



(21)申請案號：108145098

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 10 日

(51)Int. Cl. : C12N9/12 (2006.01) C12N15/54 (2006.01)

(30)優先權：2018/12/10 美國 62/777,325

2019/10/24 美國 62/925,516

(71)申請人：美商安進公司 (美國) AMGEN INC. (US)

美國

(72)發明人：阿格拉沃 尼勒 J AGRAWAL, NEERAJ J. (IN)；達瑞斯 克麗斯汀 M DARIS, KRISTINE M. (US)；史蒂芬斯 珍妮特 L STEVENS, JENNITTE L. (US)；黎宏帝諾 LE, HUONG THI NGOC (VN)；布藍可 塔拉凡 諾利亞 BLANCO TALAVAN, NOELIA (ES)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 102421902A

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：10 共 161 頁

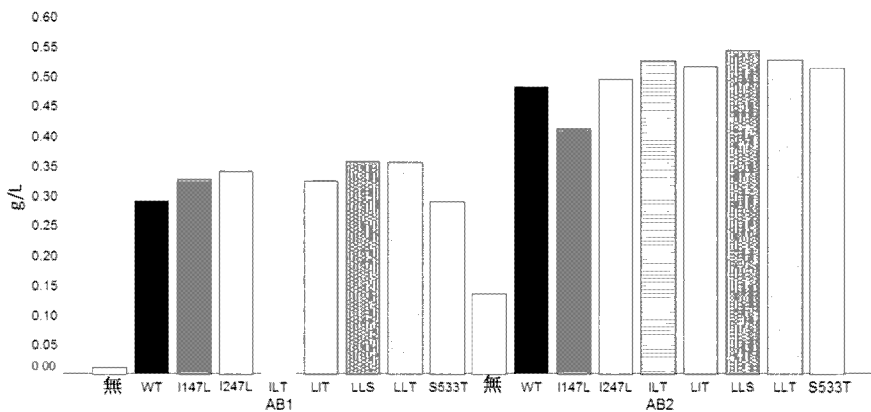
(54)名稱
突變型 piggyBac 轉位酶

(57)摘要

PiggyBac 轉位酶經工程化以增加在細胞中的穩定性。該等工程化 piggyBac 轉位酶可用於穩定地轉化細胞、細胞系發育、基因組修飾和改善重組蛋白的滴定度以及其他用途。

PiggyBac transposases engineered to increase stability in a cell. The engineered piggyBac transposases are useful for stably transforming cells, cell line development, genome modification, and improving titer of recombinant proteins, among other uses.

指定代表圖：



【圖 2】



I862531

【發明摘要】

【中文發明名稱】 突變型piggyBac轉位酶

【英文發明名稱】 MUTATED PIGGYBAC TRANSPOSASE

【中文】

PiggyBac轉位酶經工程化以增加在細胞中的穩定性。該等工程化piggyBac轉位酶可用於穩定地轉化細胞、細胞系發育、基因組修飾和改善重組蛋白的滴定度以及其他用途。

【英文】

PiggyBac transposases engineered to increase stability in a cell. The engineered piggyBac transposases are useful for stably transforming cells, cell line development, genome modification, and improving titer of recombinant proteins, among other uses.

【指定代表圖】 圖2

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 突變型piggyBac轉位酶

【英文發明名稱】 MUTATED PIGGYBAC TRANSPOSASE

【技術領域】

【0001】 本發明涉及經工程化以增加在細胞中的穩定性的piggyBac轉位酶，以及該等工程化piggyBac轉位酶在穩定地轉染細胞、細胞系發育、基因組修飾和改善重組蛋白滴定度等方面的用途。

序列表

【0002】 本申請包含電腦可讀形式的序列表（檔案名：A-2320-US-PSP2_Sequence.txt，創建於10/18/2019，其大小為64KB），作為本揭露內容的一個單獨的部分，並且藉由引用以其整體併入本文。

【先前技術】

【0003】 由於其廣泛的應用，生物製劑在世界範圍內被用於各種應用中，諸如治療和診斷。目前，約 51%的已批准的生物製劑係使用哺乳動物細胞生產的，而中國倉鼠卵巢（CHO）細胞係主要的細胞工廠（Zhou 和 Kantardjeff, Mammalian cell cultures for biologics manufacturing [用於生物製劑生產的哺乳動物細胞培養物], Springer [施普林格出版社], 紐約州海德堡, 2014）。結果，生物製藥工業正在經歷快速的範式轉變。上市速度和成本效率現在比以往更加重要。生物藥物的高昂研發成本和較長的開發提前期（lead time）使得必須消除藥物研發以及更重要地，製造中的延誤和低效。同時，產品線的複雜性和多樣性

日益增加，生物製藥公司現在需要可適應不同需求的多種模式（從衍生自供體細胞的個性化療法到每年從幾克到幾百千克量的生物藥物的生產）的基礎設施。

【0004】 因此，需要增加來自宿主細胞的重組蛋白產生並改善表現的長期穩定性。實現該目標的一種方法係改善由細胞表現系統表現的蛋白質的滴定度。本文所述的發明提供了有助於增加宿主細胞中表現的piggyBac轉位酶穩定性的突變。已經發現，與在包含野生型piggyBac轉位酶或無piggyBac轉位酶的細胞中表現的重組蛋白的滴定度相比，由用此類突變工程化的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶導致包含該工程化piggyBac轉位酶的細胞中表現的重組蛋白的滴定度得到了改善。

【發明內容】

【0005】 在一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。在一個實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代。在一個實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在一個實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，和/或包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸

取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在另一個相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。在一個實施方式中，與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的相同目的蛋白的滴定度相比，該piggyBac轉位酶使由如本文所述的工程化piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的目的重組蛋白的滴定度改善。在一個實施方式中，該目的重組蛋白係抗原結合蛋白。

【0006】 在一個方面，本發明提供了經工程化以增加在宿主細胞中的穩定性的piggyBac轉位酶，其中該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。

【0007】 在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4的胺基酸序列。在另一個

方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 14的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【0008】 在另一個方面，本發明提供了如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 5的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID

NO: 13的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。

【0009】 在另一個方面，本發明提供了包含編碼如本文所述的piggyBac轉位酶的核酸分子的載體。在一個實施方式中，該載體包含編碼如本文所述的piggyBac轉位酶的核酸分子，進一步包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在一個實施方式中，該載體包含編碼一種或多種目的蛋白的一種或多種核酸序列。

【0010】 在另一個方面，本發明提供了用如本文所述的載體轉染的細胞。在一個實施方式中，該細胞用由SEQ ID NO: 17或18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶轉染。在一個實施方式中，該細胞係宿主細胞。在一個實施方式中，該細胞係CHO細胞。在一個實施方式中，該細胞係免疫細胞。

【0011】 在另一個方面，本發明提供了用由如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子與包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的載體共轉染的細胞，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在另一個實施方式中，本發明提供了用由包含如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的載體與包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的載體共轉染的細胞，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在另一個實施方式中，本發明提供了用由包含如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子與包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的

載體共轉染的細胞，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

【0012】 在另一個方面，本發明提供了如本文所述的細胞，其中與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的相同目的蛋白的滴定度相比，由用工程化piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的目的蛋白的滴定度得到了改善。在一個實施方式中，提供了由該細胞表現的目的重組蛋白。在相關的實施方式中係包含該目的重組蛋白的藥物組成物。

