I361221

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97126423　　C12N 15/13 (2006.01)

※ 申請日期：97.6.27　　※IPC 分類：~~C07K~~ C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

免疫球蛋白之製造

IMMUNOGLOBULIN PRODUCTION

二、申 請 人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

代表人：(中文/英文)

1. 菲杜林 克勞士納
   KLAUSNER, FRIDOLIN
2. 丹尼斯 史崔柏
   STREBEL, DENISE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士貝士勞市格蘭山查街124號

124 GRENZACHERSTRASSE CH-4070 BASEL, SWITZERLAND

國　籍：(中文/英文)

瑞士　SWITZERLAND

三、發明人：(共 5 人)

姓　名：(中文/英文)

1. 尤里奇　高佛特
   GOEPFERT, ULRICH
2. 斯爾克　韓森
   HANSEN, SILKE
3. 韓德克　諾珍
   KNOETGEN, HENDRIK
4. 爾哈　柯培茲基
   KOPETZKI, ERHARD
5. 奧利佛　波拉特納
   PLOETTNER, OLIVER

國　籍：(中文/英文)

1. 德國　GERMANY
2. 德國　GERMANY
3. 德國　GERMANY
4. 德國　GERMANY
5. 德國　GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2007年06月29日；07012774.1

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☑ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☑ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本申請案闡述可用於在哺乳動物細胞中製造免疫球蛋白之方法及核酸。

【先前技術】

用於製造重組多肽之表現系統已為吾人所熟知且在先前技術文獻中已有報導。對於製造用於醫藥應用之多肽，可使用諸如CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、Sp2/0細胞、COS細胞、HEK細胞、PER.C6®細胞及諸如此類等哺乳動物細胞。將編碼多肽之核酸引入至細胞中，例如質粒(例如，表現質粒)中。表現質粒之基本元件係原核質粒繁殖單元(例如對於大腸桿菌(Escherichia coli)而言，包含複製起點及選擇標記)、真核選擇標記及一或多個用於表現所關注核酸之表現盒，該等中之每一者皆包含啓動子、結構基因及包括聚腺苷酸化信號之轉錄終止子。對於在哺乳動物細胞中瞬時表現，可包括諸如SV40 Ori或OriP等哺乳動物複製起點。作為啓動子，可選擇組成型或誘導型啓動子。對於最佳化轉錄，Kozak序列可包括於5'非轉譯區中。對於mRNA處理，亦可包括聚腺苷酸化信號。

蛋白質且尤其免疫球蛋白在當今醫學業務中起重要作用。對於人類應用，各醫藥物質必須符合不同的標準。為確保生物藥劑對人類物質之安全性，造成嚴重傷害者必須尤其移除。

mRNA剪接係藉由存在剪接供體位點與剪接受體位點調

控，該等位點分別位於內含子之5'末端及3'末端。按照Watson等人(Watson等人(編輯)，Recombinant DNA: A Short course, Scientific American Books，由W.H. Freeman and Company，紐約，USA (1983)分發)者係5'剪接供體位點ag|gtragt(外顯子|內含子)與3'剪接受體位點$(y)_nNcag|g$(內含子|外顯子)(r=嘌呤鹼基；y=嘧啶鹼基；n=整數；N=任何天然鹼基)之共有序列。

在1980年，發表論及分泌型及膜結合形式免疫球蛋白之起源的最早文章。分泌型(sIg)及膜結合(mIg)同種型之形成係由於重鏈mRNA前體之交替剪接而產生。在mIg同種型中，使用編碼分泌型形式之C-端結構域(即分別為C_H3或C_H4結構域)之外顯子中的剪接供體位點及位於其下游距離之剪接受體位點以將恆定區與編碼跨膜結構域之下游外顯子連接。

製備當在特定宿主細胞中表現時具有降低之不合適或不期望轉錄特徵之合成性核酸分子的方法報導於WO 2002/016944中。在WO 2006/042158中報導經修飾以增強重組蛋白表現及/或減少或消除錯誤剪接及/或內含子連讀副產物之核酸分子。

因此，需要具有減少之副產物之免疫球蛋白的重組製造方法。

【發明內容】

在第一態樣中，本發明包含編碼IgA或IgG類免疫球蛋白之C_H3-結構域之C-端部分或IgE或IgM類免疫球蛋白之C_H4-

結構域之C-端部分的胺基酸序列的核酸，其中包含在該C_H3-或C_H4-結構域之C-端部分的一級胺基酸序列中之甘胺酸-離胺酸-二肽係藉由核酸ggaaaa、或核酸ggcaaa、或核酸gggaaa、或核酸gggaag、或核酸ggcaag、或核酸gggaag編碼。

在一個實施例中，本發明核酸編碼選自胺基酸序列SEQ ID NO: 1、3、4、5、6、7或8之胺基酸序列。在另一實施例中，核酸編碼以核苷酸g或a為首之甘胺酸-離胺酸-二肽。在另一實施例中，編碼甘胺酸-離胺酸-二肽之核酸係核酸ggaaaa、或核酸ggcaaa、或核酸gggaaa。

本發明之第二態樣係包含本發明核酸之質粒，且本發明之第三態樣係包含本發明核酸之細胞。

本發明之又一態樣係具有SEQ ID NO: 17、18、19、20、21、22、23、30或31核苷酸序列之核酸。

本發明之第五態樣係用於在哺乳動物細胞中製造免疫球蛋白之方法，其包含以下步驟：

a) 用編碼包含SEQ ID NO: 17、18、19、20、21、22、23、30或31核酸之免疫球蛋白重鏈的核酸轉染哺乳動物細胞，該核酸編碼該免疫球蛋白重鏈之C-端部分，

b) 在適於表現該免疫球蛋白之條件下對該經轉染之哺乳動物細胞實施培養，

c) 自培養物或細胞回收免疫球蛋白。

在一個實施例中，哺乳動物細胞係CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、Sp2/0細胞、COS細胞、HEK細胞或

PER.C6®細胞。較佳地，哺乳動物細胞係CHO細胞、或BHK細胞、或PER.C6®細胞。在另一實施例中，該哺乳動物細胞經兩種核酸轉染，其中第一核酸包含編碼免疫球蛋白輕鏈之表現盒，且其中第二核酸包含編碼免疫球蛋白重鏈之表現盒，該免疫球蛋白重鏈包含編碼免疫球蛋白重鏈之C-端部分的核酸SEQ ID NO: 17、18、19、20、21、22、23、30或31。

本發明最後態樣係用於改良免疫球蛋白在哺乳動物細胞中之表現的方法，其中編碼免疫球蛋白重鏈之核酸包含編碼C_H3-或C_H4-結構域中含有之甘胺酸-離胺酸-二肽的核酸ggaaaa、或核酸ggcaaa、或核酸gggaaa、或核酸ggaaag、或核酸ggcaag、或核酸gggaag。

【實施方式】

本發明包含編碼IgA或IgG類免疫球蛋白之C_H3-結構域之C-端部分或IgE或IgM類免疫球蛋白之C_H4-結構域之C-端部分的胺基酸序列的核酸，其中包含在該C_H3-或C_H4-結構域之C-端部分的胺基酸序列中之甘胺酸-離胺酸-二肽係藉由核酸ggaaaa、或核酸ggcaaa、或核酸gggaaa、或核酸ggaaag、或核酸ggcaag、或核酸gggaag編碼，且其中該編碼甘胺酸-離胺酸-二肽之核酸視情況以核苷酸g或核苷酸a為首。

可用於實施本發明之方法及技術已為熟習此項技術者所習知且闡述於(例如)Ausubel, F.M.編輯，Current Protocols in Molecular Biology，第I至III卷(1997)，及Sambrook等

人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第二版，冷泉港實驗室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)，冷泉港，N.Y. (1989)中。如熟習此項技術者所習知，使用重組DNA技術能夠製造核酸及/或多肽之多種衍生物。該等衍生物可(例如)在一個個體中或在數個位置藉由替代、改變、交換、缺失或插入經修飾。該修飾或衍生化可(例如)藉助定向誘變實施。該等修飾可容易地由熟習此項技術者實施(參見(例如)Sambrook, J.等人，Molecular Cloning: A laboratory manual (1999)冷泉港實驗室出版社，紐約，USA)。使用重組技術使得熟習此項技術者能夠用異源核酸轉化各種宿主細胞。儘管不同細胞之轉錄及轉譯(即表現)機制使用相同元件，但是屬於不同物種之細胞可能尤其具有不同的所謂密碼子使用。因此，相同多肽(就胺基酸序列而言)可能藉由不同核酸編碼。而且，由於基因代碼之簡併性，不同核酸可能編碼相同多肽。

本文所用之"核酸"係指由個體核苷酸(亦稱為鹼基)a、c、g及t(在RNA中或u)組成之聚合分子，例如係指DNA、RNA或其修飾。該聚核苷酸分子可為天然存在之聚核苷酸分子或合成性聚核苷酸分子或一或多種天然存在之聚核苷酸分子與一或多種合成性聚核苷酸分子之組合。該定義亦涵蓋其中一或多個核苷酸經改變(例如藉由誘變)、缺失或添加之天然存在的聚核苷酸分子。核酸可經分離或整合於另一核酸中，例如於表現盒、質粒或宿主細胞之染色體中。核酸之特徵亦在於其核酸序列由個體核苷酸組成。

熟習此項技術者已熟知將(例如)多肽之胺基酸序列轉變成編碼該胺基酸序列之對應核酸序列的程序及方法。因此，核酸之特徵在於由個體核苷酸組成之其核酸序列且亦在於由此經編碼之多肽之胺基酸序列。

術語"質粒"包括(例如)穿梭質粒及表現質粒以及轉染質粒。術語"載體"在本申請案中與"質粒"同義使用。一般而言，"質粒"將亦包含複製起點(例如ColE1或oriP複製起點)及選擇標記(例如胺苄西林、卡那黴素、四環素、或氯黴素選擇標記)以分別用於細菌中質粒之複製及選擇。

"表現盒"係指含有諸如啓動子及聚腺苷酸化位點等必需調控元件以在細胞中表現至少所含有核酸之構建體。

"選擇標記"係容許攜帶選擇標記之細胞在對應選擇劑存在下特異性經選擇或不選擇之核酸。一般而言，選擇標記將賦予藥物抗性或補償宿主細胞中之代謝或分解代謝缺陷。選擇標記可為陽性、陰性或雙功能選擇標記。有用之陽性選擇標記係抗生素抗性基因。該選擇標記容許以其轉化之宿主細胞在諸如抗生素等對應選擇劑存在下經陽性選擇。未經轉化之宿主細胞在選擇性培養條件(即在選擇劑存在下)下於培養物中不能生長或存活。陽性選擇標記容許選擇攜帶標記之細胞，而陰性選擇標記容許攜帶標記之細胞經選擇性消除。用於真核細胞之選擇標記包括(例如)胺基糖苷磷酸轉移酶(APH)之基因，例如潮黴素(hyg)、新黴素(neo)、及G418選擇標記、二氫葉酸還原酶(DHFR)、胸苷激酶(tk)、麩胺醯胺合成酶(GS)、天冬醯胺合成酶、

色胺酸合成酶(選擇劑吲哚)、組胺醇脫氫酶(選擇劑組胺醇D)、及賦予對嘌呤黴素、博來黴素、腐草黴素、氯黴素、爭光黴素(Zeocin)及黴酚酸之抗性的核酸。其他標記基因報導於(例如)WO 92/08796及WO 94/28143中。

本文所用之術語"表現"係指在細胞內發生之轉錄及/或轉譯過程。細胞中所關注核酸序列之轉錄程度可基於細胞中存在之對應mRNA的量來測定。例如，自所關注序列轉錄之mRNA可藉由RT-PCR或藉由北方雜交定量(參見Sambrook等人，1989，見上文)。藉由所關注核酸編碼之多肽可使用識別且與該多肽結合之免疫球蛋白藉由多種方法定量，例如藉由ELISA、藉由分析多肽之生物活性、或藉由使用獨立於該活性之分析法，例如西方墨點法或放射免疫分析法(參見Sambrook等人，1989，見上文)。

術語"細胞"或"宿主細胞"係指核酸(例如編碼異源多肽之核酸)可或已經引入/轉染至其中之細胞。術語"細胞"包括用於質粒繁殖之原核細胞及用於核酸表現之真核細胞二者。較佳地，真核細胞係哺乳動物細胞。較佳地，哺乳動物細胞係選自包含CHO細胞(例如CHO K1、CHO DG44)、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK 293細胞、HEK 293 EBNA細胞、PER.C6®細胞及COS細胞之哺乳動物細胞群組。本文所用之表現"細胞"包括標的細胞及其子代。因此，詞語"轉化體"及"轉化細胞"包括初級標的細胞及培養物中衍生自其之細胞而不考慮轉移次數。亦應瞭解，所有子代之DNA含量可能由於特意的或無意的突變而不精確地

