体中收集源自外源基因的蛋白质;

[0113] 在本发明中,在上述步骤(c)中,显示出高效率的蛋白质表达的转化体(菌落)能够通过添加药物(新霉素、吉欧霉素或杀稻瘟菌素)的培养基中培养来选择。所选择的转化体可以在同样的培养基中继续培养,或者在转移到另一种培养基例如用于大规模表达的培养基中后培养。

[0114] 在本发明中,用于培养或移植转化体的培养基并没有特别的限制,但是例如,优选无血清培养基,并更优选 CD 培养基或添加了非动物基添加剂的 CD 培养基。

[0115] 在本发明中,当从培养的转化体中收集源自外源基因的蛋白质的时候,所述蛋白质可以通过本领域技术人员所公知的方法来纯化(过滤、离心、柱纯化等等)。所述源自外源基因的蛋白质可以以与其它蛋白的融合蛋白的形式表达以便于纯化。

[0116] 此外,本发明提供筛选具有高水平生产源自外源基因的蛋白质的能力的转化体的方法,其中包括如下步骤:

[0117] (a) 将外源基因插入到本发明的表达载体中;

[0118] (b) 用所述表达载体转化宿主细胞;和

[0119] (c) 在添加了药物(新霉素、吉欧霉素或杀稻瘟菌素)的培养基中培养转化体。

[0120] 说明书中所引用的所有现有技术文献以参照的方式并入在此。

[0121] [实施例]

[0122] 在下文中,本发明将以参考实施例的形式特别描述,但是并不局限于此。

[0123] [实施例 1] pNC1、pNC2、pNC5、pNC6 和 pNC7 的构建

[0124] 使用本领域技术人员所公知的方法,构建了本发明的载体 pNC1、pNC2、pNC5、pNC6 和 pNC7。骨架载体 pNC1 的全部核苷酸序列示于 SEQ ID NO :1。pNC1 在核苷酸 No. 1784 和 No. 2578 之间含有野生型 NPT 的 cDNA(图 1)。

[0125] pNC2 通过将 pNC1 的序列中的核苷酸 No. 1784 到 No. 2578 替换为 SEQ ID NO :2 而构建。pNC2 的替换区域引入了翻译弱化的 NPT 基因,其中 NPT 的全部核苷酸序列的密码子被改变为哺乳动物中最不常用的密码子(图 2)。

[0126] pNC5 通过将 pNC1 的序列中的核苷酸 No. 1784 到 No. 2578 替换为 SEQ ID NO :3 而构建。pNC5 的替换区域引入了翻译弱化的 NPT 基因,其中 NPT 的核苷酸序列从 5' 端起 90 个碱基范围内的 密码子(11.3%的密码子改变率)被改变为哺乳动物中最不常用的密码子(图 3)。

[0127] pNC6 通过将 pNC1 的序列中的核苷酸 No. 1784 到 No. 2578 替换为 SEQ ID NO :4 而

构建。pNC6 的替换区域引入了翻译弱化的 NPT 基因,其中 NPT 的核苷酸序列从 5' 端起 180 个碱基范围内的密码子 (22.6% 的密码子改变率) 被改变为哺乳动物中最不常用的密码子 (图 4)。

[0128] pNC7 通过将 pNC1 的序列中的核苷酸 No. 1784 到 No. 2578 替换为 SEQ ID NO :5 而构建。pNC7 的替换区域引入了翻译弱化的 NPT 基因,其中 NPT 的核苷酸序列从 5' 端起 270 个碱基范围内的密码子 (34.0% 的密码子改变率) 被改变为哺乳动物中最不常用的密码子 (图 5)。

[0129] [实施例 2]pNC1/hMBL、pNC2/hMBL、pNC5/hMBL、pNC6/hMBL 和 pNC7/hMBL 的构建

[0130] 使用本领域技术人员公知的方法,将本发明的载体 pNC1、pNC2、pNC5、pNC6 和 pNC7 中的核苷酸 No. 1267 到 No. 1275 用 SEQ ID NO :6 的编码人甘露聚糖结合凝集素 (MBL) 的 cDNA (在下文中称为 hMBL) 来替换,从而构建 pNC1/hMBL (图 6)、pNC2/hMBL (图 7)、pNC5/hMBL (图 8)、pNC6/hMBL (图 9) 和 pNC7/hMBL (图 10)。

[0131] [实施例 3] 用 pNC1/hMBL、pNC2/hMBL、pNC5/hMBL、pNC6/hMBL 和 pNC7/hMBL 转染 CHO 细胞,用 CD 培养基或添加了非动物基添加剂的 CD 培养基进行 G418 筛选

[0132] 在 25cm²培养瓶中用脂质体方法 (使用 Lipofectamine™ LTX ;Invitrogen) 用 10 μg 的 pNC1/hMBL、pNC2/hMBL、pNC5/hMBL、pNC6/hMBL 和 pNC7/hMBL 转染 5.0x10⁵CHO 细胞 (CHO DG44 细胞)。基因转染根据生产商的说明书来进行。基因转染 48 小时之后,进行细胞计数,然后细胞在添加了 4mM 的 Gluta MAX™-I (Invitrogen) 的 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本) 中稀释。细胞平铺于 5 个 96 孔微滴定板中,每个浓度为 1000 细胞 / 孔和 100 细胞 / 孔,一共 10 个板 (960 孔),在 5% 二氧化碳气体存在下 37℃ 培养大约 3 周之后,观察到存活细胞 (G418 抗性克隆)。从存活细胞中任意选择 G418 抗性克隆,与该添加了 4mM 的 Gluta MAX™-I (Invitrogen) 的 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本) 一起转移到 24 孔板中,培养直到细胞填满各个孔 1/3 或更多。0.4mL 的每个克隆放入无菌试管并以 200x g 离心 2 分钟。弃上清液,细胞悬浮于 0.1mL 新鲜培养基 (添加了 4mM 的 Gluta MAX™-I (Invitrogen) 的 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本))。计数细胞之后,细胞用培养基稀释至 5.0x 10⁵细胞 /mL,然后其 0.2mL 转移至新的 24 孔板,在 5% 二氧化碳气体存在下以 37℃ 培养细胞 72 小时。然后,细胞以 9300x g 离心 2 分钟,收集上清液。之后,测定培养上清液中 MBL 的生产水平。

[0133] [实施例 4]pNC1/hMBL、pNC5/hMBL、pNC6/hMBL 和 pNC7/hMBL 转染的克隆的 MBL 生产水平的测定

[0134] 生产水平通过 ELISA 来测定。96 孔板 (F96MAXI SORPNunc-Immunoplate, Cat. no. 442404, Nunc) 用由包被缓冲液 (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, 0.05% NaN₃, pH 9.6) 稀释的 1 μg/mL 的抗人 MBL 抗体 (获赠于日本旭川医科大学的大谷博士) 在 4℃ 下包被 16 小时。用 4% 的 Block Ace (大日本住友制药株式会社) 封闭之后,72 小时培养上清液 (1/1000 到 1/100000 稀释)、在 CHO 细胞的无血清培养基 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本) 中的两倍稀释系列 (0.3125 到 20ng/mL) 的纯化的人 MBL (获赠于日本旭川医科大学的大谷博士) 或 IS CHO 与水解液培养基 (IS 日本),以 100 μL / 孔置于平板中,将所述平板在 37℃ 下孵育 1 小时。此后进一步以 0.1 μg/mL 的生物素化的人 MBL 单克隆抗体 (获赠于日本旭川医科大学的大谷博士) 在 37℃ 下孵育 1 小时。已经在 37℃ 下孵育 30 分钟的 VECTASTAIN

Elite ABC Kit STANDARD (2 滴试剂 A, 2 滴试剂 B/5mL, Vector) 以 100 μ L/ 孔添加, 然后在 37°C 下反应 45 分钟。已经在室温下孵育 30 分钟的 PEROXIDASE SUBSTRATE KIT TMB (2 滴缓冲液, 3 滴 TMB, 2 滴过氧化氢 /5mL, Vector) 进一步以 100 μ L/ 孔加入, 在其于室温下反应 15 分钟之后, 以 100 μ L/ 孔加入 1M 磷酸以终止反应。用酶标仪 (Model 680, BioRad 制造) 测定蛋白质浓度。表 1 中显示了由 ELISA 方法获得的结果, 以及显示出人 MBL 高生产水平的最高的三个样品。具有最高生产水平的克隆展现出与未改变密码子的载体相比显著的高生产力。

[0135] [表 1]

[0136] G418 抗性克隆中 hMBL 的生产

[0137]

克隆名称	产量 (μ g/ml)
pNC1-1	14.9
pNC1-17	13.2
pNC1-49	12.2
pNC2-23	14.7
pNC2-37	20.0
pNC2-48	23.3
pNC5-2	9.2
pNC5-3	9.5
pNC5-5	9.9
pNC6-7	13.7
pNC6-21	16.0
pNC6-24	11.5
pNC7-5	32.5
pNC7-29	36.4
pNC7-30	46.1

[0138] [实施例 5] pNC1/hMBL、pNC2/hMBL、pNC5/hMBL、pNC6/hMBL 和 pNC7/hMBL 转染的细胞克隆的 hMBL 生产水平

[0139] 表 2 显示了每个克隆中本发明的 pNC1、pNC2、pNC5、pNC6 和 pNC7 表达载体表达的 hMBL 的分布。

[0140] 对于 pNC1, 在 50 个 G418 抗性株中, 72.0% 生产的 hMBL 为 0 μ g/mL 或更高但低于 5 μ g/mL。在 50 株中有 14 株 (28.0%) 显示出 5 μ g/mL 或更高的生产水平。50 株中的 7 株 (14.0%) 显示出 10 μ g/mL 或更高的生产水平。显示出最高的生产水平的株在 3 天时间里生产了 15.0 μ g/mL。

[0141] 对于 pNC2, 在 50 个 G418 抗性株中, 40.0% 生产的 hMBL 为 0 μ g/mL 或更高但低于 5 μ g/mL。在 50 株中有 30 株 (60.0%) 显示出 5 μ g/mL 或更高的生产水平。50 株中的 14 株 (28.0%) 显示出 10 μ g/mL 或更高的生产水平。50 株中的 2 株 (4.0%) 显示出 15 μ g/mL 或更高的生产水平。显示出最高的生产水平的株在 3 天时间里生产了 23.3 μ g/mL。

[0142] 对于 pNC5, 在 50 个 G418 抗性株中, 70.0% 生产的 hMBL 为 0 μ g/mL 或更高但低于

5 $\mu\text{g/mL}$ 。在 50 株中有 15 株 (30.0%) 显示出 5 $\mu\text{g/mL}$ 或更高的生产水平。显示出最高的生产水平的株在 3 天时间里生产了 9.9 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0143] 对于 pNC6, 在 50 个 G418 抗性株中, 60.0% 生产的 hMBL 为 0 $\mu\text{g/mL}$ 或更高但低于 5 $\mu\text{g/mL}$ 。在 50 株中有 20 株 (40.0%) 显示出 5 $\mu\text{g/mL}$ 或更高的生产水平。50 株中的 4 株 (8.0%) 显示出 10 $\mu\text{g/mL}$ 或更高的生产水平。50 株中的 1 株 (2.0%) 显示出 15 $\mu\text{g/mL}$ 或更高的生产水平。显示出最高的生产水平的株在 3 天时间里生产了 16.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

