



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I757291 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：106115604

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 05 月 11 日

(51)Int. Cl. : C12N15/65 (2006.01)

C12N15/66 (2006.01)

C12N15/85 (2006.01)

(30)優先權：2016/05/11 美國

62/334,966

(71)申請人：美商安美基公司 (美國) AMGEN INC. (US)

美國

(72)發明人：凱區 藍朵 羅伯特 KETCHEM, RANDAL ROBERT (US)；麥葛魯 傑佛瑞 T MCGREW, JEFFREY T. (US)；弗密娜 雅德琳 迪娜 A FOMINA YADLIN, DINA A. (US)；穆羅 川特 菲利浦 MUNRO, TRENT PHILLIP (AU)；阿格沃 尼拉吉 加格底許 AGRAWAL, NEERAJ JAGDISH (IN)；達瑞斯 克麗斯汀 瑪莉 DARIS, KRISTINE MARIE (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 20030082735A1

WO 2005024015A1

審查人員：王顥棣

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：6 共 145 頁

(54)名稱

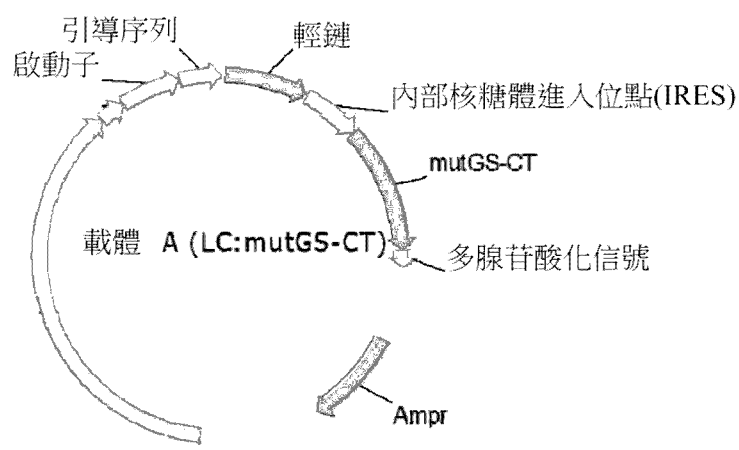
使用麩醯胺合成酶基因內互補載體直接選擇表現高水準異質蛋白的細胞

(57)摘要

本發明係關於動物細胞培養物中之多肽之重組表現之一般領域。更特定言之，本發明涉及經設計以表現多肽尤其是異多聚多肽之經重組工程改造之載體轉染之細胞之選擇改善。

This invention relates to the general field of recombinant expression of polypeptides in animal cell culture. More specifically, the invention concerns improved selection of cells transfected with recombinantly engineered vectors designed to express polypeptides, in particular heteromultimeric polypeptides.

指定代表圖：



【圖 1A】



I757291

【發明摘要】

【中文發明名稱】

使用麩醯胺合成酶基因內互補載體直接選擇表現高水準異質蛋白的細胞

【英文發明名稱】

DIRECT SELECTION OF CELLS EXPRESSING HIGH LEVELS OF HETEROMERIC PROTEINS USING GLUTAMINE SYNTHETASE INTRAGENIC COMPLEMENTATION VECTORS

【中文】

本發明係關於動物細胞培養物中之多肽之重組表現之一般領域。更特定言之，本發明涉及經設計以表現多肽尤其是異多聚多肽之經重組工程改造之載體轉染之細胞之選擇改善。

【英文】

This invention relates to the general field of recombinant expression of polypeptides in animal cell culture. More specifically, the invention concerns improved selection of cells transfected with recombinantly engineered vectors designed to express polypeptides, in particular heteromultimeric polypeptides.

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

使用麩醯胺合成酶基因內互補載體直接選擇表現高水準異質蛋白的細胞

【英文發明名稱】

DIRECT SELECTION OF CELLS EXPRESSING HIGH LEVELS OF HETEROMERIC PROTEINS USING GLUTAMINE SYNTHETASE INTRAGENIC COMPLEMENTATION VECTORS

【技術領域】

本發明係關於哺乳動物細胞培養中多肽之重組表現之一般領域。更具體而言，本發明涉及經設計以表現異質多肽之經重組工程改造之載體之細胞中選擇改善。

【先前技術】

異質重組蛋白之表現通常需要組分鏈之類似表現，以避免不能併入至成熟蛋白中的鏈之不必要的合成。另外，大多數用於產生異質重組蛋白之方法需要篩選許多純系，以鑑別表現高水準的成熟異質蛋白之各鏈的相當高表現純系。一種斷裂可選擇標記系統(在該系統中可選擇標記斷裂成兩個節段且各片段連接至異質蛋白之一條鏈之表現)可用以鑑別表現兩個可選擇標記片段及因此表現異質蛋白之兩條鏈的那些細胞。

麩醯胺合成酶(GS)藉由氨與麩胺酸鹽之縮合來催化麩醯胺生物合成。哺乳動物GS酶係由兩個堆疊的五聚環組成的十聚體，其中十個活性位點定位在次單元之接頭處。各活性位點係藉由一個次單元之N端域(β -抓握域，其由殘基25-112組成)，及藉由相鄰次單元之C端域(催化域，其由

殘基113-373組成)來形成。釀酒酵母菌(*S. cerevisiae*)及大腸桿菌(*E. coli*)之遺傳研究顯示，某些GS突變展示出基因內互補，其中映射至GS基因之5'末端的一些突變可與3'末端之突變互補(Mitchell, A. P. *Genetics* 111, 243-258 (1985); MacNeil, T., 等人 *Journal of Bacteriology* 150, 1302-1313 (1982))。因此，鑑別基於代謝酶的選擇系統(諸如利用麩醯胺合成酶之基因內互補者)可證明可用於表現具有多於兩條獨特多肽鏈的分子(例如，單株抗體及其他重組蛋白)。

【發明內容】

本發明之一個實施例提供一種載體，其包含：

a. 第一核酸，其編碼第一多肽，及

b. 第二核酸，其編碼第二多肽，其中該第二多肽係可選擇標記之初始突變體次單元，

其中該第一核酸之轉錄可操作地連接至該第二核酸之轉錄，

其進一步包含：

c. 第三核酸，其編碼第三多肽，其中該第三多肽能夠與該第一多肽締合以形成異質複合物，及

d. 第四核酸，其編碼第四多肽，其中該第四多肽係該可選擇標記之互補突變體次單元，

其中該第三核酸之轉錄可操作地連接至該第四核酸之轉錄，

其中該可選擇標記之該初始突變體次單元及該互補突變體次單元相互作用以提供可選擇活性，且進一步其中該載體能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善經轉染之細胞之選擇。

本發明之另一實施例提供一種載體，其包含：

e. 第一核酸，其編碼第一多肽，及

f. 第二核酸，其編碼第二多肽，其中該第二多肽係可選擇標記之初始片段，

其中該第一核酸之轉錄可操作地連接至該第二核酸之轉錄，其進一步包含：

g. 第三核酸，其編碼第三多肽，其中該第三多肽能夠與該第一多肽締合以形成異質複合物，及

h. 第四核酸，其編碼第四多肽，其中該第四多肽係該可選擇標記之互補片段，

其中該第三核酸之轉錄可操作地連接至該第四核酸之轉錄，

其中該可選擇標記之該初始突變體次單元及該互補突變體次單元相互作用以提供可選擇活性，且進一步其中該載體能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善經轉染之細胞之選擇。

在另一實施例中，異質複合物係免疫球蛋白。在一個實施例中，第一核酸編碼免疫球蛋白重鏈，且第三核酸編碼免疫球蛋白輕鏈，在一替代實施例中，第一核酸編碼免疫球蛋白輕鏈，且第三核酸編碼免疫球蛋白重鏈。在前述實施例中，可選擇標記係選自由以下所組成之群組的代謝酶：麩醯胺合成酶、蘇胺酸脫水酶、腺苷醯琥珀酸合成酶、及麩胺酸脫氫酶。

本發明可包括內部核糖體進入位點(IRES)；在一個實施例中，IRES發生在選自由以下所組成之群組的位點：在第一核酸與第二核酸之間的位點；在第三核酸與第四核酸之間的位點；以及在第一核酸與第二核酸之間及在第三核酸與第四核酸之間的位點。在另一實施例中，內部核糖體進入位點包含SEQ ID NO:23。

對於本文所述之實施例中任一者，當可選擇標記之初始突變體次單元係麩醯胺合成酶之N端突變體(mutGS-NT)時，可選擇標記之互補突變體次單元係麩醯胺合成酶之C端突變體(mutGS-CT)。在本發明之一個此類態樣中，mutGS-NT包含兩個或更多個選自由以下所組成之群組之突變：W60A N61A D63A D63R S66A及D76A，且mutGS-CT包含一或多個選自由以下所組成之群組之突變：E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A及R324A。在一個實施例中，mutGS-NT係選自由以下所組成之群組：W60A N61A D63A (mutGS-NT1; SEQ ID NO:6)、W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3; SEQ ID NO:25)及W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19)；且mutGS-CT係選自由以下所組成之群組：E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1; SEQ ID NO:21)及N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22)。

在其他實施例中，麩醯胺合成酶之N端片段及C端片段係藉由在麩醯胺合成酶蛋白之一或多個胺基酸處斷裂該蛋白來產生。在本發明之一個此類態樣中，麩醯胺合成酶之N端片段及/或C端片段係在麩醯胺合成酶之選自由以下所組成之群組之胺基酸處斷裂：E110、Y104、S125、N126、E264、T111、N105、N126、Q127、及N265

本發明亦提供一種經單離之宿主細胞，其經如上文所述之載體轉染、轉型、或轉導。該宿主細胞可選自由以下所組成之群組：CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、MDCK、293、3T3、骨髓瘤細胞株、及WI38細胞。本發明之一個態樣提供一種產生異質複合物之方法，其包含在條件下培養此類宿主細胞之步驟，其中該異質複合物係由該宿主細胞表

現。在一個實施例中，異質複合物係抗體。申請專利範圍之發明性方法亦可包含單離異質複合物。

本發明之一個實施例提供一種表現系統，其包含：

a) 第一載體，其編碼雙順反子轉錄本，該第一載體包含編碼第一多肽之第一核酸，該第一核酸可操作地連接至編碼第二多肽之第二核酸，其中該第二多肽係可選擇標記之初始突變體次單元，及

b) 第二載體，其編碼雙順反子轉錄本，該第二載體包含編碼第三多肽之第三核酸，該第三核酸可操作地連接至編碼第四多肽之第四核酸，其中該第四多肽係該可選擇標記之互補突變體次單元，該互補突變體次單元能夠與該可選擇標記之該初始突變體次單元締合以提供可選擇活性，

進一步其中該第三多肽能夠與該第一多肽締合以形成異質複合物；

且進一步其中該表現系統能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善該等細胞之選擇。

本發明之另一實施例提供一種表現系統，其包含：

c) 第一載體，其編碼雙順反子轉錄本，該第一載體包含編碼第一多肽之第一核酸，該第一核酸可操作地連接至編碼第二多肽之第二核酸，其中該第二多肽係可選擇標記之初始片段，及

d) 第二載體，其編碼雙順反子轉錄本，該第二載體包含編碼第三多肽之第三核酸，該第三核酸可操作地連接至編碼第四多肽之第四核酸，其中該第四多肽係該可選擇標記之互補片段，該互補片段能夠與該可選擇標記之該初始片段締合以提供可選擇活性，

進一步其中該第三多肽能夠與該第一多肽締合以形成異質複合物；

且進一步其中該表現系統能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善該等細胞

胞之選擇。

在另一實施例中，異質複合物係免疫球蛋白。在一個實施例中，第一核酸編碼免疫球蛋白重鏈，且第三核酸編碼免疫球蛋白輕鏈，在一替代實施例中，第一核酸編碼免疫球蛋白輕鏈，且第三核酸編碼免疫球蛋白重鏈。在前述實施例中，可選擇標記係選自由以下所組成之群組的代謝酶：麩醯胺合成酶、蘇胺酸脫水酶、腺苷醯琥珀酸合成酶、及麩胺酸脫氫酶。

上文所述之發明性表現系統可包括內部核糖體進入位點(IRES)；在一個實施例中，IRES發生在選自由以下所組成之群組的位點：在第一核酸與第二核酸之間的位點；在第三核酸與第四核酸之間的位點；以及在第一核酸與第二核酸之間及在第三核酸與第四核酸之間的位點。在另一實施例中，內部核糖體進入位點包含SEQ ID NO:23。

在本文所述之表現系統中，當可選擇標記之初始突變體次單元係麩醯胺合成酶之N端突變體(mutGS-NT)時，可選擇標記之互補突變體次單元係麩醯胺合成酶之C端突變體(mutGS-CT)。在本發明之一個此類態樣中，mutGS-NT包含兩個或更多個選自由以下所組成之群組之突變：W60A N61A D63A D63R S66A及D76A，且mutGS-CT包含一或多個選自由以下所組成之群組之突變：E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A及R324A。在一個實施例中，mutGS-NT係選自由以下所組成之群組：W60A N61A D63A (mutGS-NT1; SEQ ID NO:6)、W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3; SEQ ID NO:25)及W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19)；且mutGS-CT係選自由以下所組成之群組：E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1; SEQ ID NO:21)及

N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22)。

在其他實施例中，麩醯胺合成酶之N端片段及C端片段係藉由在麩醯胺合成酶蛋白之一或多個胺基酸處斷裂該蛋白來產生。在本發明之一個此類態樣中，麩醯胺合成酶之N端片段及/或C端片段係在麩醯胺合成酶之選自由以下所組成之群組之胺基酸處斷裂：E110、Y104、S125、N126、E264、T111、N105、N126、Q127、及N265。

本發明亦提供一種經單離之宿主細胞，其經如上文所述之載體轉染、轉型、或轉導。該宿主細胞可選自由以下所組成之群組：CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、MDCK、293、3T3、骨髓瘤細胞株、及WI38細胞。本發明之一個態樣提供一種產生異質複合物之方法，其包含在條件下培養此類宿主細胞之步驟，其中該異質複合物係由該宿主細胞表現。在一個實施例中，異質複合物係抗體。申請專利範圍之發明性方法亦可包含單離異質複合物。

在一個實施例中，本發明提供一種表現系統，其包含：第一載體，其包含編碼抗體之重鏈的第一核酸，該第一核酸可操作地連接至編碼N端突變體麩醯胺合成酶(mutGS-NT)之第二核酸；及第二載體，其包含編碼抗體之輕鏈的第三核酸，該第三核酸可操作地連接至編碼C端突變體麩醯胺合成酶(mutGS-CT)之第四核酸，其中麩醯胺合成酶之各突變體次單元當單獨表現時不具有可選擇活性，且該mutGS-NT與該mutGS-CT之共表現提供麩醯胺合成酶活性，其中該表現系統能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善經轉染之細胞之選擇。

在一個實施例中，本發明提供一種表現系統，其包含：第一載體，其包含編碼抗體之重鏈的第一核酸，該第一核酸可操作地連接至編碼麩醯

胺合成酶之N端片段之第二核酸；及第二載體，其包含編碼抗體之輕鏈的第三核酸，該第三核酸可操作地連接至編碼麩醯胺合成酶之C端片段之第四核酸，其中麩醯胺合成酶之各突變體次單元當單獨表現時不具有可選擇活性，且麩醯胺合成酶之該N端片段與該C端片段之共表現提供麩醯胺合成酶活性，其中該表現系統能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善經轉染之細胞之選擇。

在另一實施例中，本發明提供一種表現系統，其包含：第一載體，其包含編碼抗體之輕鏈的第一核酸，該第一核酸可操作地連接至編碼N端突變體麩醯胺合成酶(mutGS-NT)之第二核酸；及第二載體，其包含編碼抗體之重鏈的第三核酸，該第三核酸可操作地連接至編碼C端突變體麩醯胺合成酶(mutGS-CT)之第四核酸，其中麩醯胺合成酶之各突變體次單元當單獨表現時不具有可選擇活性，且該mutGS-NT與該mutGS-CT之共表現提供麩醯胺合成酶活性，其中該表現系統能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善經轉染之細胞之選擇。

在另一實施例中，本發明提供一種表現系統，其包含：第一載體，其包含編碼抗體之輕鏈的第一核酸，該第一核酸可操作地連接至編碼麩醯胺合成酶之N端片段之第二核酸；及第二載體，其包含編碼抗體之重鏈的第三核酸，該第三核酸可操作地連接至編碼麩醯胺合成酶之C端片段之第四核酸，其中麩醯胺合成酶之各片段當單獨表現時不具有可選擇活性，且麩醯胺合成酶之該N端片段與該C端片段之共表現提供麩醯胺合成酶活性，其中該表現系統能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善經轉染之細胞之選擇。

對於前述實施例之任一者，在本發明之一個態樣中，mutGS-NT包含

兩個或更多個選自由以下所組成之群組之突變：W60A N61A D63A D63R S66A及D76A，且mutGS-CT包含一或多個選自由以下所組成之群組之突變：E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A及R324A。在一個實施例中，mutGS-NT係選自由以下所組成之群組：W60A N61A D63A (mutGS-NT1; SEQ ID NO:6)、W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3; SEQ ID NO:25)及W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19)；且mutGS-CT係選自由以下所組成之群組：E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1; SEQ ID NO:21)及N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22)。

在其他實施例中，麩醯胺合成酶之N端片段及C端片段係藉由在麩醯胺合成酶蛋白之一或多個胺基酸處斷裂該蛋白來產生。在本發明之一個此類態樣中，麩醯胺合成酶之N端片段及/或C端片段係在麩醯胺合成酶之選自由以下所組成之群組之胺基酸處斷裂：E110、Y104、S125、N126、E264、T111、N105、N126、Q127、及N265。

類似地，本發明亦提供一種經單離之宿主細胞，其經如上文所述之載體轉染、轉型、或轉導。該宿主細胞可選自由以下所組成之群組：CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、MDCK、293、3T3、骨髓瘤細胞株、及WI38細胞。本發明之一個態樣提供一種產生異質複合物之方法，其包含在條件下培養此類宿主細胞之步驟，其中該異質複合物係由該宿主細胞表現。在一個實施例中，異質複合物係抗體。申請專利範圍之發明性方法亦可包含單離異質複合物。

本發明之又進一步態樣包括一種表現系統，其包含：第一載體，其

編碼雙順反子轉錄本，該第一載體包含編碼所欲多肽之第一核酸，該第一核酸可操作地連接至編碼可選擇標記之初始突變體次單元之第二核酸；及第二載體，其編碼雙順反子轉錄本，該第二載體包含第三核酸，該第三核酸可操作地連接至編碼可選擇標記之互補突變體次單元之第四核酸，其中該可選擇標記之該第一及互補突變體次單元締合以提供可選擇活性，且其中該表現系統能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善經轉染之細胞之選擇，且進一步其中該第一核酸編碼抗體重鏈且該第三核酸編碼抗體輕鏈。在一個實施例中，可選擇標記係麩醯胺合成酶。

本發明之又進一步態樣包括一種表現系統，其包含：第一載體，其編碼雙順反子轉錄本，該第一載體包含編碼所欲多肽之第一核酸，該第一核酸可操作地連接至編碼可選擇標記之初始片段之第二核酸；及第二載體，其編碼雙順反子轉錄本，該第二載體包含第三核酸，該第三核酸可操作地連接至編碼可選擇標記之互補片段之第四核酸，其中該可選擇標記之該第一及互補片段締合以提供可選擇活性，且其中該表現系統能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善經轉染之細胞之選擇，且進一步其中該第一核酸編碼抗體重鏈且該第三核酸編碼抗體輕鏈。在一個實施例中，可選擇標記係麩醯胺合成酶。