相同。包括與最初轉化細胞中所篩選者具有相同功能或生物活性之變異子代。

"多肽"係天然製造或合成製造之由藉由肽鍵連接之胺基酸組成的聚合物。少於約20個胺基酸殘基之多肽可稱為"肽"，而由兩個或更多個多肽組成或包含一個多於100個胺基酸殘基之多肽的分子可稱為"蛋白質"。多肽亦可包含諸如碳水化合物基團、金屬離子或羧酸酯等非胺基酸組份。該等非胺基酸組份可藉助其中該多肽經表現之細胞添加，且可隨細胞類型而變化。本文中之多肽根據其胺基酸骨架結構或編碼其之核酸定義。諸如碳水化合物基團等添加物通常並不指定，但仍然可以存在。

本申請案中所用之術語"胺基酸"表示羧基α-胺基酸基團，其可直接或以前體形式藉由核酸編碼。單個胺基酸係藉由各由三個核苷酸組成之核酸(所謂密碼子或鹼基三聯體)編碼。每一胺基酸藉由至少一個密碼子編碼。例如，胺基酸甘胺酸可藉由四個核酸(密碼子)gga、ggc、ggg及ggt中之每一個編碼，而胺基酸離胺酸僅可藉由兩個核酸aaa及aag編碼。該現象稱為"基因代碼之簡併"。胺基酸群組包含丙胺酸(三字母代碼：ala，一字母代碼：A)、精胺酸(arg, R)、天冬醯胺(asn, N)、天冬胺酸(asp, D)、半胱胺酸(cys, C)、麩胺醯胺(gln, Q)、麩胺酸(glu, E)、甘胺酸(gly, G)、組胺酸(his, H)、異白胺酸(ile, I)、白胺酸(leu, L)、離胺酸(lys, K)、甲硫胺酸(met, M)、苯丙胺酸(phe, F)、脯胺酸(pro, P)、絲胺酸(ser, S)、蘇胺酸(thr, T)、色

胺酸(trp, W)、酪胺酸(tyr, Y)及纈胺酸(val, V)。

本文所用之術語"免疫球蛋白"表示由一或多個基本上藉由免疫球蛋白基因編碼之多肽組成之蛋白質。該定義包括諸如突變形式等變體，即具有一或多個胺基酸替代、缺失及插入之形式、N-端經截短之形式、融合形式、嵌合形式以及人類化形式。經識別之免疫球蛋白基因包括來自(例如)靈長類動物及齧齒類動物之不同恆定區基因以及無數免疫球蛋白可變區基因。單株免疫球蛋白較佳。免疫球蛋白之每一重多肽鏈及輕多肽鏈可包含恆定區(通常為羧基端部分)。

本文所用之術語"單株免疫球蛋白"係指自實質上同源之免疫球蛋白群體獲得之免疫球蛋白，即包含該群體之單個免疫球蛋白除了可能之天然存在之可少量存在的突變外完全相同。單株免疫球蛋白具有高度特異性，其針對單個抗原位點。而且，與包括針對不同抗原位點(決定子或抗原決定部位)之不同免疫球蛋白之多株免疫球蛋白製品相反，每一單株免疫球蛋白皆針對抗原上之單個抗原位點。除單株免疫球蛋白之特異性外，單株免疫球蛋白之優勢亦在於其可不受其它免疫球蛋白污染而合成。修飾詞"單株"表明該免疫球蛋白之特徵係自實質上同源之免疫球蛋白群體獲得，且不能理解為需要藉由任一特定方法來製造該免疫球蛋白。

非人類(例如齧齒類動物)免疫球蛋白之"人類化"形式係含有衍生自非人類免疫球蛋白及人類免疫球蛋白之部分序

列的嵌合免疫球蛋白。在極大程度上，人類化免疫球蛋白係衍生自人類免疫球蛋白(接受者免疫球蛋白)之具有期望特異性及親和性的免疫球蛋白，其中來自超變區之殘基藉由來自諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物等非人類物種之超變區的殘基(供體免疫球蛋白)替換(參見(例如)Morrison, S.L.等人，Proc. Natal. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855；美國專利第5,202,238號；美國專利第5,204,244號)。在一些情形中，人類免疫球蛋白之框架區(FR)殘基藉由對應非人類殘基所替換。而且，人類化免疫球蛋白可包含進一步修飾，例如未在接受者免疫球蛋白或供體免疫球蛋白中發現之胺基酸殘基。該等修飾導致與對應親本序列同源但不相同之該接受者或供體免疫球蛋白之變體。實施該等修飾可進一步改進免疫球蛋白性能。通常而言，人類化免疫球蛋白將包含基本上所有至少一個(且一般兩個)可變結構域，其中所有或基本上所有超變環對應於非人類供體免疫球蛋白之超變環，且所有或基本上所有FR為人類接受者免疫球蛋白之FR。人類化免疫球蛋白視情況亦包含至少一部分免疫球蛋白恆定區(一般而言為人類免疫球蛋白恆定區)。用於人類化非人類免疫球蛋白之方法業內已有闡述。較佳地，將一或多個來自非人類來源之胺基酸殘基引入至人類化免疫球蛋白中。該等非人類胺基酸殘基通常稱為"引入"殘基，其一般取自"引入"可變結構域。人類化可基本上按照Winter及同事之方法藉由用超變區序列替代非人類免疫球蛋白之對應序列來實施。因

此，該等"人類化"免疫球蛋白係嵌合免疫球蛋白，其中實質上少於一個完整人類可變結構域已由來自非人類物種之對應序列所替代。實際上，人類化免疫球蛋白一般為人類免疫球蛋白，其中一些超變區殘基且可能一些框架區殘基由來自齧齒類動物或非人類靈長類動物免疫球蛋白之類似位點之殘基所替代。

端視免疫球蛋白重鏈之恆定區的胺基酸序列，免疫球蛋白可分成以下種類：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM。一些該等種類可進一步分成亞類(同種型)，例如IgG1、IgG2、IgG3及IgG4、IgA1及IgA2。根據重鏈恆定區，免疫球蛋白重鏈之不同種類分別表示為α-、δ-、ε-、γ-及μ-鏈。IgA、IgD及IgG類全長人類免疫球蛋白之重鏈恆定區由恆定結構域1(本文中表示為C_H1)、鉸鏈區、恆定結構域2 (C_H2)及恆定結構域3 (C_H3)構成。IgE及IgM類人類免疫球蛋白包含額外第四個恆定結構域(C_H4)。而且，IgM類免疫球蛋白聚合物包含多個(例如五個或六個)藉由二硫鍵共價連接之免疫球蛋白。該等不同人類免疫球蛋白種類之C-端恆定結構域胺基酸序列列示於表1中。SEQ ID NO: 01至08之第一胺基酸可存在或不存在，因為該胺基酸係藉由兩個外顯子編碼，編碼C-端恆定結構域之外顯子及編碼前述結構域之外顯子。

球蛋白重鏈之一級胺基酸序列之C-端相同。術語"一級胺基酸序列"表示對應mRNA轉譯後之免疫球蛋白重鏈的胺基酸序列。該一級胺基酸序列可在mRNA轉譯後在表現細胞中藉由(例如)自一級胺基酸序列肽酶切割一或多個C-端胺基酸進一步經修飾。因此，該一級胺基酸序列及分泌型胺基酸序列可不相同，而是在C-端相差一些胺基酸。在一個實施例中，該C-端部分包含至少100個免疫球蛋白重鏈一級胺基酸序列之C-端胺基酸，或較佳至少50個免疫球蛋白重鏈一級胺基酸序列之C-端胺基酸，或較佳至少20個免疫球蛋白重鏈一級胺基酸序列之C-端胺基酸。在一個實施例中，本發明核酸編碼IgG類免疫球蛋白之C_H3-結構域之C-端部分或IgE類免疫球蛋白之C_H4-結構域之C-端部分的胺基酸序列。在又一實施例中，本發明核酸編碼IgG類免疫球蛋白之C_H3結構域之C-端部分的胺基酸序列。

不同人類免疫球蛋白之C-端恆定結構域胺基酸序列係由對應DNA序列編碼。在基因組中，該等DNA序列含有編碼(外顯子)及非編碼(內含子)序列。在DNA轉錄成mRNA前體後，該mRNA前體亦含有該等內含子及外顯子序列。在轉譯之前，於mRNA加工期間藉由將非編碼內含子序列剪出初級mRNA轉錄物來移除非編碼內含子序列以產生成熟mRNA。初級mRNA之剪接係由剪接供體位點與適當隔開之剪接受體位點組合控制。剪接供體位點位於內含子序列之5'端且剪接受體位點位於內含子序列之3'端，二者在mRNA前體剪接過程期間均被部分移除。

術語"適當隔開"表示剪接供體位點及剪接受體位點在核酸中以可使所有剪接過程所需之元件可利用且在合適位置以容許剪接過程發生之方式排列。

本發明包含編碼IgA或IgG類免疫球蛋白之C_H3-結構域之C-端部分或IgE或IgM類免疫球蛋白之C_H4-結構域之C-端部分的胺基酸序列的核酸，其中包含在該C_H3-或C_H4-結構域之C-端部分的該胺基酸序列中之甘胺酸-離胺酸-二肽係由核酸ggaaaa、或核酸ggcaaa、或核酸gggaaa編碼。

已驚奇地發現，用本發明核酸可減少不期望剪接事件之不期望副產物形成。

本申請案中所用之術語"甘胺酸-離胺酸-二肽"表示在N-端至C-端方向上包含由一個肽鍵連接之兩個胺基酸甘胺酸及離胺酸的肽。本申請案中所用之術語"甘胺酸-離胺酸-二肽"表示較大多肽或蛋白質之二肽部分，其可見於該較大多肽之開始、內部或末端。胺基酸離胺酸可由核酸aaa及aag編碼。因此，本發明之另一實施例係包含於免疫球蛋白重鏈之C_H3-或C_H4-結構域之C-端部分的胺基酸序列中之甘胺酸-離胺酸-二肽係由核酸ggaaag、或核酸ggcaag、或核酸gggaag編碼。在另一實施例中，編碼該甘胺酸-離胺酸-二肽之核酸係以核苷酸a或g為首。

編碼不同人類免疫球蛋白種類及亞類之C-端恆定結構域的核酸序列列示於表2中。已知人類IgG1及IgG2之C_H3結構域的兩種變體形式。在一個實施例中，該核酸編碼免疫球蛋白重鏈之C-端恆定結構域的一部分。

表2： 編碼不同人類免疫球蛋白種類之重鏈之C-端部分的核酸序列。

免疫球蛋白種類 (C-端恒定結構域)	編碼免疫球蛋白重鏈之胺基酸序列之C-端部分的核酸序列	SEQ ID NO:
IgA1 (C_H3)、IgA2 (C_H3)	ggcttcagcc ccaaggacgt gctggttcgc tggctgcagg ggtcacagga gctgccccgc gagaagtacc tgacttgggc atcccggcag gagcccagcc agggcaccac caccttcgct gtgaccagca tactgcgcgt ggcagccgag gactggaaga agggggacac cttctcctgc atggtgggcc acgaggccct gccgctggcc ttcacacaga agaccatcga ccgcttggcg ggtaaaccca cccatgtcaa tgtgtctgtt gtcatggcgg aggtggacgg cacctgctac	09
IgD (C_H3)	taccacccaa cgtccgtgac tgtcacctgg tacatgggga cacagagcca gccccagaga accttccctg agatacaaag acgggacagc tactacatga caagcagcca gctctccacc cccctccagc agtggcgcca aggcgagtac aaatgcgtgg tccagcacac cgccagcaag agtaagaagg agatcttccg ctggccaggt aggtcgcacc ggagatcacc cagaagggcc ccccaggacc cccagcacct tccactcagg gcctgaccac aaagacagaa gcaagggctg	10
IgE (C_H4)	tttgcgacgc cggagtggcc ggggagccgg gacaagcgca ccctcgcctg cctgatccag aacttcatgc ctgaggacat ctcggtgcag tggctgcaca acgaggtgca gctcccggac gcccggcaca gcacgacgca gccccgcaag accaagggct ccggcttctt cgtcttcagc cgcctggagg tgaccagggc cgaatgggag cagaaagatg agttcatctg ccgtgcagtc catgaggcag cgagcccctc acagaccgtc cagcgagcgg tgtctgtaaa tcccggtaaa	11
IgM (C_H4)	acgggcttct ctcccgcgga cgtcttcgtg cagtggatgc agaggggcca gcccttgtcc ccggagaagt atgtgaccag cgccccaatg cctgagcccc aggccccagg ccggtacttc gcccacagca tcctgaccgt gtccgaagag gaatggaaca cgggggagac ctacacctgc gtggtggccc atgaggccct gcccaacagg gtcaccgaga ggaccgtgga caagtccacc ggtaaaccca ccctgtacaa cgtgtccctg gtcatgtccg acacagctgg cacctgctac	12
IgG1 (C_H3) 變體1	gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	13
IgG1 (C_H3) 變體2	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	28