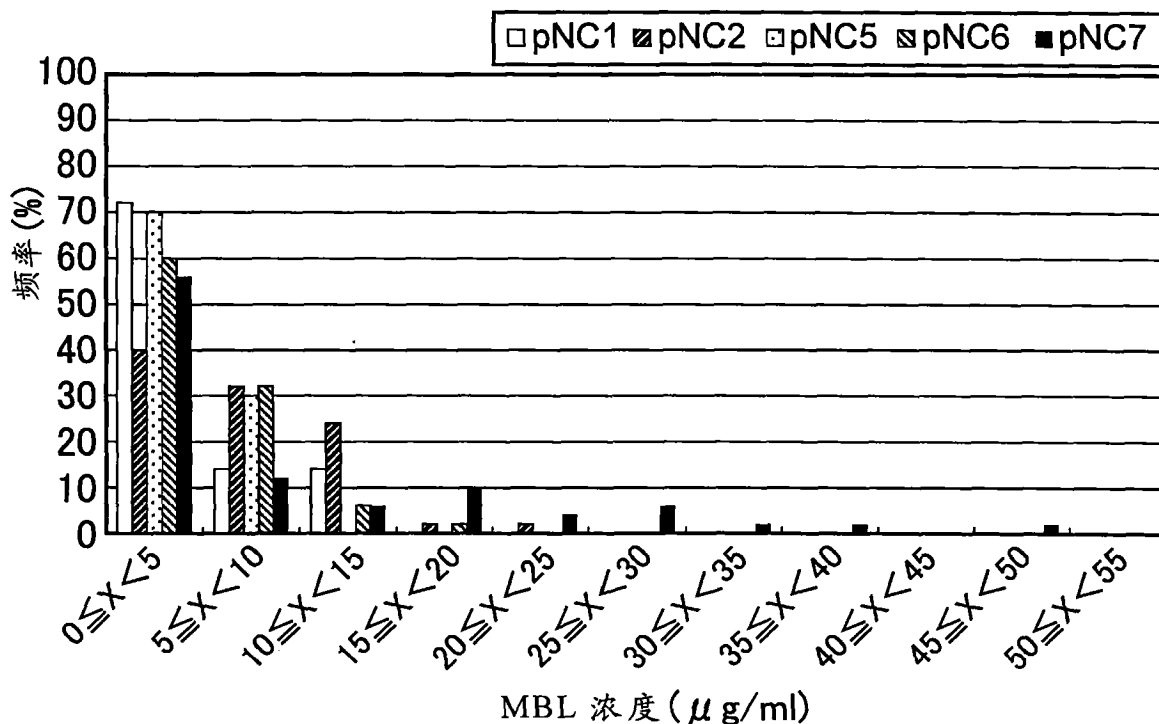
[0144] 对于 pNC7, 在 50 个 G418 抗性株中, 56.0% 生产的 hMBL 为 0 $\mu\text{g/mL}$ 或更高但低于 5 $\mu\text{g/mL}$ 。在 50 株中有 22 株 (44.0%) 显示出 5 $\mu\text{g/mL}$ 或更高的生产水平。50 株中的 16 株 (32.0%) 显示出 10 $\mu\text{g/mL}$ 或更高的生产水平。令人惊讶地, 50 株中的 13 株 (26.0%) 显示出 15 $\mu\text{g/mL}$ 或更高的生产水平。显示出最高的生产水平的株在 3 天时间里生产了 46.1 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0145] 相比于文献报道的基因扩增之前典型表达载体的原始克隆数据 (DNA, 7, p. 651, 1988 ;Biotechnology, 10, p. 1455, 1992 ;Biotechnology, 8, p. 662, 1990 ;Gene 76, p. 19, 1989 ;和 Biotechnology, 9, p. 64, 1991), 这是最高的水平。

[0146] 通过基因扩增来筛选重组细胞通常需要 6 个月到 1 年。由于培养条件和扩增刺激试剂浓度带来的很大可变性, 用原始克隆的扩增前表达水平来与所述表达载体的初始效率相比较被认为是合适的。这显示出本发明的表达载体的效率非常高。该结果证实了本发明的载体产生非常少的 G418 抗性株的同时, 还使能够以非常高的效率生产高水平的目的蛋白的细胞株的确立成为可能。这也证明本发明的表达载体实现了高水平的蛋白质表达。

[0147] [表 2]

[0148]



[0149] [实施例 6] pZC1、pZC2、pZC5 和 pZC7 的构建

[0150] 使用本领域技术人员公知的方法构建本发明的载体 pZC1、pZC2、pZC5 和 pZC7。pZC1 在骨架载体 pNC1 的序列中的核苷酸 No. 1784 到 No. 2578 之间具有描述为 SEQ ID NO :

7 的野生型吉欧霉素抗性基因 (Sh ble 基因) 的 cDNA (图 11)。pZC2 通过将 pNC1 的序列中的核苷酸 No. 1784 到 No. 2578 替换为 SEQ ID NO :8 的序列而构建。pZC2 的替换区域引入了翻译弱化的吉欧霉素抗性基因, 所述基因中吉欧霉素抗性基因的核苷酸序列的密码子被改变为哺乳动物中最不常用的密码子 (图 12)。

[0151] pZC5 通过将 pNC1 的序列中的核苷酸 No. 1784 到 No. 2578 替换为 SEQ ID NO :9 的序列而构建。pZC5 的替换区域引入了翻译弱化的吉欧霉素抗性基因, 所述基因中吉欧霉素抗性基因的核苷酸序列从 5' 端起 90 个碱基范围的密码子 (24.0% 的密码子改变率) 被改变为哺乳动物中最不常用的密码子 (图 13)。

[0152] pZC7 通过将 pNC1 的序列中的核苷酸 No. 1784 到 No. 2578 替换为 SEQ ID NO :10 的序列而构建。pZC7 的替换区域引入了翻译弱化的吉欧霉素抗性基因, 所述基因中吉欧霉素抗性基因的核苷酸序列从 5' 端起 180 个碱基范围的密码子 (48.0% 的密码子改变率) 被改变为哺乳动物中最不常用的密码子 (图 14)。

[0153] [实施例 7] pZC1/hMBL、pZC2/hMBL、pZC5/hMBL 和 pZC7/hMBL 的构建

[0154] 使用本领域技术人员公知的方法, 将本发明的载体 pZC1、pZC2、pZC5 和 pZC7 的核苷酸 No. 1267 到 No. 1275 用 SEQ ID NO :6 的编码人甘露聚糖结合凝集素 (MBL) 的 cDNA (在下文中称为 hMBL) 来替换, 从而构建 pZC1/hMBL (图 15)、pZC2/hMBL (图 16)、pZC5/hMBL (图 17) 和 pZC7/hMBL (图 18)。

[0155] [实施例 8] 用 pZC1/hMBL、pZC2/hMBL、pZC5/hMBL 和 pZC7/hMBL 转染 CHO 细胞, 用 CD 培养基或添加了非动物基添加剂的 CD 培养基进行吉欧霉素选择

[0156] 在 25cm² 培养瓶中用脂质体方法 (使用 Lipofectamine™ LTX; Invitrogen) 用 10 μg 的 pZC1/hMBL、pZC2/hMBL、pZC5/hMBL 和 pZC7/hMBL 转染 5.0x 10⁵ CHO 细胞 (CHO DG44 细胞)。基因转染根据生产商的说明书来进行。基因转染 48 小时之后, 进行细胞计数, 然后细胞在添加了 4mM 的 Gluta MAX™-I (Invitrogen) 和 200 μg/mL 吉欧霉素 (Invitrogen) 的 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本) 中稀释。细胞平铺于 5 个 96 孔微滴定板中 (480 孔), 每个浓度为 4000 细胞 / 孔, 在 5% 二氧化碳气体存在下 37°C 培养大约 3 周之后, 观察到存活细胞 (吉欧霉素抗性克隆)。从存活细胞中任意选择吉欧霉素抗性克隆, 与该添加了 4mM 的 Gluta MAX™-I (Invitrogen) 和 200 μg/mL 吉欧霉素 (Invitrogen) 的 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本) 一起转移到 24 孔板中, 培养直到细胞填满各个孔 1/3 或更多。将 0.4mL 的每个克隆放置入无菌试管并以 200x g 离心 2 分钟。弃上清液, 细胞悬浮于 0.1mL 新鲜培养基 (添加了 4mM 的 Gluta MAX™-I (Invitrogen) 的 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本))。计数细胞之后, 细胞用培养基稀释至 5.0x 10⁵ 细胞 / mL, 然后其 0.2mL 转移至新的 24 孔板, 在 5% 二氧化碳气体存在下以 37°C 培养细胞 72 小时。然后, 细胞以 9300x g 离心 2 分钟, 收集上清液。之后, 测定培养上清液中 MBL 的生产水平。

[0157] [实施例 9] pZC1/hMBL、pZC5/hMBL 和 pZC7/hMBL 转染的克隆的 MBL 生产水平的测定

[0158] 生产水平通过 ELISA 来测定。96 孔板 (F96 MAXI SORP Nunc-Immunoplate, Cat. no. 442404, Nunc) 用由包被缓冲液 (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, 0.05% NaN₃, pH 9.6) 稀释的 1 μg/mL 的抗人 MBL 抗体 (获赠于日本旭川医科大学的大谷博士) 在 4°C 下包被 16 小时。用 4% 的 Block Ace (大日本住友制药株式会社) 封闭之后, 72 小时培养上清液 (1/1000 到

1/100000 稀释)、在 CHO 细胞的无血清培养基 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本) 中的两倍稀释系列 (0.3125 到 20ng/mL) 的纯化的人 MBL (获赠于日本旭川医科大学的大谷博士) 或 IS CHO 与水解液培养基 (IS 日本), 以 100 μ L/ 孔置于平板中, 将所述平板在 37°C 下孵育 1 小时。此后进一步以 0.1 μ g/mL 的生物素化的人 MBL 单克隆抗体 (获赠于日本旭川医科大学的大谷博士) 在 37°C 下孵育 1 小时。已经在 37°C 下孵育 30 分钟的 VECTASTAIN Elite ABC Kit STANDARD (2 滴试剂 A, 2 滴试剂 B/5mL, Vector) 以 100 μ L/ 孔添加, 然后在 37°C 下反应 45 分钟。已经在室温下孵育 30 分钟的 PEROXIDASE SUBSTRATE KIT TMB (2 滴缓冲液, 3 滴 TMB, 2 滴过氧化氢 /5mL, Vector) 进一步以 100 μ L/ 孔加入, 在其于室温下反应 15 分钟之后, 以 100 μ L/ 孔加入 1M 磷酸以终止反应。用酶标仪 (Model 680, BioRad 制造) 测定蛋白质浓度。表 3 中显示了由 ELISA 方法获得的结果, 以及显示出人 MBL 高生产水平的最高的五个样品。具有改变的密码子载体的克隆显示出与未改变密码子的载体相当的生产力。

[0159] [表 3]

[0160] 吉欧霉素抗性克隆中 hMBL 的生产

[0161]

克隆名称	产量 (μ g/ml)
pZC1-23	11.7
pZC1-26	8.8
pZC1-27	14.3
pZC1-30	15.1
pZC1-46	12.4
pZC5-1	12.2
pZC5-3	7.7
pZC5-12	7.0
pZC5-39	8.3
pZC5-44	8.2
pZC7-4	7.9
pZC7-5	9.1
pZC7-6	8.5
pZC7-9	10.1
pZC7-38	8.8