【0013】 在另一個方面，本發明提供了用於改善宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度之方法，該方法包括對編碼piggyBac轉位酶的核酸分子進行工程化以增加在宿主細胞中的穩定性；使用編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子與包含編碼目的蛋白的核酸序列的載體共轉染宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件；以及培養該等細胞以表現目的重組蛋白，其中與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度相比，由用工程化piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度得到了改善。在一個實施方式中，用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的第一載體與包含編碼目的蛋白的核酸序列的第二載體轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在一個實施方式中，用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的單個載體與編碼目的蛋白的核酸序列轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

【0014】 在另一個方面，本發明提供了用於增加表現重組蛋白的哺乳動物細胞培養物中重組蛋白的產生之方法，該方法包括使用宿主細胞在生物反應器

中建立細胞培養物，該宿主細胞已經用編碼piggyBac轉位酶的核酸分子與包含編碼目的蛋白的核酸分子的載體共轉染，該編碼piggyBac轉位酶的核酸分子經工程化以增加在該宿主細胞中的穩定性，該編碼目的蛋白的核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的反向重複元件；以及表現目的重組蛋白；其中與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度相比，由用工程化piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度得到了改善。在一個實施方式中，已經用包含編碼piggyBac轉位酶的核酸分子的載體與包含編碼目的蛋白的核酸分子的載體將該宿主細胞共轉染，該編碼piggyBac轉位酶的核酸分子經工程化以增加在該宿主細胞中的穩定性，該編碼目的蛋白的核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的反向重複元件；在一個實施方式中，用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的單個載體與編碼目的蛋白的核酸序列轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

【0015】 在另一個方面，本發明提供了用於生產分離、純化的目的重組蛋白之方法，該方法包括用表現目的重組蛋白的宿主細胞在生物反應器中建立細胞培養物，其中該細胞系已經用編碼piggyBac轉位酶的核酸序列與包含編碼目的蛋白的核酸序列的載體共轉染，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在該宿主細胞中的穩定性，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件；對該等細胞進行培養以表現該目的重組蛋白；收穫目的重組蛋白，藉由一個或多個單元操作加工該目的重組蛋白，並獲得分離、純化的目的重組蛋白。在一個實施方式中，已經用包含編碼piggyBac轉位酶的核酸序列的載體與包含編碼目的蛋白的核酸序列的載體將該細胞系共轉染，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在該宿主細胞中的穩定性，該編碼

目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在一個實施方式中，用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的單個載體與編碼目的蛋白的核酸序列轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在一個實施方式中，至少一個單元操作係選自親和層析、離子交換層析、陰離子交換層析、陽離子交換層析、多模式層析、疏水相互作用層析和羥基磷灰石層析的捕獲層析步驟。在相關的實施方式中，至少一個單元操作係選自離子交換層析、陰離子交換層析、陽離子交換層析、多模式層析、疏水相互作用層析和羥基磷灰石層析的精製層析（polish chromatography）步驟。在一個實施方式中，至少一種單元操作選自病毒滅活、病毒過濾、深度過濾和UF/DF。在一個實施方式中，與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度相比，由用工程化piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度得到了改善。在一個實施方式中係分離、純化的重組蛋白。在相關的實施方式中係包含該分離的目的蛋白的藥物組成物。

【0016】 在一個方面，本發明提供了用於轉染細胞的套組（kit），該套組包含含有編碼piggyBac轉位酶的核酸序列的載體，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在該宿主細胞中的穩定性；以及至少包含piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件的載體，該piggyBac轉位子中插入了編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列。

【0017】 在一個方面，本發明提供了產生非病毒基因修飾細胞之方法，該方法包括：(a) 建立載體，該載體包含編碼piggyBac轉位酶的核酸序列，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在細胞中的穩定性，以及編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序

列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件；(b) 從供體或受試者中分離天然免疫細胞；(b) 用該載體與編碼piggyBac轉位酶的核酸序列轉染該等細胞，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在細胞中的穩定性；以及(c) 藉由細胞培養將該等細胞擴增成更大的非病毒基因修飾細胞群。在一個實施方式中，用包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的載體與包含編碼piggyBac轉位酶的核酸序列的載體轉染該等細胞，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在細胞中的穩定性。在一個實施方式中，用包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的載體與編碼piggyBac轉位酶的核酸序列轉染該等細胞，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在細胞中的穩定性。

【0018】 在一個方面，本發明提供了用非病毒基因修飾細胞治療受試者之方法，該方法包括：(a) 建立包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的載體，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件；(b) 從受試者或供體中分離天然免疫細胞；(c) 用該載體與編碼piggyBac轉位酶的核酸序列轉染該等細胞，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在細胞中的穩定性；(d) 藉由細胞培養將該等細胞擴增成更大的基因修飾細胞群；(e) 從該細胞培養物中分離轉化的細胞以獲得包含該等基因修飾細胞的細胞群；以及(f) 將該等非病毒基因修飾細胞重新引入受試者。在一個實施方式中，用包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的載體與包含編碼piggyBac轉位酶的核酸序列的載體轉染該等細胞，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元

件，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在細胞中的穩定性。在一個實施方式中，用包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的載體與編碼piggyBac轉位酶的核酸序列轉染該等細胞，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在細胞中的穩定性。在一個實施方式中，該天然免疫細胞係單核細胞。在一個實施方式中，該天然免疫細胞係T細胞。在一個實施方式中，至少一種目的蛋白係抗原受體、T細胞受體或嵌合抗原受體。在一個實施方式中，還用編碼自殺基因即可誘導開啟或加速器開關或者兩者的核酸分子轉染該細胞。在一個實施方式中係非病毒基因修飾細胞、細胞群或細胞培養物。在一個實施方式中係一種包含基因修飾細胞或細胞群的配製物。在另一個實施方式中係一種治療或預防供體或有需要的受試者中的疾病或障礙之方法，該方法包括向該供體或受試者施用有效量的該等基因修飾細胞或細胞群。

【圖式簡單說明】

【0019】 [圖1]：預測的二級結構。橫條表示預測的 α -螺旋區域，箭頭表示預測的 β 折疊區域。

【0020】 [圖2]：對於單株抗體AB1和AB2，工程化piggyBac轉位酶細胞系的滴定度與WT piggyBac轉位酶或無piggyBac轉位酶對照相比得到了改善或相當。

【0021】 [圖3]：對於表現融合蛋白的細胞系，工程化的piggyBac轉位酶細胞系的滴定度與WT piggyBac轉位酶或無piggyBac轉位酶對照相比得到了改善。

【0022】 [圖4]：對於雙特異性T細胞銜接器分子，工程化的piggyBac轉位酶細胞系的滴定度與WT piggyBac轉位酶或無piggyBac轉位酶對照相當。

【0023】 [圖5]：與未接受MSX處理（0 μ M MSX）的那些轉位酶池相比，用piggybac轉位酶雙突變體「ILT」或三突變體「LLT」轉位酶轉染的池顯示出表現增加。對於未添加轉位酶（無）的該等池，表現不會隨著MSX的添加而增加。測試了BiTE[®] HeteroFc、IgGscFV和mAb。在轉染（25）時或恢復最初的DNA轉位酶轉染池後（0-25）後添加MSX。