免疫球蛋白種類 (C-端恆定結構域)	編碼免疫球蛋白重鏈之胺基酸序列之C-端部分的核酸序列	SEQ ID NO:
	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a	
IgG2 (C_H3) 變體1	gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac acctcccatg ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	14
IgG2 (C_H3) 變體2	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat ctccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a	29
IgG3 (C_H3)	gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcag cgggcagccg gagaacaact acaacaccac gcctcccatg ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acatcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	15
IgG4 (C_H3)	gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg caggagggga atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa	16

在一個實施例中，本發明核酸編碼選自SEQ ID NO: 1、3、4、5、6、7或8之胺基酸序列的胺基酸序列。

在一個實施例中，該核酸編碼IgA、IgE、IgM或IgG類免疫球蛋白重鏈之C-端恆定結構域的一部分且係選自SEQ ID NO: 17、18、19、20、21、22、或23、或30、或31之

核酸。在另一實施例中，該核酸編碼IgA、IgE、IgM或IgG類免疫球蛋白重鏈之C-端恆定結構域的一部分且係選自SEQ ID NO: 17、18、19、22、23、30或31之核酸。在又一實施例中，該核酸編碼IgA、IgE、IgM或IgG類免疫球蛋白重鏈之C-端恆定結構域的一部分且係選自SEQ ID NO: 17、18、19、22或23之核酸。

具有SEQ ID NO: 17至23及30至31之核苷酸序列的核酸亦為本發明之態樣。在一個實施例中，SEQ ID NO: 17、18、19、22、23、30或31之核苷酸序列係本發明之態樣。在另一實施例中，SEQ ID NO: 17、18、19、22或23之核苷酸序列係本發明之態樣。

在一個實施例中，該核酸編碼IgA、IgE、IgM或IgG類免疫球蛋白之C-端恆定結構域，且包含選自SEQ ID NO: 17、18、19、20、21、22、或23、或30、或31核酸之核酸，該核酸編碼該免疫球蛋白重鏈之C-端結構域的一部分。在另一實施例中，該核酸編碼IgA、IgE、IgM或IgG類免疫球蛋白之C-端恆定結構域，且包含選自SEQ ID NO: 17、18、19、22、23、30或31核酸之核酸，該核酸編碼該免疫球蛋白重鏈之C-端結構域的一部分。在又一實施例中，該核酸編碼IgA、IgE、IgM或IgG類免疫球蛋白之C-端恆定結構域，且包含選自SEQ ID NO: 17、18、19、22或23核酸之核酸，該核酸編碼該免疫球蛋白重鏈之C-端結構域的一部分。

表3： 編碼不同種類免疫球蛋白重鏈之C-端恆定結構域胺基酸序列之一部分的本發明核酸序列。

免疫球蛋白種類	編碼C-端胺基酸序列之核酸序列	SEQ ID NO:
IgA	ggcaaaccca cccatgtcaa tgtgtctgtt gtcatggcgg aggtggacgg cacctgctac	17
IgE	catgaggcag cgagcccctc acagaccgtc cagcgagcgg tgtctgtaaa tcccggcaaa	18
IgM	ggcaaaccca ccctgtacaa cgtgtccctg gtcatgtccg acacagctgg cacctgctac	19
IgG1 變體1	atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa	20
IgG1 變體2	atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa	30
IgG2 變體1	atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa	21
IgG2 變體2	atctccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggc aaa	31
IgG3	atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa	22
IgG4	atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggcaaa	23

本發明核酸編碼IgA、IgE、IgM或IgG類免疫球蛋白之C-端恆定結構域的至少一部分。術語"C-端恆定結構域"表示IgA或IgG類免疫球蛋白重鏈之C_H3-結構域或IgE或IgM類免疫球蛋白重鏈之C_H4-結構域。說法"一部分"表示在自免疫球蛋白重鏈C-端至N-端方向上自C-端計數具有一級胺基酸序列之至少20個連續胺基酸、或至少50個連續胺基酸、或至少100個連續胺基酸之IgA、IgE、IgM或IgG類免疫球蛋白重鏈之C-端恆定結構域的C-端部分。

免疫球蛋白之重組製造已為熟習此項技術者所熟知且闡

述於(例如)Makrides, S.C.，Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202；Geisse, S.等人，Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282；Kaufman, R.J.，Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160；Werner, R.G.，Arzneimittelforschung - Drug Research 48 (1998) 870-880等綜述文章中。

對於製造包含藉由本發明核酸編碼之胺基酸序列的免疫球蛋白，本發明進一步包含用於在哺乳動物細胞中製造免疫球蛋白的方法，其包含以下步驟：

a) 用編碼免疫球蛋白重鏈之核酸轉染哺乳動物細胞，其中選自SEQ ID NO: 17、18、19、20、21、22、或23、或30、或31核酸之核酸編碼該免疫球蛋白重鏈之C-端結構域的一部分，

b) 在適於表現該免疫球蛋白之條件下對該經轉染之哺乳動物細胞實施培養，

c) 自培養物或細胞回收免疫球蛋白。

術語"在適於表現免疫球蛋白之條件下"表示用於表現免疫球蛋白之哺乳動物細胞之培養且已為熟習此項技術者所習知或可容易地由熟習此項技術者所確定之條件。熟習此項技術者亦習知該等條件可端視所培養之哺乳動物細胞類型及所表現之免疫球蛋白類型而變化。通常而言，哺乳動物細胞係在(例如)介於20℃與40℃之間之溫度下培養且培養足以容許免疫球蛋白之有效蛋白質製造的時間段，例如4天至28天。

在一個實施例中，該轉染哺乳動物細胞係用編碼免疫球

蛋白重鏈之核酸實施，其中選自SEQ ID NO: 17、18、19、22、23、30或31核酸之核酸編碼該免疫球蛋白重鏈之C-端結構域的一部分。在又一實施例中，該轉染哺乳動物細胞係用編碼免疫球蛋白重鏈之核酸實施，其中選自SEQ ID NO: 17、18、19、22或23核酸之核酸編碼該免疫球蛋白重鏈之C-端結構域的一部分。在一個實施例中，哺乳動物細胞係用一種(a，即one)包含編碼免疫球蛋白重鏈之表現盒及編碼免疫球蛋白輕鏈之表現盒的核酸轉染。在另一實施例中，哺乳動物細胞係用兩種核酸轉染，一種核酸包含編碼免疫球蛋白輕鏈之表現盒且一種核酸包含編碼免疫球蛋白重鏈之表現盒。

用本發明方法製造之免疫球蛋白較佳係異源免疫球蛋白。術語"異源免疫球蛋白"表示非藉由該哺乳動物細胞天然製造之免疫球蛋白。按照本發明方法製造之免疫球蛋白係藉由重組手段製造。該等方法廣泛為熟習此項技術者所習知且包含於原核及真核細胞中表現蛋白質以及隨後回收及分離異源免疫球蛋白及通常將其純化至醫藥上可接受之純度。對於免疫球蛋白之製造(即表現)，藉由標準方法將編碼輕鏈之核酸及編碼包含本發明核酸之重鏈之核酸各插入至表現盒中。可容易地使用習用程序對編碼免疫球蛋白之核酸實施分離及測序。雜交瘤細胞可用作該等核酸之來源。可將表現盒插入至表現質粒中，隨後將表現質粒轉染至宿主細胞中，否則其不製造免疫球蛋白。表現係在合適原核或真核宿主細胞中實施且自溶胞後之細胞或自培養物

上清液回收免疫球蛋白。

不同方法已非常確實且廣泛用於蛋白質回收及純化，例如用微生物蛋白質之親和層析法(例如蛋白質A或蛋白質G親和層析法)、離子交換層析法(例如陽離子交換(羧基甲基樹脂)、陰離子交換(胺基乙基樹脂)及混合形式交換)、嗜硫菌吸附(例如用β-巰基乙醇及其他SH配體)、疏水性相互作用或芳香族吸附層析法(例如用苯基-瓊脂糖、氮雜-親芳烴(arenophilic)樹脂、或間-胺基苯基硼酸)、金屬螯合親和層析法(例如用Ni(II)-及Cu(II)-親和性物質)、尺寸排除層析法及電泳方法(例如凝膠電泳、毛細管電泳)(Vijayalakshmi，M.A. Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102)。

本發明進一步包含編碼包含本發明核酸之免疫球蛋白重鏈的核酸。而且，本發明包含質粒及細胞，該質粒包含本發明核酸，該細胞包含該質粒。

本發明之另一態樣係用於改良免疫球蛋白在哺乳動物細胞中之表現的方法，其中編碼免疫球蛋白重鏈之核酸包含編碼C_H3-或C_H4-結構域中含有之甘胺酸-離胺酸-二肽的核酸ggaaaa、或核酸ggcaaa、或核酸gggaaa、或核酸ggaaag、或核酸ggcaag、或核酸gggaag。該核酸可減少或抑制不期望之剪接事件。

在本發明之一個實施例中，該免疫球蛋白重鏈係IgG4亞類人類抗體之免疫球蛋白重鏈或IgG1、IgG2或IgG3亞類人類抗體之免疫球蛋白重鏈。在一個實施例中，該免疫球蛋

白重鏈係人類免疫球蛋白重鏈且較佳來自人類IgG4亞類或係來自人類IgG1亞類之突變免疫球蛋白重鏈。在另一實施例中，該免疫球蛋白重鏈係來自具有突變L234A及L235A之人類IgG1亞類。在又一實施例中，該免疫球蛋白重鏈係具有突變S228P之人類IgG4免疫球蛋白重鏈。在一個實施例中，該免疫球蛋白重鏈係在L234、L235及/或D265具有突變及/或含有PVA236突變之IgG4亞類或IgG1或IgG2亞類之免疫球蛋白重鏈。在其他實施例中，突變係S228P、L234A、L235A、L235E及/或PVA236(PVA236意指IgG1之自胺基酸位置233至236的胺基酸序列ELLG(以一字母胺基酸代碼給出)或IgG4之EFLG藉由PVA替換)。較佳者係突變IgG4之S228P及IgG1之L234A及L235A(按照Kabat之EU索引編號)。

本文所用之"調控元件"係指編碼所關注多肽之核酸序列轉錄及/或轉譯所必需之以順式形式存在之核苷酸序列。轉錄調控元件通常包含擬表現核酸序列之啓動子上游、轉錄起始及終止位點及聚腺苷酸化信號序列。術語"轉錄起始位點"係指核酸中對應於納入初級轉錄物(即mRNA前體)中之第一核酸的核酸鹼基；轉錄起始位點可能與啓動子序列重疊。術語"轉錄終止位點"係指通常在擬轉錄所關注基因之3'末端呈現之造成RNA聚合酶終止轉錄的核苷酸序列。聚腺苷酸化信號序列或聚腺苷酸添加信號提供用於在真核mRNA之3'末端的具體位點上切割及在核中向經切割3'末端轉錄後添加約100-200個腺嘌呤核苷酸(聚腺苷酸尾)之

序列的信號。聚腺苷酸化信號序列可包括位於自切割位點約10-30個核苷酸上游之共有序列AATAAA。

為製造分泌型多肽，所關注核酸包括編碼信號序列/前導肽之DNA片段。信號序列引導新近合成之多肽到達及通過ER膜，其中可確定該多肽之分泌途徑。信號序列在蛋白質越過ER膜期間藉由信號肽酶切除。就信號序列之功能而言，宿主細胞分泌機制之識別甚為重要。因此，所用信號序列應藉由宿主細胞之分泌機制蛋白質及酶識別。