在本發明之一個此類態樣中，麩醯胺合成酶包含兩個互補突變；因此，mutGS-NT包含兩個或更多個選自由以下所組成之群組之突變：W60A N61A D63A D63R S66A及D76A，且mutGS-CT包含一或多個選自由以下所組成之群組之突變：E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A及R324A。在一個實施例中，mutGS-NT係選自由以下所組成之群組：W60A N61A D63A (mutGS-NT1; SEQ ID NO:6)、

W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3; SEQ ID NO:25)及W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19)；且mutGS-CT係選自由以下所組成之群組：E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1; SEQ ID NO:21)及N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22)。

在其他此類實施例中，麩醯胺合成酶之N端片段及C端片段係藉由在麩醯胺合成酶蛋白之一或多個胺基酸處斷裂該蛋白來產生。在本發明之一個此類態樣中，麩醯胺合成酶之N端片段及/或C端片段係在麩醯胺合成酶之選自由以下所組成之群組之胺基酸處斷裂：E110、Y104、S125、N126、E264、T111、N105、N126、Q127、及N265。

本發明亦提供一種經單離之宿主細胞，其經如上文所述之載體轉染、轉型、或轉導。該宿主細胞可選自由以下所組成之群組：CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、MDCK、293、3T3、骨髓瘤細胞株、及WI38細胞。本發明之一個態樣提供一種產生異質複合物之方法，其包含在條件下培養此類宿主細胞之步驟，其中該異質複合物係由該宿主細胞表現。在一個實施例中，異質複合物係抗體。申請專利範圍之發明性方法亦可包含單離異質複合物。

【圖式簡單說明】

圖1係實例1至5中所利用之核酸構築體之示意性表示，各核酸構築體包含可選擇標記之次單元並表現不同多肽，該等多肽可締合以在細胞中形成異質複合物。縮寫係如下：muGS，突變體麩醯胺合成酶；Ampr，安比西林抗性。圖1(A)描繪載體A (LC:mutGS-CT)，且圖1(B)描繪載體B (HC:mutGS-NT)。

圖2係顯示拯救(rescue)實驗1之結果之圖。將各版本(1-5)之構築體A及B轉染至CHO-K1 GS剔除細胞中並測試其等在無麩醯胺之培養基中拯救細胞之能力。將表現全長GS酶之質體用作對照。

圖3係顯示單獨A或B片段均不能拯救KO細胞株之圖，其確定使GS酶活性恢復需要這兩種片段。

圖4係實例6中所使用之表現載體之示意性表示，各表現載體含有抗體輕鏈或重鏈、IRES、及麩醯胺合成酶片段。

圖5係顯示GS片段載體在抗體LC及HC基因之下游之使用之圖。載體組合2A-LC及2B-HC能夠拯救GS剔除細胞。

圖6係顯示以下的圖，在10D饋料分批生產率檢定中之來自構築體2選擇匯集物(pool)之細胞之生產率，並將其與使用表現全長麩醯胺合成酶之載體選擇之對照匯集物比較。

【實施方式】

相關申請案之交互參照

本申請案主張2016年5月11日申請之美國臨時申請案第62/334,966號之權益，該案據此以全文引用的方式併入。

重組異質複合物在細胞中的有效產生當該複合物之各組分成比例地且大量地表現時經改善。本發明藉由提供選擇經重組工程改造之細胞之方法及組成物改善經轉染之細胞之選擇，該等經重組工程改造之細胞以成比例量表現多於一種異質多肽，使得該等多肽可有效締合以形成表現水準高於傳統製備之異質複合物的異質複合物。本發明之優勢亦在於，其減少選擇表現高水準的所欲重組異質多肽複合物的細胞所需的時間，其係本發明所提供之改善經轉染之細胞之選擇的另一態樣。

儘管本申請案中所使用之術語在此項技術內係標準的，但是本文中提供某些術語之定義以確保申請專利範圍中之含義之清楚性及明確性。單位、前綴、及符號皆以其SI (國際單位制)可接受之形式表示。本文中所述之數字範圍包括限定該範圍之數字，且包括並支持所以限定之範圍內的各整數。除非另有指明，否則本文中所述之方法及技術通常係根據此項技術中熟知之習知方法且如本說明書通篇所引用及討論之各種一般性及更特定參考文獻中所述來執行。參見例如，Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)、及 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992)、以及 Harlow 及 Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)。

所揭示之方法可適用於在經攪拌之槽式反應器(包括傳統分批及饋料分批細胞培養，其可包含但不必包含旋轉過濾器)、灌注系統(包括交替切向流(「ATF」)培養、聲學(acoustic)灌注系統、深層過濾器(depth filter)灌注系統、及其他系統)、中空纖維生物反應器(HFB，其在一些情況下可用於灌注過程中)中生長之黏附培養或懸浮培養，以及各種其他細胞培養方法(參見例如，Tao 等人, (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 82:751-65；Kuystermans 及 Al-Rubeai, (2011) 「Bioreactor Systems for Producing Antibody from Mammalian Cells」在 *Antibody Expression and Production* 中, *Cell Engineering* 7:25-52, Al-Rubeai (ed) Springer；Catapano 等人, (2009) 「Bioreactor Design and Scale-Up」在 *Cell and Tissue Reaction Engineering: Principles and Practice* 中, Eibl 等人(編)

Springer-Verlag，該等文獻均以全文引用方式併入本文)。

除非另有特定指明，否則如本文中所使用之術語「一個」或「一種」意謂一或多個(種)。此外，除非另外為上下文所需，否則單數術語將包括複數且複數術語將包括單數。一般而言，結合本文所述之細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學、及蛋白及核酸化學及雜交所使用之命名法，以及該等領域之技術係此項技術中所熟知及常用者。

本揭露提供調節表現「感興趣的蛋白」之細胞培養物之性質的方法；「感興趣的蛋白」包括天然存在之蛋白、重組蛋白、及經工程改造之蛋白(例如，自然界中不存在且已由人類設計及/或創造的蛋白)。感興趣的蛋白可為(但不必為)已知或懷疑具有治療相關性的蛋白。感興趣的蛋白之具體實例包括：抗原結合蛋白(如本文所述及定義)、肽體(即，包含直接或間接融合至其他分子諸如抗體之Fc域之(一或多個)肽的分子，其中該肽部分特異性結合至所欲靶標；該(一或多個)肽可融合至Fc區或插入至Fc-環圈，或經修飾之Fc分子，例如，如美國專利臨時申請案第US2006/0140934號中所述，該案以全文引用方式併入本文)、融合蛋白(例如，Fc融合蛋白，其中Fc片段融合至蛋白或肽，包括肽體)、細胞介素、生長因子、激素、及其他天然存在之分泌之蛋白、以及天然存在之蛋白之突變體形式。

術語「異質複合物」意謂包括藉由至少兩個不同分子之締合所形成之分子複合物。締合可為非共價相互作用或共價連接，例如，二硫鍵。兩個不同分子通常為兩個不同多肽，然而，本發明考慮到在多肽與核酸之間以及在不同核酸之間的異質複合物。在一個實施例中，異質複合物提供功能性活性，諸如，結合基質之能力(例如，能夠結合對應抗原的免疫球蛋白

白)、酶活性、或類似功能性活性。在一個實施例中，本發明之異質複合物被分泌至產生其的宿主細胞之培養基中。

如本文中所使用之術語「締合」或「相互作用」意謂描述至少兩個分子之間的關係，其中一個分子結合至其他分子及/或影像其他分子之活性。相互作用可包括兩個多肽(或多肽及核酸)之直接或間接結合、或分子活性經另一分子功能性活化或抑制。

在一具體實施例中，異質複合物係免疫球蛋白分子。脊椎動物系統中之免疫球蛋白為由兩條相同輕鏈及兩條相同重鏈構成的抗體。這四條鏈藉由二硫鍵接合在一起，使得各輕鏈與重鏈接合，且重鏈跨其等全部尾部連接，形成Y形異質複合物。可操縱編碼免疫球蛋白分子之DNA以產生能夠編碼重組蛋白諸如親和力增強的抗體或其他基於抗體之多肽的DNA的許多技術係已知的(參見例如，Larrick等人 (1989), *Biotechnology* 7:934-938；Reichmann等人 (1988), *Nature* 332:323-327；Roberts等人 (1987), *Nature* 328:731-734；Verhoeyen等人 (1988), *Science* 239:1534-1536；Chaudhary等人 (1989), *Nature* 339:394-397)。

本發明中亦可使用產生人類抗體之重組細胞(諸如使用抗體文庫及/或基因轉殖動物來製備，及視情況在體外進一步修飾)，以及人源化抗體。參見例如，Cabilly等人，美國專利第4,816,567號；Cabilly 等人，歐洲專利第0,125,023 B1號；Boss 等人，美國專利第4,816,397號；Boss 等人，歐洲專利第0,120,694 B1號；Neuberger 等人，WO 86/01533；Neuberger 等人，歐洲專利第0,194,276 B1號；Winter, 美國專利第5,225,539號；Winter, 歐洲專利第0,239,400 B1號；Queen 等人，歐洲專利第0,451,216 B1號；及Padlan 等人，歐洲專利第0,519,596 A1號。例如，本發明可用於

誘導免疫特異性地識別特異性細胞靶標之人類及/或人源化抗體之表現，該等靶標例如人類EGF受體、her-2/neu抗原、CEA抗原、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、CD5、CD11a、CD18、NGF、CD20、CD45、Ep-cam、其他癌症表面分子、TNF- α 、TGF- β 1、VEGF、其他細胞介素、 α 4 β 7整聯蛋白、IgE、病毒蛋白(例如細胞巨大病毒)等，僅舉幾個例子。

除免疫球蛋白之外，異質複合物之實例包括但不限於任何異二聚或異寡聚蛋白，例如，BMP2/BMP7、骨源蛋白、介白素1轉化酶(ICE)、各種介白素受體(例如，IL-18受體、IL-13受體、IL-4受體、及IL-7受體)、細胞核之受體諸如類視色素受體、T細胞受體、整聯蛋白諸如細胞黏著分子、整聯蛋白、腫瘤壞死因子受體、及I類及II類主要組織相容性複合物蛋白(MHC)之可溶性形式及膜結合形式。對於係受體之異質複合物，本發明涵蓋多肽之可溶性形式及膜結合形式兩者。可根據本發明產生之額外異質蛋白之描述可見於例如以下中：Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, 第II卷 (Aggarwal及Gutterman, 編 Blackwell Sciences, Cambridge Mass., 1998)；Growth Factors: A Practical Approach (McKay及Leigh, 編 Oxford University Press Inc., New York, 1993)；及The Cytokine Handbook (A W Thompson, 編; Academic Press, San Diego Calif.; 1991)。

如本文中所使用之術語「融合蛋白」係指融合至異源蛋白或肽之蛋白或蛋白之域(例如，可溶性細胞外域)。此類融合蛋白之實例包括表現為與免疫球蛋白分子之一部分的融合的蛋白、表現為與拉鍊部分的融合蛋白的蛋白、及多功能性蛋白諸如細胞介素及生長因子之融合蛋白(即，GM-CSF及IL-3、MGF及IL-3)。WO 93/08207及WO 96/40918描述了被稱為

CD40L之分子之各種可溶性寡聚形式之製備，分別包括免疫球蛋白融合蛋白及拉鍊融合蛋白；其中所討論之技術可適用於其他蛋白。本文中所述之分子中任一者均可表現為融合蛋白，包括但不限於細胞受體分子之細胞外域、酶、激素、細胞介素、免疫球蛋白分子之一部分、拉鍊域、及表位。

術語「抗原結合蛋白」係以其最廣泛意義使用且意謂包含結合至抗原或靶標之部分及視情況允許抗原結合部分採用促進抗原結合蛋白與抗原之結合的構形的支架或構架部分的蛋白。抗原結合蛋白之實例包括：人類抗體、人源化抗體；嵌合抗體；重組抗體；單鏈抗體；雙功能抗體；三功能抗體；四功能抗體；Fab片段；F(ab')₂片段；IgD抗體；IgE抗體；IgM抗體；IgG1抗體；IgG2抗體；IgG3抗體；或IgG4抗體，及其片段。抗原結合蛋白可包含例如具有接枝CDR或CDR衍生物之替代性蛋白支架或人工支架。此類支架包括但不限於包含經引入以例如使抗原結合蛋白之三維結構穩定之突變的抗體來源支架，以及包含例如生物相容性聚合物之完全合成支架。參見例如，Korndorfer等人，2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(1):121-129 (2003)；Roque等人，*Biotechnol. Prog.* 20:639-654 (2004)。此外，可使用肽抗體模擬物（「PAM」），以及利用纖網蛋白組分作為支架之基於抗體模擬物的支架。

抗原結合蛋白可具有例如天然存在之免疫球蛋白之結構。「免疫球蛋白」係四聚分子。在天然存在之免疫球蛋白中，各四聚物由兩對相同的多肽鏈組成，各對具有一條「輕」鏈(約25 kDa)及一條「重」鏈(約50 kDa至70 kDa)。各鏈之胺基端部分包括具有約100個至110個或110個以上胺基酸之主要負責抗原識別的可變區。各鏈之羧基端部分限定主要負責效應

子功能之恆定區。人類輕鏈分類為 κ 及 λ 輕鏈。重鏈分類為 μ 、 δ 、 γ 、 α 、或 ϵ ，且將抗體之同型分別定義為IgM、IgD、IgG、IgA、及IgE。

天然存在之免疫球蛋白鏈展現相同的具有由三個高變區接合之相對保守架構區(FR)的一般結構，亦稱為互補決定區或CDR。從N端至C端，輕鏈及重鏈兩者均包含域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及FR4。各域之胺基酸之指定可根據Kabat等人在Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH出版號91-3242, (1991)中之定義來進行。視需要，CDR亦可根據替代命名方案來重新定義，諸如Chothia之命名方案(參見Chothia及Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917；Chothia等人, (1989) Nature 342:878-883；或Honegger及Pluckthun, (2001) J. Mol. Biol. 309:657-670)。

在本揭露之上下文中，抗原結合蛋白描述為當解離常數(K_D) $\leq 10^{-8}$ M時「特異性結合」或「選擇性結合」其靶抗原。該抗體當 $K_D \leq 5 \times 10^{-9}$ M時以「高親和力」特異性結合抗原，且當 $K_D \leq 5 \times 10^{-10}$ M時「極高親和力」特異性結合抗原。

除非另外指明，否則術語「抗體」包括參考任何同型或子類之糖基化及非糖基化免疫球蛋白或其與完整抗體競爭進行特異性結合之抗原結合區。另外，除非另外指明，否則術語「抗體」係指完整免疫球蛋白或其與完整抗體競爭進行特異性結合之抗原結合部分。抗原結合部分可藉由重組DNA技術或藉由完整抗體之酶促或化學裂解來產生，且可形成感興趣的蛋白之要素。抗原結合部分尤其包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、域抗體(dAbs)、包括互補決定區(CDR)之片段、單鏈抗體(scFv)、嵌合抗體、雙

功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、及含有足以賦予多肽之特異性抗原結合的免疫球蛋白之至少一部分的多肽。

術語「抗體」係指結構及/或功能係基於抗體(例如，全長或全免疫球蛋白分子)之結構及/或功能，及/或由抗體或其片段之可變重鏈(VH)及/或可變輕鏈(VL)引起的分子。抗體構築體因此能夠結合至其特異性靶標或抗原。此外，根據本發明之抗體構築體之結合域包含抗體之允許靶結合之最低結構要求。此最低要求可例如藉由存在至少三個輕鏈CDR (即，VL區之CDR1、CDR2、及CDR3)及/或三個重鏈(即，VH區之CDR1、CDR2、及CDR3)，較佳所有六個CDR，來限定。限定抗體之最低結構要求之替代性方法係分別限定特定靶標之結構內的抗體表位(包含表位區(表位簇)之靶蛋白之蛋白域)，或藉由參考與經限定之抗體之表位競爭的特定抗體。根據本發明之構築體所基於的抗體包括例如單株抗體、重組抗體、嵌合抗體、去免疫化抗體、人源化抗體、及人類抗體。

Fab片段係具有V_L、V_H、C_L、及C_H1域之單價片段；F(ab')₂片段係具有藉由鉸鏈區之二硫橋連接之兩個Fab片段之二價片段；Fd片段具有V_H及C_H1域；Fv片段具有抗體之單臂之V_L及V_H域；dAb片段具有V_H域、V_L域、或V_H或V_L域之抗原結合片段；經單離之互補決定區(CDR)；及單鏈Fv (scFv) (美國專利第6,846,634號、第6,696,245號、美國申請公開案第05/0202512號、第04/0202995號、第04/0038291號、第04/0009507號、第03/0039958號、Ward等人, (1989) Nature 341:544-546)。

單鏈抗體(scFv)係V_L及V_H區經由連接子(例如，胺基酸殘基之合成序列)接合以形成連續蛋白鏈之抗體，其中連接子足夠長以允許蛋白鏈自身摺疊並形成單價抗原結合位點(參見例如，Bird等人, Science 242:423-26

(1988)及Huston等人, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83)。
雙功能抗體係包含兩條多肽鏈之二價抗體，其中各多肽鏈包含由連接子接合之 V_H 及 V_L 域，該連接子太短以致不允許相同鏈上兩個域之間的配對，因此允許各域與另一多肽鏈上之互補域配對(參見例如，Holliger等人, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48；及Poljak等人, (1994) *Structure* 2:1121-23)。若雙功能抗體之兩條多肽鏈係相同的，則由其等配對所產生之雙功能抗體將具有兩個相同的抗原結合位點。具有不同序列的多肽鏈可用以製備具有兩個不同抗原結合位點之雙功能抗體。類似地，三功能抗體及四功能抗體係分別包含三條多肽鏈及四條多肽鏈，且分別形成三個抗原結合位點及四個抗原結合位點之抗體，該等抗原結合位點可相同或不同。

此外，術語「抗體」包括單價構築體、二價構築體、及多價(polyvalent/multivalent)構築體、及因此雙特異性構築體(其特異性結合至僅兩種抗原結構)、以及多特異性(polyspecific/multispecific)構築體(其經由不同結合域特異性結合多於兩種抗原結構，例如三種、四種、或四種以上)。另外，術語「抗體」包括由僅一條多肽鏈組成之分子以及由多於一條鏈組成之分子，其鏈可為相同的(同二聚體、同三聚體、或同寡聚物)或不同的(異二聚體、異三聚體、或異寡聚物)。上文所鑑別之抗體及變異體或其衍生物之實例尤其描述於以下中：Harlow及Lane, *Antibodies a laboratory manual*, CSHL Press (1988)及Using Antibodies: a laboratory manual, CSHL Press (1999)；Kontermann 及 Dübel, *Antibody Engineering*, Springer, 第2版 2010；及Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009。

如本文中所使用之術語「雙特異性」係指係「至少雙特異性」的抗體，*即*，其包含至少一第一結合域及一第二結合域，其中該第一結合域結合至一個抗原或靶標(此處：靶細胞表面抗原)，且該第二結合域結合至另一抗原或靶標。因此，雙特異性構築體包含針對至少兩種不同抗原或靶標的特異性。雙特異性抗體亦可涵蓋多特異性抗體構築體，諸如三特異性抗體構築體(其包括三個結合域)或具有多於三種(例如四種、五種.....)特異性之構築體。