【0024】 [圖6A]和6B 與使用電穿孔或基於脂質的方法轉染的piggyBac轉位酶雙突變體「ILT」DNA或mRNA相關的池表現水平。

【0025】 6A)：基於電穿孔的轉染方法，將DNA轉位酶和mRNA轉位酶相比較。增加mRNA轉位酶改善了表現。1) 0 μ g轉位酶，20 μ g mAb DNA；2) 雙突變體「ILT」DNA：20 μ g mAb DNA，5 μ g轉位酶，比率為4：1；3) 雙突變體「ILT」mRNA 20 μ g mAb DNA，5 μ g轉位酶，比率為4：1；4) 雙突變體「ILT」mRNA 20 μ g mAb DNA，10 μ g轉位酶，比率為2：1；5) 雙突變體「ILT」mRNA 20 μ g mAb DNA，20 μ g轉位酶，比率為1：1；11) 雙突變體「ILT」mRNA 14 μ g mAb DNA，100 μ g轉位酶，比率為7：1；12) 雙突變體「ILT」mRNA 28 μ g mAb DNA，200 μ g轉位酶，比率為7：1。

【0026】 6B)：基於脂質的轉染方法，將DNA轉位酶和mRNA轉位酶相比較。增加mRNA轉位酶改善了表現。PiggyBac轉位酶雙突變體「ILT」DNA 2 μ g mAb DNA，0.5 μ g轉位酶，比率為4：1；2 μ g mAb DNA，2 μ g轉位酶，比率為1：1；4 μ g mAb DNA，4 μ g轉位酶，比率為1：1；PiggyBac轉位酶雙突變體「ILT」mRNA 2 μ g mAb DNA，0.5 μ g轉位酶，比率為4：1；2 μ g mAb DNA，2 μ g轉位酶，比率為1：1；4 μ g mAb DNA，4 μ g轉位酶，比率為1：1。

【0027】 [圖7] 電穿孔轉染池中的表現水平。雙突變轉位酶「ILT」DNA和兩個mRNA的轉染。合成mRNA (PB syn mRNA) 和mRNA (PB mRNA) 轉染池的滴定度與DNA (PB DNA) 轉位酶池相似，滴定度高於無轉位酶對照池。向下箭頭為最小值。向上箭頭係最大值。白色條係中位數。

【0028】 [圖8A]和8B：轉染的細胞系池中的DNA和mRNA的基因組和轉錄水平的整合。

【0029】 8A) 用雙突變體「ILT」DNA轉位酶轉染的所有池細胞系均具有基因組水平的整合，而用mRNA轉染的那些細胞系沒有基因組水平的整合。約1.7 kb的條帶表示在該細胞系基因組中存在該轉位酶。泳道1 階梯。泳道2-4 piggyBac轉位酶雙突變體「ILT」DNA。泳道5 無轉染。泳道6-11 piggyBac轉位酶雙突變體「ILT」mRNA。泳道12 質體DNA對照。

【0030】 8B) 檢查RNA水平的轉錄的RT PCR測定的凝膠圖像。用雙突變體「ILT」DNA轉位酶轉染的所有池細胞系均具有RNA水平的轉錄，而用mRNA轉染的那些細胞系沒有RNA水平的轉錄。約1.7 kb的條帶表示該轉位酶轉錄物存在。泳道1 階梯。泳道2-3 piggyBac轉位酶雙突變體「ILT」mRNA。泳道4 piggyBac轉位酶雙突變體「ILT」DNA。泳道5 質體DNA對照。

【0031】 [圖9] 該池具有較低的拷貝數，並且包含沒有整合該轉位酶的殖株。

【0032】 [圖10]使用非病毒基因遞送和piggyBac轉位酶產生的TCR-T細胞在體外表現出穩健的功能。(A) 使用雙突變體ILT對T細胞成功進行工程化以表現TCR。(B) 靶細胞裂解和 (C) 與抗原呈遞細胞共同孵育5天後，piggyBac工程化的TCR-T細胞的增殖。

【實施方式】

【0033】 DNA 轉位子或可轉位元件係可以從宿主基因組中的一個位置移動到另一個位置的遺傳元件。可轉位元件典型地分為兩類，第 1 類以反轉錄轉位子為代表，第 2 類包括「剪切和黏貼」DNA 轉位子。

【0034】 第 2 類 DNA 轉位子的特徵係由兩個部分組成，即包括側翼為兩個末端反向重複序列的 DNA 區段的轉位子，以及催化轉位子移動的轉位酶。該轉位酶藉由結合反向重複序列、切除側翼為末端反向重複序列的 DNA 區段（剪切片段）並將該區段重新整合到新的位置（黏貼片段）而發揮作用。

【0035】 該 piggyBac 轉位子係第 2 類轉位子，雖然最初係從粉紋夜蛾（*Trichoplusia ni*）（捲心菜尺蠖蛾（loopier moth））中分離出來的，但已顯示出它可以在哺乳動物細胞中進行主動轉位，並優先選擇可利用的染色質結構（Li 等人, Molecular and Cellular Biology [分子與細胞生物學] 33(7): 1317-1330, 2013；Yoshida 等人, Scientific Reports [科學報告] 文章編號 43613 (2017)）。由於能夠將外源 DNA 引入基因組並促進穩定的轉基因表現，piggyBac 轉位子系統係在哺乳動物細胞中進行基因操縱的有用工具，並已被用於促進哺乳動物細胞的穩定轉染，以產生穩定且高產的哺乳動物細胞的多株培養，從轉染細胞的異種群體快速產生重組蛋白以及為細胞系發育培養殖株體，這係由於其識別模體通常與開放染色質區域和活躍轉錄區域相關（已發表美國專利申請案號：US 2010/0311116；Ding 等人, Cell [細胞] 122(3): 473-483, 2005；Wu 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 103(4) 15008-13, 2006, Matasci 等人, Biotechnology & Bioengineering [生物技術與生物工程] 108(9): 2141-50, 2011；Matasci 等人, BMC Proceedings [英國醫學委員會會刊] 5(SUPPL.8) p. 34, 2011；Balasubramanian 等人, J. Biotechnology [生物技術雜誌] 200:61-9, 2015；Balasubramanian 等人, Biotechnology Progress [生物技術進展] 32(5):1308-1317,

2016；Balasubramanian 等人, *Biotechnology & Bioengineering* [生物技術與生物工程] 113(6):1234-43, 2016；Ahmadi 等人, *PLoS ONE* [公共科學圖書館·綜合] 12(6):e0179902, 2017；Rajendra 等人, *Biotechnology Progress* [生物技術進展] 33(2):534-540, 2017；以及 Rajendra 等人, *Biotechnology Progress* [生物技術進展] 33(6): 1436-1448, 2017.)。

【0036】 使用展示文庫方法和/或與來自其他物種的同源染色體進行序列比較並產生過高活性的轉位酶，藉由修飾轉位酶以增加切除頻率，努力改善基於莫耳的piggyBac效率（例如，參見美國專利案號8,399,643；美國專利案號9,670,503；美國專利案號9,783,790；美國專利案號9,546,382；以及Yusa等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美國國家科學院院刊] 108(4): 1531-36, 2011)。