轉譯調控元件包括轉譯起始(AUG)及終止密碼子(TAA、TAG或TGA)。內核糖體進入位點(IRES)可包括於一些構建體中。

"啓動子"係指控制基因/結構基因或與其可操作地連接之核酸序列轉錄的聚核苷酸序列。啓動子包括用於RNA聚合酶結合及轉錄起始之信號。所用啓動子將在預期在其中表現所選擇序列之宿主細胞細胞類型中起作用。包括來自多種不同來源之組成型、誘導型及抑制型啓動子之許多啓動子已為熟習此項技術者所熟知(且在諸如GenBank等資料庫中予以鑑別)且可以選殖聚核苷酸或在選殖聚核苷酸內得到(自(例如)諸如ATCC等存儲機構以及其他商業或個人來源)。"啓動子"包含引導結構基因轉錄之核苷酸序列。一般而言，啓動子位於基因之5'非編碼或非轉譯區中，與結構基因之轉錄起始位點鄰近。在轉錄起始中起作用之啓動子內的序列元件之特徵通常在於共有核苷酸序列。該等啓動子元件包括RNA聚合酶結合位點、TATA序列、CAAT序

列、分化特異性元件(DSE；McGehee, R.E.等人，Mol. Endocrinol. 7 (1993) 551-560)、環AMP反應元件(CRE)、血清反應元件(SRE; Treisman, R., Seminars in Cancer Biol. 1 (1990) 47-58)、糖皮質激素反應元件(GRE)及用於其他轉錄因子之結合位點，例如CRE/ATF(Treisman, R., Seminars in Cancer Biol. 1 (1990) 47-58；O'Reilly, M.A.等人，J. Biol. Chem. 267 (1992) 19938)、AP2(Ye, J.等人，J. Biol. Chem. 269 (1994) 25728)、SP1、cAMP反應元件結合蛋白(CREB; Loeken, M.R., Gene Expr. 3 (1993) 253)及八聚體因子(參見，通常而言，Watson等人編輯，Molecular Biology of the Gene，第4版(The Benjamin/Cummings Publishing Company公司，1987)及Lemaigre, F.P.及Rousseau, G.G.，Biochem. J. 303 (1994) 1-14)。若啓動子為誘導型啓動子，則轉錄速率響應誘導劑而增加。相反，若啓動子為組成型啓動子，則轉錄速率不受誘導劑調控。亦已知抑制型啓動子。例如，c-fos啓動子在生長激素結合至細胞表面上之其受體時特異性地被激活。四環素(tet)調控表現可藉助由(例如)CMV啓動子繼之兩個Tet-操縱基因位點組成之人工雜合啓動子達成。Tet-抑制子與兩個Tet-操縱基因位點結合並阻斷轉錄。在添加誘導物四環素後，Tet-抑制子自Tet-操縱基因位點釋放並進行轉錄(Gossen, M.及Bujard，H. PNAS 89 (1992) 5547-5551)。對於包括金屬硫蛋白及熱激啓動子之其他誘導型啓動子，參見，例如，Sambrook等人(見上文)及Gossen, M., Curr. Opin.

Biotech. 5 (1994) 516-520。已由於高程度表現鑑別為強啓動子之真核啓動子包括SV40早期啓動子、腺病毒主要晚期啓動子、小鼠金屬硫蛋白-I啓動子、Rous肉瘤病毒長末端重複序列、中國倉鼠延長因子1 α(CHEF-1，參見例如美國專利第5,888,809號)、人類EF-1 α、泛素及人類巨細胞病毒立即早期啓動子(CMV IE)。

"啓動子"可為組成型或誘導型啓動子。可能需要增強子(即，作用於啓動子以增加轉錄之順式作用DNA元件)結合啓動子起作用以提高單獨用啓動子所獲得之表現程度，且可作為轉錄調控元件包括。通常，含有啓動子之聚核苷酸片段亦包括增強子序列(例如，CMV或SV40)。

本文所用之"增強子"係指可增強基因或與其可操作地連接之編碼序列轉錄的聚核苷酸序列。與啓動子不同，增強子之取向及位置相對獨立且可見於轉錄單元之5'或3'(Lusky, M.,等人，Mol. Cell Bio., 3 (1983) 1108-1122)、內含子內(Banerji, J.等人，Cell，33 (1983) 729-740)以及編碼序列本身內(Osborne, T.F.等人，Mol. Cell Bio., 4 (1984) 1293-1305)。因此，增強子可置於轉錄起始位點之上游或下游或距啓動子相當大距離處，儘管實際上增強子可在物理上及功能上與啓動子重疊。來自多種不同來源之許多增強子已為熟習此項技術者所熟知(且在諸如GenBank等資料庫中予以鑑別)且可以選殖聚核苷酸序列或在選殖聚核苷酸序列內得到(自(例如)諸如ATCC等存儲機構以及其他商業或個人來源)。許多包含啓動子序列(例如常用之

CMV啓動子)之聚核苷酸亦包含增強子序列。例如，所有上文所列示之強啓動子亦可含有強增強子(參見(例如)Bendig, M.M., Genetic Engineering, 7 (Academic Press，1988) 91-127)。

"內核糖體進入位點"或"IRES"闡述功能上啓動獨立於IRES之基因5'之轉譯起始且容許兩個順反子(開放閱讀框)在動物細胞中自單個轉錄物轉譯之序列。IRES提供用於其開放閱讀框立即下游(在本文中下游與3'可互換使用)轉譯之獨立核糖體進入位點。與可為多順反子(即，編碼數個自mRNA依序轉譯之不同多肽)的細菌mRNA不同，動物細胞之大多數mRNA係單順反子且編碼僅一個蛋白質之合成。就真核細胞中之單順反子轉錄物而言，轉譯將始於5'端轉譯起始位點，終止於第一終止密碼子，且該轉錄物將自核糖體釋放，導致mRNA中僅第一經編碼多肽轉譯。在真核細胞中，在轉錄物中具有與第二或隨後開放閱讀框可操作地連接之IRES的多順反子轉錄物容許該下游開放閱讀框依序轉譯以產生兩個或更多個藉由相同轉錄物編碼之多肽。先前已闡述在載體構建中使用IRES元件，參見，例如，Pelletier, J.等人，Nature 334 (1988) 320-325；Jang, S.K.等人，J. Virol. 63 (1989) 1651- 1660；Davies, M.V.等人，J. Virol. 66 (1992) 1924-1932；Adam, M.A.等人，J. Virol. 65 (1991) 4985- 4990；Morgan, R.A.等人，Nucl. Acids Res. 20 (1992) 1293-1299；Sugimoto, Y等人，Biotechnology 12 (1994) 694-698；Ramesh, N.等人，Nucl.

Acids Res. 24 (1996) 2697-2700；及Mosser, D.D.等人，BioTechniques 22 (1997) 150-161。

"可操作地連接"係指兩個或更多個組件之並置，其中所述之該等組件係呈允許該等以期望方式起作用之關係。例如，若啓動子及/或增強子以順式方式作用以控制或調節所連接序列之轉錄，則該啓動子及/或增強子可操作地連接於編碼序列。通常而言(但並非必需)，"可操作地連接"之DNA序列係鄰接序列，在需要連接兩個蛋白質編碼區域(例如分泌前導序列及多肽)時，則為鄰接序列且在(閱讀)框中。然而，儘管可操作地連接之啓動子通常位於編碼序列之上游，但不必與其鄰接。增強子無需鄰接。若增強子增加編碼序列之轉錄，則增強子可操作地連接於編碼序列。可操作地連接之增強子可位於編碼序列之上游、內部或下游及距啓動子相當大距離。若聚腺苷酸化位點位於編碼序列之下游端以致轉錄經過編碼序列進行至聚腺苷酸化序列，則該聚腺苷酸化位點可操作地連接於編碼序列。若轉譯終止密碼子位於編碼序列之下游端(3'端)以致轉譯經過編碼序列進行至終止密碼子並在該處終止，則該轉譯終止密碼子可操作地連接於外顯子核酸序列。連接係藉由此項技術習知之重組方法完成，例如，使用PCR方法及/或藉由在適宜限制位點接合。若適宜限制位點不存在，則根據習用操作使用合成之寡核苷酸銜接子(adaptors)或連接子。

"異源DNA"或"異源多肽"係指天然不存在於給定宿主細胞中之DNA分子或多肽、或DNA分子群體或多肽群體。只

要宿主DNA與非宿主DNA(即外源DNA)組合，對於特定宿主細胞異源之DNA分子即可含有來源自宿主細胞物種之DNA(即內源DNA)。例如，含有編碼多肽之非宿主DNA片段可操作地連接於包含啓動子之宿主DNA片段的DNA分子視為異源DNA分子。反之，異源DNA分子可包含與外源啓動子可操作地連接之內源結構基因。

由非宿主DNA分子所編碼之肽或多肽係"異源"肽或多肽。

"表現質粒"係編碼擬在宿主細胞中表現之蛋白質的核酸分子。一般而言，表現質粒包含原核質粒繁殖單元(例如對於大腸桿菌，包含複製起點及選擇標記)、真核選擇標記及一或多個用於表現所關注結構基因之表現盒，該等中之每一者皆包含啓動子、結構基因及包括聚腺苷酸化信號之轉錄終止子。基因表現通常置於啓動子之控制下，且稱該結構基因與啓動子"可操作地連接"。類似地，若調控元件調節核心啓動子之活性，則調控元件與核心啓動子可操作地連接。

"經分離多肽"係基本上不含雜質細胞組份之多肽，該等雜質細胞組份係例如碳水化合物、脂質或與天然多肽有關之其他蛋白質雜質。一般而言，經分離多肽製品含有高度純化形式之多肽，即至少約80%純淨、至少約90%純淨、至少約95%純淨、高於95%純淨或高於99%純淨。一種顯示特定蛋白質製品含有經分離多肽之方法係藉由在蛋白質製品之十二烷硫酸鈉(SDS)-聚丙烯醯胺凝膠電泳及凝膠之

考馬斯亮藍(Coomassie Brilliant Blue)染色後出現單鍵。然而，術語"經分離的"不排除存在呈替代物理形式之相同多肽，例如二聚體或(另一選擇為)糖基化或衍生化形式。

本申請案中表示之"轉錄終止子"係長度上具有50-750個鹼基對之DNA序列，其給與RNA聚合酶mRNA合成終止之信號。在表現盒之3'末端的非常高效(強)之終止子可用以防止RNA聚合酶連讀，尤其當使用強啓動子時。無效轉錄終止子可導致形成操縱子樣mRNA，此可能緣於不期望(例如經質粒編碼)之基因表現。

以下實例、序列表及圖係提供用於幫助理解本發明，本發明之真實範圍於隨附專利申請範圍中闡明。應瞭解，可對所述程序實施修改，此並不偏離本發明之精神。

序列說明

SEQ ID NO: 01　人類IgA類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H3)胺基酸序列的C-端部分

SEQ ID NO: 02　人類IgD類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H3)胺基酸序列的C-端部分

SEQ ID NO: 03　人類IgE類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H4)胺基酸序列的C-端部分

SEQ ID NO: 04　人類IgM類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H4)胺基酸序列的C-端部分

SEQ ID NO: 05　人類IgG1類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H3)胺基酸序列的C-端部分

SEQ ID NO: 06　人類IgG2類免疫球蛋白之重鏈恆定結

構域(C_H3)胺基酸序列的C-端部分

SEQ ID NO: 07　人類IgG3類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H3)胺基酸序列的C-端部分

SEQ ID NO: 08　人類IgG4類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H3)胺基酸序列的C-端部分

SEQ ID NO: 09　編碼人類IgA類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H3)胺基酸序列之C-端部分的核酸序列

SEQ ID NO: 10　編碼人類IgD類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H3)胺基酸序列之C-端部分的核酸序列

SEQ ID NO: 11　編碼人類IgE類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H4)胺基酸序列之C-端部分的核酸序列

SEQ ID NO: 12　編碼人類IgM類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H4)胺基酸序列之C-端部分的核酸序列