[0162] [实施例 10] pZC1/hMBL、pNC5/hMBL 和 pNC7/hMBL 转染的细胞克隆的 hMBL 生产水平

[0163] 表 4 显示了每个克隆中本发明的 pZC1、pZC5 和 pZC7 表达载体表达的 hMBL 的分布。

[0164] 对于 pZC1, 在 50 个吉欧霉素抗性株中, 70.0% 生产的 hMBL 为 0 μ g/mL 或更高但低于 5 μ g/mL。在 50 株中有 15 株 (30.0%) 显示出 5 μ g/mL 或更高的生产水平。50 株中的 4 株 (8.0%) 显示出 10 μ g/mL 或更高的生产水平。50 株中的 1 株 (2.0%) 显示出 15 μ g/mL 或更高的生产水平。显示出最高的生产水平的株在 3 天时间里生产了 15.1 μ g/mL。

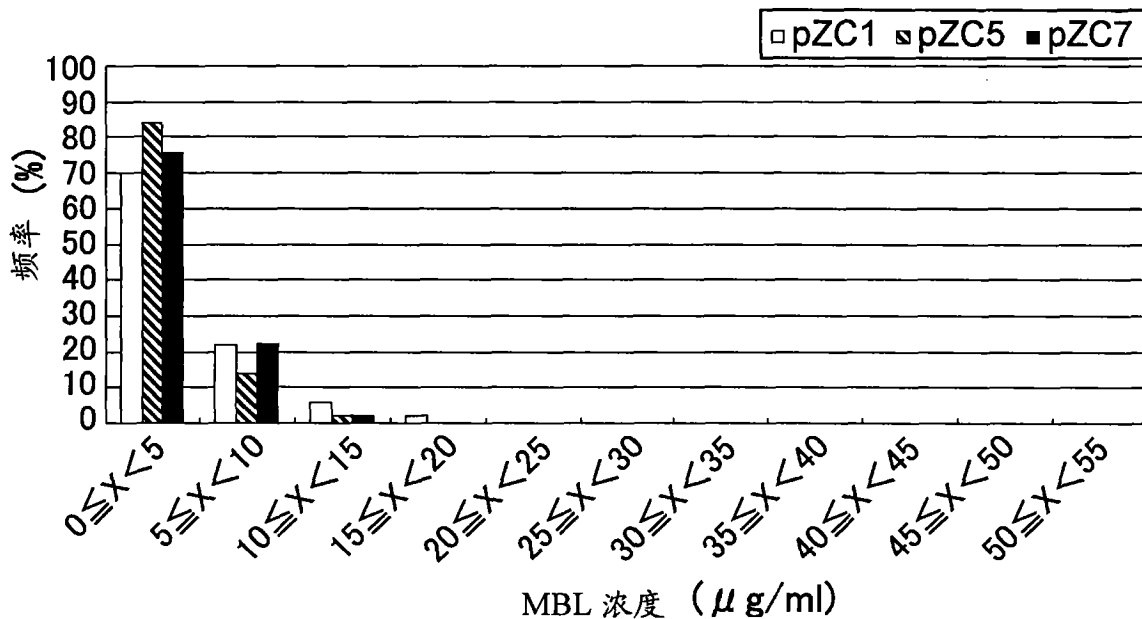
[0165] 对于 pZC5, 在 50 个吉欧霉素抗性株中, 84.0% 生产的 hMBL 为 $0 \mu\text{g/mL}$ 或更高但低于 $5 \mu\text{g/mL}$ 。在 50 株中有 8 株 (16.0%) 显示出 $5 \mu\text{g/mL}$ 或更高的生产水平。50 株中的 1 株 (2.0%) 显示出 $10 \mu\text{g/mL}$ 或更高的生产水平。显示出最高的生产水平的株在 3 天时间里生产了 $12.2 \mu\text{g/mL}$ 。

[0166] 对于 pZC7, 在 49 个吉欧霉素抗性株中, 75.5% 生产的 hMBL 为 $0 \mu\text{g/mL}$ 或更高但低于 $5 \mu\text{g/mL}$ 。在 49 株中有 12 株 (24.5%) 显示出 $5 \mu\text{g/mL}$ 或更高的生产水平。49 株中的 1 株 (2.0%) 显示出 $10 \mu\text{g/mL}$ 或更高的生产水平。显示出最高的生产水平的株在 3 天时间里生产了 $10.1 \mu\text{g/mL}$ 。

[0167] 在 pZC 中, 显示出最高的外源蛋白生产水平的克隆的生产水平为 3 天内 $15.1 \mu\text{g/mL}$; 而在 pNC 中, 显示出最高的外源蛋白生产水平的克隆的生产水平为 3 天内 $46.1 \mu\text{g/mL}$ 。这显示出通过将作为构成部位而包含的药物抗性基因的密码子改变为最不常用的密码子, pNC 的外源蛋白生产能力显著增加。对于 pZC, 药物抗性基因的密码子改变区域可以从 C 末端或序列的中间区域开始。或者, 可以设想间隔地排列将被改变的密码子和不被改变的密码子, 如此等等。不管怎样, 通过调整将被改变的密码子, 药物选择效率增加了, 这种载体被认为是插入到了具有非常高表达能力的感受态细胞染色体的一个位置, 就如 pNC 的情况那样。

[0168] [表 4]

[0169]



[0170] [实施例 11] pBC1 和 pBC6 的构建

[0171] 使用本领域技术人员公知的方法构建本发明的载体 pBC1 和 pBC6。pBC1 在骨架载体 pNC1 的序列中核苷酸 No. 1784 到 No. 2578 之间具有描述为 SEQ ID NO:11 的野生型杀稻瘟菌素抗性基因 (bsd 基因) 的 cDNA (图 19)。

[0172] pBC6 通过将 pNC1 的序列中的核苷酸 No. 1784 到 No. 2578 替换为 SEQ ID NO:12 的序列而构建。pBC7 的替换区域引入了翻译弱化的杀稻瘟菌素抗性基因, 所述基因中杀稻瘟菌素抗性基因的核苷酸序列自 5' 端起 120 个碱基范围的密码子 (30.1% 的密码子改变率) 被改变为哺乳动物中最不常用的密码子 (图 20)。

[0173] [实施例 12] pBC1/hMBL 和 pBC6/hMBL 的构建

[0174] 使用本领域技术人员公知的方法, 将本发明的载体 pBC1 和 pBC6 的核苷酸 No. 1267 到 No. 1275 用 SEQ ID NO:6 的编码人甘露聚糖结合凝集素 (MBL) 的 cDNA (在下文中称为 hMBL) 来替换, 从而构建 pBC1/hMBL (图 21) 和 pBC6/hMBL (图 22)。

[0175] [实施例 13] 用 pBC1/hMBL 和 pBC6/hMBL 转染 CHO 细胞, 用 CD 培养基或添加了非动物基添加剂的 CD 培养基进行杀稻瘟菌素筛选

[0176] 在 25cm²培养瓶中用脂质体方法 (使用 Lipofectamine™ LTX; Invitrogen) 用 10 μg 的 pBC1/hMBL 和 pBC6/hMBL 转染 5.0x 10⁵ CHO 细胞 (CHO DG44 细胞)。基因转染根据生产商的说明书来进行。基因转染 48 小时之后, 进行细胞计数, 然后细胞在添加了 4mM 的 Gluta MAX™-I (Invitrogen) 和 10 μg/mL 杀稻瘟菌素 (Invitrogen) 的 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本) 中稀释。细胞平铺于 5 个 96 孔微滴定板中 (480 孔), 每个浓度为 4000 细胞/孔, 在 5% 二氧化碳气体存在下 37°C 培养大约 3 周之后, 观察到存活细胞 (杀稻瘟菌素抗性克隆)。从存活细胞中任意选择杀稻瘟菌素抗性克隆, 与该添加了 4mM 的 Gluta MAX™-I (Invitrogen) 和 10 μg/mL 杀稻瘟菌素 (Invitrogen) 的 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本) 一起转移到 24 孔板中, 培养直到细胞填满各个孔的 1/3 或更多。0.4mL 的每个克隆放置入无菌试管并以 200x g 离心 2 分钟。弃上清液, 细胞悬浮于 0.1mL 新鲜培养基 (添加了 4mM 的 Gluta MAX™-I (Invitrogen) 的 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本))。计数细胞之后, 细胞用培养基稀释至 5.0x 10⁵ 细胞/mL, 然后其 0.2mL 转移至新的 24 孔板, 在 5% 二氧化碳气体存在下以 37°C 培养细胞 72 小时。然后, 细胞以 9300x g 离心 2 分钟, 收集上清液。之后, 测定培养上清液中 MBL 的生产水平。

[0177] [实施例 14] pBC1/hMBL 和 pBC6/hMBL 转染的克隆的 MBL 生产水平的测定

[0178] 生产水平通过 ELISA 来测定。96 孔板 (F96MAXI SORP Nunc-Immunoplate, Cat. no. 442404, Nunc) 用由包被缓冲液 (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, 0.05% NaN₃, pH 9.6) 稀释的 1 μg/mL 的抗人 MBL 抗体 (获赠于日本旭川医科大学的大谷博士) 在 4°C 下包被 16 小时。用 4% 的 Block Ace (大日本住友制药株式会社) 封闭之后, 72 小时培养上清液 (1/1000 到 1/100000 稀释)、在 CHO 细胞的无血清培养基 IS CHO-CD w/ 水解液培养基 (IS 日本) 中的两倍稀释系列 (0.3125 到 20ng/mL) 的纯化的人 MBL (获赠于日本旭川医科大学的大谷博士) 或 IS CHO 与水解液培养基 (IS 日本), 以 100 μL/孔置于平板中, 将所述平板在 37°C 下孵育 1 小时。此后进一步以 0.1 μg/mL 的生物素化的人 MBL 单克隆抗体 (获赠于日本旭川医科大学的大谷博士) 在 37°C 下孵育 1 小时。已经在 37°C 下孵育 30 分钟的 VECTASTAIN Elite ABC Kit STANDARD (2 滴试剂 A, 2 滴试剂 B/5mL, Vector) 以 100 μL/孔添加, 然后在 37°C 下反应 45 分钟。已经在室温下孵育 30 分钟的 PEROXIDASE SUBSTRATE KIT TMB (2 滴缓冲液, 3 滴 TMB, 2 滴过氧化氢/5mL, Vector) 进一步以 100 μL/孔加入, 在其于室温下反应 15 分钟之后, 以 100 μL/孔加入 1M 磷酸以终止反应。用酶标仪 (Model 680, BioRad 制造) 测定蛋白质浓度。表 5 中显示了由 ELISA 方法获得的结果, 以及显示出人 MBL 高生产水平的最高的五个样品。具有改变的密码子载体的克隆显示出与未改变密码子的载体相当的生产力。

[0179] [表 5]

[0180] 杀稻瘟菌素抗性克隆中 hMBL 的生产

[0181]

克隆名称	产量 ($\mu\text{g/ml}$)
pBC1-6	6.2
pBC1-19	11.2
pBC1-22	9.2
pBC1-35	7.5
pBC1-48	5.7
pBC6-13	7.9
pBC6-19	9.1
pBC6-25	11.5
pBC6-32	8.5
pBC6-45	12.5