一或多個CDR可共價地或非共價地併入至分子中以使該分子為抗原結合蛋白。抗原結合蛋白可併入(一或多個) CDR作為較大多肽鏈之一部分，可將(一或多個) CDR共價地連接至另一多肽鏈，或可非共價地併入(一或多個) CDR。CDR容許抗原結合蛋白特異性結合至具體的感興趣的抗原。

抗原結合蛋白可具有一或多個結合位點。若存在多於一個結合位點，則該等結合位點可彼此相同或可不同。例如，天然存在之人類免疫球蛋白通常具有兩個相同的結合位點，然而「雙特異性」或「雙功能性」抗體具有兩個不同的結合位點。

為清楚起見，且如本文中所述，應指出，抗原結合蛋白可(但不必)源自人類(例如，人類抗體)，且在一些情況下將包含非人類蛋白，例如大鼠或鼠類蛋白，且在其他情況下，抗原結合蛋白可包含人類蛋白及非人類蛋白之雜種(例如，人源化抗體)。

感興趣的蛋白可包含人類抗體。術語「人類抗體」包括具有來源於人類免疫球蛋白序列之一或多個可變區及恆定區的所有抗體。在一個實施例中，所有可變域及恆定域皆來源於人類免疫球蛋白序列(完全人類抗

體)。此類抗體可以多種方式製備，包括經由以小鼠之感興趣的抗原免疫，該小鼠經遺傳修飾以表現衍生自人類重鏈及/或輕鏈編碼基因之抗體，諸如來源於Xenomouse®、UltiMab™、或Velocimmune®系統之小鼠。亦可採用基於噬菌體之方法。

可替代地，感興趣的蛋白可包含人源化抗體。「人源化抗體」具有與來源於非人類物種之抗體之序列相差一或多個胺基酸取代、刪除、及/或增加的序列，使得當將人源化抗體向人類受試者投與時，相較於非人類物種抗體，其不太可能誘導免疫反應，及/或誘導不太嚴重的免疫反應。在一個實施例中，非人類物種抗體之重鏈及/或輕鏈之構架及恆定域中之某些胺基酸經突變以產生人源化抗體。在另一實施例中，將人類抗體之(一或多個)恆定域融合至非人類物種之(一或多個)可變域。如何製備人源化抗體之實例可見於美國專利第6,054,297號、第5,886,152號、及第5,877,293號中。

如本文中所使用之術語「Fc」區包含兩個重鏈片段，其包含抗體之C_H2及C_H3域。將兩個重鏈片段藉由兩個或兩個以上二硫鍵且藉由C_H3域之疏水性相互作用來保持在一起。包含Fc區之感興趣的蛋白(包括抗原結合蛋白及Fc融合蛋白)形成本揭露之另一態樣。

「半抗體(hemibody)」係免疫功能性免疫球蛋白構築體，其包含完整的重鏈、完整的輕鏈、及與完整的重鏈之Fc區配對之第二重鏈Fc區。可(但不必)採用連接子來接合重鏈Fc區及第二重鏈Fc區。在具體實施例中，半抗體係本文中所揭示之抗原結合蛋白之單價形式。在其他實施例中，可採用帶電荷殘基對來將一個Fc區與第二Fc區締合。半抗體可為本揭露之上下文中的感興趣的蛋白。

術語「宿主細胞」意謂經遺傳工程改造以表現具有商業或科學利益的多肽的細胞。遺傳工程改造細胞株涉及以編碼重組多核苷酸分子(「感興趣的基因」)之核酸轉染、轉型、或轉導細胞，及/或以其他方式改變(例如，藉由同源重組及重組細胞與非重組小之基因活化或融合)，以便導致宿主細胞表現所欲的重組多肽。用於遺傳工程改造細胞及/或細胞株以表現感興趣的多肽之方法及載體係熟習此項技術者熟知的；例如，各種技術說明於以下中：**Current Protocols in Molecular Biology**, Ausubel等人, 編 (Wiley & Sons, New York, 1988, 及季度更新)；Sambrook等人, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (Cold Spring Laboratory Press, 1989)；Kaufman, R.J., **Large Scale Mammalian Cell Culture**, 1990, 第15-69頁。術語包括親本細胞之後代，無論該後代在形態上或在遺傳構成上是否與原始親本細胞相同，只要感興趣的基因存在即可。細胞培養物可包含一或多個宿主細胞。

術語「融合瘤」意謂由永生化細胞及抗體產生細胞之融合產生之細胞或細胞之後代。所得融合瘤係產生抗體之永生化細胞。用以產生融合瘤之個別細胞可來自任何哺乳動物來源，包括但不限於倉鼠、大鼠、豬、兔、綿羊、山羊、及人類。術語亦涵蓋三源融合瘤(trioma)細胞株，其當異雜交骨髓瘤融合之後代(其係人類細胞與鼠類骨髓瘤細胞株之間的融合之產物)隨後與漿細胞融合時得到。術語意謂包括產生抗體之任何永生化雜交細胞株，諸如，例如，四源融合瘤(quadroma) (參見例如，Milstein等人, (1983) *Nature*, 537:3053)。

術語「培養物」及「細胞培養物」可互換使用，且係指在合適於細胞群之存活及/或生長之條件下維持於培養基中之細胞群。如熟習此項技

術者將清楚的，這些術語亦指包含細胞群及該群所懸浮之培養基之組合。

術語「多肽」及「蛋白」(例如，如感興趣的蛋白或感興趣的多肽之上下文中所使用)在本文中可互換地用以指胺基酸殘基之聚合物。該等術語亦應用於一或多個胺基酸殘基為對應天然存在之胺基酸之類似物或模擬物的胺基酸聚合物，以及天然存在之胺基酸聚合物。該等術語亦可涵蓋經修飾(例如藉由增加碳水化合物殘基以形成醣蛋白)或磷酸化的胺基酸聚合物。多肽及蛋白可由天然存在且非重組細胞產生，或多肽及蛋白可由經遺傳工程改造或重組細胞產生。多肽及蛋白可包含具有天然之胺基酸序列之分子、或具有天然序列之一或多個胺基酸之刪除、增加、及/或取代之分子。

術語「多肽」及「蛋白」涵蓋僅包含天然存在之胺基酸之分子，以及包含非天然存在之胺基酸之分子。非天然存在之胺基酸(視需要，其可取代本文中所揭示之任何序列中所見之任何天然存在之胺基酸)之實例包括(但不限於)：4-羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸鹽、 ϵ -N,N,N-三甲基離胺酸、 ϵ -N-乙醯基離胺酸、O-磷酸絲胺酸、N-乙醯基絲胺酸、N-甲醯基甲硫胺酸、3-甲基組胺酸、5-羥基離胺酸、 σ -N-甲基精胺酸、及其他類似胺基酸及亞胺基酸(例如，4-羥基脯胺酸)。在本文中所使用之多肽記號中，根據標準使用及慣例，左側方向係胺基端方向，且右側方向係羧基端方向。

「細胞培養」或「培養」意謂細胞在多細胞有機體或組織外的生長及繁殖。哺乳動物之合適之培養條件係此項技術中已知的。參見例如，*Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, 編, Oxford University Press, New York (1992)。哺乳動物細胞可以懸浮之方式或在

附接至固體基質的同時培養。可使用流體化床生物反應器、中空纖維生物反應器、滾瓶、搖瓶、或經攪拌之槽式生物反應器(具有或不具有微載劑)。在一個實施例中，使用500 L至2000 L生物反應器。在一個實施例中，使用1000 L至2000 L生物反應器。

術語「細胞培養基(cell culturing medium)」(亦稱為「培養基(culture medium)」、「細胞培養基(cell culture media)」、「組織培養基」)係指用於生長細胞(例如，動物或哺乳動物細胞)，且一般提供以下之至少一或多種組分之任何營養素溶液：能源(通常以碳水化合物諸如葡萄糖之形式)；所有必需胺基酸之一或多者，且一般係二十種鹼性胺基酸加半胱胺酸；維生素及/或通常以低濃度需要的其他有機化合物；脂質或遊離脂肪酸；及痕量要素，例如，通常以低濃度(通常在微莫耳範圍內)需要之無機化合物或天然存在之要素。

營養素溶液可視情況補充有額外可選組分以使細胞之生長最佳化，諸如激素及其他生長因子，例如，胰島素、運鐵蛋白、表皮生長因子、血清、及類似者；鹽，例如，鈣、鎂、及磷酸鹽，以及緩衝液，例如，HEPES；核苷及鹼，例如，腺苷、胸苷、次黃嘌呤；以及蛋白及組織水解產物，例如，經水解之動物或植物蛋白(蛋白腴或蛋白腴混合物，其可獲自動物副產品、經純化之明膠、或植物物質)；抗生素，例如，健他黴素；細胞保護劑或界面活性劑，諸如Pluronic[®]F68 (亦稱為Lutrol[®] F68及Kolliphor[®] P188)；非離子三嵌段共聚物，其由側接兩條親水性聚氧丙烯(聚(氧化丙烯))鏈之中心疏水性聚氧丙烯(聚(氧化丙烯))鏈組成；聚胺，例如，腐胺、亞精胺、及精胺(參見例如，WIPO公開案第WO 2008/154014號)；及丙酮酸鹽(參見例如美國專利第8053238號)，其取決於欲培養之細

胞之需要及/或所欲的細胞培養參數。

細胞培養基包括任何細胞培養過程通常採用的及/或已知與任何細胞培養過程(諸如，但不限於，細胞之分批、延長分批、饋料分批、及/或灌注或連續培養)一起使用的那些細胞培養基。

「基礎」或(分批)細胞培養基係指通常用以起始細胞培養且足夠完整以支持細胞培養的細胞培養基。

「生長」細胞培養基係指通常用於指數生長之時期期間(「生長期」)的細胞培養中，且足夠完整以支持在此期期間的細胞培養的細胞培養基。生長細胞培養基亦可含有選擇劑，其向併入宿主細胞株中之可選擇標記賦予抗性或存活。此類選擇劑包括但不限於遺傳黴素(G4118)、新黴素、濕黴素B、嘌呤黴素、吉歐黴素、甲硫胺酸磺醯亞胺、胺甲喋呤、無麩醯胺細胞培養基、缺乏甘胺酸之細胞培養基、次黃嘌呤及胸苷、或單獨胸苷。

「產生」細胞培養基係指通常用於在當指數生長結束且蛋白產生開始時的過渡期間(「過渡」及/或「產物」期)的細胞培養中，且足夠完整以維持在此期期間的所欲的細胞密度、生存力、及/或產物效價的細胞培養基。

「灌注」細胞培養基係指通常用於藉由灌注或連續培養方法維持的細胞培養中，且足夠完整以支持在此過程期間的細胞培養的細胞培養基。灌注細胞培養基調配物可比基礎細胞培養基調配物更豐富或更濃縮，以適應用以移除用過培養基之方法。灌注細胞培養基可在生長期及產生期兩者期間使用。

濃縮細胞培養基可含有維持細胞培養所必需的營養素中之一些或所有；具體而言，濃縮培養基可含有鑑別或已知在細胞培養之產生期之時程

期間被消耗的營養素。濃縮培養基可基於幾乎任何細胞培養基調配物。此類濃縮饋料培養基可含有以例如約2X、3X、4X、5X、6X、7X、8X、9X、10X、12X、14X、16X、20X、30X、50X、100x、200X、400X、600X、800X、或甚至約1000X組分之正常量的細胞培養基之組分中之一些或所有。

用以製備細胞培養基之組分可完全研磨成粉末培養基調配物；與按需要添加至細胞培養基之液體補充物一起部分研磨；或以完全液體形式添加至細胞培養物中。

細胞培養物亦可補充有可能難以調配或在細胞培養物中快速耗減的具體營養素之獨立濃縮饋料。此類營養素可係胺基酸，諸如酪胺酸、半胱胺酸、及/或胱胺酸(參見例如，WIPO公開案第2012/145682號)。在一個實施例中，濃縮酪胺酸溶液獨立地饋料至生長於含有酪胺酸之細胞培養基中的細胞培養物，使得細胞培養物中酪胺酸之濃度不超過8 mM。在另一實施例中，濃縮酪胺酸及胱胺酸溶液獨立地饋料至生長於缺乏酪胺酸、胱胺酸、或半胱胺酸之細胞培養基中的細胞培養物。獨立饋料可在產生期之前或開始時開始。獨立饋料可藉由在與濃縮饋料培養基相同或不同天分批饋料至細胞培養基來實現。獨立饋料亦可在與灌注培養基相同或不同天灌注。

「無血清」應用於不含有動物血清(諸如胎牛血清)的細胞培養基。各種組織培養基(包括經定義之培養基)係可商購的，例如，可使用以下細胞培養基之任一者或組合：RPMI-1640培養基、RPMI-1641培養基、杜貝卡氏經改良依格氏培養基(DMEM)、最低必需培養基Eagle、F-12K培養基、漢姆氏F12K培養基、伊思考夫修改之杜貝卡氏培養基、麥考伊氏5A

培養基、萊柏維茲氏L-15培養基、及無血清培養基諸如EX-CELL™ 300系列(JRH Biosciences, Lenexa, Kansas)、以及其他細胞培養基。亦可獲得此類細胞培養基之無血清版本。細胞培養基可補充有額外或濃度增加的組分，諸如胺基酸、鹽、糖、維生素、激素、生長因子、緩衝液、抗生素、脂質、痕量要素、及類似者，其取決於欲培養之細胞之需要及/或所欲的細胞培養參數。

術語「生物反應器」意謂可用於細胞培養物之生長的任何容器。本揭露之生物培養物可生長於生物反應器中，其可基於藉由生物反應器中之細胞生長所產生的感興趣的蛋白之應用來選擇。生物反應器可為任何大小，只要其可用於細胞之培養即可；通常，生物反應器之大小適合於生長於其內部的細胞培養物之體積。通常，生物反應器將為至少1公升，且可為2公升、5公升、10公升、50公升、100公升、200公升、250公升、500公升、1,000公升、1500公升、2000公升、2,500公升、5,000公升、8,000公升、10,000公升、12,000公升或更大，或可為之間的任何體積。生物反應器之內部條件(包括但不限於pH及溫度)可在培養時期期間控制。熟習此項技術者基於相關考量應意識到，且應能夠選擇，用於實踐本發明之合適之生物反應器。

「細胞密度」係指給定體積的培養基中細胞之數目。「活細胞密度」係指給定體積的培養基中活細胞之數目，如藉由標準生存力檢定(諸如台盼藍染料排阻方法)所判定。

術語「細胞生存力」意謂培養物中之細胞在一組給定培養條件或實驗變化下存活的能力。術語亦指在具體時間為活著的細胞相對於在該時間培養物中細胞(活的及死亡的)之總數目的部分。

「填充細胞體積」(PCV)(亦稱為「百分比填充細胞體積」(%PCV))係細胞所佔據之體積與細胞培養物之總體積之比率，表現為百分比(參見 Stettler, 等人, (2006) *Biotechnol Bioeng.* Dec 20:95(6):1228-33)。填充細胞體積係細胞密度及細胞直徑之函數；填充細胞體積之增加可起因於細胞密度、或細胞直徑、或兩者之增加。填充細胞體積係細胞培養物中固體含量之量度。固體在收集及下游純化期間被移除。更多固體意謂在收集及下游純化步驟期間將固體物質與所欲產物分離之更多努力。同樣，所欲產物在收集過程期間可變得捕集在固體中並損失，導致產物產量降低。因為宿主細胞大小不同且細胞培養物亦含有死亡及瀕死細胞及其他細胞碎片，所以填充細胞體積係比細胞密度或活細胞密度更準確描述細胞培養物中固體含量的方式。例如，取決於細胞之大小，具有 50×10^6 個細胞/ml之細胞密度的2000 L培養物可具有許多不同的填充細胞體積。此外，一些細胞當處於生長停止狀態時大小將增加，所以在生長停止之前及在生長停止之後的填充細胞體積將可能是不同的，其歸因於細胞大小增加導致生物質增加。

「生長停止」(其亦可稱為「細胞生長停止」)係細胞之數目停止增加或當細胞週期不再進展時的點。生長停止可藉由判定細胞培養物之活細胞密度來監測。生長停止狀態的一些細胞大小可增加，但數目不增加，所以生長停止培養物之填充細胞體積可增加。若細胞非係健康衰退，則生長停止可藉由逆轉引起生長停止的條件來在一定程度上逆轉。

術語「效價」意謂給定量培養基體積中由細胞培養物所產生之感興趣的多肽或蛋白(其可為天然存在的或感興趣的重組蛋白)之總量。效價可以毫克或微克多肽或蛋白每毫升(或體積之其他量度)培養基之單位表現。

「累積效價」係在培養之時程期間細胞所產生之效價，且可例如藉由測量每日效價並使用該等值計算累積效價來判定。

術語「饋料分批培養」係指懸浮培養之形式，且意謂在培養過程開始後一次或數次向培養物提供額外組分的培養細胞之方法。所提供之組分通常包含在培養過程期間已耗減的細胞之營養補充物。另外或可替代地，額外組分可包括輔助組分(例如，細胞週期抑制化合物)。饋料分批培養通常在某一處停止，且將培養基中之細胞及/或組分收集並視情況純化。

術語「積分活細胞密度」或「IVCD」可互換使用，且意謂在培養之時程內活細胞之平均密度乘以培養進行的時間之量。

「累積活細胞密度」(CVCD)係藉由將兩個時間點之間的平均活細胞密度(VCD)與那兩個時間點之間的持續時間相乘來計算。CVCD係藉由對VCD之於時間繪圖所形成之曲線下面積。

本發明利用進行基因內互補以使用兩載體系統直接選擇編碼異質蛋白(諸如抗體)之表現構築體的可選擇標記。「基因內互補」係指遺傳物質(即，核酸)之節段之間的互補，各節段在相同基因座內具有不同缺失。由遺傳物質編碼之個別蛋白係有缺陷的且非功能性的，但兩種個別缺陷型蛋白可締合以形成活性蛋白。若個別缺陷型蛋白能夠締合併展現活性，則該等個別缺陷型蛋白稱為「互補」。對於由多個相同次單元(諸如GS)構成之可選擇標記蛋白而言，基因內互補可當突變體次單元係互補的時候發生。

「基因內互補」亦可發生在由遺傳物質所編碼之個別蛋白之片段之間，該等片段締合以形成活性蛋白。如本文中所述，高等真核生物中之成熟GS酶呈由兩個五聚環組成之十聚複合物形式存在。本發明證明了，GS之基因內互補可成功地用作用於產生表現重組蛋白之細胞株的選擇系統之

一部分。該系統在經遺傳修飾為麩醯胺合成酶缺失的CHO細胞中重組抗體之高水準表現方面的實用性。

藉由在編碼核酸中引入一或多個突變來使由遺傳物質所編碼之個別蛋白係有缺陷的且非功能性的，該(一或多個)突變改變蛋白之結構足以使其為非功能性的。該一或多個突變可藉由分子生物學領域中已知的任何方法引入。可替代地，可使用已使得係有缺陷的且非功能性的蛋白片段。在此類情況下，兩個蛋白片段可藉由基因內互補來締合以形成活性蛋白。

構築了編碼多肽及可選擇標記之突變體次單元的核酸分子，其以突變體次單元之表現與多肽之表現相關聯之方式佈置。因此，當將編碼互補突變體次單元之核酸分子引入至細胞中並應用選擇性條件時，各互補突變體次單元之大致相等且高水準的表現將提供最高可選擇活性。此外，可操作連接的多肽將以幾乎相等且高的量表現，因此使表現相等且高水準所欲多肽之細胞之選擇最佳化。