SEQ ID NO: 13、28　編碼人類IgG1類免疫球蛋白(變體1及2)之重鏈恆定結構域(C_H3)胺基酸序列之C-端部分的核酸序列

SEQ ID NO: 14、29　編碼人類IgG2類免疫球蛋白(變體1及2)之重鏈恆定結構域(C_H3)胺基酸序列之C-端部分的核酸序列

SEQ ID NO: 15　編碼人類IgG3類免疫球蛋白之重鏈恆

定結構域(C_H3)胺基酸序列之C-端部分的核酸序列

SEQ ID NO: 16　編碼人類IgG4類免疫球蛋白之重鏈恆定結構域(C_H3)胺基酸序列之C-端部分的核酸序列

SEQ ID NO: 17　編碼IgA類免疫球蛋白之一部分C-端恆定結構域(C_H3)胺基酸序列的本發明核酸序列

SEQ ID NO: 18　編碼IgE類免疫球蛋白之一部分C-端恆定結構域(C_H4)胺基酸序列的本發明核酸序列

SEQ ID NO: 19　編碼IgM類免疫球蛋白之一部分C-端恆定結構域(C_H4)胺基酸序列的本發明核酸序列

SEQ ID NO: 20、30　編碼IgG1類免疫球蛋白(變體1及2)之一部分C-端恆定結構域(C_H3)胺基酸序列的本發明核酸序列

SEQ ID NO: 21、31　編碼IgG2類免疫球蛋白(變體1及2)之一部分C-端恆定結構域(C_H3)胺基酸序列的本發明核酸序列

SEQ ID NO: 22　編碼IgG3類免疫球蛋白之一部分C-端恆定結構域(C_H3)胺基酸序列的本發明核酸序列

SEQ ID NO: 23　編碼IgG4類免疫球蛋白之一部分C-端

恒定結構域(C_H3)胺基酸序列的本發明核酸序列

SEQ ID NO: 24至27實例中所用之核酸引物。

材料及方法

重組DNA技術

如Sambrook等人，1989(見上文)中所述使用標準方法來處理DNA。所有分子生物學試劑皆為市售(若無另外說明)且按照製造商說明書使用。

核酸序列測定

DNA序列係藉由在MediGenomix GmbH(Martinsried，德國)上實施之雙鏈測序測定。

DNA及蛋白質序列分析及序列資料管理

使用GCG(Genetics Computer Group，Madison，Wisconsin，USA)之軟體包(版本10.2)及Infomax之Vector NTI Advance suite(版本8.0)來創建序列、映射、分析、注釋及說明。

細胞培養技術

使CHO-DXB11細胞在含有10% FCS(自Hyclone，Thermo Fisher Scientific公司獲得之胎牛血清，目錄號：SH3007.03)的MEM α培養基(Invitrogen公司，Gibco®，目錄號：22571)中生長。

HEK-293-EBNA細胞(ATCC # CRL-10852)係在補充有2 mM麩胺醯胺(Gibco®，目錄號：25030)、1% (v/v) MEM非必需胺基酸(Gibco®，目錄號：11140)、10% (v/v)超低IgG

FCS(Gibco®，目錄號：16250)及250 μg/ml G418(Roche Applied Sciences，Roche Diagnostics GmbH，德國，目錄號：1464981)之DMEM中培養。

用於培養CHO-DG44細胞之培養基係補充有10% (v/v)經透析FCS(Gibco®，目錄號：26400)及2% (v/v) HT補充物(Gibco®，目錄號：41065)之MEMα培養基(Gibco®，目錄號：22561)。為選擇經穩定轉染之CHO DG44細胞系，省去HT補充物並添加20至500 nM胺甲蝶呤(MTX)，單獨或與400 μg/ml潮黴素B(Roche Diagnostics GmbH，Roche Applied Sciences，德國，目錄號：10843555001)一起。

所有細胞系皆保持在37℃下具有5% CO_2之增濕培育箱中。細胞轉染係藉由核轉染(Amaxa GmbH，德國)或藉由使用FuGENE 6(Roche Diagnostics GmbH，Roche Applied Sciences，德國，目錄號：1815075)之脂轉染實施。

而且，採用如(例如)Bonifacino, J. S.等人(編輯)(2000) Current Protocols in cell Biology, John Wiley and Sons公司中所述之標準細胞培養技術。

蛋白質A-沈澱、SDS-PAGE及西方墨點法

用蛋白質A-瓊脂糖珠粒使來自細胞培養物上清液之免疫球蛋白沈澱並隨後藉由SDS/聚丙烯醯胺凝膠電泳(十二烷硫酸鈉，SDS-PAGE)及西方墨點法實施分析。

為使免疫球蛋白沈澱，將含有高達7 μg免疫球蛋白之細胞培養物上清液用TBS緩衝液(50 mM TRIS/HCl、pH 7.5，補充有150 mM NaCl)、1% (v/v)諾乃洗滌劑(Nonidet)-

P40(Roche Diagnostics GmbH，Roche Applied Sciences，目錄號：1754599)稀釋至最終體積為1 ml，且隨後與15 µl濕體積蛋白質A-瓊脂糖珠粒培育1小時。將該等珠粒藉由離心分離回收並用含有1% (v/v)諾乃洗滌劑P-40之TBS、然後用經2倍濃縮之PBS(磷酸鹽緩衝鹽水)及最後用100 mM檸檬酸鈉緩衝液(pH 5)洗滌。在最後洗滌步驟後，將上清液完全自該等珠粒移除。將結合免疫球蛋白用20 µl含有50 mM DTT(二硫蘇糖醇)之經2倍濃縮之LDS(十二烷硫酸鋰)樣品緩衝液(Invitrogen公司)溶析。在於95℃下培育5分鐘後，對懸浮液實施離心分離並回收上清液以用於進一步分析。

SDS-PAGE：SDS-PAGE係按照製造商建議使用NuPAGE®凝膠系統(Invitrogen公司)實施。將樣品裝載至10% NuPAGE® Novex Bis/TRIS凝膠(Invitrogen公司，目錄號：NP0301)上並在還原NuPAGE® MES SDS(4-嗎啉乙磺酸/十二烷硫酸鈉)運行緩衝液中分離蛋白質。一般而言，對於用Simply Blue Safe Stain®(Invitrogen公司)之考馬斯染色裝載2至3 µg免疫球蛋白/泳道且對於西方墨點法裝載0.4至0.6 µg。

西方墨點法：對於蛋白質自SDS/聚丙烯醯胺凝膠之電轉移，使用標準PVDF(聚二氟亞乙烯)或硝酸纖維素膜。在電轉移之後於TBS(三羥甲基胺基甲烷緩衝鹽水，50 mM TRIS/HCl，pH 7.5，150 mM NaCl)中洗滌膜。藉由在含有1% (w/v)西方阻斷試劑(Roche Diagnostics GmbH，Roche

Applied Sciences，目錄號：11921673001)之TBS中實施培育阻斷非特異性結合位點。人類免疫球蛋白γ重鏈及κ輕鏈係用稀釋於含有0.5% (w/v)西方阻斷試劑之TBS中之偶聯過氧化物酶的多株檢測抗體(進一步細節參見以下段落)來檢測。在用含有0.05% (v/v) Tween® 20之TBS實施三次洗滌步驟及用TBS實施一次洗滌步驟後，藉由化學發光使用LumiLightPlus受質溶液(Roche Diagnostics GmbH，Roche Applied Sciences，目錄號：12015196001) 及LUMI-Imager F1分析儀(Roche Diagnostics GmbH，Roche Applied Sciences)檢測結合之偶聯過氧化物酶的檢測抗體。

人類免疫球蛋白γ重鏈(H)及κ輕鏈(L)係同時或分開檢測。對於同時檢測，使用經1:2500 (v/v)稀釋之偶聯過氧化物酶的山羊抗-人類IgG (H+L)-抗體(Jackson ImmunoResearch Laboratories公司，目錄號：109-035-088)。對於連續檢測，首先用以1:1000 (v/v)稀釋之偶聯過氧化物酶之兔抗-人類Ig γ-抗體(DAKO GmbH，德國，代號P0214)或用以1:7500 (v/v)稀釋之偶聯過氧化物酶之$F(ab')_2$山羊抗-人類Fc γ-抗體(Jackson ImmunoResearch Laboratories，目錄號：109-036-008)對膜實施探測。在檢測免疫球蛋白γ重鏈後，將該等膜在補充有2% (w/v) SDS及100 mM β-巯基乙醇之62.5 mM TRIS/HCl (pH 6.7)中於50℃下刮除30分鐘。對於第二次檢測，用以1:1000 (v/v)稀釋之偶聯過氧化物酶之兔抗-人類Igκ-抗體(DAKO GmbH，

代號P0129)實施再探測。

實例1

製備IgG1類免疫球蛋白之表現質粒

質粒4831(在下文中表示為p4831)係用於在真核細胞中表現抗-IGF-1R-抗體(具有保留外顯子-內含子組織之經基因組學組織之表現盒)之表現質粒(序列參見(例如)美國專利第2005/0008642號或歐洲專利第1 646 720)。其包含以下功能元件：

- 衍生自載體pUC18之複製起點(pUC起點)，
- 在大腸桿菌中賦予胺苄西林抗性之ß(β)-內醯胺酶基因(Amp)，
- 用於表現γ1-重鏈之表現盒，其包含以下元件：
  - 來自人類巨細胞病毒之主要立即早期啓動子及增強子(hCMV IE1啓動子)，
  - 包括Kozak序列之合成性5'UTR，
  - 包括信號序列內含子(L1_內含子_L2)之鼠科動物免疫球蛋白重鏈信號序列，
  - 佈置在3'末端剪接供體位點之重鏈可變區(VH) cDNA，
  - 小鼠免疫球蛋白μ-增強子區，
  - 人類免疫球蛋白重鏈γ1-基因(IGHG1)，其包括外顯子CH1、鉸鏈、CH2及CH3、間插內含子及具有聚腺苷酸化信號序列及視情況含有突變之3'UTR，
- 用於表現κ-輕鏈之表現盒，其包含以下元件：

- 來自人類巨細胞病毒之主要立即早期啓動子及增強子(hCMV IE1啓動子)，
- 包括Kozak序列之合成性5'UTR，
- 包括信號序列內含子(L1_內含子_L2)之鼠科動物免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 佈置在3'末端剪接供體位點之輕鏈可變區(VL) cDNA，
- 內含子小鼠Ig-κ增強子區，
- 包括IGKC外顯子及具有聚腺苷酸化信號序列之IGK 3'UTR的人類免疫球蛋白κ基因(IGK)。

- 適於在真核細胞中選擇之潮黴素B磷酸轉移酶轉錄單元，其包括

- SV40早期啓動子及起點，
- 潮黴素B磷酸轉移酶編碼序列(HygB)，
- SV40早期聚腺苷酸化信號

- 用於在真核細胞中表現適於營養缺陷選擇之鼠科動物二氫葉酸還原酶(DHFR)之表現盒，其包括

- 縮短形式之SV40早期啓動子及起點，
- 鼠科動物DHFR之編碼序列，
- SV40早期聚腺苷酸化信號。

p4831之有注釋的質粒圖譜顯示於圖1中。

將P4831轉染至CHO-DG44細胞中並在用潮黴素B及胺甲蝶呤(MTX)選擇後分離穩定細胞系。用蛋白質A-瓊脂糖珠粒使藉由所選擇純系#23分泌之抗體沈澱並藉由SDS-PAGE

及考馬斯染色(圖2a))實施分析。除預期之50 kDa免疫球蛋白γ-1重鏈及25 kDa免疫球蛋白κ輕鏈外，亦檢測到相當大量之80 kDa副產物蛋白質。藉由抗-人類免疫球蛋白γ鏈抗體(圖2b))以及藉由抗-人類免疫球蛋白κ鏈抗體(圖2c))識別該蛋白質。

實例2

製備具有經修飾CH3-結構域之IgG1類免疫球蛋白的表現質粒

為防止由異常剪接之γ1 mRNA前體所造成之副產物產生，藉由使4573位置上之T突變成C破壞p4831之CH3外顯子的內剪接位點。同時T4567由C替換以移除BsmA I限制位點。