[0182] [实施例 15] 用 pBC1/hMBL 和 pBC6/hMBL 转染的细胞克隆的 hMBL 生产水平

[0183] 表 6 显示了每个克隆中本发明的 pBC1 和 pBC6 表达载体表达的 hMBL 的分布。

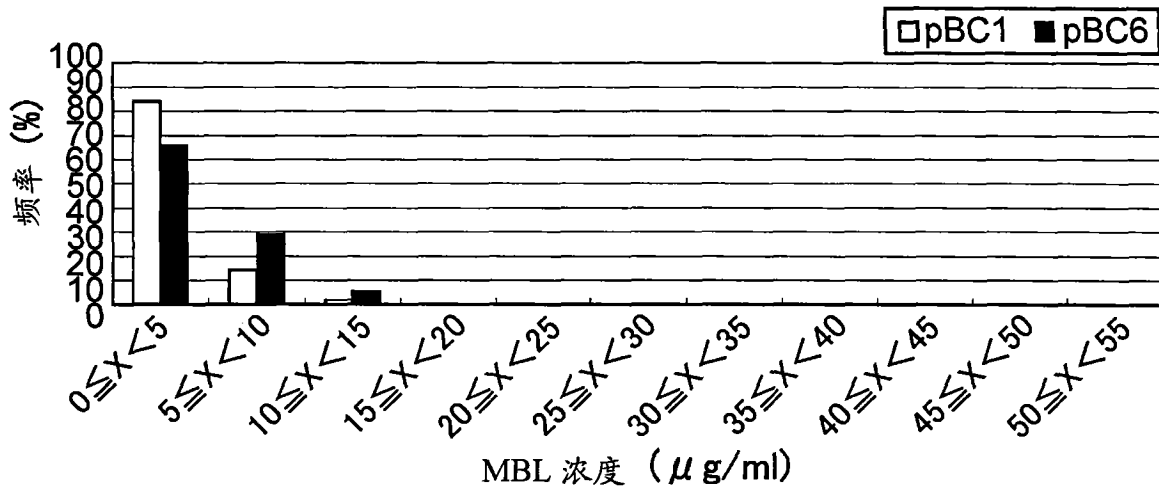
[0184] 对于 pBC1, 在 56 个杀稻瘟菌素抗性株中, 83.9% 生产的 hMBL 为 $0\ \mu\text{g/ml}$ 或更高但低于 $5\ \mu\text{g/ml}$ 。在 56 株中有 9 株 (26.1%) 显示出 $5\ \mu\text{g/ml}$ 或更高的生产水平。56 株中的 1 株 (1.8%) 显示出 $10\ \mu\text{g/ml}$ 或更高的生产水平。显示出最高的生产水平的株在 3 天时间里生产了 $11.2\ \mu\text{g/ml}$ 。

[0185] 对于 pBC6, 在 59 个杀稻瘟菌素抗性株中, 66.1% 生产的 hMBL 为 $0\ \mu\text{g/ml}$ 或更高但低于 $5\ \mu\text{g/ml}$ 。在 59 株中有 20 株 (33.9%) 显示出 $5\ \mu\text{g/ml}$ 或更高的生产水平。59 株中的 3 株 (5.1%) 显示出 $10\ \mu\text{g/ml}$ 或更高的生产水平。显示出最高的生产水平的株在 3 天时间里生产了 $12.5\ \mu\text{g/ml}$ 。

[0186] 在 pBC 中, 显示出最高的外源蛋白生产水平的克隆的生产水平为 3 天内 $12.5\ \mu\text{g/ml}$; 而在 pNC 中, 显示出最高的外源蛋白生产水平的克隆的生产水平为 3 天内 $46.1\ \mu\text{g/ml}$ 。这显示出通过将作为构成部位而包含的药物抗性基因的密码子改变为最不常用的密码子, pNC 的外源蛋白生产能力显著增加。对于 pBC, 药物抗性基因的密码子改变区域可以从 C 末端或序列的中间区域开始。或者, 可以设想间隔地排列将被改变的密码子和不被改变的密码子, 如此等等。不管怎样, 通过调整将被改变的密码子, 药物选择效率增加了, 这种载体被认为是插入到了具有非常高表达能力的感受态细胞的染色体的一个位置, 就像 pNC 的情况那样。

[0187] [表 6]

[0188]



[0189] 工业实用性

[0190] 本发明提供了能够使用哺乳动物细胞作为宿主以高水平生产源自外源基因的蛋白质的表达载体。此外，它们能够生产具有哺乳动物原有的翻译后修饰和高生物活性的蛋白质。因此，有用蛋白质物质例如生物制药的生产成本得到显著的降低。

[0191] 此外，由于根据本发明的生产蛋白质的方法不使用病毒或者微生物，因此高安全性的蛋白质生产成为可能。

[0001]

序列表

<110> 国立大学法人北海道大学
扶桑药品工业株式会社

<120> 用于用动物细胞大量生产源自外源基因的蛋白质的表达载体及其应用

<130> F2-A0801P

<150> JP 2008-046782
<151> 2008-02-27

<160> 12

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 6078
<212> DNA
<213> 人工合成

<220>
<223> 人工合成的载体序列

<400> 1
cgaigtacgg gccagatata cgogttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc 60
aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt 120
aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta 180
tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg 240
gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc ccctattga 300
cgtcaatgac ggtaaatggc cgcctggca ttatgcccag tacatgacct tatgggactt 360
tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg 420
gcagtacatc aatgggctg gatagcggtt tgactcacgg ggatttcaa gtctccacc 480
cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg 540
taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatat 600
aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgttaac tggcttatcg aaattgtcga 660
ggagaacttc agggtagatt tggggaccct tgattgttct ttctttttcg ctattgtaaa 720
attcatgtta tatggagggg gcaaagtttt cagggtgttg tttagaatgg gaagatgtcc 780

[0002]

ctgtatcac catggaccct catgataatt ttgtttcttt cactttctac tctgttgaca	840
accattgtct cctcttattt tcttttcatt ttctgtaact ttttcgtaa actttagctt	900
gcatttgtaa cgaattttta aattcacitt tgtttatttg tcagattgta agtactttct	960
ctaatacctt tttttcaag gcaatcaggg tatattatat tgtacttcag cacagtttta	1020
gagaacaatt gttataatta aatgataagg tagaatattt ctgcatataa attctggctg	1080
gcgtggaaat attcttattg gtagaaaca ctacatcctg gtcatcatcc tgcctttctc	1140
tttatggtta caatgatata cactgtttga gatgaggata aaatactctg agtccaaacc	1200
gggcccctct gctaaccatg ttcatgcctt ctctttttc ctacagctcc tgggcaacgt	1260
gctggcggcc gccttctaga gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt	1320
gcccccccc cgtgccctcc ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttccaat	1380
aaaatgagga aatgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtggg	1440
tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggaggatc	1500
tccgcgggtg ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc ccagcaggc	1560
agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg	1620
cccatccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc cgcccatgg ctgactaatt	1680
tttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tccgctctg agctattcca gaagtagtga	1740
ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc aaaaaagctg cagatgattg aacaagatgg	1800
attgcacgca ggttctccg ccgcttgggt ggagaggcta ttccgctatg actgggcaca	1860
acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccgt	1920
tcttttctc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg	1980
gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcccagct gtgctcgacg ttgtcactga	2040
agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca	2100
ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgccggggc tgcatacgt	2160
tgatccggct acctgccc atcgaccacca agcgaacat cgcacgagc gagcacgtac	2220
tccgatggaa gccggctctg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc	2280

[0003]

gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc ggcgatgcc gacggcgagg atctcgtcgt	2340
gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt	2400
catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg	2460
tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggfat	2520
cgccgctccc gattcgcagc gcatcgccct ctatcgccct ctgacgagt tcttctgaga	2580
tccgtgacat aattggacaa actacctaca gagatttaaa gctctaaggt aaatataaaa	2640
ttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg tttgtgtatt ttagattcca	2700
acctatggaa ctgatgaatg ggagcagtgg tggaatgcct ttaatgagga aaacctgttt	2760
tgctcagaag aaatgccatc tagtgatgat gaggctactg ctgactctca acattctact	2820
cctccaaaaa agaagagaaa ggtagaagac cccaaggact ttccttcaga attgctaagt	2880
ttttgagtc atgctgtgtt tagtaataga actcttgctt gctttgctat ttacaccaca	2940
aaggaaaaag ctgcactgct atacaagaaa attatggaaa aatattctgt aacctttata	3000
agtaggcata acagttataa tcataacata ctgttttttc ttactccaca caggcataga	3060
gtgctgcta ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa	3120
ggggttaata aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac	3180
cacatttga gaggttttac ttgctttaaa aaacctocca cacctcccc tgaacctgaa	3240
acataaaatg aatgcaatg ttgttgttaa ctgttttatt gcagcttata atggttacaa	3300
ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt tttcactgc attctagttg	3360
tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg gccatcgat gaattcaacg	3420
tacgtagctt ggcaactggc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta	3480
ccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg	3540
cccgaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgctgatgc	3600
ggatatttct ccttacgat ctgtgcggtt tttcacaccg catatggtgc actctcagta	3660
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg	3720
cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg	3780
ggagctgcat gtgtcagagg ttttaccgt catcaccgaa acgcgcgagg acgaaagggc	3840

[0004]

ctcgtgatac gcctatitit ataggitaa gtcatgataa taatggtttc ttagacgtca	3900
ggtagcactt ttcggggaaa tgtgocgga acccctattt gttatitit ctaaatacat	3960
tcaaatagt atccgctcat gagacaataa cctgataaa tgcttcaata atattgaaa	4020
aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttccctitit tgcggcattt	4080
tgcttccctg ttttgctca ccagaaacg ctggigaaag taaaagatgc tgaagatcag	4140
ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaatat ccttgagagt	4200
tttgcctccg aagaacgtit tccaatgatg agcactitit aagtctctgt atgtggcgcg	4260
gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag	4320
aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcacc ttacggatgg catgacagta	4380
agagaattat gcagtctgc cataacctat agtgataaca ctgcccaca ctactctg	4440
acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gctititgc acaacatggg ggatcatgta	4500
actgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac	4560
accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt	4620
actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca	4680
cttctgcctt cggcccttcc ggctggctgg tttattctg ataaatctgg agccggtgag	4740
cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta	4800
gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag	4860
ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt	4920
tagattgatt taaaacttca ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ctttttgat	4980
aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag tttcgttcc actgagcgtc agaccccgta	5040
gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttitctgc gcgtaatctg ctgcttgcga	5100
acaaaaaac caccgtacc agcgttgggt tgttgccgg atcaagagct accaactctt	5160
ttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagatacaca atactgtcct tctagtgtag	5220
ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatactt cgctctgcta	5280
atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca	5340

[0005]

agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cggggggttc gtgcacacag	5400
cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gcattgagaa	5460
agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaaggc cagggtcgga	5520
acaggagagc gcacgagggg gcttcagggg ggaaacgctt ggtatcttta tagtcctgtc	5580
gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggaggagc	5640
ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt	5700
gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt	5760
gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcagagtc agtgagcgag	5820
gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa	5880
tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgaac cgcaattaat	5940
gtgagttagc tactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg	6000
ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac	6060
gaatttcgta cgaagctt	6078