在本發明之一個實施例中，可選擇標記係麩醯胺合成酶(GS)，其活性位點定位在GS之兩個次單元之接頭處，所以互補、功能上受損的突變體次單元之共表現應得到一些完整功能性活性位點。個別突變體次單元單獨不具有顯著的可選擇活性，但當與其等互補突變體次單元共表現時提供可選擇活性。次單元之最佳活性可取決於其等相互作用，且因而可藉由相互作用域來促進。此類相互作用域可內源於次單元，或其可異源於次單元。可用於本發明中之額外可選擇標記包括精胺基琥珀酸解離酶、腺苷醯琥珀酸合成酶、及麩胺酸脫氫酶，可鑑別其等互補突變體。例如，與精胺基琥珀酸解離酶突變體之基因內互補可藉由不存在精胺酸之情況下的生長來確定，而與腺苷醯琥珀酸合成酶突變體之基因內互補可藉由不存在腺苷

之情況下的生長來確定。

在一個非限制性實施例中，本發明需要使用可選擇標記之兩個片段，各片段可表現為相互作用域之融合蛋白。當表現時，相互作用域促進兩個片段之締合或二聚化，從而允許次單元起作用並提供可選擇活性(例如，但不限於Pelletier等人 (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:12141-12146所述者)。合適之選擇性標記包括GS及上文所述之其他可選擇標記，以及可選擇標記諸如賦予通常為毒性的具體藥品之抗性的那些，及在規定條件下賦予細胞存活或誘導細胞死亡的代謝酶，如本文中所揭示。

「相互作用域」係包括但不限於能夠促進兩個或兩個以上同源或異源多肽之相互作用或締合之多肽的域。在一個實施例中，相互作用域係二聚化域。二聚化域可為能夠誘導兩個多肽之相互作用或締合之多肽。存在兩種類型的二聚體，其等能夠形成同二聚體(與相同序列)或異二聚體(與另一序列)。

在一個說明性但非限制性實施例中，相互作用域係白胺酸拉鍊捲曲螺旋多肽。白胺酸拉鍊通常包含約35個胺基酸，其含有特徵的七殘基重複，其中疏水性殘基在重複之第一及第四殘基處(Harbury等人 (1993), *Science* 262:1401)。因此，白胺酸拉鍊適合於出於使多肽寡聚合之目的融合至多肽，因為其係小分子且與較大相互作用域相比較不可能破壞多肽正常功能。白胺酸拉鍊之實例包括但不限於多肽之白胺酸拉鍊域，諸如GCN4、C/EBP、c-Fos、c-Jun、c-Myc、及c-Max。

二聚化域之額外實例包括螺旋-環圈-螺旋域(Murre等人 (1989), *Cell* 58:537-544)。視網酸受體、甲狀腺激素受體、其他細胞核激素受體(Kurokawa等人 (1993), *Genes Dev.* 7:1423-1435)、及酵母轉錄因子

GAL4及HAP1 (Marmonstein等人 (1992), Nature 356:408-414 ; Zhang等人 (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2851-2855 ; 美國專利第5,624,818號)所有皆具有帶有此基序之二聚化域。

在又另一實施例中，相互作用域係四聚化域，其係能夠結合三個其他四聚化域以形成四聚複合物的多肽。含有四聚化域之蛋白之實例包括但不限於大腸桿菌乳糖抑制物(胺基酸46-360 ; Chakerian等人 (1991), J. Biol. Chem. 266:1371 ; Alberti等人 (1993), EMBO J. 12:3227 ; 及Lewis等人 (1996), Nature 271:1247) , 及在殘基322-355處之p53四聚化域 (Clore等人 (1994), Science 265:386 ; Harbury等人 (1993), Science 262:1401 ; 美國專利第5,573,925號)。

在一替代性實施例中，本發明需要使用可選擇標記之三個次單元，各次單元表現為相互作用域之融合蛋白，從而增強締合以提供可選擇活性。在此實施例中，存在異質複合物之三種組分。在(一或多個)經表現之載體中，其各自之編碼序列可操作地連接至可選擇標記之各別次單元之各者之編碼序列，例如表現單一重鏈及兩條不同輕鏈之雙特異性抗體，其中該兩條輕鏈均能夠與該重鏈締合。本發明亦涵蓋使用已知的或有待揭示的具有四個或甚至更多個次單元的可選擇標記。

本發明亦可用於製備異多聚(或異寡聚)蛋白，其含有三個或更多個次單元，諸如本文中先前所述者。這包括雙特異性抗體，及此項技術中已知的其他異多聚蛋白。例如，雙特異性抗體可藉由使用以下來表現：如本文中所述之能夠基因內互補之第一可選擇標記(例如，GS)，以表現第一抗體之重鏈及輕鏈；及不同的可選擇標記諸如斷裂代謝酶或抗性標記、或第二可選擇標記(其不同於第一可選擇標記且能夠基因內互補)，以表現第二抗

體之重鏈及輕鏈，該第二抗體能夠與該第一抗體締合以形成雙特異性抗體。

可替代地，可使用如本文所述之能夠基因內互補之第一可選擇標記(例如，GS)表現雙特異性抗體之兩條不同重鏈，其中該等重鏈能夠彼此締合。然後可使用不同的可選擇標記表現輕鏈。在一些情況下，雙特異性抗體之兩個臂之輕鏈可相同，其指明單一可選擇標記(代謝酶或抗性標記、或可選擇標記之其他形式)可用於表現輕鏈。可替代地，不同輕鏈可與雙特異性抗體之各不同重鏈締合，在此情況下，使用不同的可選擇標記諸如斷裂代謝酶或抗性標記、或第二可選擇標記(其不同於第一可選擇標記且能夠基因內互補)表現第一輕鏈及第二輕鏈。

如以下將在實例中顯示，已發現，本發明之方法及組成物減少選擇表現高水準異多聚蛋白之所欲細胞所必需的時間的量。因此，在又另一實施例中，本發明涵蓋選擇表現高水準重組多肽(具體而言，異多聚多肽)之細胞。另外，本發明在改善經由細胞培養過程產生異質複合物之方面具有特別實用性。

在一些實施例中，編碼突變體標記次單元之核酸同框融合至編碼連接子之核酸，其隨後同框融合至編碼相互作用域之核酸。連接子可包括允許相互作用域相互作用並允許次單元起作用以提供可選擇活性的任何相對短的、可撓性序列。連接子之實例在相關技術中係豐富的，且可包含GGPGG、GPGGG，其中在單一字母胺基酸密碼子中，G係甘胺酸且P係脯胺酸。在一個實施例中，密碼子為例如Curtis等人(1991; Proc Natl Acad Sci 88(13):5809-5813)所述之一系列甘胺酸及絲胺酸殘基。

在一個實施例中，兩個互補突變體次單元由兩個載體表現，其中第

一載體包含編碼第一多肽之第一核酸，且其中第一核酸可操作地連接至編碼可選擇標記之突變體次單元之第二核酸。第二載體包含編碼多肽之第三核酸，該多肽能夠與第一核酸所編碼之第一多肽締合，其中該第三核酸可操作地連接至編碼可選擇標記之互補突變體次單元之第四核酸。因此，兩個載體同時引入至細胞群中，且應用基因內互補之選擇。

在另一實施例中，兩個互補片段由兩個載體表現，其中第一載體包含編碼第一多肽之第一核酸，且其中第一核酸可操作地連接至編碼可選擇標記之片段之第二核酸。第二載體包含編碼多肽之第三核酸，該多肽能夠與第一核酸所編碼之第一多肽締合，其中該第三核酸可操作地連接至編碼可選擇標記之互補片段之第四核酸。因此，兩個載體同時引入至細胞群中，且應用基因內互補之選擇。

例如，表現抗體之兩載體系統係藉由製備包含編碼抗體之一條鏈之第一核酸的第一載體來構築，其中該第一核酸可操作地連接至編碼mutGS-NT之第二核酸。第二載體包含編碼抗體之另一條鏈之第三核酸，其中該第三核酸可操作地連接至編碼mutGS-CT之第四核酸。因此，在一個實施例中，該第一核酸編碼免疫球蛋白重鏈，且該第三核酸編碼免疫球蛋白輕鏈。可替代地，該第一核酸編碼免疫球蛋白輕鏈，且該第三核酸編碼免疫球蛋白重鏈。

在另一實施例中，兩個互補片段由兩個載體表現，其中第一載體包含編碼第一多肽之第一核酸，且其中第一核酸可操作地連接至編碼可選擇標記之片段之第二核酸。第二載體包含編碼多肽之第三核酸，該多肽能夠與第一核酸所編碼之第一多肽締合，其中該第三核酸可操作地連接至編碼可選擇標記之互補片段之第四核酸。因此，兩個載體同時引入至細胞群

中，且應用基因內互補之選擇。

在此情況下，表現抗體之兩載體系統係藉由製備包含編碼抗體之一條鏈之第一核酸的第一載體來構築，其中該第一核酸可操作地連接至編碼N端麩醯胺合成酶片段之第二核酸。第二載體包含編碼抗體之另一條鏈之第三核酸，其中該第三核酸可操作地連接至編碼C端麩醯胺合成酶片段之第四核酸。因此，在一個實施例中，該第一核酸編碼免疫球蛋白重鏈，且該第三核酸編碼免疫球蛋白輕鏈。可替代地，該第一核酸編碼免疫球蛋白輕鏈，且該第三核酸編碼免疫球蛋白重鏈。

額外實施例包括使用允許mutGS次單元之一或兩者之表現的一或多個IRES。在本發明之上下文中，「IRES」意謂內部核糖體進入位點，其促進mRNA從內部位點(即，非係mRNA之5'末端之位點)之轉譯之起始。

合適之IRES之一個實例係腦心肌炎病毒(ECMV)之IRES，如Jang及Wimmer Genes & Development 4 1560 (1990)以及Jang, Davies, Kaufman及Wimmer J. Vir. 63 1651 (1989)中所述。EMCV之殘基335-848形成合適之IRES；ECMV IRES之其他部分係已知的且將合適用於本發明中。IRES之合適之部分或變異體係將賦予第二開放閱讀框(ORF)之充分轉譯者。

另外，IRES之3'末端可改變(或突變)以減小轉譯效率，從而提供增強選擇及/或擴增方法之手段。例如，IRES之效率可藉由使用先前顯示以允許有效選擇及擴增之序列(Aldrich等人, Biotechnol Prog 19, 1433; 2003)來減小。替代性序列係已知的，或可藉由熟習此項技術者判定。

在另一實施例中，除可選擇標記之次單元及異質複合物之多肽之外，本發明進一步提供一種編碼不同功能性可選擇標記之核酸。出於本文

中之目的，「不同功能性可選擇標記」非係能夠基因內互補之可選擇標記之突變體次單元，而是具有不同可選擇活性的蛋白。熟知的標記諸如爭光黴素(zeomycin)、新黴素、嘌呤黴素、滅瘟素S、或賦予黴酚酸之抗性的GPT等等可用作不同官能性可選擇標記。另外，亦可使用能夠基因內互補之不同可選擇標記之互補突變體。

在此實施例中，本發明包含兩個載體，其中各載體包含：編碼可形成異質複合物之多肽之第一核酸，該第一核酸可操作地連接至編碼可選擇標記之至少一個突變體次單元之第二核酸；以及編碼不同功能性可選擇標記之核酸。此外，由各載體之第一核酸所編碼之各別多肽可締合以形成複合物，且各載體之第二核酸所編碼之一或多個次單元可締合以提供可選擇活性，且第三核酸所編碼之多肽提供不同於第二核酸所編碼之次單元之可選擇活性的可選擇活性。

例如，第一載體可編碼新黴素之抗性，且第二載體可編碼爭光黴之抗性，或僅一個載體可含有額外不同功能性可選擇標記。因此，將一個載體轉染至細胞株中，並應用選擇(即，將藥品G418添加至抗新黴素細胞)。在選擇之後，可使用習知方法判定是否存在載體，及載體上之核酸所編碼之多肽之表現水準，例如藉由PCR、南方墨點法、ELISA、西方墨點法、及類似方法。一旦已獲得高水準表現，就將第二載體轉染至細胞株中。在維持第一載體之選擇的同時，應用第二可選擇標記之選擇(即，爭光黴素抗性)，且評估第二載體之存在及各別載體編碼之蛋白之表現。在此實施例中，一旦已判定存在兩個載體，就應用如本文中所述之已締合於細胞中以提供可選擇活性之次單元之表現之選擇。

在一替代性實施例中，將本發明之編碼獨立的可選擇活性之兩種核

酸同時轉染，並同時應用選擇。一旦已判定存在兩個載體，就應用已締合於細胞中以提供可選擇活性之次單元之表現之選擇，如上文所述。

在又另一實施例中，將編碼獨立的可選擇活性之本發明載體各自轉染至分開的細胞株中。一旦應用選擇，且已鑑別出表現高水準的由各所欲載體所編碼之蛋白的純系，就將細胞如Hori等人(美國專利第5,916,771號)中所述來融合。一旦融合完成，就應用次單元所提供之可選擇活性之選擇。

在又另一實施例中，將視情況不含有獨立的可選擇活性的本發明核酸以第三載體同時轉染。第三載體編碼分開的可選擇活性諸如例如新黴素抗性或 β 半乳糖苷酶，從而可允許經成功轉染之細胞之初步選擇。一旦已執行此初步選擇，可應用突變體次單元之可選擇活性之選擇。在此實施例中，轉染相等量的兩個表現載體，同時以前兩個載體之三分之一濃度轉染第三載體(例如，3:3:1或6:6:1之比率，或類似比率)。熟習此項技術者應認識到，該等比率之變化在本發明之範疇內。

編碼所欲異質複合物之組分之核酸可藉由此項技術中已知的方法呈cDNA或呈基因體DNA獲得。例如，編碼所欲組分之信使RNA可採用RNA單離之標準技術從合適之來源單離出，並使用寡-dT纖維素層析法以隔離聚-A mRNA。當欲表現之異質複合物係抗體時，所欲核酸之合適之來源可從成熟B細胞或融合瘤培養物單離出。此外，用於本發明中之核酸可藉由化學合成來獲得。

除編碼異質複合物之所欲組分之核酸之外，載體構築體可包括促進原核細胞及/或真核細胞中之複製、將構築體整合至真核染色體中之額外組分，及有助於選擇及/或篩選含有該構築體之細胞的標記。本發明之載

體係重組DNA載體，其包括但不限於質體、噬菌體、噬菌粒、黏接質體、病毒、反轉錄病毒、及類似載體，該等載體將所欲核酸插入至細胞中。

當核酸置放成與另一核酸呈一功能性關係時，其係「可操作地連接」的。更特定言之，可操作地連接意謂編碼不同多肽之兩個不同核酸使轉錄被同時誘導。可操作地連接亦意欲意謂，經連接之核酸在單一轉錄單元中為連續的，同時從一或多個核糖體開始位點(例如，內部核糖體進入位點)引導轉移。編碼兩個不同多肽之經可操作地連接之轉錄單元稱為「雙順反子轉錄本」。

本發明之方法亦可結合已知的或有待發現的誘導重組蛋白之產生的方法使用。「誘導條件」意謂增加所欲重組蛋白之每細胞相對產量之技術。此類技術包括冷溫度變換、及增加化學品、及任何已知的或有待發現的技術之組合，僅舉幾個例子，以及任何有待描述及/或發現的誘導技術。通常，誘導高密度的細胞之分批培養物或灌注培養物以產生重組蛋白。常常，其他細胞過程(諸如生長及分化)經抑制，以便將大部分細胞能量引導至重組蛋白產生中。

具有次單元之任何可選擇標記均可用於本發明之方法及組成物中。如本文中所使用之術語「次單元」當指代可選擇標記時係指可選擇標記之一部分。此外，可選擇標記之第一突變體次單元(本文中稱為「初始突變體次單元」)可與相同可選擇突變體之第二互補突變體次單元(本文中稱為「互補突變體次單元」)一起表現，以提供單獨任一突變體次單元中不存在之可選擇活性水準。次單元亦可指具有由另一經突變之多肽互補之突變的多肽，其亦為可選擇標記之不同次單元。

賦予對動物細胞通常為毒性的具體藥品之抗性的可選擇標記可用於本發明之方法及組成物中。例如，抗性可選擇標記之非限制性實例如下：爭光黴素(zeo)；嘌呤黴素(PAC)；滅瘟素S (BlaS)、GPT(其賦予黴酚酸之抗性) (Mulligan及Berg (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072)；新黴素抗性基因，其賦予胺基糖苷 G-418 之抗性 (Colberre-Garapin 等人 (1981), J. Mol. Biol. 150:1)；及hygro，其賦予濕黴素之抗性(Santerre等人 (1984), Gene 30:147)。

在規定條件下賦予細胞存活或誘導細胞死亡的代謝酶亦可用於本發明之方法及組成物中。實例包括但不限於：二氫葉酸還原酶(DHFR)；單純疱疹病毒胸苷激酶(TK) (Wigler等人 (1977), Cell 11:223)、次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(HGPRT) (Szybalska及Szybalski (1962), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026)、及腺嘌呤磷酸核糖基轉移酶(APRT) (Lowy等人 (1980), Cell 22:817)，其等係可分別用於缺乏TK、HGPRT、或APRT之細胞中的基因。

在一個實施例中，麩醯胺合成酶(GS)係本發明之方法及組成物中所使用之可選擇標記。GS包含相同次單元之兩個堆疊的五聚環，其中十個活性位點係由一個次單元之N端殘基及相鄰次單元之C端殘基形成。製備N端(mutGS-NT)及C端(mutGS-CT)突變體構築體並評估互補。mutGS-NT及mutGS-CT均不允許缺乏麩醯胺之培養基中的細胞生長，然而，當將GS突變體細胞以兩個構築體轉染時，以類似水準經兩個構築體轉染的那些細胞在缺乏麩醯胺之培養基中存活。當發生以兩個此類突變體共轉染時，該等突變體稱為「互補」。可替代地，可使用表現內源GS之細胞，且轉染子可藉由賦予增加的甲硫胺酸磺醯亞胺(MSX)之毒性水準之抗性來選擇。

基於顏色選擇之可選擇標記亦可用於本發明之方法及組成物中。在一具體實例中，可使用 β -半乳糖苷酶(Blau等人, WO 98/44350)。螢光標記亦可用於本發明之方法中，例如，GFP已用於細胞之純系選擇以測量蛋白-片段互補檢定中之蛋白相互作用(Remy及Michnick (1999), Proc. Natl. Acad. Sci., 96:5394-5399)。類似地，螢光素共軛之胺甲喋呤可用以偵測表現互補DHFR片段之細胞(Remy及Michnick (2001), Proc. Natl. Acad. Sci., 98:7678-83)。螢光標記之優勢在於，此選擇可在任何動物細胞類型中進行，且不限於在代謝路徑中具有缺失的那些動物細胞類型，或不需要例如新黴素之藥品敏感性。

如本文中所使用之術語「多肽」包括天然存在之蛋白或僅重組表現之蛋白(包括轉譯前及轉譯後加工)或其片段，它們通常保留二級結構。蛋白係具有高分子量(從小蛋白[具有50-100個胺基酸]之約10,000至某些形式之大於1,000,000)之大分子；其等由不同量的相同的20種胺基酸組成，完整蛋白中之該等胺基酸經由稱為肽鍵之共價化學鍵聯合併。連接在一起的胺基酸形成稱為多肽鏈之線性未分支聚合結構；此類鏈可含有數百個胺基酸殘基；這些胺基酸殘基針對給定種類的蛋白以特定次序佈置。術語「肽」包括多肽或蛋白之短片段，其長度通常小於20個胺基酸。