如下構建P4855。p4817(具有相同γ1重鏈轉錄單元之p4831的原種質粒)係由以下元件構成：

- 來自載體pUC18之容許該質粒在大腸桿菌中複製之複製起點(pUC Ori)
- 在大腸桿菌中賦予胺苄西林抗性之β-內醯胺酶基因(Amp)
- 用於表現γ1-重鏈之表現盒，其包含以下元件：
  - 來自人類巨細胞病毒之主要立即早期啓動子及增強子(hCMV IE1啓動子)，
  - 包括Kozak序列之合成性5'UTR，
  - 包括信號序列內含子(L1_內含子_L2)之鼠科動物免疫球蛋白重鏈信號序列，
  - 佈置在3'末端剪接供體位點之重鏈可變區(VH)

cDNA，

- 小鼠免疫球蛋白μ-增強子區，
- 人類免疫球蛋白重鏈γ1-基因(IGHG1)，其包括外顯子CH1、鉸鏈、CH2及CH3、間插內含子及具有聚腺苷酸化信號序列及視情況含有突變之3'UTR，

p4817之質粒圖譜顯示於圖3中。

藉由以下對P4817實施處理：使用QuickChange定向誘變套組(Stratagene，目錄號：200518)及序列特異性寡核苷酸1 agcctctccc tgtccccggg caaatgagtg cgacggccg SEQ ID NO: 24及2

cggccgtcgc actcatttgc ccggggacag ggagaggct SEQ ID NO: 25

定向誘變將突變p4817之839 bp SfiI/SgrAI片段切除並使其與p4831之13133 bp SgrAI/SfiI片段連接以形成p4855。

實例3

實例1及2核酸之表現、所製造免疫球蛋白之分離及所製造免疫球蛋白之分析

將質粒p4831及p4855瞬時轉染至CHO-DXB11細胞中。在非選擇條件下培養細胞。培養三天後，收穫細胞培養物上清液並用蛋白質A-瓊脂糖珠粒純化分泌之免疫球蛋白。用抗-人類IgG-抗體(H+L)之免疫球蛋白的西方墨點分析顯示80 kDa副產物已藉由經p4831轉染之細胞而非藉由經p4855轉染之細胞表現(圖4)。

實例4

製備IgG4類免疫球蛋白之表現質粒

質粒5031經設計用於人類抗-P-選擇素-抗體在真核組織培養細胞中之瞬時及穩定表現。對於例示性抗-P-選擇素-抗體參見(例如)歐洲專利第1 737 891或美國專利第2005/0226876號。P5031係由以下元件構成：

- 來自載體pUC18之容許該質粒在大腸桿菌中複製之複製起點(pUC起點)，
- 在大腸桿菌中賦予胺苄西林抗性之ß-內醯胺酶基因(Amp)，
- 用於表現人類γ4-重鏈之表現盒，其包含以下元件：
  - 來自人類巨細胞病毒之主要立即早期啓動子及增強子(hCMV IE1啓動子)，
  - 包括Kozak序列之合成性5'UTR，
  - 包括信號序列內含子(L1_內含子_L2)之鼠科動物免疫球蛋白重鏈信號序列，
  - 佈置在3'末端剪接供體位點之重鏈可變區(VH) cDNA，
  - 小鼠Ig μ-增強子區，
  - 人類免疫球蛋白重鏈γ4-基因(IGHG4)，其包括外顯子CH1、鉸鏈、CH2及CH3、間插內含子及具有聚腺苷酸化信號序列及視情況含有突變之3'UTR，
- 用於表現人類κ-輕鏈之表現盒，其包含以下元件：
  - 來自人類巨細胞病毒之主要立即早期啓動子及增強子(hCMV IE1啓動子)，
  - 包括Kozak序列之合成性5'UTR，

- 包括信號序列內含子(L1_內含子_L2)之鼠科動物免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 佈置在3'末端剪接供體位點之輕鏈可變區(VL) cDNA，
- 內含子小鼠Ig-κ增強子區，
- 包括IGKC外顯子及具有聚腺苷酸化信號序列之IGK 3'UTR的人類免疫球蛋白κ基因(IGK)，

-適於在真核細胞中選擇之潮黴素B磷酸轉移酶轉錄單元，其包括

- SV40早期啓動子及起點，
- 潮黴素B磷酸轉移酶編碼序列(HygB)，
- SV40早期聚腺苷酸化信號，

-用於在真核細胞中表現適於營養缺陷選擇之鼠科動物二氫葉酸還原酶(DHFR)之表現盒，其包括

- 縮短形式之SV40早期啓動子及起點，
- 鼠科動物DHFR之編碼序列，
- SV40早期聚腺苷酸化信號。

p5031之質粒圖譜顯示於圖5中。

當用質粒p5031轉染HEK-293-EBNA細胞時，該等細胞製造包含80 kDa副產物之免疫球蛋白(圖6，泳道1及2)。該蛋白質在西方墨點分析中藉助抗-人類Ig γ-抗體以及藉助抗-人類Igκ-抗體結合。

實例5

製備具有經修飾CH3-結構域之IgG4類免疫球蛋白的表現

質粒

按照實例3引入修飾。簡言之，使T4565突變成C，同時第二核苷酸T4559亦交換成C以移除BsmAI限制位點。寡核苷酸3

gcctctccct gtccctgggc aaatgagtgc cagg SEQ ID NO: 26

及寡核苷酸4

cctggcactc atttgcccag ggacagggag aggc SEQ ID NO: 27

用於定向誘變。所獲得之質粒命名為p5032。

實例6

實例5核酸之表現、所製造免疫球蛋白之分離及所製造免疫球蛋白之分析

將質粒p5031及p5032瞬時轉染至HEK-293-EBNA細胞中。在非選擇條件下培養細胞。培養三天後，收穫細胞培養物上清液並用蛋白質A-瓊脂糖珠粒純化分泌之免疫球蛋白。用抗-人類IgG-抗體(H+L)之免疫球蛋白的西方墨點分析顯示經p5031轉染之細胞表現80 kDa副產物(圖6，泳道1+2)，而經p5032轉染之細胞未表現副產物(圖6，泳道3+4)。

將質粒p5032轉染至HEK-293-EBNA細胞中，未表現80 kDa蛋白質(圖6，泳道3及4)。此清楚地表明，80 kDa融合蛋白係異常mRNA前體剪接之結果且瞬時表現期間該不期望蛋白質之製造可藉由免疫球蛋白重鏈γ4基因(IGHG4)之內CH3剪接位點突變有效抑制。

IGHG4之內C_H3剪接位點突變亦在穩定細胞系中防止80

kDa表現。用p5032將CHO-DG44細胞轉染並經選擇用於質粒與胺甲蝶呤(MTX)之穩定整合。將來自6種純系之抗體純化並藉由SDS-PAGE及考馬斯染色(圖7)進行分析。該等抗體中沒有一種抗體含有80 kDa亞單元。

【圖式簡單說明】

圖1 p4831之有注釋的質粒圖譜。

圖2藉由純系#23分泌之抗體的SDS-PAGE及西方墨點分析；a)考馬斯染色，b)用偶聯過氧化物酶之抗-人類免疫球蛋白γ鏈-抗體之西方墨點分析，c)用偶聯過氧化物酶之抗-人類免疫球蛋白κ輕鏈-抗體之西方墨點分析。泳道1：人類抗-IGF-1R-參考抗體；泳道2：包含純系#23之抗體的CHO-DG44純系#23之培養物上清液。

圖3 p4817之有注釋的質粒圖譜。

圖4藉由經p4831或4855轉染之CHO-DXB11分泌之免疫球蛋白的西方墨點分析。泳道1：經p4831轉染之CHO細胞，泳道2：經p4855轉染之CHO細胞。

圖5 p5031之有注釋的質粒圖譜。

圖6藉由經質粒p5031或p5032轉染後之HEK-293-EBNA細胞分泌之抗體的SDS-PAGE分析；泳道1+2：p5031，泳道3+4：p5032，泳道5-8：人類抗-IGF-1R-抗體作為參考抗體；5：0.2 μg，6：0.7 μg，7：2 μg，8：6 μg。

圖7用p5032將CHO-DG44細胞轉染並經選擇用於質粒與胺甲蝶呤(MTX)之穩定整合。將來自6種純系之抗體純化並藉由SDS-PAGE及考馬斯染色進行分析。

序列表

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

<120> 免疫球蛋白之製造

<130> 24355 FT

<140> 097124423
<141> 2008-06-27

<150> EP 07012774.1
<151> 2007-06-29

<160> 31

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 131
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

```
Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu
1               5                  10                  15

Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly
            20                  25                  30

Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu
        35                  40                  45

Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser
    50                  55                  60

Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly
            100                 105                 110

Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly
        115                 120                 125

Thr Cys Tyr
    130
```

<210> 2
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser
1 5 10 15

Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe
20 25 30

Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val
35 40 45

Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser
50 55 60

Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser
65 70 75 80

Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg
85 90 95

Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr
100 105

<210> 3
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp
1 5 10 15

Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe
20 25 30

Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu
35 40 45

```
Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu
65                  70                  75                  80

Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro
                85                  90                  95

Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
            100                 105                 110
```

<210> 4
<211> 131
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

```
Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg
1               5                   10                  15

Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr
            20                  25                  30

Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln
        35                  40                  45

Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro
    50                  55                  60

Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu
65                  70                  75                  80

Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly
            100                 105                 110

Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly
        115                 120                 125

Thr Cys Tyr
```

130

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

```
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
    50                  55                  60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65                  70                  75                  80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
                85                  90                  95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            100                 105
```

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1               5                   10                  15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
            20                  25                  30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu
        35                  40                  45

Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
    50                  55                  60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65                  70                  75                  80

Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
                85                  90                  95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            100                 105
```

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
100 105

<210> 9
<211> 300
<212> DNA
<213> 智人

<400> 9
ggcttcagcc ccaaggacgt gctggttcgc tggctgcagg ggtcacagga gctgccccgc 60

gagaagtacc tgacttgggc atcccggcag gagcccagcc agggcaccac caccttcgct 120

gtgaccagca tactgcgcgt ggcagccgag gactggaaga agggggacac cttctcctgc 180

atggtgggcc acgaggccct gccgctggcc ttcacacaga agaccatcga ccgcttggcg 240

ggtaaaccca cccatgtcaa tgtgtctgtt gtcatggcgg aggtggacgg cacctgctac 300

<210> 10
<211> 300
<212> DNA
<213> 智人

<400> 10
taccacccaa cgtccgtgac tgtcacctgg tacatgggga cacagagcca gccccagaga 60

accttccctg agatacaaag acgggacagc tactacatga caagcagcca gctctccacc 120

cccctccagc agtggcgcca aggcgagtac aaatgcgtgg tccagcacac cgccagcaag 180

agtaagaagg agatcttccg ctggccaggt aggtcgcacc ggagatcacc cagaagggcc 240

ccccaggacc cccagcacct tccactcagg gcctgaccac aaagacagaa gcaagggctg 300

<210> 11
<211> 300
<212> DNA
<213> 智人

<400> 11
tttgcgacgc cggagtggcc ggggagccgg gacaagcgca ccctcgcctg cctgatccag 60

aacttcatgc ctgaggacat ctcggtgcag tggctgcaca acgaggtgca gctcccggac 120

gcccggcaca gcacgacgca gccccgcaag accaagggct ccggcttctt cgtcttcagc 180

cgcctggagg tgaccagggc cgaatgggag cagaaagatg agttcatctg ccgtgcagtc 240

catgaggcag cgagcccctc acagaccgtc cagcgagcgg tgtctgtaaa tcccggtaaa 300

<210> 12
<211> 300
<212> DNA
<213> 智人

<400> 12
acgggcttct ctcccgcgga cgtcttcgtg cagtggatgc agaggggcga gcccttgtcc 60

ccggagaagt atgtgaccag cgccccaatg cctgagcccc aggccccagg ccggtacttc 120

gcccacagca tcctgaccgt gtccgaagag gaatggaaca cgggggagac ctacacctgc 180

gtggtggccc atgaggccct gcccaacagg gtcaccgaga ggaccgtgga caagtccacc 240

ggtaaaccca ccctgtacaa cgtgtccctg gtcatgtccg acacagctgg cacctgctac 300

<210> 13
<211> 300
<212> DNA
<213> 智人

<400> 13
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 60

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 120

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 180

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 240

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 300

<210> 14
<211> 300
<212> DNA
<213> 智人

<400> 14
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 60

ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 120

gagaacaact acaagaccac acctcccatg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 180

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 240

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 300

<210> 15
<211> 300
<212> DNA
<213> 智人

<400> 15
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 60

ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcag cgggcagccg 120

gagaacaact acaacaccac gcctcccatg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 180

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acatcttctc atgctccgtg 240

atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 300

<210> 16
<211> 300
<212> DNA
<213> 智人

<400> 16
gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 60

ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 120

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 180

agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg caggagggga atgtcttctc atgctccgtg 240

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa 300

<210> 17

<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IgA

<400> 17
ggcaaaccca cccatgtcaa tgtgtctgtt gtcatggcgg aggtggacgg cacctgctac 60

<210> 18
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IgE

<400> 18
catgaggcag cgagcccctc acagaccgtc cagcgagcgg tgtctgtaaa tcccggcaaa 60

<210> 19
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IgM

<400> 19
ggcaaaccca ccctgtacaa cgtgtccctg gtcatgtccg acacagctgg cacctgctac 60

<210> 20
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1(變體 1)

<400> 20
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa 60

<210> 21
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG2(變體 1)

<400> 21

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa 60

<210> 22
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG3

<400> 22
atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa 60

<210> 23
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG4

<400> 23
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggcaaa 60

<210> 24
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 誘變引物 1

<400> 24
agcctctccc tgtccccggg caaatgagtg cgacggccg 39

<210> 25
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 誘變引物 2

<400> 25
cggccgtcgc actcatttgc ccggggacag ggagaggct 39

<210> 26
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 誘變引物 3

<400> 26
gcctctccct gtccctgggc aaatgagtgc cagg 34

<210> 27
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 誘變引物 4

<400> 27
cctggcactc atttgcccag ggacagggag aggc 34

<210> 28
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 28
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 60

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 120

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 180

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 240

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 300

ctctccctgt ctccgggtaa a 321

<210> 29
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 29