【0037】 關於piggyBac轉位酶的結構知之甚少。對piggyBac轉位酶胺基酸序列的分析表明，它主要是 α 螺旋蛋白。在試圖改善引入細胞中的piggyBac轉位酶的穩定性時，在 α 螺旋和推定的N聯糖基化位點（即NXS/t模體）內進行了突變，並如本文所述發現可改善滴定度。將工程化版的piggyBac轉位酶（包括單個突變或多個突變的組合）與目的蛋白（側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件）一起轉染到細胞中，並評估與用來自粉紋夜蛾的野生型未突變的piggyBac轉位酶（SEQ ID NO: 2）轉染的相似細胞和不包含piggyBac轉位酶的細胞相比目的蛋白的表現。發現與由包含野生型piggyBac轉位酶或無piggyBac轉位酶的細胞中表現的重組蛋白的滴定度相比，由經工程化以增加穩定性的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶改善了在包含該工程化piggyBac轉位酶的細胞中表現的重組蛋白的滴定度。

【0038】 如本文所用，術語「piggyBac轉位子」或「piggyBac可轉位元件」係指可從供體多核苷酸（例如，載體）切下並整合到靶位點（例如，細胞的基

因組或染色體外DNA) 中的多核苷酸序列。例如，來自粉紋夜蛾的piggyBac可轉位元件的長度為2472 bp，具有短的反向重複序列，包括不對稱的末端重複序列結構，在5'13-bp末端重複序列和5'19-bp內部重複序列之間有3-bp的間隔子，並且在3'13-bp末端重複序列和3'19-bp內部重複序列之間有31-bp間隔子，以及編碼功能性轉位酶的單個2.1-kp開放閱讀框。(Li等人, Mol. Genet. Genomics [分子遺傳學與基因組學] (2001) 266: 190-198；Cary等人, Virology [病毒學] (1989) 172: 156-169)。

【0039】如本文所用，piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件係指T的5'和3'區段，包括靶TTAA位點、piggyBac轉位子的末端重複序列間隔子和內部重複序列，對於粉紋夜蛾，該等包括靶TTAA位點、5'13-bp末端重複序列和5'19-bp內部重複序列以及之間的3-bp間隔子、3'13-bp末端重複序列和3'19-bp內部重複序列以及之間的31-bp間隔子。

【0040】如本文所用，術語「piggyBac轉位酶」係指催化從供體多核苷酸(例如，載體)切除piggyBac轉位子並隨後將該piggyBac轉位子整合到靶細胞的基因組或染色體外DNA中的多肽。該piggyBac轉位酶利用剪切和黏貼機制，插入TTAA靶位點，該位點在插入時複製並在插入後精確切除，將供體位點恢復到其轉位子前狀態。(Elick等人, Genetica [遺傳學] 98: 33-41, 1996. Fraser等人, Insect Mol. Biol. [昆蟲分子生物學] 5: 141-151, 1996. Wang和Fraser, Insect Mol. Biol. [昆蟲分子生物學] 1: 109-116, 1993)。該piggyBac轉位酶可以作為多肽存在。可替代地，該piggyBac轉位酶可呈遞包含編碼piggyBac轉位酶的編碼序列的核酸分子。在本發明的一些實施方式中，當該piggyBac轉位酶作為編碼工程化piggyBac轉位酶的工程化核酸分子存在時，該工程化核酸分子可以存在於包含該piggyBac轉位子的相同載體上，即順式存在。在本發明的其他實施方式中，該工程化核

酸分子可以存在於與該轉位子分開的第二載體上，即反式存在。本文所述的工程化piggyBac轉位酶的獨特之處在於，與由包含野生型piggyBac轉位酶或無piggyBac轉位酶的細胞表現的目的重組蛋白的滴定度相比，由包含該工程化piggyBac轉位酶的細胞表現的目的重組蛋白的滴定度得到了改善。

【0041】術語「多肽（polypeptide）」或「蛋白質（protein）」在全文中可互換使用，並且是指包括藉由肽鍵彼此連結的兩個或更多個胺基酸殘基的分子。多肽和蛋白質還包括具有天然序列的胺基酸殘基的一個或多個缺失、插入和/或取代的大分子，即包括由天然存在的非重組細胞產生的多肽或蛋白質；或藉由基因工程細胞或重組細胞產生，並且包括具有天然蛋白質的胺基酸序列的胺基酸殘基的一個或多個缺失、插入和/或取代的分子。多肽和蛋白質還包括如下胺基酸聚合物，其中一種或多種胺基酸為相應天然存在的胺基酸和聚合物的化學類似物。多肽和蛋白質還包括修飾，所述修飾包括但不限於糖基化、脂質附著、硫酸化、麩胺酸殘基的 γ -羧化、羥基化和ADP核糖基化。

【0042】本文所述的piggyBac轉位酶旨在包括與野生型粉紋夜蛾（*Trichoplusia ni*）（捲心菜尺蠖蛾）piggyBac轉位酶（SEQ ID NO: 2）相比，具有一個或多個胺基酸殘基的插入、缺失、或取代或其任何組合以及胺基酸殘基的插入、缺失或取代以外的修飾的多肽。如本文所用，「在一個或多個位置處的胺基酸取代」意指在所述位置中1、2、3、4、5、6或7處的取代。在一些實施方式中，「在一個或多個位置處的胺基酸取代」意指在所述位置中1、2、3、4、5或6處的取代。在一些實施方式中，「在一個或多個位置處的胺基酸取代」意指在所述位置中1、2、3、4或5處的取代。在一些實施方式中，「在一個或多個位置處的胺基酸取代」意指在所述位置中1、2、3或4處的取代。在一些實施方式中，「在一個或多個位置處的胺基酸取代」意指在所述位置中1、2或3處的取

代。在一些實施方式中，「在一個或多個位置處的胺基酸取代」意指在所述位置中1或2處的取代。

【0043】 本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。在一個實施方式中，該轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代。在一個實施方式中，該轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在一個實施方式中，該轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，和/或包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在另一個相關的實施方式中，該轉位酶包含SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。在一個實施方式中，與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的相同目的蛋白的滴定度相比，由工程化piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的目的重組蛋白的滴定度得到了改善。

【0044】 本發明還提供了經工程化以增加在宿主細胞中穩定性的piggyBac轉位酶，其中該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 14的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

表1 野生型和突變型piggyBac轉位酶的胺基酸序列

SEQ ID NO:	ID	序列
2	WT	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SEIVKW

		TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKIWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGTS MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
4	I147L	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRV SALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SELVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKIWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGTS MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
6	I247L	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRV SALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SEIVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKLWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT

		SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGTS MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
8	S533T	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRV SALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFTDEII SEIVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL F DRSLSMVYVSVMSRDRFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKIWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGTS MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNITNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
10	LLT (I247L I147L S533T)	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRV SALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFTDEII SELVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL F DRSLSMVYVSVMSRDRFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKLWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGTS MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNITNILPNEVPG TSDDSTEE

		PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
12	ILT (I247 I147L S533T)	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SEIVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKLWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVGHSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGTS MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMKRKRLEAPTLKRYLRDNITNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
14	LIT (I247L I147 S533T)	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SELVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKIWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVGHSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGTS MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMKRKRLEAPTLKRYLRDNITNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
16	LLS (I247L I147L S533)	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SELVKW

	TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKLWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGT MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPQMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
--	---