術語「細胞培養」意謂包括細胞在多細胞有機體或組織外的生長及繁殖。通常，細胞培養係在無菌、經控制之溫度、及大氣條件下在組織培養板(例如，10-cm板、96孔板等等)中執行，或其他黏附培養(例如，在微載劑珠粒上)或以懸浮培養之形式(諸如在滾瓶中)。培養物可生長於搖瓶、小規模生物反應器、及/或大規模生物反應器中。生物反應器係用以培養細胞之裝置，在該裝置中可監測並調整環境條件諸如溫度、氣氛、攪

拌、及/或pH。許多公司(例如, ABS公司, Wilmington, Del.; Cell Trends公司, Middletown, Md.)以及大學及/或政府資助組織(例如, 細胞培養中心, Minneapolis, Minn.)提供基於合同的細胞培養服務。

培養物與選擇可選擇活性之試劑接觸的最佳時期長於一個正常生長週期之典型時期(例如, 對於中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞), 其中一個生長週期據報導係大致20-22小時(Rasmussen等人 (1998), Cytotechnology, 28:31-42))。同樣地, 在一個實施例中, 培養物包含可選擇條件, 例如, 藥品、代謝物、或彩色基質, 較佳持續至少約一天、更佳持續至少約3天、且甚至更佳持續至少約7天。

合適於在培養物中生長的多種動物細胞株可購自例如美國菌種保存中心(ATCC, Manassas, Va.)及NRRL (Peoria, Ill.)。通常用於工業或學院實驗室中的更多已建立細胞株中的一些包括CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、CV1、MDCK、293、3T3、PC12、骨髓瘤(myeloma) (例如, NSO)、及WI38細胞株, 僅舉幾個例子。在其他實施例中, 非動物細胞株可用於本發明之方法中, 例如, 植物細胞株、昆蟲細胞株(例如, sf9)、酵母細胞、或細菌細胞諸如大腸桿菌。

在一個實施例中, 使用GS-缺失CHO細胞諸如CHOZN® GS-/- ZFN-修飾CHO細胞(Sigma Aldrich Fine Chemicals, St. Louis MO)。GS-缺失CHO細胞(或其他哺乳動物細胞)亦可使用此項技術中已知的方法製備。另外, CHO細胞易於呈黏附培養物或懸浮培養物操縱, 且展現相對良好的遺傳穩定性。此外, 可使用熟習此項技術者熟知的技術(例如, 藉由轉型、病毒感染、及/或選擇)建立新的動物細胞株。

如上文所指出, 多種宿主-表現載體系統可用以表現本發明之異質複

合物。當異質複合物具有可溶性時，肽或多肽可自培養物回收，即在不分泌異質複合物之情況下自宿主細胞回收，且在細胞分泌異質複合物之情況下自培養基回收。然而，表現系統亦涵蓋表現錨定於細胞膜中之異質複合物的經工程改造之宿主細胞。

純化或富集來自此類表現系統之異質複合物可使用適當清潔劑及脂質微胞以及熟習此項技術者熟知的方法來實現。然而，此類經工程改造之宿主細胞自身可用於不僅保留異質複合物之結構及功能特性是重要的，而且例如在藥品篩選檢定中評估生物活性亦是重要的情形中。

藉由本發明之方法所表現之蛋白可被收集。此外，該蛋白可使用已知過程自此類培養物或組分(例如，自培養基或細胞萃取物或體液)經純化、或經部分純化。短語「經部分純化」意謂，已進行了某一或某些分餾程序，但存在多於所欲蛋白的多肽種類(至少10%)。「經純化」意謂，蛋白係基本上均質的，即，存在小於1%的污染蛋白。分餾程序可包括但不限於以下之一或多個步驟：過濾、離心、沈澱、相分離、親和純化、凝膠過濾、離子交換層析法、粒徑排阻層析法(SEC)、疏水性相互作用層析法(HIC；使用如苯醌、丁醌、或丙醌之樹脂)、HPLC、或上述之一些組合。

本發明亦視情況涵蓋進一步調配該等蛋白。術語「調配」意謂該等蛋白可為最終使用者經緩衝液交換、殺菌、鬆散填充、及/或填充。出於本發明之目的，術語「無菌鬆散形式」意謂，調配物不含或基本上不含微生物污染(達到諸如食品及/或藥品目的可接受之程度)，且具有經限定之組成及濃度。

術語「無菌單位劑量形式」意謂適合於顧客及/或患者投與或消耗之

形式。此類組成物可包含有效量的蛋白，以及其他組分諸如生理學上可接受之稀釋劑、載劑、或賦形劑。術語「生理學上可接受」意謂不干擾(一或多種)活性成分之生物活性之有效性的非毒性物質。

針對本發明，開發了多組編碼哺乳動物GS蛋白之N端改變(mutGS-NT)的不活化突變，以及多組編碼該蛋白之C端改變(mutGS-CT)的不活化突變。使GS催化位點進行丙胺酸掃描，在該位點中突變個別地且組合地發生於涉及結合麩胺酸鹽、ATP、及/或氨之所有進化上保守的丙胺酸殘基。將大多數殘基基於來自公開的GS酶之X射線結晶學及生物化學研究來選擇，但將活性位點中在4.5 Å的基質/配位子/金屬內的所有殘基評估為潛在的候選者。鑑別N端及C端催化受損但結構上完整的GS突變體之組合，並評估它們經共表現時彼此互補以恢復一些GS活性的能力。

藉由將抗體之一條鏈之表現與mutGS-NT或N端GS片段連接並將另一條鏈之表現與mutGS-CT或C端GS片段連接來構築兩載體系統。構築一種表現載體，其具有驅動抗體重鏈(HC)在單一mRNA上之表現之啟動子/強化子及允許mutGS-NT或N端GS片段之表現的IRES。分開地，藉由構築具有驅動LC之表現的啟動子/強化子及允許mutGS-CT或C端GS片段之表現的IRES之載體，將抗體之輕鏈(LC)之表現連接至mutGS-CT或C端GS片段。mutGS-NT及mutGS-CT、N端或C端GS片段自身均不允許缺乏麩醯胺之培養基中之細胞生長。然而，當以兩種構築體轉染GS突變體細胞時，那些以類似水準經兩種構築體轉染之細胞允許缺乏麩醯胺之培養基中之存活。那些細胞亦產生類似量的感興趣的抗體之LC及HC。可藉由降低IRES之效率，導致mutGS可選擇標記之轉譯減少，或可能藉由增加GS抑制劑L-甲硫胺酸磺醯亞胺(MSX)來進一步增加選擇之嚴格性。

本發明之範疇不限於本文中所述之意欲作為本發明之個別態樣之單一說明的特定實施例，且在功能上等效之方法及組分均在本發明之範疇內。事實上，除本文中所示及所述之修改之外，熟習此項技術者根據前述描述及隨附圖式將明白對本發明之各種修改。此類修改意欲屬於隨附申請專利範圍之範疇。

實例

實例1

此實例描述鑑別為可能可用於基因內互補之麩醯胺合成酶(GS)突變體之選擇及製備。選擇4個鼠類GS之N端殘基(W60、N61、D63、及S66)及11個C端殘基(E134、E136、E196、E203、N248、H253、N255、R319、R324、E338、及R340)用於丙胺酸突變掃描中之評估。個別及重組突變體構築體產生於pcDNA3.3載體(新黴素抗性，Invitrogen Grand Island, NY)中，得到總計9個N端突變體構築體及16個C端突變體構築體。

針對CHO-K1細胞株中完整GS蛋白之表現評估突變體構築體。在36℃、5% CO₂、70%相對濕度下，於排氣型搖瓶中之含有麩醯胺之非選擇性化學性限定生長培養基中培養細胞，並於加濕培育箱中以150-160 rpm振盪。以ViCell自動細胞計數器(Beckman-Coulter公司, Brea, CA)測量活細胞密度(VCD)及生存力。藉由每3-4天稀釋來使培養物傳代。

藉由電穿孔將每種條件下一百萬個細胞以10微克線性化DNA轉染(生物學一式三份)。根據製造商之建議，在37℃下，將DNA以PvuI-HF限制酶(New England Biolabs, Ipswich, MA)線性化隔夜。使用瓊脂糖凝膠電泳確定各質體之完全線性化。在限制消化之後，在-70℃下，藉由向各消

化物中添加10%反應體積的3 M乙酸鈉及200%反應體積的100%乙醇來將DNA沈澱隔夜。在乙醇沈澱之後，DNA集結成粒，將球粒以70%乙醇洗滌一次，風乾，且再懸浮於HEPES緩衝鹽水中。在NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE)上測量DNA濃度，且以HEPES緩衝鹽水調整至1微克/微升。

對於基因內互補測試，使用各自5毫克的兩種質粒以及10微克經剪切之鮭精DNA (Invitrogen)。藉由以下建立轉染：將來自第3天生長培養物之每種條件下一百萬個細胞旋轉下沉(spinning down)；將細胞再懸浮於150微升HEPES緩衝鹽水中；添加總計10微克的質粒DNA（各質粒5微克）及10微克；且將混合物轉移至96孔電穿孔板(Bio-Rad Laboratories公司, Hercules, CA)之孔中。

電穿孔係使用Gene Pulser MXcell™ (Bio-Rad Laboratories公司, Hercules, CA)於96孔板中執行，其中設置如下：指數波，電壓=290 V，電容=950 microF，電阻=950歐姆。在電穿孔之後，將細胞轉移至排氣型24深孔板(24DWP)中之2 ml/孔經預熱之非選擇性生長培養基中，且在加濕Kühner培育箱(Kühner AG, Basel, Switzerland)中以220 rpm振盪。

在轉染後三天，將細胞計數，且以 1×10^6 個活細胞/mL轉移至選擇性培養基(缺乏麩醯胺之化學性限定生長培養基)中。藉由每3-4天使細胞在選擇性培養基中連續傳代直至所恢復的培養物生存力高於90%來產生穩定的匯集物。於試劑中培育細胞(將培養物1:10稀釋至以工作濃度(1:50 PBS稀釋液)的ViaCount FLEX試劑(EMD Millipore, Billerica, MA)中)15分鐘之後，在Guava EasyCyte™ HT流式細胞儀(EMD Millipore, Billerica, MA)上使用ViaCount檢定模組執行細胞計數。

使所有匯集物恢復至至少90%生存力，之後在功能檢定中測試。在匯集物產生之後，執行三份匯集物之西方墨點法分析，以確定各構築體之GS蛋白過表現之水準並判定是否有任何突變干擾了完整GS蛋白之產生。

對於西方墨點法分析，將3 x 10⁶個細胞於冰上溶解於補充有無EDTA Halt蛋白酶及磷酸酶抑制劑混合物(Thermo Scientific, Rockford, IL)之100微升RIPA緩衝液(Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL)中持續30分鐘。藉由以13,000 rpm離心清除溶解產物，添加4x裝載緩衝液(Invitrogen, Grand Island, NY)，且將樣本在95℃下煮沸5分鐘。將15 µl各樣本在E-Page 48凝膠(Invitrogen, Grand Island, NY)上運作，且使用iBlot (Invitrogen, Grand Island, NY)轉移至PVDF膜。在4℃下以1:500小鼠抗麩醯胺合成酶抗體(Cat # 610518, BD biosciences, San Jose, CA)探測各膜隔夜，接著以1:2,000抗小鼠Alexa Fluor 680二級抗體(Life Technologies, Grand Island, NY)培育。在Odyssey紅外成像系統(LI-COR, Lincoln, NE)上掃描墨點，且使用ImageJ軟體定量。

表1：所測試之鼠類麩醯胺合成酶突變體

經選擇之GS突變體 (丙胺酸掃描)	突變體類別	完整GS蛋白	序列ID
W60A	N端	是	2
N61A	N端	是	3
D63A	N端	是	4
S66A	N端	是	5
W60A N61A D63A (NT1)	N端	是	6
W60A N61A S66A	N端	是	7
W60A D63A S66A	N端	是	8
N61A D63A S66A	N端	是	9
W60A N61A D63A S66A (NT2)	N端	是	10

E134A	C端	是	11
E136A	C端	是	12
E196A	C端	是	13
E203A	C端	是	14
N248A	C端	是	15
H253A	C端	是	16
N255A	C端	是	17
R319A	C端	是	18
R324A	C端	是	20
E134A E136A E196A E203A	C端	是	21
N248A H253A N255A	C端	是	22

儘管初始分析指明胺基酸殘基E388及R340為突變之候選殘基，但是E388A及R340A GS突變體之過表現(呈單一突變或結合其他突變)並不產生完整GS蛋白。因此，不再考慮含有這些突變之構築體。

因為穩定的突變體GS匯集物產生於野生型CHO-K1親代細胞株中，該細胞株具有功能性GS酶，所以在缺乏麩醯胺且補充有25 microM GS抑制劑L-甲硫胺酸磺醯亞胺(MSX)之選擇性培養基中以生長/生存力篩選執行突變體活性評估。野生型CHO-K1細胞在選擇性培養基中4次傳代之後死亡。某些N端及C端突變阻止選擇性培養基中之培養物生長，但是即使生長受損的匯集物亦保留了相對高的生存力。

經個別GS N端突變體轉染之細胞之生長類似於野生型構築體，所以不再測試這些構築體。然而，兩種N端多重突變體構築體W60A N61A D63A (mutGS-NT1; SEQ ID NO:6)及W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10)產生高水準的經過表現之GS蛋白且在功能檢定中表現得最接近於空載體陰性對照，於是選擇它們用於進一步分析。此外，兩種其他N端突變體構築體W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3;

SEQ ID NO:25) 及 W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19)係為了盡力增加互補作用之嚴格性而製備，於是對它們進行評估。在後一構築體中，天冬胺酸-63突變成精胺酸而非丙胺酸，因為魚腥藻(*Anabena azollae*)中之類似突變體完全消除生物合成活性且表現與野生型相同，然而丙胺酸之突變保留6.5%的生物合成活性(Eur. J. Biochem. 266, 1202 (1999) Crespo等人)。

雖然若干單一C端突變體構築體通過了功能評估，但是選擇含有多重突變之兩種構築體E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1; SEQ ID NO:21)及N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22)用於進一步分析。

實例2

此實例描述GS中之突變對重組異二聚蛋白(即，單株抗體(mAb))之表現的作用。將實例1中所述之經選擇之N端及C端突變體選殖至mAb表現載體中以構築兩載體系統之多重組合，其中輕鏈(LC)之表現經由IRES連接至mutGS-CT，且重鏈(HC)連接至mutGS-NT。根據製造商之指示(Sigma-Aldrich St. Louis, MO)，使用CompoZr® Knockout ZFN Kit-CHO GS構築CHO-K1 GS剔除細胞株。將CHO-K1麩醯胺合成酶剔除(CHO-K1 GS-KO)細胞株如先前所述培養。

使用含有連接至野生型GS (陽性對照)或經選擇之N端及C短突變體之mAb LC或HC之載體執行一式三份的CHO-K1 GS剔除轉染，且於缺乏麩醯胺之培養基中培養。將含有野生型GS之初始pcDNA3.3載體用作額外陽性對照。藉由在無麩醯胺之培養基中傳代20天，pcDNA3.3野生型GS匯集物及mAb連接之野生型GS匯集物恢復高於90%的生存力。與此相反，在

無麩醯胺之培養基中17天之後，經模擬轉染之匯集物及所有mAb連接之突變體GS匯集物死亡，其確定經選擇之突變體產生功能上受損的GS蛋白產物。

最後，為了在CHO-K1 GS剔除細胞株中產生mAb之匯集物，針對在兩載體表現系統內的GS基因內互補評估經選擇之N端及C端突變體。將這些細胞以在GS序列中具有經指出之突變的基因內互補載體A (LC:mutGS-CT)及B (HC:mutGS-NT)轉染(示出於以下表2中)。所有經評估之mutGS-CT/mutGS-NT組合均能夠在無麩醯胺之培養基中25天內恢復至大致90%的生存力。兩載體LC:mutGS-CT/HC:mutGS-NT匯集物之生存力下降較大，且比含有野生型GS之單一載體陽性對照需要更長時間在選擇性培養基中恢復。

以10天饋料分批產生檢定針對mAb表現進一步評估所產生之一式三份的穩定的匯集物。產生檢定係由以1:5分開的第4天生長培養物藉由稀釋至24DWP中之化學性限定產生培養基中(約 0.5×10^6 個活細胞/ml)建立。使用Guava ViaCount檢定(Millipore, Billerica, MA)，在第3天、第6天、第8天、及第10天檢測培養物生長及生存力。以化學性限定饋料培養基在第3天、第6天、及第8天執行推注饋料。使用比色PolyChem (Polymedco, Cortlandt Manor, NY)試劑在饋料當天測量培養基葡萄糖濃度，且以50%葡萄糖儲備溶液調整至12 g/L。在第10天藉由使用POROS A/20蛋白A管柱之親和高效液相層析術(HPLC)判定培養物上清液之產生結束效價。以含有經由IRES連接至個別GS突變體之個別mAb鏈之GS基因內互補兩載體系統所產生之所有匯集物均產生可偵測水準的抗體；值示出於以下表2中(實例3)。

實例3

此實例描述藉由減小IRES GS接頭效率來增加選擇之嚴格性從而增加經轉染之匯集物中之抗體效價的方法。初始構築體中之序列係直到ATG-12的野生型EMCV序列，ATG-12融合至GS之起始密碼子(Davies及Kaufman, J Virol 66, 1924; 1992)。IRES之效率係藉由使用先前顯示以允許有效選擇及擴增之序列(Aldrich等人, Biotechnol Prog 19, 1433; 2003)來減小。將更有效的(ED3)接合中接頭之DNA序列與下文不太有效的接合(317)之DNA序列比較。ED3序列之下的數字指示WT EMCV中所見的ATG。最後一個ATG表示GS之起始密碼子。

317	GATGATAATACCCTCGAGATCCGTGCCATCATG	(SEQ ID NO:23)
ED3	GATGATAATATGGCCACAACCATG	(SEQ ID NO:24)
	10 11 12	

表現載體與圖1中所示者相同，非係與IRES及GS之接頭處之序列相同。以具有不太有效的IRES-GS接合之兩個質體轉染細胞得到轉染後較低的生存力及較長的恢復時間。三種CT1-NT4轉染中僅兩種CT1-NT4轉染恢復，且其他mutIRES組合中沒有恢復。然而，對於恢復的那些mutIRES組合，10天饋料分批培養得到0.55 g/L (一個匯集物)及0.17 g/L(另一匯集物)。這些匯集物之比生產率分別為16 p/c/d及6.9 p/c/d。0.55 g/L效價超過先前所報導之效價，且不需要實現那些效價的FACS分選(Ye, J. 等人 Biotechnol Prog 26, 1431; 2010)。

表2：具有不同IRES-GS接合之基因內GS轉染子之表現。

構築體	效價平均值(n=3) g/L	qP平均值(n=3) p/c/d
CT1-NT1	0.08	1.17
CT1-NT2	0.05	0.76
CT1-NT3	0.05	0.82
CT1-NT4	0.07	0.82
CT2-NT1	0.04	0.59
CT2-NT2	0.05	0.72
CT2-NT3	0.06	0.87
CT2-NT4	0.04	0.56
CT2-NT4 MSX 1	0.29	9.18
mut IRES CT1-NT4 1	0.55	15.69
mut IRES CT1-NT4 3	0.17	6.86