<210> 2

<211> 795

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 人工合成的核苷酸序列

<400> 2

atgattgaac aagatggitt acatgcaggt tcaccagcag catgggtaga acgattattt	60
ggttatgatt gggcacaaca aactattggt tgttcagatg cagcagtatt tcgattatca	120
gcacaaggtc gaccagtatt atttgtaaaa actgatttat caggtgcatt aatgaatta	180
caagatgaag cagcacgatt atcatggta gcaactactg gtgtaccatg tgcagcagta	240
ttagatgtag taactgaagc aggtcgagat tggttattat taggtgaagt accaggtcaa	300
gatttattat catcacattt agcaccagca gaaaaagtat caattatggc agatgcaatg	360
cgacgattac atacittaga tccagcaact tgtccatttg atcatcaagc aaaacatcga	420
attgaacgag cacgaactcg aatggaagca ggtttagtag atcaagatga tttagatgaa	480

[0006]

gaacatcaag gtttagcacc agcagaatta tttagcagat taaaagcacg aatgccagat 540
 ggtgaagatt tagtagtaac tcatggtgat gcatgtttac caaatattat ggtagaaaat 600
 ggtcgatttt caggttttat tgattgtggt cgattagggt tagcagatcg atatcaagat 660
 attgcattag caactcgaga tattgcagaa gaattagggt gtgaatgggc agatcgattt 720
 ttagtattat atggtattgc agcaccagat tcacaacgaa ttgcatttta tgcattatta 780
 gatgaatttt ttgga 795

<210> 3
 <211> 795
 <212> DNA
 <213> 人工合成

<220>
 <223> 人工合成的核苷酸序列

<400> 3
 atgattgaac aagatggttt acatgcaggt tcaccagcag catgggtaga acgattattt 60
 ggttatgatt gggcacaaca aactattggt tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca 120
 gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg 180
 caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg 240
 ctcgacgttg tactgaagc ggaagggac tggctgctat tgggcaagt gccggggcag 300
 gatctcctgt catctacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg 360
 cggcggtgac atacgcttga tccggctacc tgccattcg accaccaagc gaaacatcgc 420
 atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggicttgtcg atcaggatga tctggacgaa 480
 gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac 540
 ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gccctgcttc cgaatatcat ggtggaaaat 600
 gcccgcittt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac 660
 atagcgttgg ctaccctgga tattgctgaa gagcttggcg gccaatgggc tgaccgcttc 720
 ctctgctttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt 780
 gacgagttct tctga 795

[0007]

<210> 4
 <211> 795
 <212> DNA
 <213> 人工合成

 <220>
 <223> 人工合成的核苷酸序列

 <400> 4
 atgattgaac aagatggttt acatgcaggt tcaccagcag catgggtaga acgattattt 60
 ggttatgatt gggcacaaca aactattggt tgttcagatg cagcagtatt tcgattatca 120
 gcacaaggtc gaccagtatt atttgtaaaa actgatttat cagggtgcatt aatgaatta 180
 caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg 240
 ctcgacgttg tcactgaagc ggggaaggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag 300
 gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg 360
 cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc 420
 atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttctcg atcaggatga tctggacgaa 480
 gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac 540
 ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat 600
 ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac 660
 atagcgttgg ctaccctgta tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc 720
 ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgcga tcgccttcta tcgccttctt 780
 gacgagttct tctga 795

<210> 5
 <211> 795
 <212> DNA
 <213> 人工合成

<220>
 <223> 人工合成的核苷酸序列

<400> 5
 atgattgaac aagatggttt acatgcaggt tcaccagcag catgggtaga acgattattt 60
 ggttatgatt gggcacaaca aactattggt tgttcagatg cagcagtatt tcgattatca 120

[0008]

gcacaaggtc gaccagtatt atttgtaaaa actgatttat caggtgcatt aaatgaatta	180
caagatgaag cagcacgatt atcatggta gcaactactg gtgtacatg tgcagcagta	240
ttagatgtag taactgaagc aggtcgagat tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag	300
gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg	360
cgccggctgc atacgcttga tccggctacc tgccattcg accaccaagc gaaacatgc	420
atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa	480
gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgc	540
ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat	600
ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac	660
atagcgttgg ctaccogtga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatggc tgaccgcttc	720
ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tgcagcgca tcgcttcta tcgcttctt	780
gacgagttct tctga	795

<210> 6

<211> 759

<212> DNA

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 6

ggccgccacc atgagcctgt tccccagcct gcccctgctg ctgctgagca tgggtggccg	60
cagctacagc gagaccgtga cctgcgagga cgcccagaag acctgccccg ccgtgattgc	120
ctgcagcagc cccggcatca acggcttccc cggcaaggac ggcccgacg gcaccaaggg	180
cgagaagggc gagcccggcc agggcctgcg cggcctgag ggcccccccg gcaagctggg	240
ccccccggc aaccccggc ccagcggcag ccccgcccc aagggccaga agggcgaccc	300
cggaagagc cccgacggcg acagcagcct ggccgccagc gagcgcaagg ccctgcagac	360
cgagatggc cgcataaga agtggctgac cttcagcctg ggcaagcagg tgggcaacaa	420
gttcttctg accaacggcg agataatgac cttcgagaag gtgaaggccc tgtgcgtgaa	480
gttcaggcc agcgtggcca cccccgcaa cgccgccgag aacggcgcca ttcagaacct	540
gatcaaggag gaggccttcc tgggcatcac cgacgagaag accgagggcc agttcgtgga	600

[0009]

cctgaccggc aaccgcctga cctacaccaa ctggaacgag ggcgagccca acaacgccgg	660
cagcgacgag gactgcgtgc tgctgctgaa gaacggccag tggaacgacg tgccctgcag	720
caccagccac ctggccgtgt gcgagttccc catctgaat	759
<210> 7	
<211> 375	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> 人工合成的核苷酸序列	
<400> 7	
atggccaagt tgaccagtgc cgttccgggtg ctacaccgcg gcgacgtcgc cggagcggtc	60
gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttcgcgggt	120
gtggtccggg acgacgtgac cctgttcac agcgcgggtcc aggaccaggt ggtgccggac	180
aacaccctgg cctgggtgtg tgtgcgcggc ctggacgagc tgtacgccga gtggtcggag	240
gtcgtgtcca cgaacttccg ggacgcctcc gggccggcca tgaccgagat cggcgagcag	300
ccgtgggggc gggagttcgc cctgcgcgac ccggccggca actgcgtgca cttcgtggcc	360
gaggagcagg actga	375
<210> 8	
<211> 375	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> 人工合成的核苷酸序列	
<400> 8	
atggcaaat taacttcagc agtaccagta ttaactgcac gagatgtagc aggtgcagta	60
gaattttgga ctgatcgatt aggtttttca cgagattttg tagaagatga ttttgcaggt	120
gtagtacgag atgatgtaac tttatttatt tcagcagtac aagatcaagt agtaccagat	180
aatactttag catgggtatg tgtacgaggt ttagatgaat tatatgcaga atggtcagaa	240
gtagtatcaa ctaattttcg agatgcatca ggtccagcaa tgactgaaat tggatgacaa	300

[0010]

ccatggggtc gagaatttgc attaccagat ccagcaggta atttgtaca tttttagca 360
gaagaacaag attga 375

<210> 9
<211> 375
<212> DNA
<213> 人工合成

<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列

<400> 9
atggcaaat taacttcagc agtaccagta ttaactgcac gagatgtagc aggtgcagta 60
gaattttgga ctgatcgatt aggtttttca cgggacttcg tggaggacga cttcgccggt 120
gtggtccggg acgacgtgac cctgttcac agcgcggtcc aggaccaggt ggtgccggac 180
aacaccctgg cctgggtgtg tgtgcgcggc ctggacgagc tgtacgccga gtggtcggag 240
gtcgtgtcca cgaacttccg ggacgcctcc gggccggcca tgaccgagat cggcgagcag 300
ccgtgggggc gggagttcgc cctgcgcgac ccggccggca actgcgtgca cttcgtggcc 360
gaggagcagg actga 375

<210> 10
<211> 375
<212> DNA
<213> 人工合成

<220>
<223> 人工合成的核苷酸序列

<400> 10
atggcaaat taacttcagc agtaccagta ttaactgcac gagatgtagc aggtgcagta 60
gaattttgga ctgatcgatt aggtttttca cgagattttg tagaagatga ttttgcaggt 120
gtagtaccgag atgatgtaac tttatttatt tcagcagtac aagatcaagt agtaccagat 180
aacaccctgg cctgggtgtg tgtgcgcggc ctggacgagc tgtacgccga gtggtcggag 240
gtcgtgtcca cgaacttccg ggacgcctcc gggccggcca tgaccgagat cggcgagcag 300
ccgtgggggc gggagttcgc cctgcgcgac ccggccggca actgcgtgca cttcgtggcc 360
gaggagcagg actga 375

[0011]

<210> 11
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> 人工合成

 <220>
 <223> 人工合成的核苷酸序列

 <400> 11
 atgcctttgt ctcaagaaga atccaccctc attgaaagag caacggctac aatcaacagc 60
 atccccatct ctgaagacta cagcgtcgcc agcgcagctc tctctagcga cggccgcac 120
 ttacttggtg tcaatgtata tcattttact gggggacctt gtgcagaact cgtggtgctg 180
 ggcactgctg ctgctgcccc agctggcaac ctgacttgta tcgtcgcgat cggaaatgag 240
 aacaggggca tcttgagccc ctgcccagcg tgtcgacagg tgcttctcga tctgcatcct 300
 gggatcaaag cgatagttaa ggacagtgat ggacagccga cggcagttgg gattcgtgaa 360
 ttgctgccct ctggttatgt gtgggagggc taa 393

<210> 12
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> 人工合成

 <220>
 <223> 人工合成的核苷酸序列

 <400> 12
 atggcaaaac cattatcaca agaagaatca actttaattg aacgagcaac tgcaactatt 60
 aattcaattc caatttcaga agattattca gtagcatcag cagcattatc atcagatggt 120
 cgcacttca ctggtgtcaa tgtatatcat ttactgggg gacctgtgc agaactcgtg 180
 gtgctgggca ctgctgctgc tgcggcagct ggcaacctga cttgtatcgt cgcgatcgga 240
 aatgagaaca ggggcatctt gagcccctgc ggacggtgcc gacaggtgct tctcgatctg 300
 catcctggga tcaaagccat agtgaaggac agtgatggac agccgacggc agttgggatt 360
 cgtgaattgc tgcctctggt ttatgtgtgg gagggctaa 399