【0045】術語「多核苷酸」、「核酸分子」或「工程化核酸分子」在全文中可互換使用，並且包括單股和雙股核酸，並包括基因組DNA、RNA、mRNA、cDNA或合成來源或與自然界通常存在的序列無關的一些組合。術語「分離的多核苷酸」、「分離的核酸分子」或「分離的工程化核酸分子」具體是指合成來源的序列或自然界中通常不存在的序列。包含規定序列的分離的核酸分子除該等規定序列以外還可以包括針對多達十種或甚至多達二十種其他蛋白質或其部分的編碼序列，或可以包括控制所敘述核酸序列的編碼區的表現的可操作地連接的調節序列，及/或可以包括載體序列。構成該等核酸分子的核苷酸可以是核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸或者任一類型核苷酸的經修飾形式。該等修飾包括鹼基修飾，諸如溴尿苷及肌苷衍生物；核糖修飾，諸如2',3'-二去氧核糖；及核苷酸間鍵修飾，諸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺基硫代磷酸酯、苯胺基磷酸酯及胺基磷酸酯。

【0046】如本文所用，術語「分離的」意指 (i) 不含至少一些通常與其一起被發現的蛋白質或多核苷酸，(ii) 基本上不含來自相同來源的其他蛋白質或多核苷酸，例如來自相同物種，(iii) 與至少約50%的在自然界與其相關的多核苷

酸、脂質、碳水化合物或其他物質分離，(iv) 可操作地與在自然界與其不相關的多肽相關（藉由共價或非共價相互作用），或(v) 在自然界中不存在。

【0047】 在一個實施方式中，本發明提供了如本文所述的編碼 piggyBac 轉位酶的工程化核酸分子。本發明還提供了由 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 18 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 15 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 11 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 18 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 3 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 5 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 7 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 9 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 11 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 13 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 15 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 17 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由 SEQ ID NO: 18 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶。

表 2. 野生型和突變型 piggyBac 轉位酶的核酸序列

SEQ	ID	核酸序列
-----	----	------

ID NO:		
1	WT	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG ATCGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTCACCCCCGTGCGGAAG ATCTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCCT TCAGAAATGTA CATCCCCAACAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG

		ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAG CAACATCCTGCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
3	I147L	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG CTGGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG ATCTGGGACC TGTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA

		AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAG CAACATCCTGCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
5	I247L	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG ATCGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT

		TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG CTGTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAG CAACATCCTGCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
7	S533T	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA

	ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG ATCGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTCACCCCCGTGCGGAAG ATCTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCCT TCAGAAATGTA CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCCACCTGAAGAGATACCTGCGG GACAAACATCAC CAACATCCTGCCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA
--	---

		CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
9	LLT (I247L I147L S533T)	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG CTGGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTCACCCCCGTGCGGAAG CTGTGGGACC TGTTTCATCCACCAAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGACCTG

		CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAC CAACATCCTGCCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
11	ILT (I147 I247L S533T)	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG ATCGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTCACCCCGTGCGGAAG CTGTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG

		ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAC CAACATCCTGCCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
13	LIT (I147L I247 S533T)	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG CTGGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA

		TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG ATCTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAC CAACATCCTGCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
15	LLS (I147L I247L S533S)	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA

	CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG CTGGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTCACCCCGTGCGGAAG CTGTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTAACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA
--	---

		AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAG CAACATCCTGCCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
17	ILT (I147I I247L S533T) RNA	AUGGGCUCUAGCCUGGACGACGAGCACAUCCUGAGCGCC CUGCUGCAG AGCGACGACGAACUGGUGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG AUCAGCGACCA CGUGUCCGAGGACGACGUGCAGUCCGACACCGAGGAAGC CUUCAUCGACG AGGUGCACGAAGUGCAGCCUACCAGCAGCGGCUCCGAGA UCCUGGACGAG CAGAACGUGAUCGAGCAGCCUGGCAGCUCCUGGCCAGC AACAGAAUCCU GACCCUGCCCCAGAGAACCAUCAGAGGCAAGAACAAGCA CUGCUGGUCCA CCUCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGUGUCCGCCUGA ACAUCGUGCGG AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAAUGUGCAGAAACAUCUAC GACCCCCUGCU GUGCUUCAAGCUGUUCUUCACCGACGAGAUCAUCAGCGA GAUCGUGAAGU GGACCAACGCCGAGAUAGCCUGAAGAGGGCGGGAGAGCA UGACCGGCGCC ACCUUCAGAGACACCAACGAGGACGAGAUUCUACGCCUUC UUCGGCAUCCU GGUGAUGACCGCCGUGAGAAAGGACAACCACAUGAGCAC CGACGACCUGU UCGACAGAUCCCUGAGCAUGGUGUACGUGUCCGUGAUGA GCAGAGACAGA UUCGACUUCCUGAUCAGAUCCUGAGAAUGGACGACAAG AGCAUCAGACC CACCCUGCGGGAGAACGACGUGUUCACCCCCGUGCGGAA GCUGUGGGACC UGUUCAUCCACCAGUGCAUCCAGAACUACACCCCUGGCG CCCACCUGACC AUCGAUGAGCAGCUGCUGGGCUUCAGAGGCAGAUGCCCC UUCAGAAUGUA CAUCCCCAACAGCCCAGCAAGUACGGCAUCAAGAUCU GAUGAUGUGCG ACAGCGGCACCAAGUACAUGAUCAACGGCAUGCCCUACC UGGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGUGCCCCUGGGCGAGUACUACGUG AAAGAACUGAG CAAGCCUGUGCAUGGCAGCUGCAGGAACAUCACCUGCGA CAACUGGUUCA CCAGCAUCCCCUGGCCAAGAACCUGCUGCAGGAACCCU ACAAGCUGACC AUCGUGGGCACCGUGCGGAGCAACAAGCGGGAGAUCCCA

		GAGGUGCUGAA GAACAGCAGAUCCAGACCUGUGGGAACAAGCAUGUUCUG CUUCGACGGCC CCCUGACCCUGGUGUCCUACAAGCCCAAGCCCGCCAAGA UGGUGUACCUG CUGUCCAGCUGCGACGAGGACGCCAGCAUCAAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGAUGGUGAUGUACUACAACCAGACCAAGGGCGGCGU GGACACCCUGG ACCAGAUGUGCAGCGUGAUGACCUGCAGCAGAAAGACCA ACAGAUGGCCC AUGGCCCUGCUGUACGGCAUGAUCAAUAUCGCCUGCAUC AACAGCUUCAU CAUCUACAGCCACAACGUGUCCAGCAAGGGCGAGAAGGU GCAGAGCCGGA AGAAAUUCAUGCGGAACCUGUACAUGAGCCUGACCUCCA GCUUCAUGAGA AAGAGACUGGAAGCCCCACCCUGAAGAGAUACCUGCGG GACAACAUCAC CAACAUCCUGCCCAACGAAGUGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGUGAUGAAGAAGAGGACCUACUGCACCUACUGUC CCAGCAAGAUC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCUGCAAGAAAUUGCAAAAA AGUGAUCUGCCG GGAGCACACAUCGACAUGUGCCAGAGCUGUUUCUAGC
18	LLT (I147L I247L S533T) RNA	AUGGGCUCUAGCCUGGACGACGAGCACAUCCUGAGCGCC CUGCUGCAG AGCGACGACGAACUGGUGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG AUCAGCGACCA CGUGUCCGAGGACGACGUGCAGUCCGACACCGAGGAAGC CUUCAUCGACG AGGUGCACGAAGUGCAGCCUACCAGCAGCGGCUCCGAGA UCCUGGACGAG CAGAACGUGAUCGAGCAGCCUGGCAGCUCCUGGCCAGC AACAGAAUCCU GACCCUGCCCCAGAGAACCAUCAGAGGCAAGAACAAGCA CUGCUGGUCCA CCUCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGUGUCCGCCCUGA ACAUCGUGCGG AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAAUGUGCAGAAACAUCUAC GACCCCCUGCU GUGCUUCAAGCUGUUCUUCACCGACGAGAUCAUCAGCGA GCUGGUGAAGU GGACCAACGCCGAGAUAGCCUGAAGAGGCGGGAGAGCA UGACCGGCGCC ACCUUCAGAGACACCAACGAGGACGAGAUUCACGCCUUC UUCGGCAUCCU GGUGAUGACCGCCGUGAGAAAGGACAACCACAUGAGCAC CGACGACCUGU UCGACAGAUCCCUGAGCAUGGUGUACGUGUCCGUGAUGA GCAGAGACAGA UUCGACUCCUGAUCAGAUCCUGAGAAUGGACGACAAG AGCAUCAGACC CACCCUGCGGGAGAACGACGUGUUCACCCCCGUGCGGAA GCUGUGGGACC