標記CT1-NT1-4及CT2-NT1-4之所有樣本均使用pED3接頭(SEQ ID NO:24)。標記mutIRES之樣本具有SEQ ID NO:23中所示之不太有效的IRES。

實例4

係實例描述增加這些培養物之選擇性的另一策略。轉染係如實例2中所述執行，但在選擇期間，將GS抑制劑MSX添加至培養物中以選擇較高水準的GS表現。具有更有效的(即，非突變體)IRES之三種CT2-NT4培養物中有一種恢復，而CT1-NT4或具有突變體IRES之轉染子均沒有恢復。對於恢復的單一培養物，10天饋料分批培養得到0.29 g/L，其中比生產率為9.18 p/c/d(參見上文表2)。

實例5

此實例描述大量mut IRES CT1-NT4轉染之結果。這些構築體具有

SEQ ID NO:23中所示之不太有效的IRES。使用含有mut IRES CT1-NT4之載體執行總計88種CHO-K1 GS剔除轉染。88種轉染中總計10種在選擇中存活，且在大致25天的培養之後得到茁壯生長的轉染匯集物，且行為類似於實例2中之較少量轉染。在無麩醯胺培養基中17天之後，經模擬轉染之匯集物GS匯集物死亡。

以10天饋料分批產生檢定針對mAb表現進一步評估一式兩份的穩定的匯集物。產生檢定係由第4天生長培養物藉由以 0.6×10^6 個活細胞/ml接種至24DWP中之化學性限定產生培養基中建立。使用Guava ViaCount檢定(Millipore, Billerica, MA)，在第3天、第6天、第8天、及第10天檢測培養物生長及生存力。以化學性限定饋料培養基在第3天、第6天、及第8天執行推注饋料。使用比色PolyChem (Polymedco, Cortlandt Manor, NY)試劑在饋料當天測量培養基葡萄糖濃度，且以50%葡萄糖儲備溶液調整至12 g/L。在第10天藉由使用POROS A/20蛋白A管柱之親和高效液相層析術(HPLC)判定培養物上清液之產生結束效價。以含有經由IRES連接至個別GS突變體之個別mAb鏈之GS基因內互補兩載體系統所產生之所有匯集物均產生相對高水準的抗體，其中兩種匯集物平均超過1g/L；值示出於表3中。

表3：具有mut IRES-GS接合之基因內CT1-NT4 GS轉染子之表現。

構築體	效價平均值(n=2) g/L	qP平均值(n=2) p/c/d
mut IRES CT1-NT4 4	0.425	14.10
mut IRES CT1-NT4 5	0.76	13.02

mut IRES CT1- NT4 6	0.57	11.05
mut IRES CT1- NT4 7	1.025	11.64
mut IRES CT1- NT4 8	0.44	6.73
mut IRES CT1- NT4 9	1.055	11.74
mut IRES CT1- NT4 10	0.6	12.16
mut IRES CT1- NT4 11	0.375	7.61
mut IRES CT1- NT4 12	0.56	7.21
mut IRES CT1- NT4 13	0.81	14.06

實例6

此實例描述麩醯胺合成酶之分子互補方法。將麩醯胺合成酶表現為兩個獨立的片段，且酶活性藉由兩個片段之遺傳互補而完全再組。產生一系列構築體，其等在各種殘基處斷裂麩醯胺合成酶。這些點係基於來自酶之分子結構的資訊。將這些構築體在基於細胞之檢定中測試其等拯救缺失麩醯胺合成酶活性之細胞株之能力。根據此測試，鑑別出若干片段，該等片段能夠充分拯救麩醯胺合成酶缺失細胞，且因此證明，這些片段可締合以產生完全功能性麩醯胺合成酶。

許多先前關於蛋白片段互補的工作已使用呈功能性單體存在且重新組裝僅需要經設計之片段的蛋白。此工作證明了使用分子互補以再現GS單體之活性及十聚功能性酶複合物之後續形成的能力。藉由使用分子模型化方法鑑別互補蛋白片段，以尋找GS單體中可允許將蛋白斷裂的區。亦將GCN4白胺酸拉鍊(LZ)及可撓性連接子添加至分開的片段以幫助重新組裝。所測試之片段示出於表4中，且這些研究中所使用之鼠類GS蛋白之序列示出於表5中。將GS片段選殖至哺乳動物表現載體中，且轉染至缺失GS活性之CHO細胞中。這些細胞通常可僅存活於補充有麩醯胺之細胞培養基中。藉由將麩醯胺從培養基移除來測試這些構築體拯救這些細胞之能力。

表4：GS分子互補片段設計：

1.	N端 -- E110 -- LZ	LZ -- T111 -- C端
2.	N端 -- Y104 -- LZ	LZ -- N105 -- C端
3.	N端 -- S125 -- LZ	LZ -- N126 -- C端
4.	N端 -- N126 -- LZ	Q127 -- C端 -- LZ
5.	N端 -- E264 -- LZ	LZ -- N265 -- C端

N端LZ =

MSDRMKQLEDKVEELLSKVYHLENEVARLKKLVGERGGGGSGGGG
GS

C端LZ =

GGGGSGGGGGSSDRMKQLEDKVEELLSKVYHLENEVARLKKLVGER
-STOP

表5：這些研究中所使用之小鼠GS酶之序列及經強調之斷裂點

1 MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCE
51 PKCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCE
101 VFKYNRKPAETNLRHICKRLMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWP
151 SNGFPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACL YAGVKITGTNAEVMMPA
201 QWEFQIGPCEGIRMGDHL WIA RFILHRVCEDFGV IATFDPKPIPGNWNGA
251 GCHTNFSTKAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRL
301 TGFHETSNINDFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYA
351 VTEAIVRTCLLNETGDEPFQYKN*

Y 104 E 110 S 125 N 126 E 264

如圖2中所示，構築體1、2、3、及5能夠成功拯救麩醯胺合成酶缺失細胞。這證明，這些片段能夠在體內形成完全功能性麩醯胺合成酶。拯救結果之概述示出於表6中。作為對照，評估是否單獨A或B片段之任一者能夠拯救麩醯胺合成酶缺失細胞株。如圖4中所示，單獨A或B片段均不能拯救麩醯胺合成酶缺失細胞株，其確定使麩醯胺合成酶活性恢復需要這兩種片段。

表6：表4中所述之GS片段之拯救動力學。

WT	4/4	14
1.	2/4	約30
2.	4/4	18
3.	4/4	約24
4.	0/4	無恢復
5.	4/4	約24

接著在含有抗體輕鏈及重鏈基因之表現載體之情況下測試這些細胞互補構築體，以評估其等在細胞株發展選擇系統中之實用性。將兩個表現載體改造成含有如表 4 中所示之互補麩醯胺合成酶片段，一個含有抗體輕鏈基因，且第二個含有抗體重鏈基因(圖 4)。亦將 IRES 序列替換成經由同框 ATG 之突變所減毒之版本(BioTechniques 20:102-110 1996 年 1 月)。這將相較於抗體基因進一步降低表現之麩醯胺合成酶片段之水準，且增加

系統之選擇嚴格性，以達成偏向於在高轉錄活性位點處基因體整合的選擇性壓力水準。此研究之結果示出於圖 6 中。構築體 1、2、3、及 5 在此檢定中經測試，且以兩種定向將重鏈及輕鏈基因連接至麩醯胺合成酶 A 及 B 片段之各者。來自構築體 2 之含有麩醯胺合成酶片段之載體能夠在無麩醯胺培養基中之選擇中存活。

在 10D 饋料分批生產率檢定中評估來自構築體 2 選擇匯集物之細胞之生產率，並與使用表現全長 GS 酶之載體選擇之對照匯集物比較。如圖 6 中所示，來自構築體 2 之細胞證明高生產率。

[序列表]

SEQ ID NO:1

>天然 murGS

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
FPGPQGPPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:2

>muGS W60A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
KCVEELPEANFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
FPGPQGPPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:3

>muGS N61A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
KCVEELPEWAFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG

FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:4

>muGS D63A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEWNFAGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:5

>muGS S66A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEWNFDGSATFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:6

>muGS W60A N61A D63A NT1

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEAAAFAGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:7

>muGS W60A N61A S66A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEAAFDGSATFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:8

>muGS W60A D63A S66A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEANFAGSATFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF

QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:9

>muGS N61A D63A S66A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
KCVEELPEWAFAGSATFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
FPGPQGPPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:10

>muGS W60A N61A D63A S66A NT2

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
KCVEELPEAAAFAGSATFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
FPGPQGPPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:11

>muGS E134A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMAQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:12

>muGS E136A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQAYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:13

>muGS E196A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAAVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST

KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:14

>muGS E203A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
FPGPQGPPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWAF
QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:15

>muGS N248A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
FPGPQGPPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWAGAGCHTNFST
KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:16

>muGS H253A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCATNFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:17

>muGS N255A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTAFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:18

>muGS R319A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN

DFSAGVANAGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:19

>MUGS W60A N61A D63R S66A NT4

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
KCVEELPEAAFRGSATFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMQAQWFEF
QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:20

>muGS R324A

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMQAQWFEF
QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
DFSAGVANRGASIAIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:21

>muGS E134A E136A E196A E203A CT1

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP

KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMAQAYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAAVMPAQWAF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCCLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:22

>muGS N248A H253A N255A CT2

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWAGAGCATAFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCCLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:23

>317 IRES 接頭

GATGATAATACCCTCGAGATCCGTGCCATCATG

SEQ ID NO:24

>ed3 IRES 接頭

GATGATAATATGGCCACAACCATG

SEQ ID NO:25

>muGS W60A N61A D63A S66A D76A NT3

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCEP
 KCVEELPEAAFAGSATFQSEGSNSAMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSNG
 FPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPAQWEF
 QIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCHTNFST
 KAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHETSNIN
 DFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYAVTEAIVRTCLLNE
 TGDEPFQYKN*

SEQ ID NO:26

MSDRMKQLEDKVEELLSKVYHLENEVARLKKLVGERGGGGSGGGGGS

SEQ ID NO:27

GGGGSGGGGGSSDRMKQLEDKVEELLSKVYHLENEVARLKKLVGER

SEQ ID NO:28

MATSASSHLNKGIKQMYMSLPQGEKVQAMYIWVDGTGEGLRCKTRTLDCE
 PKCVEELPEWNFDGSSTFQSEGSNSDMYLHPVAMFRDPFRKDPNKLVLCE
 VFKYNRKPAETNLRHICKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWP
 SNGFPGPQGPYYCGVGADKAYGRDIVEAHYRACLYAGVKITGTNAEVMPA
 QWEFQIGPCEGIRMGDHLWIARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGA
 GCHTNFSTKAMREENGLKCIEEAIDKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRL
 TGFHETSNINDFSAGVANRGASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPYA
 VTEAIVRTCLLNETGDEPFQYKN*

【序列表】

- <110> 美商安美基公司(AMGEN INC.)
- <120> 使用麩醯胺合成酶基因內互補載體直接選擇表現高水準異質蛋白的細胞
- <130> A-2011-WO-PCT
- <140> TW 106115604
- <141> 2017-05-11
- <150> 62/334,966
- <151> 2016-05-11
- <160> 28
- <170> PatentIn 3.5 版本
- <210> 1
- <211> 373
- <212> PRT
- <213> 小家鼠
- <400> 1

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
50 55 60

Ser	Ser	Thr	Phe	Gln	Ser	Glu	Gly	Ser	Asn	Ser	Asp	Met	Tyr	Leu	His
65				70					75					80	
Pro	Val	Ala	Met	Phe	Arg	Asp	Pro	Phe	Arg	Lys	Asp	Pro	Asn	Lys	Leu
			85						90					95	
Val	Leu	Cys	Glu	Val	Phe	Lys	Tyr	Asn	Arg	Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Asn
		100						105					110		
Leu	Arg	His	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Met	Asp	Met	Val	Ser	Asn	Gln	His
		115					120					125			
Pro	Trp	Phe	Gly	Met	Glu	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Gly
	130					135					140				
His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro
145					150					155					160
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val
			165					170						175	
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly
		180						185					190		
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
		195					200					205			
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile
	210					215					220				
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro

225

230

235

240

Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe

245

250

255

Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu

260

265

270

Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr

275

280

285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His

290

295

300

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

305

310

315

320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr

325

330

335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr

340

345

350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro

355

360

365

Phe Gln Tyr Lys Asn

370

<210> 2

<211> 373

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 2

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Ala Asn Phe Asp Gly
50 55 60

Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
100 105 110

Leu Arg His Ile Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
115 120 125

Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly

C205751SEQBX20210917C.pdf

35					40					45									
Cys	Glu	Pro	Lys	Cys	Val	Glu	Glu	Leu	Pro	Glu	Trp	Ala	Phe	Asp	Gly				
50					55					60									
Ser	Ser	Thr	Phe	Gln	Ser	Glu	Gly	Ser	Asn	Ser	Asp	Met	Tyr	Leu	His				
65					70					75					80				
Pro	Val	Ala	Met	Phe	Arg	Asp	Pro	Phe	Arg	Lys	Asp	Pro	Asn	Lys	Leu				
					85					90					95				
Val	Leu	Cys	Glu	Val	Phe	Lys	Tyr	Asn	Arg	Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Asn				
					100					105					110				
Leu	Arg	His	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Met	Asp	Met	Val	Ser	Asn	Gln	His				
115										120					125				
Pro	Trp	Phe	Gly	Met	Glu	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Gly				
130										135					140				
His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro				
145										150					155				
															160				
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val				
					165										170				
															175				
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly				
					180										185				
															190				
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro				
195										200									
															205				

Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile
210				215				220							
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro
225				230				235				240			
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	His	Thr	Asn	Phe
				245				250				255			
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Ile	Glu	Glu
260								265				270			
Ala	Ile	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys	Arg	His	Gln	Tyr	His	Ile	Arg	Ala	Tyr
275								280				285			
Asp	Pro	Lys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	His
290				295				300							
Glu	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Arg	Gly
305				310				315				320			
Ala	Ser	Ile	Arg	Ile	Pro	Arg	Thr	Val	Gly	Gln	Glu	Lys	Lys	Gly	Tyr
				325				330				335			
Phe	Glu	Asp	Arg	Arg	Pro	Ser	Ala	Asn	Cys	Asp	Pro	Tyr	Ala	Val	Thr
340								345				350			
Glu	Ala	Ile	Val	Arg	Thr	Cys	Leu	Leu	Asn	Glu	Thr	Gly	Asp	Glu	Pro
355				360				365							

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

<210> 4
<211> 373
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 4

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Ala Gly
50 55 60

Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
100 105 110

Leu	Arg	His	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Met	Asp	Met	Val	Ser	Asn	Gln	His
115				120				125							
Pro	Trp	Phe	Gly	Met	Glu	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Gly
130				135				140							
His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro
145				150				155				160			
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val
165				170				175							
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly
180				185				190							
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
195				200				205							
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile
210				215				220							
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro
225				230				235				240			
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	His	Thr	Asn	Phe
245				250				255							
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Ile	Glu	Glu
260				265				270							

Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

- <210> 5
- <211> 373
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成多肽

<400> 5

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

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

Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly	
			180					185					190			
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro	
			195					200					205			
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile	
		210					215						220			
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro	
		225				230				235					240	
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	His	Thr	Asn	Phe	
					245					250					255	
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Ile	Glu	Glu	
			260						265					270		
Ala	Ile	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys	Arg	His	Gln	Tyr	His	Ile	Arg	Ala	Tyr	
			275					280					285			
Asp	Pro	Lys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	His	
		290					295					300				
Glu	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Arg	Gly	
		305					310				315				320	
Ala	Ser	Ile	Arg	Ile	Pro	Arg	Thr	Val	Gly	Gln	Glu	Lys	Lys	Gly	Tyr	
				325						330					335	

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

<210> 6
<211> 373
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 6

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Ala Ala Phe Ala Gly
50 55 60

Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro	Val	Ala	Met	Phe	Arg	Asp	Pro	Phe	Arg	Lys	Asp	Pro	Asn	Lys	Leu
85				90				95							
Val	Leu	Cys	Glu	Val	Phe	Lys	Tyr	Asn	Arg	Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Asn
100				105				110							
Leu	Arg	His	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Met	Asp	Met	Val	Ser	Asn	Gln	His
115				120				125							
Pro	Trp	Phe	Gly	Met	Glu	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Gly
130				135				140							
His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro
145				150				155				160			
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val
165				170				175							
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly
180				185				190							
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
195				200				205							
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile
210				215				220							
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro
225				230				235				240			

Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
245 250 255

Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu
260 265 270

Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

<210> 7
<211> 373
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 7

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
 20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
 35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Ala Ala Phe Asp Gly
 50 55 60

Ser Ala Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
 85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
 100 105 110

Leu Arg His Ile Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
 115 120 125

Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
 130 135 140

His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro
145 150 155 160

Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Lys Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val
165 170 175

Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Thr Gly
180 185 190

Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro
195 200 205

Cys Glu Gly Ile Arg Met Gly Asp His Leu Trp Ile Ala Arg Phe Ile
210 215 220

Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro
225 230 235 240

Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
245 250 255

Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu
260 265 270

Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300

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

305310315320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325330335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340345350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355360365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

<210> 8
<211> 373
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 8

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
15105

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
202530

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
354045

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Ala Asn Phe Ala Gly
50 55 60

Ser Ala Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
100 105 110

Leu Arg His Ile Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
115 120 125

Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
130 135 140

His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro
145 150 155 160

Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Lys Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val
165 170 175

Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Thr Gly
180 185 190

Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro
195 200 205

Cys Glu Gly Ile Arg Met Gly Asp His Leu Trp Ile Ala Arg Phe Ile

210	215	220
Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro		
225	230	235 240
Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe		
	245	250 255
Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu		
	260	265 270
Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr		
	275	280 285
Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His		
	290	295 300
Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly		
305	310	315 320
Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr		
	325	330 335
Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr		
	340	345 350
Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro		
	355	360 365
Phe Gln Tyr Lys Asn		
	370	

<210> 9
<211> 373
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 9

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Ala Phe Ala Gly
50 55 60

Ser Ala Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
100 105 110

Leu Arg His Ile Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His

115	120	125
Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly		
130	135	140
His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro		
145	150	155
		160
Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Lys Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val		
	165	170
		175
Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Thr Gly		
	180	185
		190
Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro		
	195	200
		205
Cys Glu Gly Ile Arg Met Gly Asp His Leu Trp Ile Ala Arg Phe Ile		
	210	215
		220
Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro		
	225	230
		235
		240
Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe		
	245	250
		255
Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu		
	260	265
		270
Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr		
	275	280
		285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

<210> 10
<211> 373
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 10

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp

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

Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
195					200					205					
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile
210					215					220					
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro
225					230					235					240
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	His	Thr	Asn	Phe
245					250					255					
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Ile	Glu	Glu
260					265					270					
Ala	Ile	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys	Arg	His	Gln	Tyr	His	Ile	Arg	Ala	Tyr
275					280					285					
Asp	Pro	Lys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	His
290					295					300					
Glu	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Arg	Gly
305					310					315					320
Ala	Ser	Ile	Arg	Ile	Pro	Arg	Thr	Val	Gly	Gln	Glu	Lys	Lys	Gly	Tyr
325					330					335					
Phe	Glu	Asp	Arg	Arg	Pro	Ser	Ala	Asn	Cys	Asp	Pro	Tyr	Ala	Val	Thr
340					345					350					