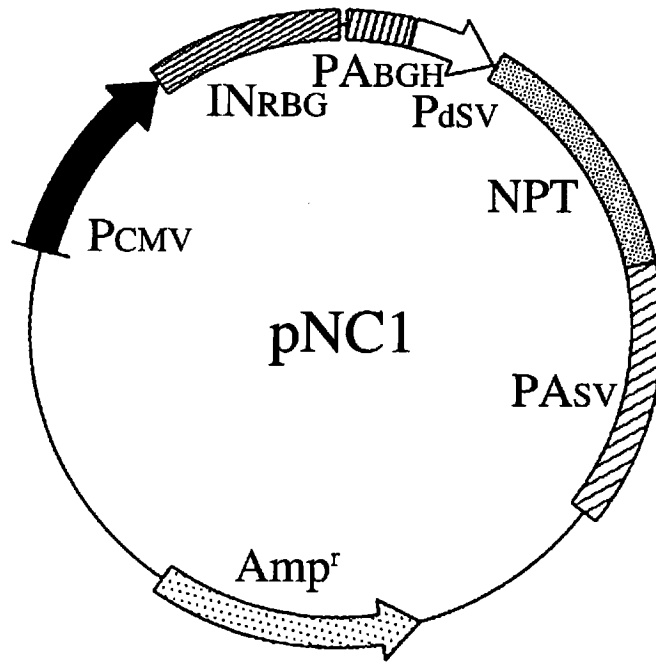


图 1

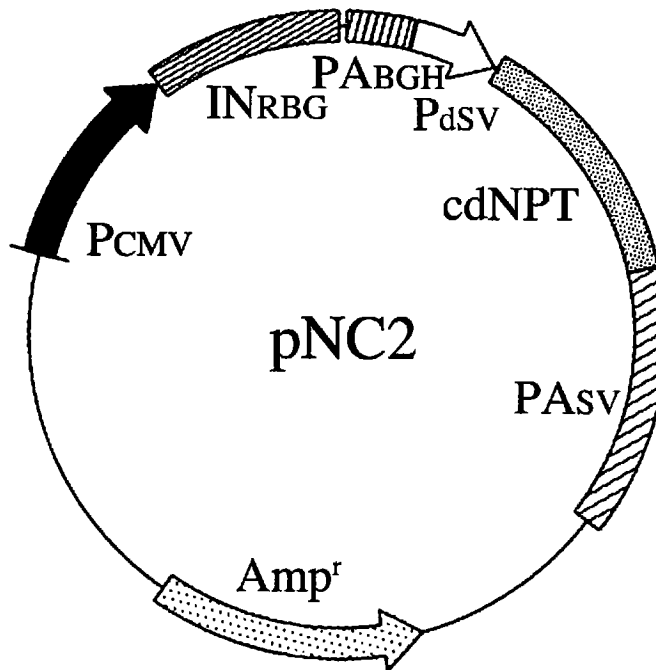


图 2

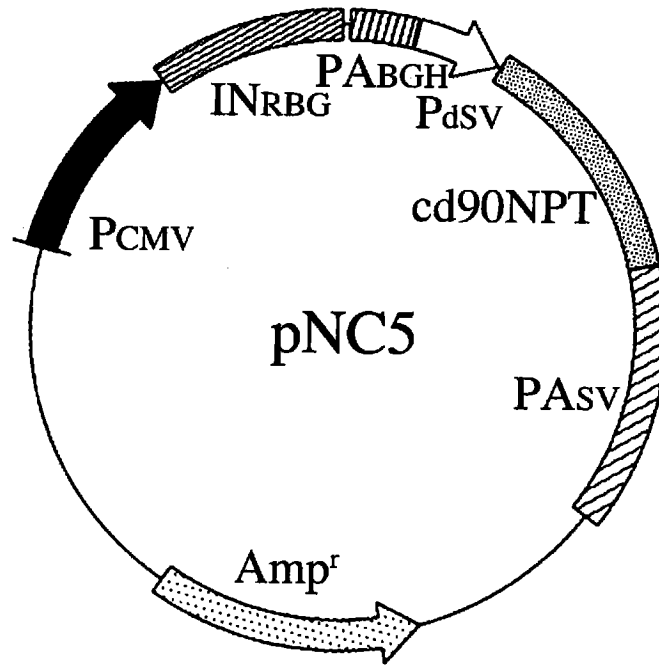


图 3

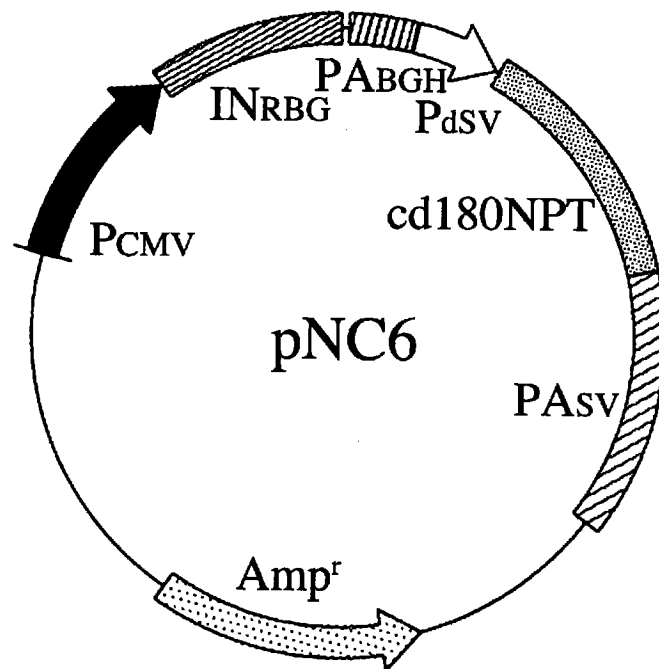


图 4

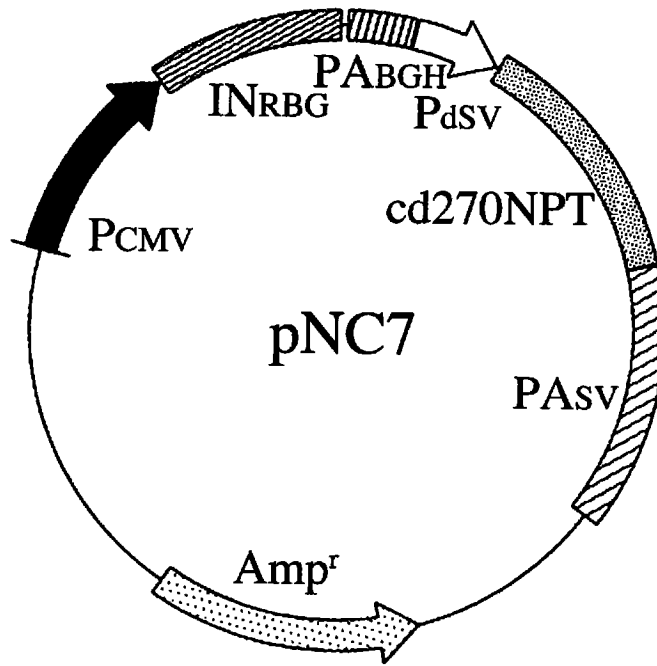


图 5

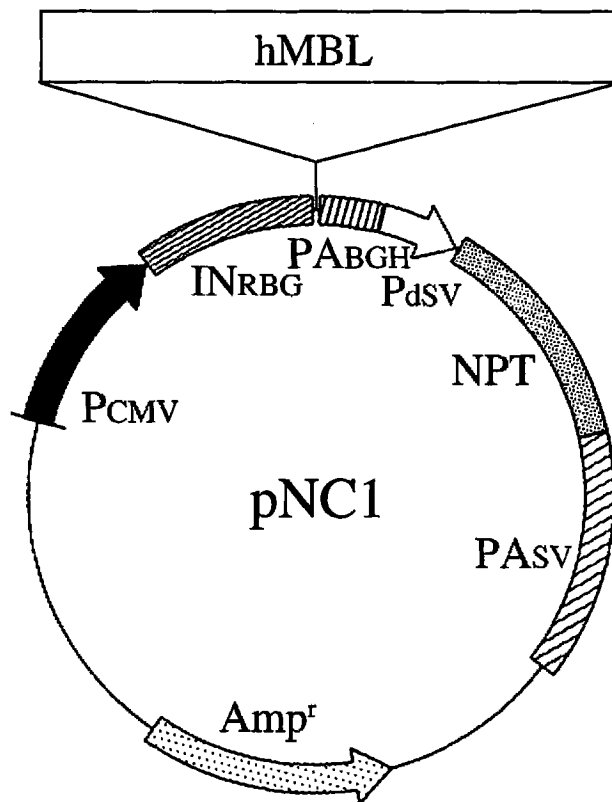


图 6

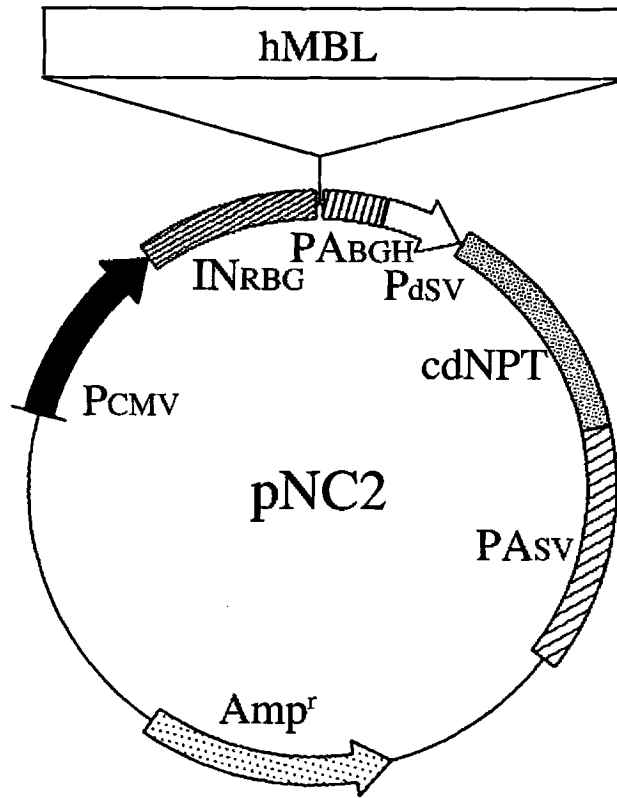


图 7