	UGUUCAUCCACCAGUGCAUCCAGAACUACACCCCUGGCG CCCACCUGACC AUCGAUGAGCAGCUGCUGGGCUUCAGAGGCAGAUGCCCC UUCAGAAUGUA CAUCCCCAACAGCCCAGCAAGUACGGCAUCAAGAUCU GAUGAUGUGCG ACAGCGGCACCAAGUACAUGAUCAACGGCAUGCCCUACC UGGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGUGCCCCUGGGCGAGUACUACGUG AAAGAACUGAG CAAGCCUGUGCAUGGCAGCUGCAGGAACAUCACCUGCGA CAACUGGUUCA CCAGCAUCCCCUGGCCAAGAACCUGCUGCAGGAACCCU ACAAGCUGACC AUCGUGGGCACCGUGCGGAGCAACAAGCGGGAGAUCCCA GAGGUGCUGAA GAACAGCAGAUCCAGACCUGUGGGAACAAGCAUGUUCUG CUUCGACGGCC CCCUGACCCUGGUGUCCUACAAGCCCAAGCCCGCCAAGA UGGUGUACCUG CUGUCCAGCUGCGACGAGGACGCCAGCAUCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGAUGGUGAUGUACUACAACCAGACCAAGGGCGGCGU GGACACCCUGG ACCAGAUGUGCAGCGUGAUGACCUGCAGCAGAAAGACCA ACAGAUGGCCC AUGGCCUGCUGUACGGCAUGAUCAAUAUCGCCUGCAUC AACAGCUUCAU CAUCUACAGCCACAACGUGUCCAGCAAGGGCGAGAAGGU GCAGAGCCGGA AGAAAUUCAUGCGGAACCUGUACAUGAGCCUGACCUCCA GCUUCAUGAGA AAGAGACUGGAAGCCCCACCCUGAAGAGAUACCUGCGG GACAACAUCAC CAACAUCCUGCCCAACGAAGUGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGUGAUGAAGAAGAGGACCUACUGCACCUACUGUC CCAGCAAGAUC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCUGCAAGAAAUGCAAAAA AGUGAUCUGCCG GGAGCACACAUCGACAUGUGCCAGAGCUGUUUCUAGC
--	--

【0048】 目的多肽和蛋白質可能具有科學意義或商業意義，包括基於蛋白質的治療法。目的蛋白尤其包括分泌型蛋白質、非分泌型蛋白質、胞內蛋白質或膜結合蛋白質。目的多肽和蛋白質可以使用細胞培養方法藉由重組動物細胞系產生，並且可以被稱為「重組蛋白質」。所表現的（一種或多種）蛋白質可以在細胞內產生或被分泌到培養基中，從培養基中可以回收和/或收集所述蛋白質。術語「分離的蛋白質」或「分離的重組蛋白質」係指目的多肽或蛋白質，

該目的多肽或蛋白質從會干擾其治療、診斷、預防、研究或其他用途的蛋白質或多肽或其他污染物中純化出來。目的蛋白包括藉由結合靶、特別是下面列出的那些中的靶而發揮治療作用的蛋白質，包括從其衍生的靶、與其相關的靶及其修飾。

【0049】 目的蛋白包括「抗原結合蛋白」。「抗原結合蛋白」係指包括抗原結合區或抗原結合部分的蛋白質或多肽，該抗原結合區或抗原結合部分對與其結合的另一分子（抗原）具有親和力。抗原結合蛋白涵蓋抗體、肽體、抗體片段、抗體衍生物、抗體類似物、融合蛋白（包括單鏈可變片段（scFv）和雙鏈（雙價）scFv、突變蛋白和Xmab）。還包括雙特異性T細胞銜接器（BiTE[®]）、具有延長（諸如半衰期延長）的雙特異性T細胞銜接器（例如HLE BiTE、HeteroIg BITE以及其他）、嵌合抗原受體（CAR、CAR T）和T細胞受體（TCR）。

【0050】 scFv係單鏈抗體片段，它具有連接在一起的抗體重鏈和輕鏈的可變區。參見美國專利案號7,741,465、和6,319,494以及Eshhar等人, Cancer Immunol Immunotherapy [癌症免疫學免疫療法](1997) 45: 131-136。scFv保留了親本抗體與靶抗原特異性相互作用的能力。

【0051】 術語「抗體」包括任何同種型或亞類的糖基化免疫球蛋白和非糖基化免疫球蛋白，或者其與完整抗體競爭特異性結合的抗原結合區。除非另有說明，否則抗體包括人類的、人源化的、嵌合的、多特異性的、單株的、多株的、heteroIgG、雙特異性的抗體、及其寡聚物或抗原結合片段。抗體包括 IgG1 型、IgG2 型、IgG3 型或 IgG4 型。還包括具有抗原結合片段或抗原結合區的蛋白質，諸如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、雙抗體、Fd、dAb、最大抗體（maxibody）、單鏈抗體分子、單結構域 V_HH、互補決定區（CDR）片段、scFv、雙抗體、三

抗體、四抗體和至少包含足以使特異性抗原與靶多肽結合的免疫球蛋白的一部分的多肽。

【0052】 還包括人類的、人源化的和其他抗原結合蛋白，諸如人類抗體和人源化抗體，該等抗原結合蛋白當施用於人類時不會產生明顯有害的免疫反應。

【0053】 還包括經修飾的蛋白質，諸如經非共價鍵、共價鍵或者共價鍵和非共價鍵兩者化學修飾的蛋白質。還包括進一步包含一種或多種譯後修飾的蛋白質，其可以藉由細胞修飾系統或由酶和/或化學方法離體引入或以其他方式引入的修飾製得。

【0054】 目的蛋白還可以包括重組融合蛋白，該重組融合蛋白包括例如多聚化結構域，諸如白胺酸拉鍊、捲曲螺旋、免疫球蛋白的Fc部分等。還包括包含分化抗原的全部或部分胺基酸序列的蛋白質（稱為CD蛋白質）或其配位基或與該等中的任一個實質上相似的蛋白質。