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

- <210> 11
- <211> 373
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成多肽
- <400> 11

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
50 55 60

Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95

Val	Leu	Cys	Glu	Val	Phe	Lys	Tyr	Asn	Arg	Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Asn
100					105					110					
Leu	Arg	His	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Met	Asp	Met	Val	Ser	Asn	Gln	His
115					120					125					
Pro	Trp	Phe	Gly	Met	Ala	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Gly
130					135					140					
His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro
145					150					155					160
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val
165					170					175					
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly
180					185					190					
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
195					200					205					
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile
210					215					220					
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro
225					230					235					240
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	His	Thr	Asn	Phe
245					250					255					

Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu
260 265 270

Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

- <210> 12
- <211> 373
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成多肽

<400> 12

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
 20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
 35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
 50 55 60

Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
 85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
 100 105 110

Leu Arg His Ile Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
 115 120 125

Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Ala Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
 130 135 140

His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro
145 150 155 160

Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val
165					170					175					
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly
180					185					190					
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
195					200					205					
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile
210					215					220					
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro
225					230					235					240
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	His	Thr	Asn	Phe
245					250					255					
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Ile	Glu	Glu
260					265					270					
Ala	Ile	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys	Arg	His	Gln	Tyr	His	Ile	Arg	Ala	Tyr
275					280					285					
Asp	Pro	Lys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	His
290					295					300					
Glu	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Arg	Gly
305					310					315					320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

- <210> 13
- <211> 373
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成多肽

<400> 13

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
50 55 60

Ser	Ser	Thr	Phe	Gln	Ser	Glu	Gly	Ser	Asn	Ser	Asp	Met	Tyr	Leu	His
65				70				75						80	
Pro	Val	Ala	Met	Phe	Arg	Asp	Pro	Phe	Arg	Lys	Asp	Pro	Asn	Lys	Leu
			85					90					95		
Val	Leu	Cys	Glu	Val	Phe	Lys	Tyr	Asn	Arg	Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Asn
		100						105					110		
Leu	Arg	His	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Met	Asp	Met	Val	Ser	Asn	Gln	His
	115						120				125				
Pro	Trp	Phe	Gly	Met	Glu	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Gly
	130					135					140				
His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro
145				150					155					160	
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val
			165					170					175		
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly
		180					185						190		
Thr	Asn	Ala	Ala	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
		195					200					205			
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile
	210					215					220				

Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro
225					230					235					240
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	His	Thr	Asn	Phe
				245					250					255	
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Ile	Glu	Glu
			260						265				270		
Ala	Ile	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys	Arg	His	Gln	Tyr	His	Ile	Arg	Ala	Tyr
		275					280					285			
Asp	Pro	Lys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	His
	290					295					300				
Glu	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Arg	Gly
305					310					315					320
Ala	Ser	Ile	Arg	Ile	Pro	Arg	Thr	Val	Gly	Gln	Glu	Lys	Lys	Gly	Tyr
				325					330					335	
Phe	Glu	Asp	Arg	Arg	Pro	Ser	Ala	Asn	Cys	Asp	Pro	Tyr	Ala	Val	Thr
			340						345				350		
Glu	Ala	Ile	Val	Arg	Thr	Cys	Leu	Leu	Asn	Glu	Thr	Gly	Asp	Glu	Pro
		355					360					365			
Phe	Gln	Tyr	Lys	Asn											
			370												

<210> 14

<211> 373
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 14

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
 20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
 35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
 50 55 60

Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
 85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
 100 105 110

Leu Arg His Ile Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
 115 120 125

Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
130 135 140

His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro
145 150 155 160

Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Lys Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val
165 170 175

Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Thr Gly
180 185 190

Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Ala Phe Gln Ile Gly Pro
195 200 205

Cys Glu Gly Ile Arg Met Gly Asp His Leu Trp Ile Ala Arg Phe Ile
210 215 220

Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro
225 230 235 240

Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
245 250 255

Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu
260 265 270

Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His

290	295	300
Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly		
305	310	315 320
Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr		
	325 330	335
Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr		
	340 345	350
Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro		
	355 360	365
Phe Gln Tyr Lys Asn		
	370	

<210> 15
<211> 373
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 15

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met			
1 5 10 15			
Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp			
20 25 30			

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

195	200	205
Cys Glu Gly Ile Arg Met Gly Asp His Leu Trp Ile Ala Arg Phe Ile		
210	215	220
Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro		
225	230	235 240
Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Ala Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe		
	245	250 255
Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu		
	260	265 270
Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr		
	275	280 285
Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His		
	290	295 300
Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly		
305	310	315 320
Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr		
	325	330 335
Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr		
	340	345 350
Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro		
	355	360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

- <210> 16
 - <211> 373
 - <212> PRT
 - <213> 人工序列
-
- <220>
 - <223> 合成多肽
-
- <400> 16

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
50 55 60

Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn

100					105					110						
Leu	Arg	His	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Met	Asp	Met	Val	Ser	Asn	Gln	His	
115					120					125						
Pro	Trp	Phe	Gly	Met	Glu	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Gly	
130					135					140						
His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro	
145					150					155					160	
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val	
165					170					175						
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly	
180					185					190						
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro	
195					200					205						
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile	
210					215					220						
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro	
225					230					235					240	
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	Ala	Thr	Asn	Phe	
245					250					255						
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Ile	Glu	Glu	
260					265					270						

Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

- <210> 17
- <211> 373
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成多肽

<400> 17

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met

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

Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly	
			180							185					190	
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro	
			195					200						205		
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile	
		210					215						220			
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro	
225						230					235				240	
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	His	Thr	Ala	Phe	
				245					250						255	
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Ile	Glu	Glu	
			260						265					270		
Ala	Ile	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys	Arg	His	Gln	Tyr	His	Ile	Arg	Ala	Tyr	
		275					280						285			
Asp	Pro	Lys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	His	
		290					295					300				
Glu	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Arg	Gly	
305					310					315					320	
Ala	Ser	Ile	Arg	Ile	Pro	Arg	Thr	Val	Gly	Gln	Glu	Lys	Lys	Gly	Tyr	
				325					330					335		

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

<210> 18
<211> 373
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 18

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
50 55 60

Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro	Val	Ala	Met	Phe	Arg	Asp	Pro	Phe	Arg	Lys	Asp	Pro	Asn	Lys	Leu
85					90					95					
Val	Leu	Cys	Glu	Val	Phe	Lys	Tyr	Asn	Arg	Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Asn
100					105					110					
Leu	Arg	His	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Met	Asp	Met	Val	Ser	Asn	Gln	His
115					120					125					
Pro	Trp	Phe	Gly	Met	Glu	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Gly
130					135					140					
His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro
145					150					155					160
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val
165					170					175					
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly
180					185					190					
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
195					200					205					
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile
210					215					220					
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro
225					230					235					240

Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
245 250 255

Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu
260 265 270

Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Ala Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

- <210> 19
- <211> 373
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 19

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
 20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
 35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Ala Ala Phe Arg Gly
 50 55 60

Ser Ala Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
 85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
 100 105 110

Leu Arg His Ile Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
 115 120 125

Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
 130 135 140

His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro
145					150					155					160
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val
				165					170					175	
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly
			180						185					190	
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
			195					200					205		
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile
		210					215					220			
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro
225					230					235					240
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	His	Thr	Asn	Phe
					245					250					255
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Ile	Glu	Glu
			260						265					270	
Ala	Ile	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys	Arg	His	Gln	Tyr	His	Ile	Arg	Ala	Tyr
			275					280					285		
Asp	Pro	Lys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	His
			290				295					300			

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

- <210> 20
- <211> 373
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成多肽

<400> 20

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys	Glu	Pro	Lys	Cys	Val	Glu	Glu	Leu	Pro	Glu	Trp	Asn	Phe	Asp	Gly
50						55					60				
Ser	Ser	Thr	Phe	Gln	Ser	Glu	Gly	Ser	Asn	Ser	Asp	Met	Tyr	Leu	His
65					70				75					80	
Pro	Val	Ala	Met	Phe	Arg	Asp	Pro	Phe	Arg	Lys	Asp	Pro	Asn	Lys	Leu
				85					90					95	
Val	Leu	Cys	Glu	Val	Phe	Lys	Tyr	Asn	Arg	Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Asn
		100						105					110		
Leu	Arg	His	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Met	Asp	Met	Val	Ser	Asn	Gln	His
		115					120					125			
Pro	Trp	Phe	Gly	Met	Glu	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Gly
	130					135					140				
His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro
145						150				155					160
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val
				165					170					175	
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly
			180						185				190		
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
			195					200					205		

Cys Glu Gly Ile Arg Met Gly Asp His Leu Trp Ile Ala Arg Phe Ile
210 215 220

Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro
225 230 235 240

Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
245 250 255

Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu
260 265 270

Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ile Ala Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn

370

<210> 21
<211> 373
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 21

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
50 55 60

Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
100 105 110

Leu Arg His Ile Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
115 120 125

Pro Trp Phe Gly Met Ala Gln Ala Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
130 135 140

His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro
145 150 155 160

Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Lys Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val
165 170 175

Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Thr Gly
180 185 190

Thr Asn Ala Ala Val Met Pro Ala Gln Trp Ala Phe Gln Ile Gly Pro
195 200 205

Cys Glu Gly Ile Arg Met Gly Asp His Leu Trp Ile Ala Arg Phe Ile
210 215 220

Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro
225 230 235 240

Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
245 250 255

Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu
260 265 270

Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr

275	280	285
Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His		
290	295	300
Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly		
305	310	315 320
Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr		
325	330	335
Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr		
340	345	350
Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro		
355	360	365
Phe Gln Tyr Lys Asn		
370		

- <210> 22
- <211> 373
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成多肽

- <400> 22

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
50 55 60

Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
100 105 110

Leu Arg His Ile Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
115 120 125

Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
130 135 140

His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro
145 150 155 160

Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Lys Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val
165 170 175

Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Thr Gly

180					185					190						
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro	
195					200					205						
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile	
210					215					220						
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro	
225					230					235					240	
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Ala	Gly	Ala	Gly	Cys	Ala	Thr	Ala	Phe	
245					250					255						
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Ile	Glu	Glu	
260					265					270						
Ala	Ile	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys	Arg	His	Gln	Tyr	His	Ile	Arg	Ala	Tyr	
275					280					285						
Asp	Pro	Lys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	His	
290					295					300						
Glu	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Arg	Gly	
305					310					315					320	
Ala	Ser	Ile	Arg	Ile	Pro	Arg	Thr	Val	Gly	Gln	Glu	Lys	Lys	Gly	Tyr	
325					330					335						
Phe	Glu	Asp	Arg	Arg	Pro	Ser	Ala	Asn	Cys	Asp	Pro	Tyr	Ala	Val	Thr	
340					345					350						

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

<210> 23
<211> 33
<212> PRT
<213> 腦心肌炎病毒

<400> 23

Gly Ala Thr Gly Ala Thr Ala Ala Thr Ala Cys Cys Cys Thr Cys Gly
1 5 10 15

Ala Gly Ala Thr Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Ala Thr Cys Ala Thr
20 25 30

Gly

<210> 24
<211> 24
<212> PRT
<213> 腦心肌炎病毒

<400> 24

Gly Ala Thr Gly Ala Thr Ala Ala Thr Ala Thr Gly Gly Cys Cys Ala
1 5 10 15

Cys Ala Ala Cys Cys Ala Thr Gly

20

<210> 25
<211> 373
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 25

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Ala Ala Phe Ala Gly
50 55 60

Ser Ala Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Ala Met Tyr Leu His
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95

Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
100 105 110

Leu	Arg	His	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Met	Asp	Met	Val	Ser	Asn	Gln	His
115				120				125							
Pro	Trp	Phe	Gly	Met	Glu	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Gly
130				135				140							
His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro
145				150				155				160			
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val
165				170				175							
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly
180				185				190							
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
195				200				205							
Cys	Glu	Gly	Ile	Arg	Met	Gly	Asp	His	Leu	Trp	Ile	Ala	Arg	Phe	Ile
210				215				220							
Leu	His	Arg	Val	Cys	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Phe	Asp	Pro
225				230				235				240			
Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Asn	Trp	Asn	Gly	Ala	Gly	Cys	His	Thr	Asn	Phe
245				250				255							
Ser	Thr	Lys	Ala	Met	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Ile	Glu	Glu
260				265				270							
Ala	Ile	Asp	Lys	Leu	Ser	Lys	Arg	His	Gln	Tyr	His	Ile	Arg	Ala	Tyr

275	280	285
Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His		
290	295	300
Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly		
305	310	315 320
Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr		
	325	330 335
Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr		
	340	345 350
Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro		
	355	360 365
Phe Gln Tyr Lys Asn		
370		

- <210> 26
- <211> 47
- <212> PRT
- <213> 釀酒酵母菌

<400> 26

Met Ser Asp Arg Met Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu			
1	5	10	15
Ser Lys Val Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu			
	20	25	30

Val Gly Glu Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

- <210> 27
 - <211> 46
 - <212> PRT
 - <213> 釀酒酵母菌
- <400> 27

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Arg Met Lys
1 5 10 15

Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Val Tyr His Leu
20 25 30

Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu Arg
35 40 45

- <210> 28
 - <211> 373
 - <212> PRT
 - <213> 小家鼠
- <400> 28

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys	Glu	Pro	Lys	Cys	Val	Glu	Glu	Leu	Pro	Glu	Trp	Asn	Phe	Asp	Gly
50						55					60				
Ser	Ser	Thr	Phe	Gln	Ser	Glu	Gly	Ser	Asn	Ser	Asp	Met	Tyr	Leu	His
65					70				75					80	
Pro	Val	Ala	Met	Phe	Arg	Asp	Pro	Phe	Arg	Lys	Asp	Pro	Asn	Lys	Leu
			85						90					95	
Val	Leu	Cys	Glu	Val	Phe	Lys	Tyr	Asn	Arg	Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Asn
		100						105					110		
Leu	Arg	His	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Met	Asp	Met	Val	Ser	Asn	Gln	His
		115						120					125		
Pro	Trp	Phe	Gly	Met	Glu	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Gly
	130					135					140				
His	Pro	Phe	Gly	Trp	Pro	Ser	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro
145					150					155				160	
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Lys	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ile	Val
			165						170					175	
Glu	Ala	His	Tyr	Arg	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Gly
		180							185				190		
Thr	Asn	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Ala	Gln	Trp	Glu	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro
		195					200					205			

Cys Glu Gly Ile Arg Met Gly Asp His Leu Trp Ile Ala Arg Phe Ile
210 215 220

Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro
225 230 235 240

Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
245 250 255

Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Cys Ile Glu Glu
260 265 270

Ala Ile Asp Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Tyr Ala Val Thr
340 345 350

Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種載體，其包含：

a) 第一核酸，其編碼第一多肽，及

b) 第二核酸，其編碼麩氨胺合成酶之 N 端突變體(mutGS-NT)，
其中該 mutGS-NT 包含兩個或更多個選自由以下所組成之群組之突變：W60A N61A D63A D63R S66A 及 D76A，

其中該第一核酸之轉錄可操作地連接至第二核酸之轉錄，

其進一步包含：

c) 第三核酸，其編碼第三多肽，其中該第三多肽能夠與該第一多肽締合以形成異質複合物，及

d) 第四核酸，其編碼麩氨胺合成酶之 C 端突變體(mutGS-CT)，
其中該 mutGS-CT 包含一或多個選自由以下所組成之群組的突變：
E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A 及
R324A，

其中該第三核酸之轉錄可操作地連接至該第四核酸之轉錄，

其中該麩氨胺合成酶之N端突變體及該麩氨胺合成酶之C端突變體相互作用以提供可選擇活性，且進一步其中該載體能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善經轉染之細胞之選擇。

【請求項2】

如請求項1之載體，其中該異質複合物係免疫球蛋白。

【請求項3】

如請求項1或2之載體，其中內部核糖體進入位點(IRES)發生在選自

由以下所組成之群組的位點：

- a) 在該第一核酸與該第二核酸之間的位點；
- b) 在該第三核酸與該第四核酸之間的位點，及
- c) 在該第一核酸與該第二核酸之間、以及在該第三核酸與該第四核酸之間的位點。

【請求項4】

如請求項1或2之載體，其中該mutGS-NT係選自由以下所組成之群組：W60A N61A D63A (mutGS-NT1; SEQ ID NO:6)、W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3; SEQ ID NO:25) 及 W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19)；且該mutGS-CT係選自由以下所組成之群組：E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1; SEQ ID NO:21) 及 N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22)。

【請求項5】

一種表現系統，其包含：

- a) 第一載體，其編碼雙順反子轉錄本，該第一載體包含編碼第一多肽之第一核酸，該第一核酸可操作地連接至編碼第二多肽之第二核酸，其中該第二多肽係麩醯胺合成酶之 N 端突變體(mutGS-NT)，其中該 mutGS-NT 包含兩個或更多個選自由以下所組成之群組之突變：W60A N61A D63A D63R S66A 及 D76A，及
- b) 第二載體，其編碼雙順反子轉錄本，該第二載體包含編碼第三多肽之第三核酸，該第三核酸可操作地連接至編碼第四多肽之第四核酸，其中該第四多肽係麩醯胺合成酶之 C 端突變體(mutGS-CT)，

其中該 mutGS-CT 包含一或多個選自由以下所組成之群組的突變：
E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A 及
R324A，該麩醯胺合成酶之 C 端突變體能夠與該麩醯胺合成酶之 N
端突變體締合以提供可選擇活性，

進一步其中該第三多肽能夠與該第一多肽締合以形成異質複合物；

且進一步其中該表現系統能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善該等
細胞之選擇。

【請求項6】

如請求項5之表現系統，其中該異質複合物係免疫球蛋白。

【請求項7】

如請求項5或6之表現系統，其中內部核糖體進入位點(IRES)發生在
選自由以下所組成之群組的位點：

- a) 在該第一核酸與該第二核酸之間的位點；
- b) 在該第三核酸與該第四核酸之間的位點，及
- c) 在該第一核酸與該第二核酸之間、以及在該第三核酸與該第四
核酸之間的位點。

【請求項8】

如請求項5或6之表現系統，其中該mutGS-NT係選自由以下所組成之
群組：W60A N61A D63A (mutGS-NT1; SEQ ID NO:6)、W60A N61A
D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) W60A N61A D63A S66A
D76A (mutGS-NT3; SEQ ID NO:25) 及 W60A N61A D63R S66A
(mutGS-NT4; SEQ ID NO:19)；且該mutGS-CT係選自由以下所組成之群
組：E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1; SEQ ID NO:21) 及

N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22)。

【請求項9】

一種經單離之宿主細胞，其經如請求項1至4中任一項之載體或如請求項5至8中任一項之表現系統轉染、轉型或轉導，其中該細胞係選自由以下所組成之群組：CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、MDCK、293、3T3、骨髓瘤細胞株、及WI38細胞。

【請求項10】

一種產生異質複合物之方法，其包含在條件下培養如請求項9之宿主細胞之步驟，其中該異質複合物係由該宿主細胞表現，其中當該細胞經如請求項1至4中任一項之載體轉型或轉導時，該異質複合物係抗體。