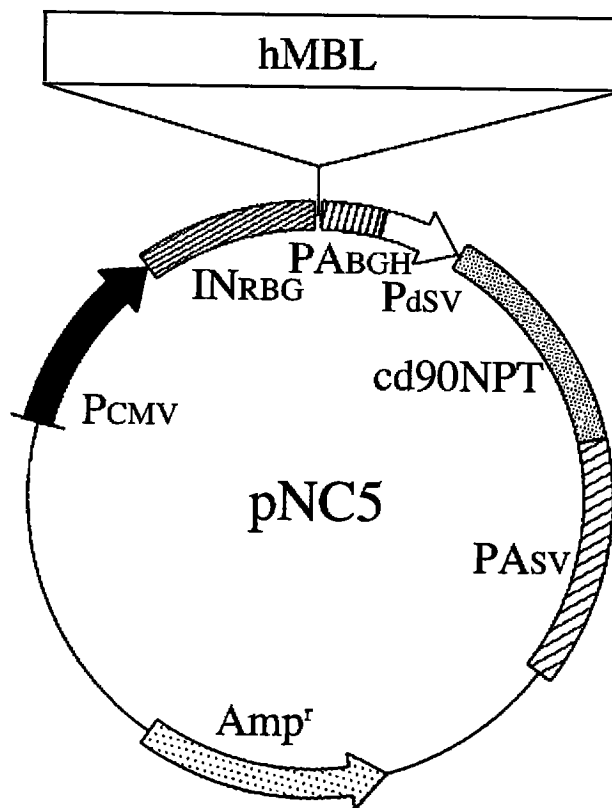


图 8

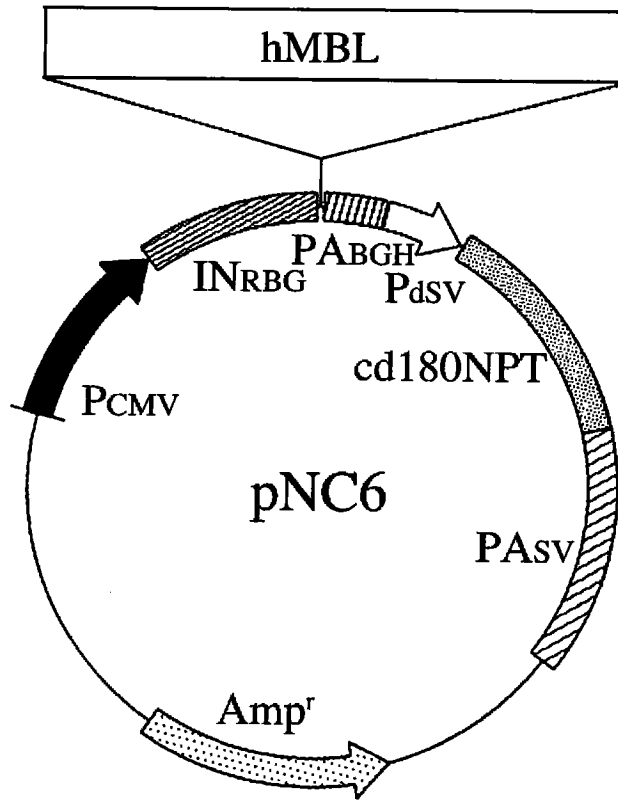


图 9

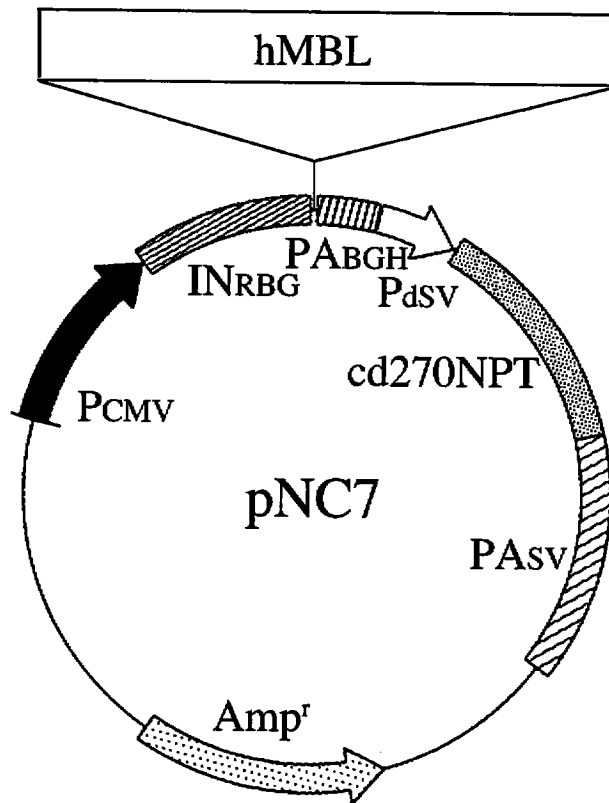


图 10

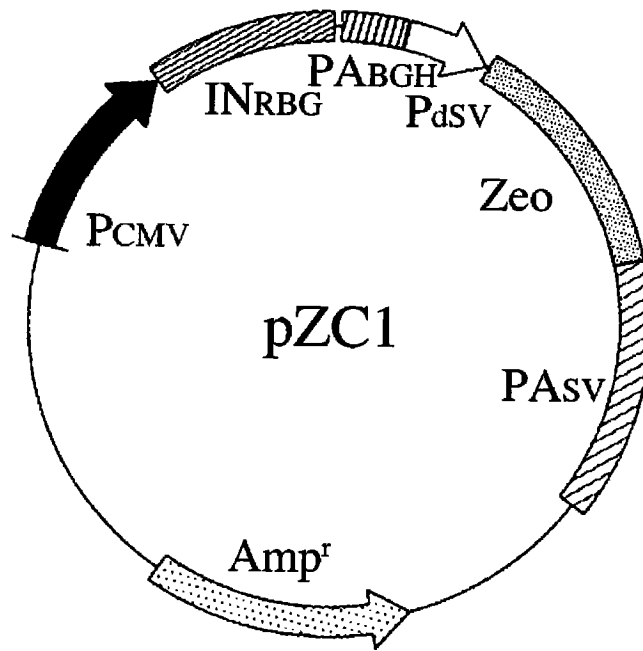


图 11

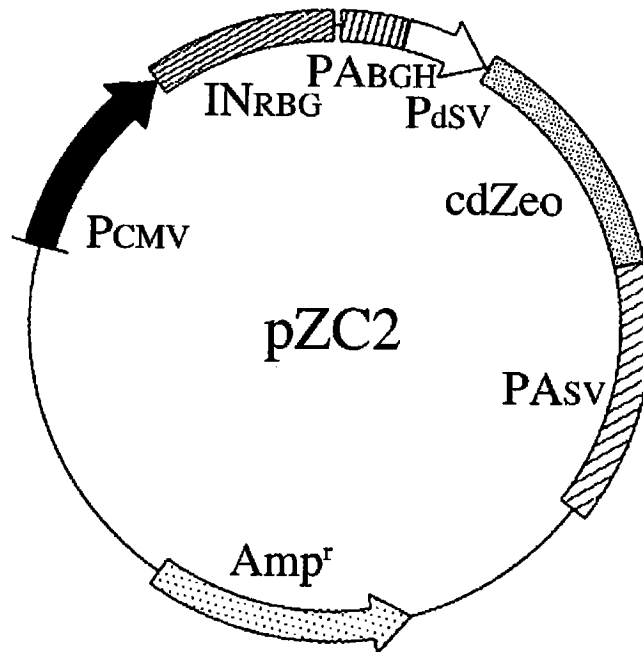


图 12

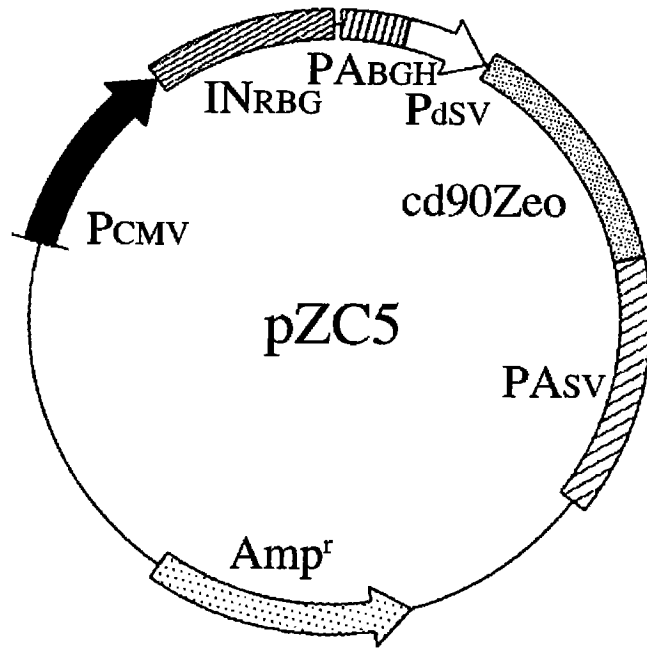


图 13

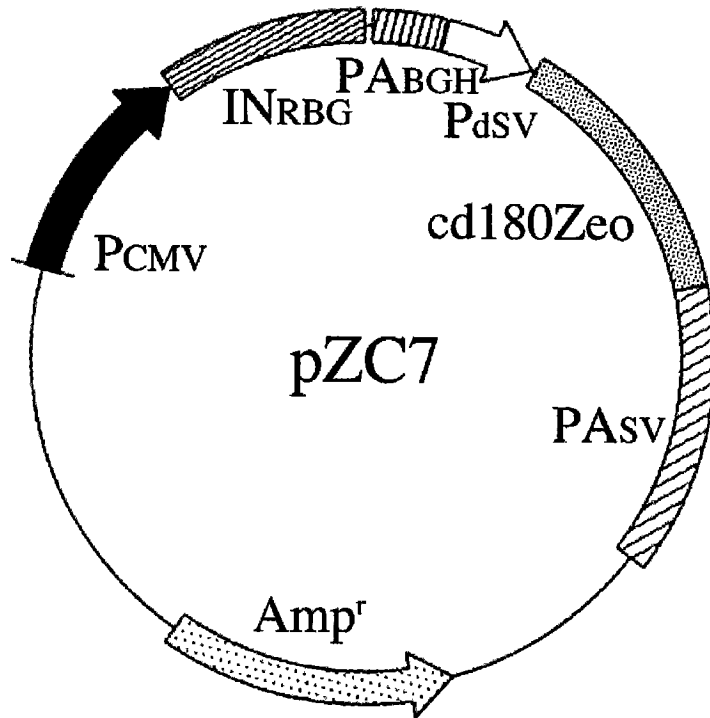


图 14

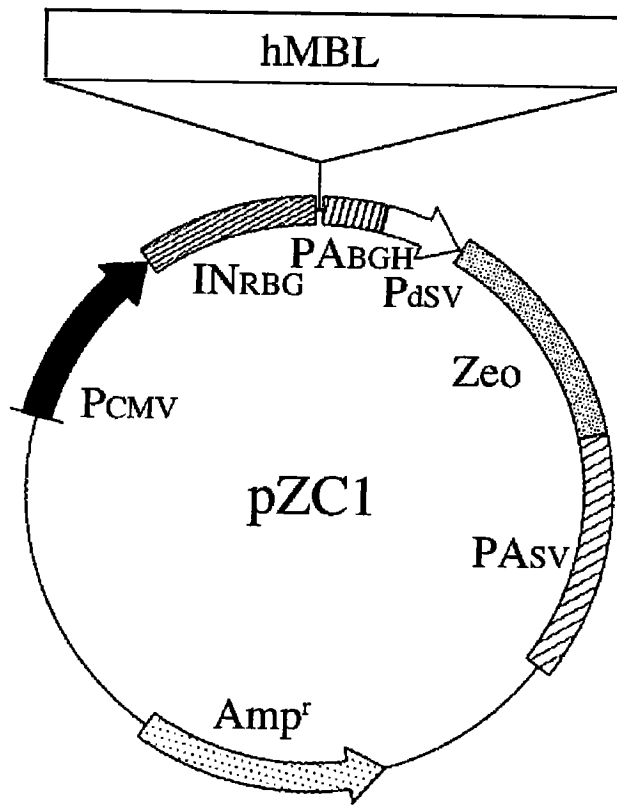