【0055】 在一些實施方式中，目的蛋白可以包括集落刺激因子，諸如粒細胞集落刺激因子（G-CSF）。此類G-CSF試劑包括但不限於Neupogen®（非格司亭）和Neulasta®（培非格司亭）。還包括紅血球生成刺激劑（ESA），諸如Epoen®（依伯汀 α ），Aranesp®（達貝泊汀 α ），Dynepo®（依伯汀 δ ），Mircera®（甲氧基聚乙二醇-依伯汀 β ），Hematide®，MRK-2578，INS-22，Retacrit®（依伯汀 ζ ），Neorecormon®（依伯汀 β ），Silapo®（依伯汀 ζ ），Binocrit®（依伯汀 α ），epoetin alfa Hexal，Abseamed®（依伯汀 α ），Ratioepo®（依伯汀 θ ），Eporatio®（依伯汀 θ ），Biopoin®（依伯汀 θ ），依伯汀 α ，依伯汀 β ，依伯汀 ζ ，依伯汀 θ 和依伯汀 δ ，依伯汀 ω ，依伯汀 ι ，組織纖溶酶原激活劑，GLP-1受體激動劑，以及前述任何內容的分子或其變體或類似物和生物仿製藥。

【0056】 在一些實施方式中，目的蛋白可以包括與一種或多種CD蛋白質、HER受體家族蛋白質、細胞黏附分子、生長因子、神經生長因子、成纖維細胞生長因子、轉化生長因子（TGF）、胰島素樣生長因子、骨誘導因子、胰島素和胰島素相關蛋白、凝血和凝血相關蛋白、集落刺激因子（CSF）、其他血液和血清蛋白血型抗原特異性結合的蛋白質；受體、受體相關蛋白、生長激素、生長激素受體、T細胞受體；神經營養因子、神經營養蛋白、鬆弛素（relaxin）、干擾素、介白素、病毒抗原、脂蛋白、整合素、類風濕因子、免疫毒素、表面膜蛋白、轉運蛋白、歸巢受體、位址素、調節蛋白和免疫黏附素。

【0057】 在一些實施方式中，目的蛋白單獨或以任何組合結合以下一種或多種蛋白質的蛋白質：CD蛋白質（包括但不限於CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD70、CD123、CD133、CD138、CD171和CD174）、HER受體家族蛋白質（包括例如HER2、HER3、HER4和EGF受體）、EGFR ν III、細胞黏附分子（例如LFA-1、Mol、p150,95、VLA-4、ICAM-1、VCAM和 α v/ β 3整合素）、生長因子（包括但不限於例如血管內皮生長因子（「VEGF」））；VEGFR2、生長激素、甲狀腺刺激素、卵泡刺激素、黃體生成激素、生長激素釋放因子、副甲狀腺素、米勒管抑制物質（mullerian-inhibiting substance）、人類巨噬細胞炎性蛋白（MIP-1- α ）、促紅血球生成素（EPO）、神經生長因子（諸如NGF- β ）、血小板源性生長因子（PDGF）、成纖維細胞生長因子（包括例如aFGF和bFGF）、表皮生長因子（EGF）、Cripto、轉化生長因子（TGF）（其中包括TGF- α 和TGF- β （包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4或TGF- β 5））、胰島素樣生長因子-I和胰島素樣生長因子-II（IGF-I和IGF-II）、des(1-3)-IGF-I（腦IGF-I）和骨誘導因子、胰島素和胰島素相關蛋白（包括但不限於胰島素、胰島素A鏈、胰島素B

鏈、胰島素原和類胰島素生長因子結合蛋白)；(凝血蛋白和凝血相關蛋白，尤其諸如，VIII因子、組織因子、範威爾邦德(von Willebrand)因子、蛋白質C、 α -1-抗胰蛋白酶、纖溶酶原激活劑(諸如尿激酶和組織纖溶酶原激活劑(「t-PA」))、邦巴辛(bombazine)、凝血酶、血小板生成素和血小板生成素受體、集落刺激因子(CSF)(尤其包括以下物質:M-CSF、GM-CSF和G-CSF)、其他血液和血清蛋白(包括但不限於白蛋白、IgE和血型抗原)、受體和受體相關蛋白(包括例如flk2/flt3受體、肥胖(OB)受體、生長激素受體和T細胞受體)；神經營養因子，包括但不限於骨源性神經營養因子(BDNF)和神經營養蛋白-3、神經營養蛋白-4、神經營養蛋白-5或神經營養蛋白-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6)；鬆弛素A鏈、鬆弛素B鏈和鬆弛素原、干擾素(包括例如干擾素 α 、干擾素 β 和干擾素 γ)、介白素(IL)(例如IL-1至IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-23、IL-12/IL-23、IL-2Ra、IL1-R1、IL-6受體、IL-4受體和/或IL-13受體、IL-13RA2或IL-17受體、IL-1RAP)；病毒抗原，包括但不限於AIDS包膜病毒抗原、脂蛋白、降鈣素、升糖素、心鈉素、肺表面活性劑、腫瘤壞死因子- α 和腫瘤壞死因子- β 、腦啡肽酶、BCMA、IgKappa、ROR-1、ERBB2、間皮素、RANTES(受激活調節的正常T細胞表現與分泌因子)、小鼠促性腺激素相關肽、DNA酶、FR- α 、抑制素和活化素、整合素、蛋白質A或D、類風濕因子、免疫毒素、骨形態發生蛋白質(BMP)、超氧化物歧化酶、表面膜蛋白、衰變加速因子(DAF)、AIDS包膜、轉運蛋白、歸巢受體、MIC(MIC-a、MIC-B)、ULBP 1-6、EPCAM、位址素、調節蛋白、免疫黏附素、抗原結合蛋白、生長激素、CTGF、CTLA4、伊紅趨素(eotaxin)-1、MUC1、CEA、c-MET、密蛋白(Claudin)-18、GPC-3、EPHA2、FPA、LMP1、MG7、NY-ESO-1、PSCA、神經節苷脂GD2、神經節苷脂GM2、BAFF、OPGL(RANKL)、肌生成抑制素、Dickkopf-1(DKK-1)、

Ang2、NGF、IGF-1受體、肝細胞生長因子(HGF)、TRAIL-R2、c-Kit、B7RP-1、PSMA、NKG2D-1、計劃性細胞死亡蛋白1和配位基、PD1和PDL1、甘露糖受體/hCG β 、丙型肝炎病毒、間皮素dsFv[PE38綴合物、嗜肺軍團菌(*Legionella pneumophila*)(lly)、IFN γ 、 γ 干擾素誘導蛋白10(IP10)、IFNAR、TALL-1、胸腺基質淋巴細胞生成素(TSLP)、前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶/Kexin 9型(PCSK9)、幹細胞因子、Flt-3、降鈣素基因相關肽(CGRP)、OX40L、 α 4 β 7、血小板特異性(血小板糖蛋白Iib/IIIb(PAC-1)、轉化生長因子 β (TFG β)、透明帶精子結合蛋白3(ZP-3)、TWEAK、血小板衍生的生長因子受體 α (PDGFR α)、硬化蛋白(sclerostin)以及任何前述內容的生物活性片段或變體。