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 60

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat ctccgtggag 120

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc 180

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 240

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 300

ctctccctgt ctccgggtaa a 321

<210> 30
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG2(變體 2)

<400> 30
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa 60

<210> 31
<211> 213
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1(變體 2)

<400> 31
atctccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacacctccc 60

atgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 120

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 180

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggc aaa 213

五、中文發明摘要：

本發明包含編碼IgA或IgG類免疫球蛋白之C_H3-結構域之C-端部分、或IgE或IgM類免疫球蛋白之C_H4-結構域之C-端部分的胺基酸序列的核酸，其中包含在該C_H3-或C_H4-結構域之C-端部分的胺基酸序列中之甘胺酸-離胺酸-二肽係由核酸ggaaaa、或核酸ggcaaa、或核酸gggaaa、或核酸gggaag、或核酸ggcaag、或核酸ggaaag編碼。

六、英文發明摘要：

The current invention comprises a nucleic acid encoding the amino acid sequence of the C-terminal part of the C_H3-domain of an immunoglobulin of the class IgA or IgG, or the C-terminal part of the C_H4-domain of an immunoglobulin of the class IgE or IgM, wherein the glycine-lysine-dipeptide comprised in the amino acid sequence of the C-terminal part of the C_H3- or C_H4-domain is encoded by the nucleic acid ggaaaa, or the nucleic acid ggcaaa, or the nucleic acid gggaaa, or the nucleic acid gggaag, or the nucleic acid ggcaag, or the nucleic acid ggaaag.

十一、圖式：

公告本

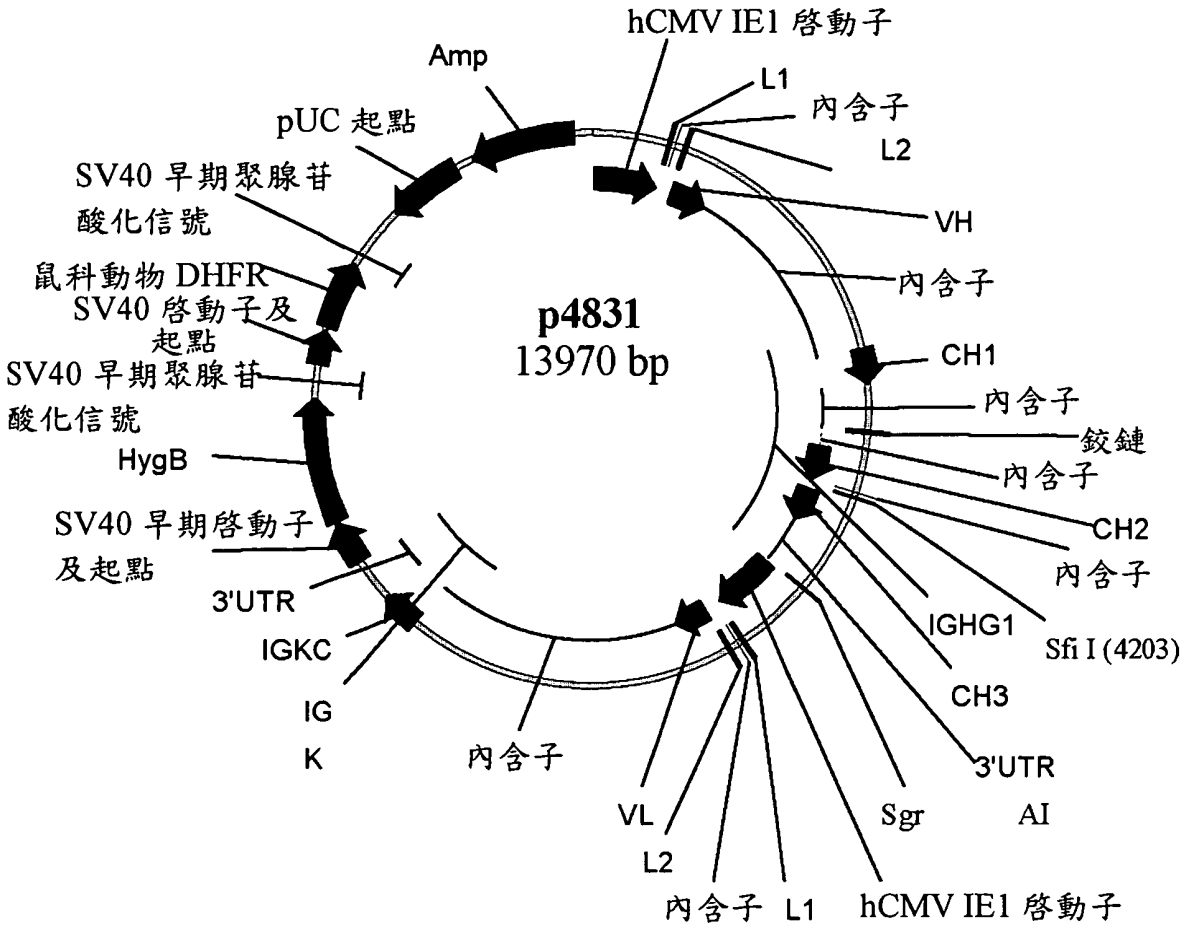
hCMV IE1 啓動子
Amp
L1
內含子
L2
pUC 起點
SV40 早期聚腺苷
酸化信號
VH
鼠科動物 DHFR
SV40 啓動子及
起點
內含子
p4831
13970 bp
CH1
SV40 早期聚腺苷
酸化信號
內含子
鉸鏈
HygB
內含子
SV40 早期啓動子
及起點
CH2
內含子
3'UTR
IGHG1
Sfi I (4203)
IGKC
CH3
IG
K
內含子
3'UTR
VL
Sgr
AI
L2
內含子
L1
hCMV IE1 啓動子

圖1

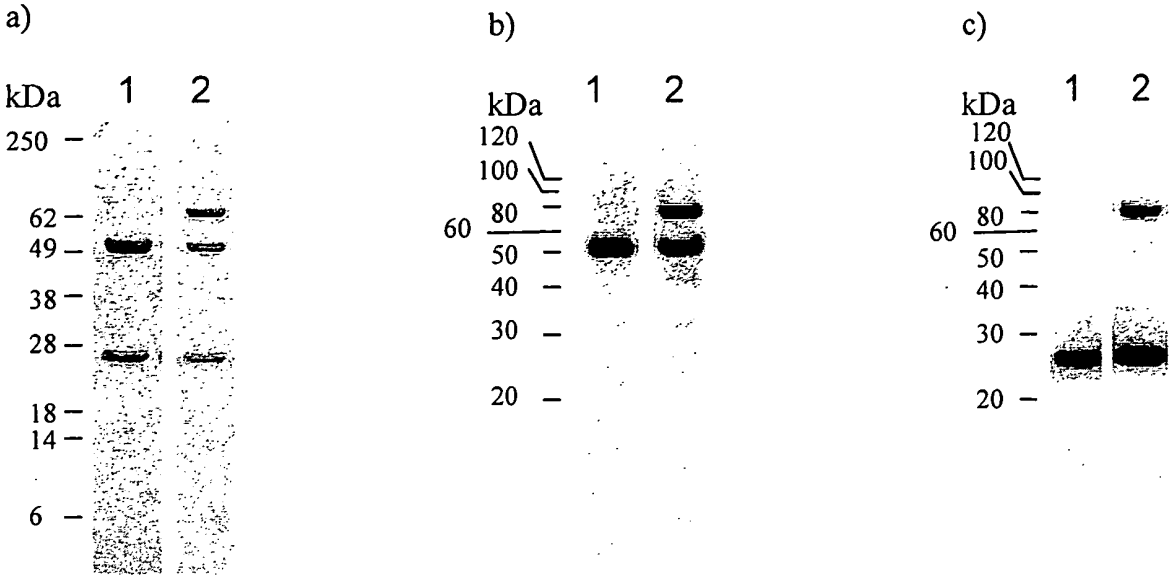
a)
kDa
1
2
250
62
49
38
28
18
14
6
b)
kDa
1
2
120
100
80
60
50
40
30
20
c)
kDa
1
2
120
100
80
60
50
40
30
20

圖2

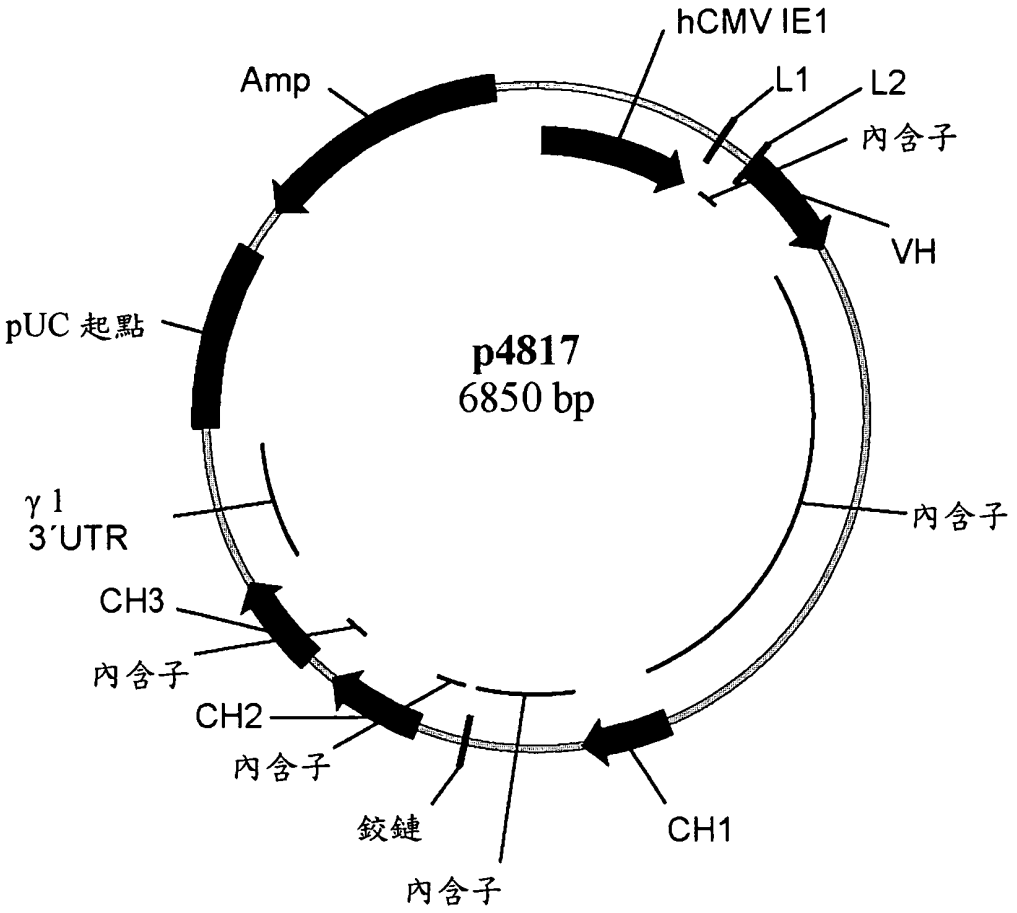
hCMV IE1
Amp
L1
L2
內含子
VH
pUC 起點
p4817
6850 bp
γ1
3′UTR
內含子
CH3
內含子
CH2
內含子
鉸鏈
CH1
內含子

圖3

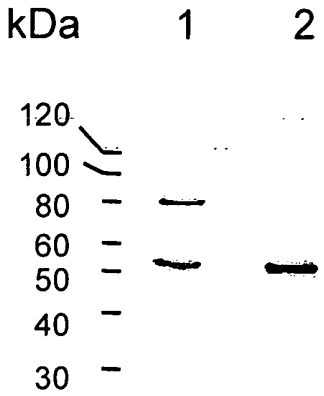

圖4

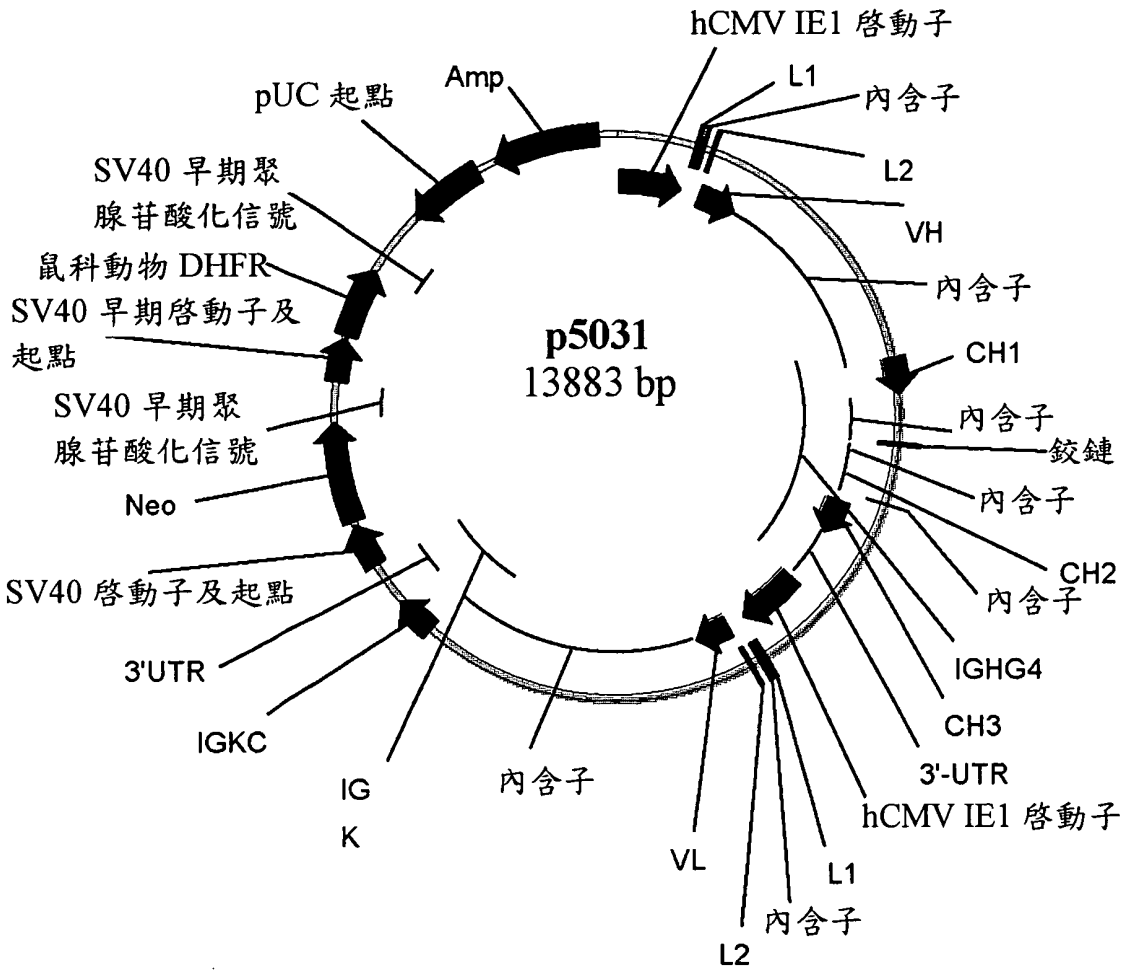
hCMV IE1 啓動子
L1
內含子
L2
VH
內含子
CH1
內含子
鉸鏈
內含子
CH2
內含子
IGHG4
CH3
3'-UTR
hCMV IE1 啓動子
L1
內含子
L2
VL
內含子
IG
K
IGKC
3'UTR
SV40 啓動子及起點
Neo
SV40 早期聚
腺苷酸化信號
SV40 早期啓動子及
起點
鼠科動物 DHFR
SV40 早期聚
腺苷酸化信號
pUC 起點
Amp
p5031
13883 bp

圖5

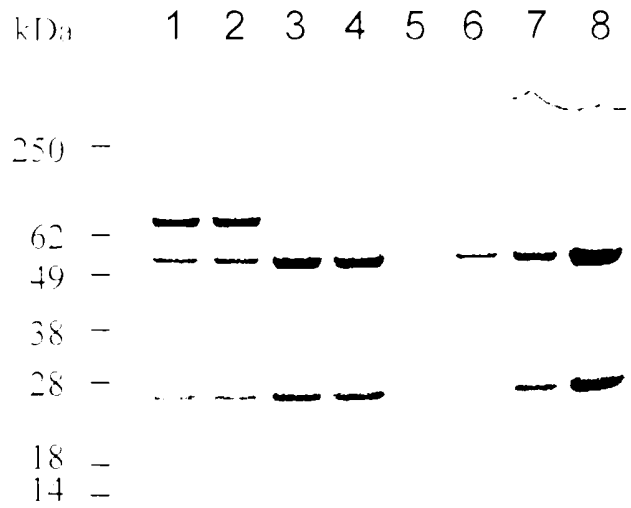

圖6

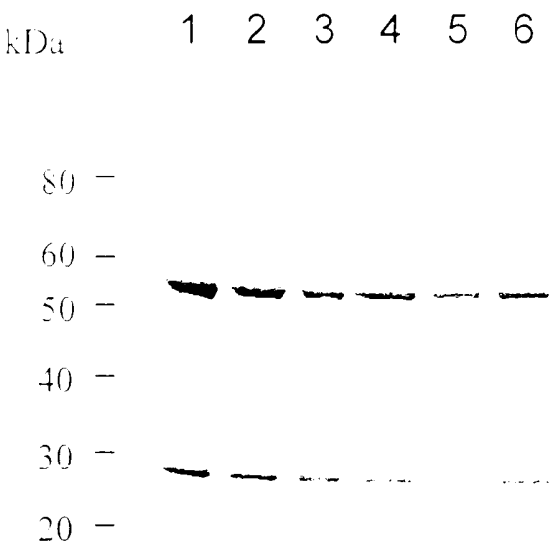

圖7

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(4)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

表1： 不同免疫球蛋白種類之C-端胺基酸序列。甘胺酸-離胺酸-二肽加以下劃線。

免疫球蛋白種類 (C-端恆定結構域)	C-端部分之胺基酸序列 (在N-端至C-端方向上)	SEQ ID NO:
IgA1 (C_H3)、IgA2 (C_H3)	GNTFRPEVHL LPPPSEELAL NELVTLTCLA RGFSPKDVLV RWLQGSQELP REKYL TWASR QEPSQGTTTF AVTSILRVAA EDWKKGDTFS CMVGHEALPL AFTQK TIDRL AGKPTHVNVS VVMAEVDGTC Y	01
IgD (C_H3)	AAQAPVKLSLN LLASSDPPEA ASWLLCEVSG FSPPNILLMW LEDQREVNTS GFAPARPPPQ PGSTTFWAWS VLRVPAPPSP QPATYTCVVS HEDSRTLLNA SRSLEVSY	02
IgE (C_H4)	GPRAAPEVYA FATPEWPGSR DKRTLACLIQ NFMPEDISVQ WLHNEVQLPD ARHSTTQPRK TKGSGFFVFS RLEVTRAEWE QKDEFICRAV HEAASPSQTV QRAVSVNPGK	03
IgM (C_H4)	GVALHRPDVY LLPPAREQLN LRESATITCL VTGFSPADVF VQWMQRGQPL SPEKYVTSAP MPEPQAPGRY FAHSILTVSE EEWNTGETYT CVVAHEALPN RVT ERTVDK STGKPTLYNV SLVMSDTAGT CY	04
IgG1 (C_H3)	GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	05
IgG2 (C_H3)	GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	06
IgG3 (C_H3)	GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK	07
IgG4 (C_H3)	GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK	08

術語"IgA或IgG類免疫球蛋白之C_H3-結構域之C-端部分或IgE或IgM類免疫球蛋白之C_H4-結構域之C-端部分"表示免疫球蛋白重鏈之胺基酸序列，其位於全長或天然存在免疫球蛋白重鏈之C-末端，由此該C-端部分之C-端與該免疫

第097124423號專利申請案
中文申請專利範圍替換本(100年6月)

100年6月14日修正本

公告本

十、申請專利範圍：

1. 一種經分離核酸，其編碼IgA或IgG類免疫球蛋白之C_H3-結構域之C-端部分的胺基酸序列、或IgE或IgM類免疫球蛋白之C_H4-結構域之C-端部分的胺基酸序列，其特徵在於包含在該C_H3-或C_H4-結構域之C-端部分的胺基酸序列中之甘胺酸-離胺酸-二肽係由核酸ggaaaa、或核酸ggcaaa、或核酸gggaaa、或核酸ggaaag、或核酸ggcaag、或核酸gggaag編碼。

2. 如請求項1之核酸，其特徵在於該核酸編碼一個選自SEQ ID NO: 1、3、4、5、6、7或8之胺基酸序列的胺基酸序列。

3. 如請求項1或2之核酸，其特徵在於編碼該甘胺酸-離胺酸-二肽之核酸係以核苷酸g或a為首。

4. 如請求項1或2之核酸，其特徵在於該甘胺酸-離胺酸-二肽係由核酸ggaaaa、或核酸ggcaaa、或核酸gggaaa編碼。

5. 如請求項1之核酸，其特徵在於該C-端部分包含該免疫球蛋白重鏈一級胺基酸序列之至少20個C-端胺基酸。

6. 如請求項1之核酸，其特徵在於該核酸編碼IgA、IgE、IgM或IgG類免疫球蛋白重鏈之C-端恆定結構域的一部分且係選自SEQ ID NO: 17、18、19、20、21、22、23、30或31之核酸。

7. 如請求項6之核酸，其特徵在於該核酸係選自SEQ ID NO: 17、18、19、22、23、30或31之核酸。

8. 如請求項7之核酸，其特徵在於該核酸係選自SEQ ID NO: 17、18、19、22或23之核酸。

9. 如請求項1、2及5至7中任一項之核酸，其特徵在於該核酸編碼IgG1或IgG4類人類免疫球蛋白重鏈之C-端恆定結構域的一部分。

10. 一種質粒，其包含如請求項1之核酸。

11. 一種細胞，其包含如請求項1之核酸。

12. 如請求項11之細胞，其特徵在於該細胞係哺乳動物細胞。

13. 如請求項12之細胞，其特徵在於該哺乳動物細胞係選自CHO細胞、HEK細胞或BHK細胞。

14. 一種在哺乳動物細胞中製造免疫球蛋白之活體外方法，其包含以下步驟：

a) 用編碼免疫球蛋白重鏈之核酸轉染該哺乳動物細胞，其中SEQ ID NO: 17、18、19、20、21、22、23、30或31之核酸編碼該免疫球蛋白重鏈之C-端部分，

b) 經轉染之哺乳動物細胞在適於表現該免疫球蛋白之條件下培養，

c) 自該培養物或該細胞回收該免疫球蛋白。

15. 如請求項14之方法，其特徵在於該哺乳動物細胞係用一種包含編碼免疫球蛋白重鏈之表現盒及編碼免疫球蛋白輕鏈之表現盒的核酸轉染。

16. 如請求項14之方法，其特徵在於該哺乳動物細胞係用兩種核酸轉染，其中第一核酸包含編碼免疫球蛋白輕鏈之

表現盒，第二核酸包含編碼免疫球蛋白重鏈之表現盒。

17. 如請求項14至16中任一項之方法，其特徵在於該轉染該哺乳動物細胞係用編碼免疫球蛋白重鏈之核酸實施，其中SEQ ID NO: 17、18、19、22、23、30或31之核酸編碼該免疫球蛋白重鏈之C-端部分。

18. 如請求項17之方法，其特徵在於該轉染該哺乳動物細胞係用編碼免疫球蛋白重鏈之核酸實施，其中SEQ ID NO: 17、18、19、22或23之核酸編碼該免疫球蛋白重鏈之C-端部分。

19. 一種改良免疫球蛋白在哺乳動物細胞中表現的活體外方法，其中編碼該免疫球蛋白重鏈之核酸包含編碼該免疫球蛋白重鏈之C_H3-或C_H4-結構域中所含之甘胺酸-離胺酸-二肽的核酸ggaaaa、或核酸ggcaaa、或核酸gggaaa、或核酸ggaaag、或核酸ggcaag、或核酸gggaag。