图 15

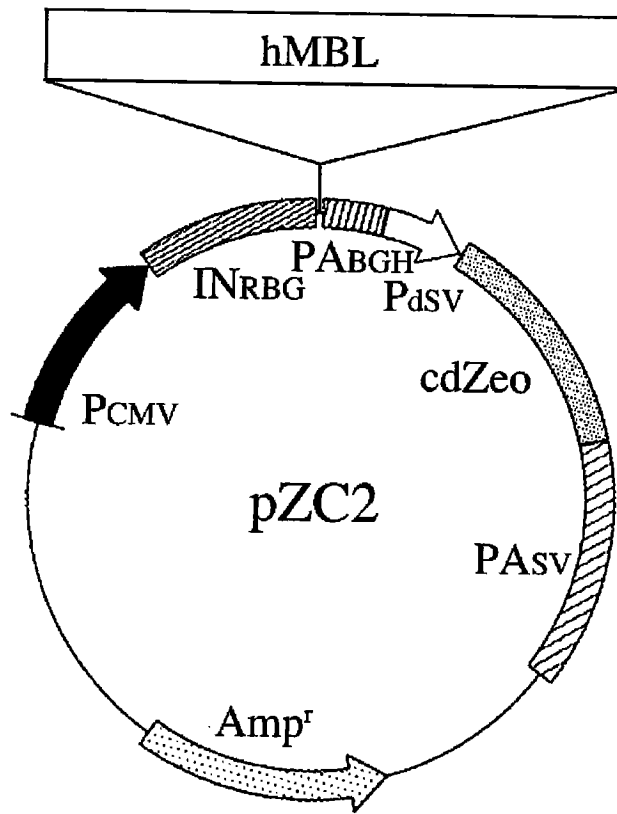


图 16

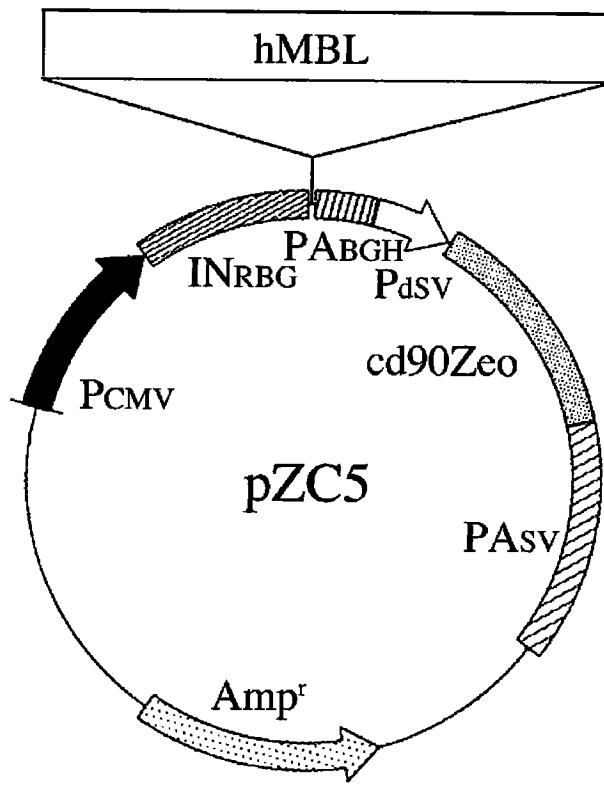


图 17

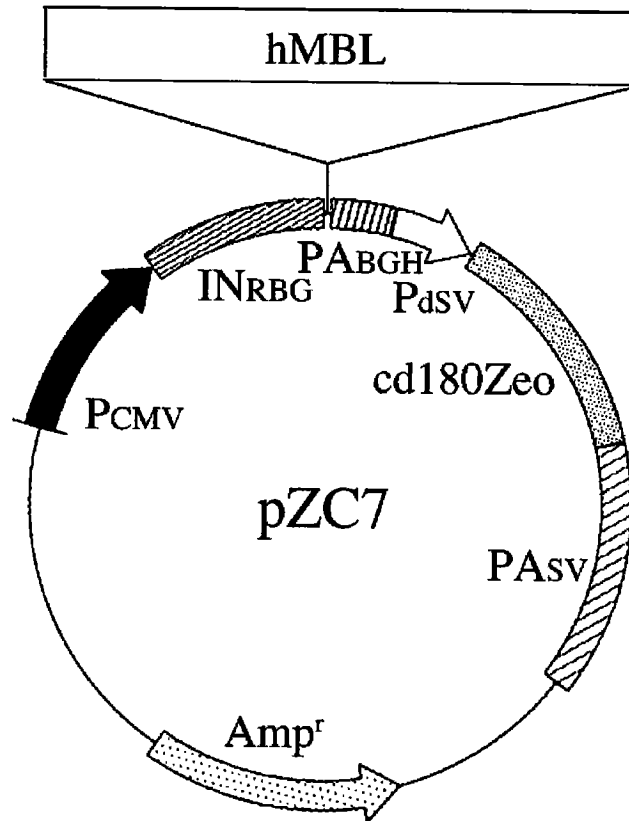


图 18

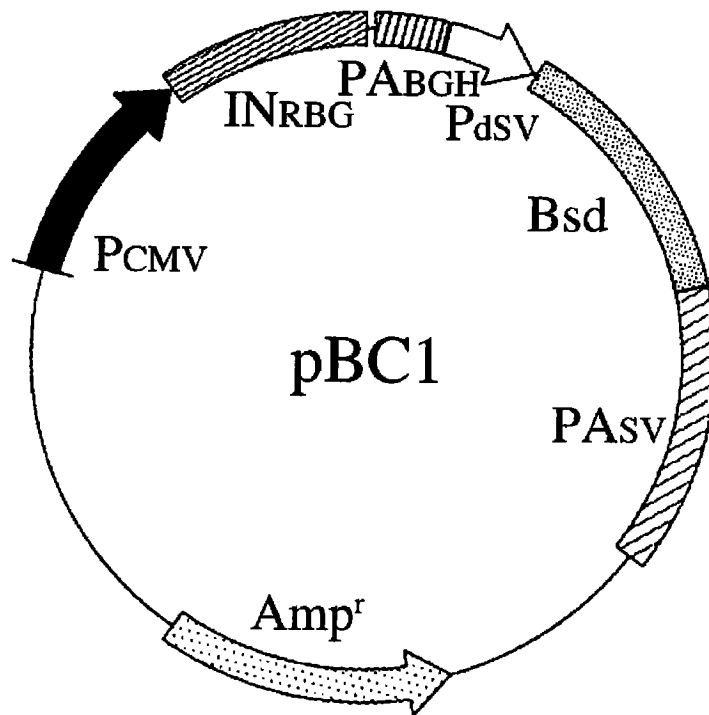


图 19

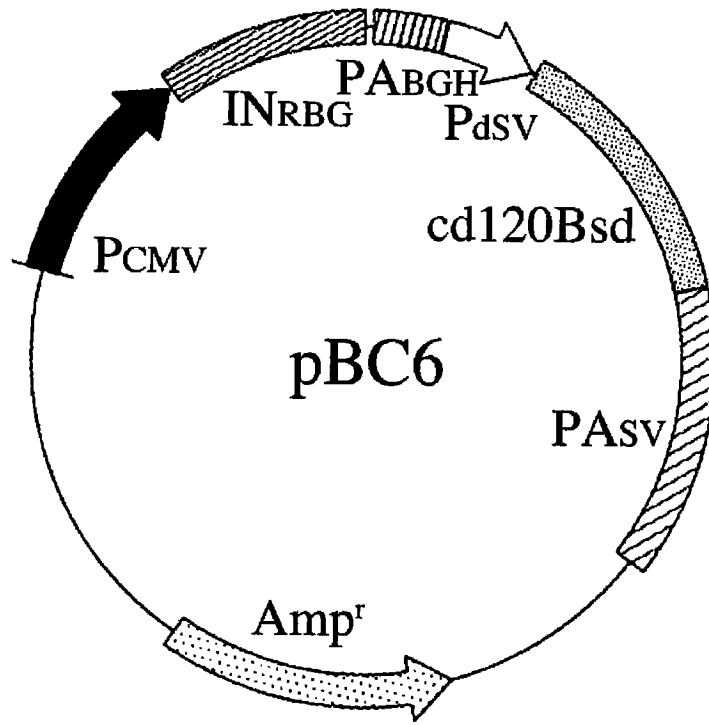


图 20

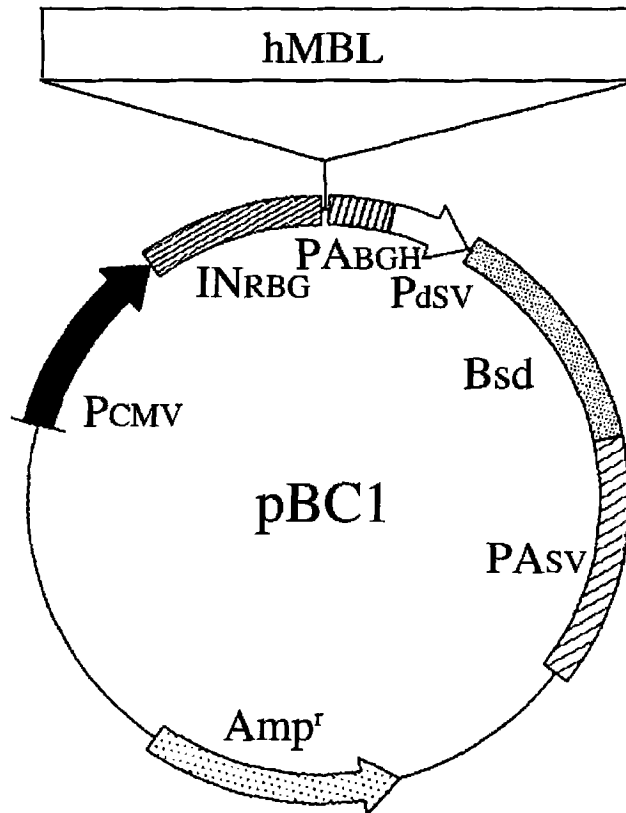


图 21

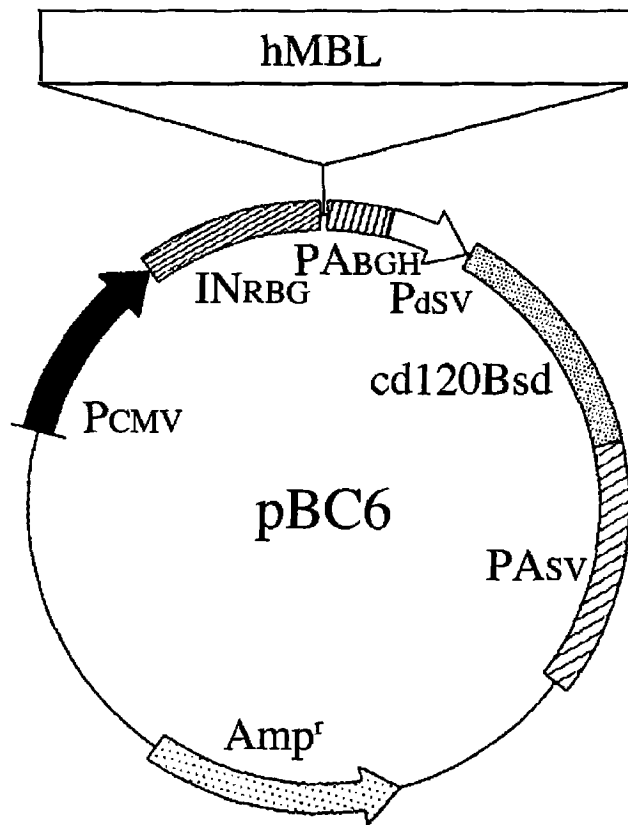


图 22