【請求項11】

如請求項10之方法，其進一步包含單離該異質複合物。

【請求項12】

一種表現系統，其包含：第一載體，其包含編碼抗體之重鏈的第一核酸，該第一核酸可操作地連接至編碼N端突變體麩氨胺合成酶(mutGS-NT)之第二核酸；及第二載體，其包含編碼抗體之輕鏈的第三核酸，該第三核酸可操作地連接至編碼C端突變體麩氨胺合成酶(mutGS-CT)之第四核酸，其中該mutGS-NT包含兩個或更多個選自由以下所組成之群組之突變：W60A N61A D63A D63R S66A及D76A，且該mutGS-CT包含一或多個選自由以下所組成之群組的突變：E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A及R324A，其中麩氨胺合成酶之各突變體次單元當單獨表現時不具有可選擇活性，且該mutGS-NT與該mutGS-CT之共表現提供麩氨胺合成酶活性，其中該表現系統能夠轉染至哺乳動物細

胞中並改善經轉染之細胞之選擇。

【請求項13】

如請求項12之表現系統，其中該mutGS-NT係選自由以下所組成之群組：W60A N61A D63A (mutGS-NT1; SEQ ID NO:6)、W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3; SEQ ID NO:25) 及 W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19)；且該mutGS-CT係選自由以下所組成之群組：E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1; SEQ ID NO:21) 及 N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22)。

【請求項14】

一種表現系統，其包含：第一載體，其編碼雙順反子轉錄本，該第一載體包含編碼所欲多肽之第一核酸，該第一核酸可操作地連接至第二核酸，該第二核酸編碼具有由以下所組成之群組之突變的麩氨胺合成酶之N端突變體(mutGS-NT)：W60A N61A D63A S66A及其組合；及第二載體，其編碼雙順反子轉錄本，該第二載體包含第三核酸，該第三核酸可操作地連接至第四核酸，該第四核酸編碼具有由以下所組成之群組之突變的麩氨胺合成酶之C端突變體(mutGS-CT)：E134A E136A E196A E203A N248A H253A N255A R319A R324A及其組合，其中該麩氨胺合成酶之N端突變體及麩氨胺合成酶之C端突變體締合以提供可選擇活性，且其中該表現系統能夠轉染至哺乳動物細胞中並改善經轉染之細胞之選擇，且進一步其中該第一核酸編碼抗體重鏈且該第三核酸編碼抗體輕鏈。

【請求項15】

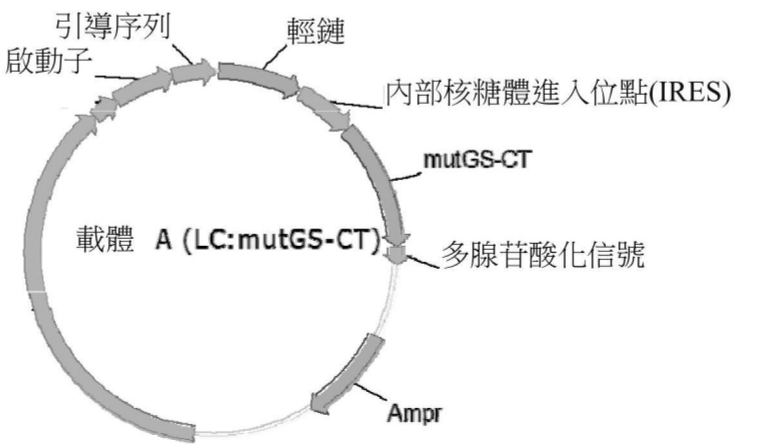
如請求項14之表現系統，其中該mutGS-NT係選自由以下所組成之群

組：W60A N61A D63A (mutGS-NT1; SEQ ID NO:6)、W60A N61A D63A S66A (mutGS-NT2; SEQ ID NO:10) W60A N61A D63A S66A D76A (mutGS-NT3; SEQ ID NO:25) 及 W60A N61A D63R S66A (mutGS-NT4; SEQ ID NO:19)；且該mutGS-CT係選自由以下所組成之群組：E134A E136A E196A E203A (mutGS-CT1; SEQ ID NO:21) 及 N248A H253A N255A (mutGS-CT2; SEQ ID NO:22)。

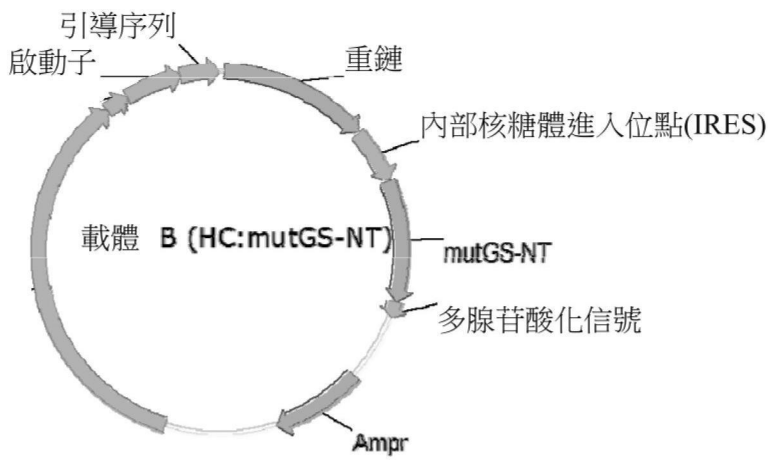
【請求項16】

一種經單離之宿主細胞，其經如請求項12至15中任一項之表現系統轉染、轉型或轉導。

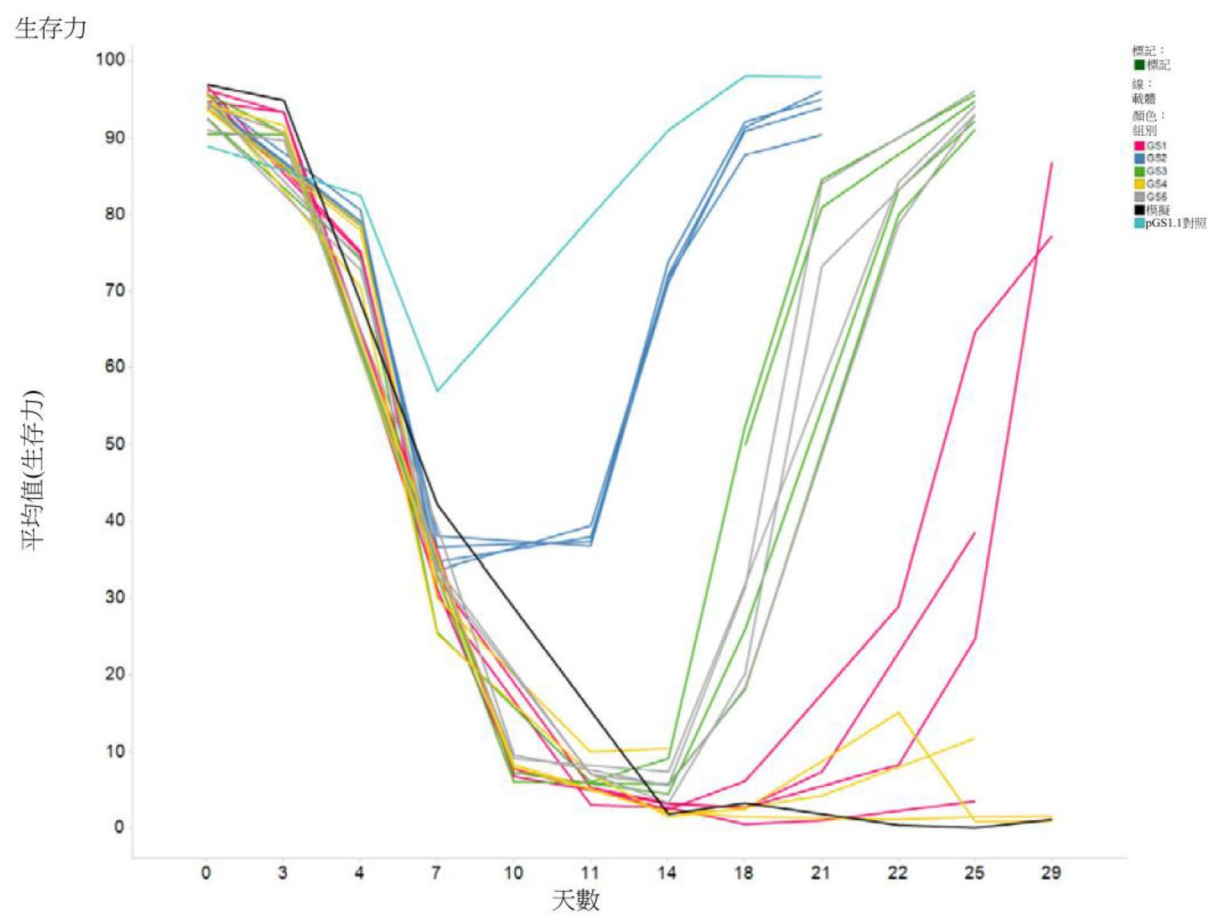
【發明圖式】



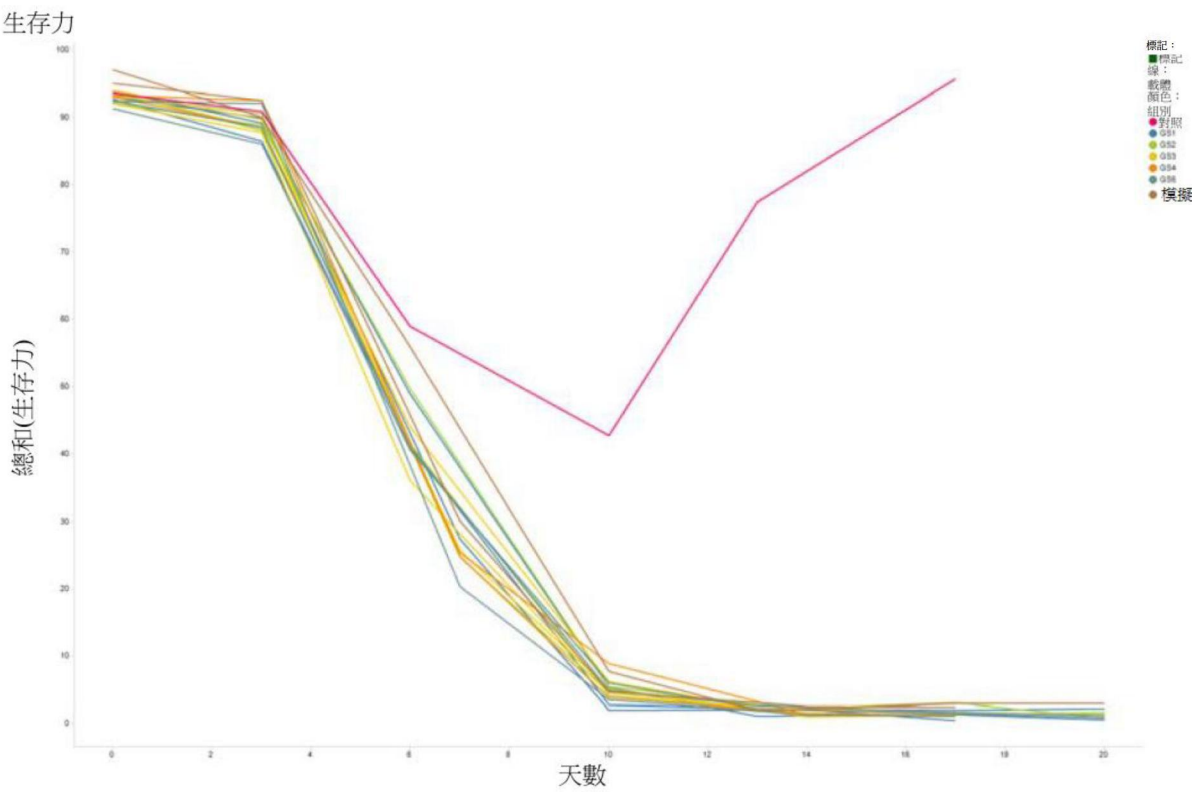
【圖 1A】



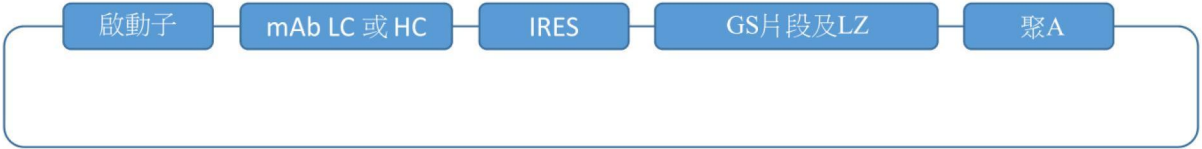
【圖 1B】



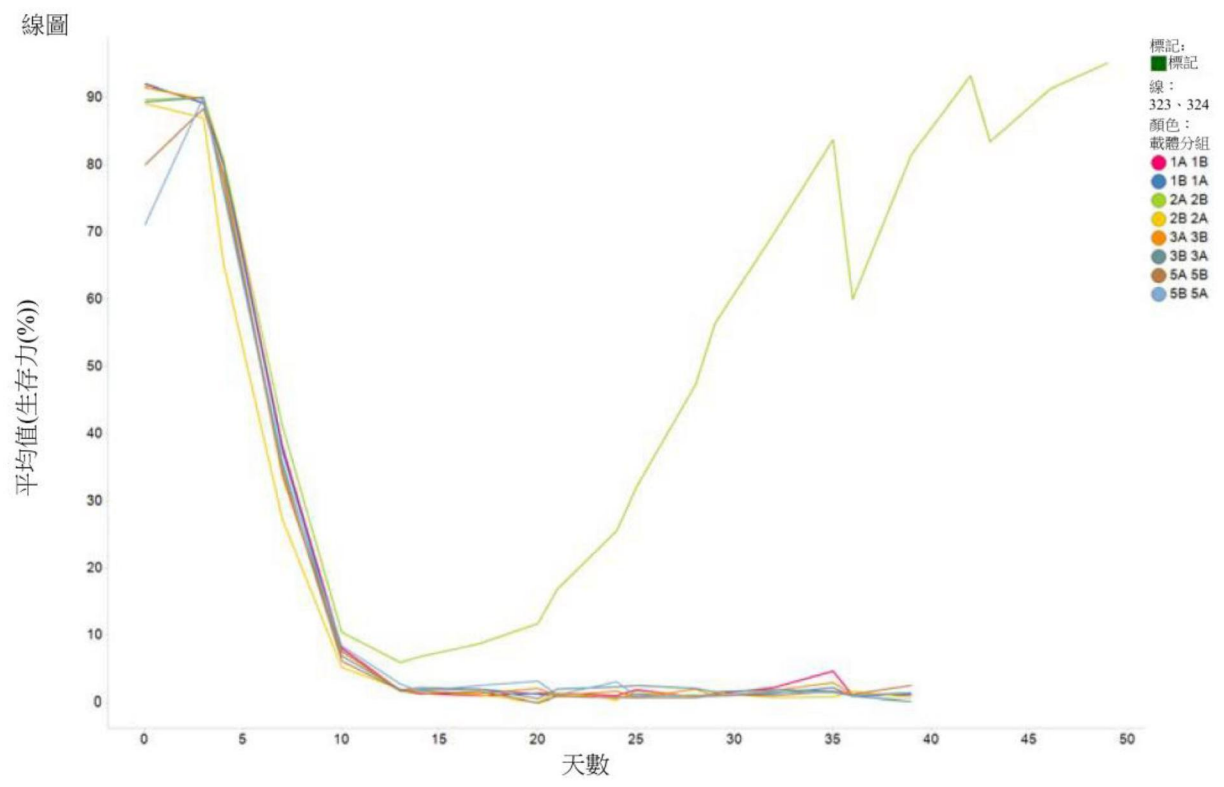
【圖 2】



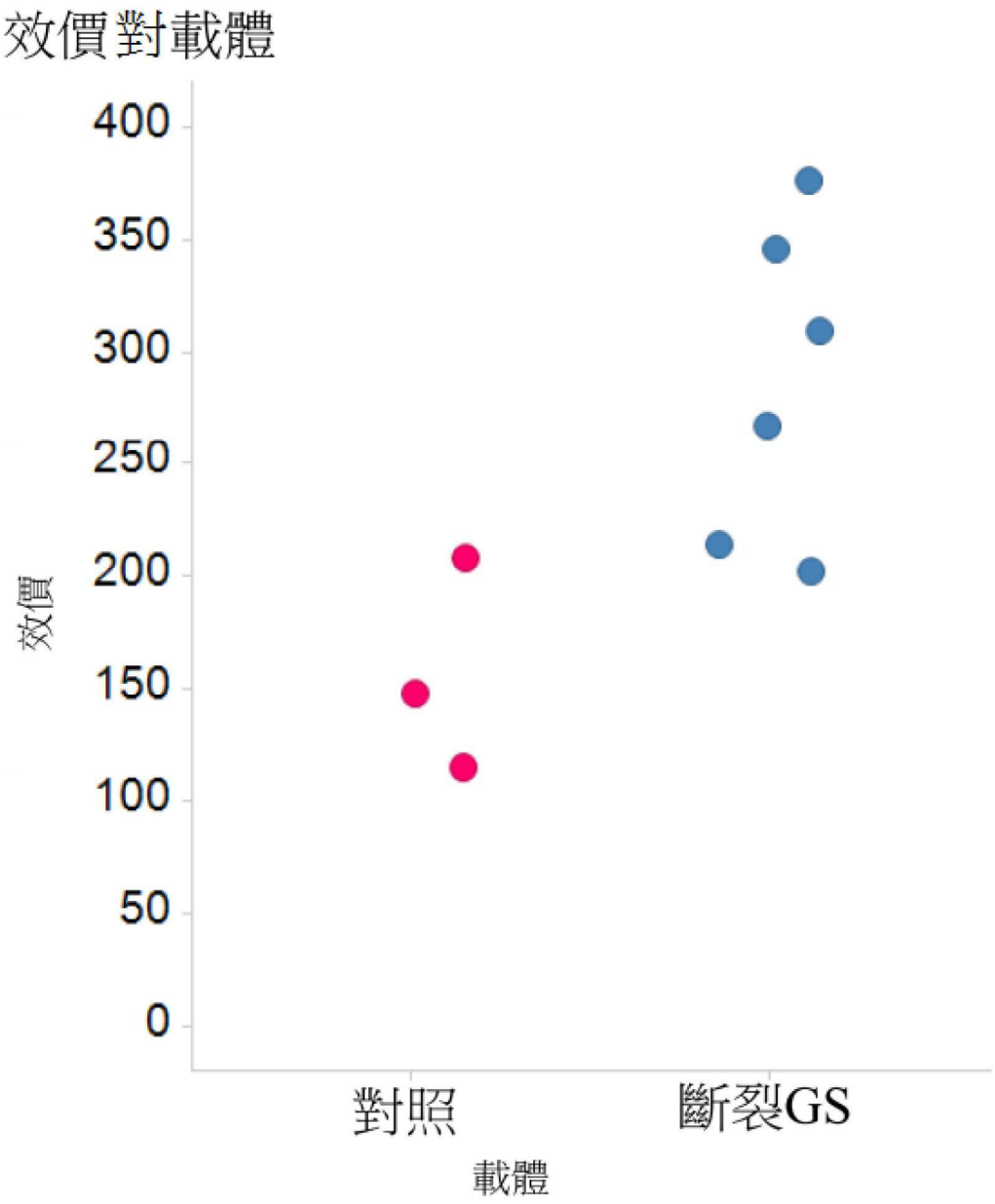
【圖 3】



【圖 4】



【圖 5】



【圖 6】