【0058】在另一個實施方式中，目的蛋白包括阿昔單抗(abciximab)、阿達木單抗(adalimumab)、阿德木單抗(adecatumumab)、阿柏西普(aflibercept)、阿倫單抗(alemtuzumab)、阿利庫單抗(alirocumab)、阿那白滯素(anakinra)、阿塞西普(atacicept)、巴厘昔單抗(basiliximab)、貝利木單抗(belimumab)、貝伐單抗(bevacizumab)、生物素單抗(biosozumab)、博納吐單抗(blinatumomab)、本妥昔單抗(brentuximab vedotin)、布羅達單抗(brodalumab)、莫坎妥珠單抗(cantuzumab mertansine)、康納單抗(canakinumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、塞妥珠單抗(certolizumab pegol)、可那木單抗(conatumumab)、達利珠單抗(daclizumab)、迪諾舒單抗(denosumab)、依庫麗單抗(eculizumab)、依決洛單抗(edrecolomab)、依法利珠單抗(efalizumab)、依帕珠單抗(epratuzumab)、依那西普(etanercept)、依伏庫單抗(evolocumab)、加利昔單抗(galiximab)、蓋尼塔單抗(ganitumab)、吉妥珠單抗(gemtuzumab)、戈利木單抗(golimumab)、替伊莫單抗(ibritumomab tiuxetan)、英夫利昔單抗(infliximab)、易普利姆瑪(ipilimumab)、樂地單抗(lerdelimumab)、魯

昔單抗(lumiliximab)、左旋單抗(lxdkizumab)、馬帕木單抗(mapatumumab)、磷酸莫特沙尼(motesanib diphosphate)、莫羅單抗-CD3(muromonab-CD3)、那他珠單抗(natalizumab)、奈西立肽(nesiritide)、尼妥珠單抗(nimotuzumab)、納武單抗(nivolumab)、奧瑞珠單抗(ocrelizumab)、奧法木單抗(ofatumumab)、奧馬珠單抗(omalizumab)、奧普瑞介白素(oprelvekin)、帕利珠單抗(palivizumab)、帕尼單抗(panitumumab)、派姆單抗(pembrolizumab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、培克珠單抗(pexelizumab)、蘭尼單抗(ranibizumab)、利妥木單抗(rilotumumab)、利妥昔單抗(rituximab)、羅米司亭(romiplostim)、洛莫索珠單抗(romosozumab)、沙格司亭(sargamostim)、托珠單抗(tocilizumab)、托西莫單抗(tositumomab)、曲妥單抗(trastuzumab)、優特克單抗(ustekinumab)、維多珠單抗(vedolizumab)、維西珠單抗(visilizumab)、伏洛昔單抗(volociximab)、紮木單抗(zanolimumab)、紮魯木單抗(zalutumumab)、以及前述任何內容的生物仿製藥(biosimilar)。

【0059】 根據本發明所述的目的蛋白涵蓋所有前述內容，並且進一步包括包含上述任何抗體的1、2、3、4、5或6個互補決定區(CDR)的抗體。還包括這樣的變體，其包括與目的蛋白的參考胺基酸序列具有70%或更高、特別是80%或更高、更特別是90%或更高、再更特別是95%或更高、具體是97%或更高、更具體是98%或更高、再更具體是99%或更高同一性的胺基酸序列的區。在這方面的同一性可以使用多種眾所周知的且容易獲得的胺基酸序列分析軟體來確定。較佳的是軟體包括實施史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)演算法的那些軟體，該軟體被認為係搜索和比對序列問題的令人滿意的解決方案。還可以採用其他演算法，特別是在速度係重要考慮因素的情況下。可以用於此方面的用於DNA、RNA和多肽的比對和同源性匹配的常用程式包括FASTA、TFASTA、BLASTN、

BLASTP、BLASTX、TBLASTN、PROSRCH、BLAZE和MPSRCH，後者係用於在MasPar製造的大規模並行處理器上執行的史密斯-沃特曼演算法的實施方式。

【0060】目的蛋白還可以包括基因工程化受體，諸如嵌合抗原受體（CAR或CAR-T）和T細胞受體（TCR），以及包含與該靶向抗原相互作用的抗原結合分子的其他蛋白質。藉由摻入與靶抗原相互作用的抗原結合分子，CAR可以被工程化以結合抗原（諸如細胞表面抗原）。CAR典型地將抗原結合結構域（諸如scFv）與一個或多個共刺激（「傳訊」）結構域和一個或多個激活結構域串聯在一起。

【0061】較佳的是，該抗原結合分子係其抗體片段，並且更較佳的是一個或多個單鏈抗體片段（「scFv」）。scFv較佳的是用於在嵌合抗原受體中使用，因為它們可以被工程化以作為單鏈的部分與其他CAR組分被表現。參見Krause等人, J. Exp. Med., [實驗醫學雜誌] 188(4): 619-626, 1998；Finney等人, Journal of Immunology [免疫學雜誌], 161: 2791-2797, 1998。

【0062】嵌合抗原受體摻入一個或多個共刺激（傳訊）結構域以增加其效力。參見美國專利案號7,741,465和6,319,494，以及Krause等人和芬尼等人（前述），Song等人, Blood [血液] 119: 696-706 (2012)；Kalos等人, Sci Transl. Med. [科學·轉化醫學] 3: 95 (2011)；Porter等人, N. Engl. J. Med. [新英格蘭醫學雜誌] 365: 725-33 (2011), 以及Gross等人, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. [藥理學與毒理學年度評論] 56: 59-83 (2016)。適合的共刺激結構域可以來自（除其他來源外）CD28、CD28T、OX40、4-1BB/CD137、CD2、CD3（ α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 γ 、 ξ ）、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD27、CD30、CD33、CD37、CD40、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、PD-1、ICOS、淋巴細胞功能

相關抗原-1 (LFA-1 (CD11a/CD18)、CD247、CD276 (B7-H3)、LIGHT (腫瘤壞死因子超家族成員14; TNFSF14)、NKG2C、Ig α (CD79a)、DAP-10、Fc γ 受體、MHC I類分子、TNF、TNFr、整合素、傳訊淋巴細胞活化分子、BTLA、Toll配位基受體、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、41-BB、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83配位基、或其片段或組合。共刺激結構域可包含細胞外部分、跨膜部分和細胞內部分的一個或多個。

【0063】 CAR 還包括一個或多個激活結構域。CD3 ζ 係天然 T 細胞上 T 細胞受體的元件並且已顯示係 CAR 內重要的細胞內激活元件。

【0064】 CAR係跨膜蛋白，包含細胞外結構域，典型地包含能夠識別並結合目的抗原的抗原結合蛋白，並且還包括「鉸鏈」區域。另外係跨膜結構域和細胞內（胞質）結構域。

【0065】 細胞外結構域有利於傳訊和淋巴細胞對抗原的有效應答。來自本文所述的任何蛋白質或其任何組合。細胞外結構域可以衍生自合成或天然來源，諸如本文所述的蛋白質。細胞外結構域通常包含鉸鏈部分。這係細胞外結

構域的一部分，有時稱為「間隔子」區。鉸鏈可衍生自如本文所述的該等蛋白質，特別是上述共刺激蛋白質，以及免疫球蛋白（Ig）序列或其他合適的分子，以實現距靶細胞所需的特殊距離。

【0066】跨膜結構域可以與該CAR的細胞外結構域融合。它可以類似地融合到CAR的細胞內結構域。該跨膜結構域可以衍生自合成或天然來源，諸如本文所述的蛋白質，特別是上述共刺激蛋白質。

【0067】細胞內（胞質）結構域可以與跨膜結構域融合，並且可以提供免疫細胞的正常效應子功能中的至少一種的激活。T細胞的效應子功能例如可以是包括細胞介素的分泌的細胞溶解活性或輔助活性。細胞內結構域可以衍生自本文所述的蛋白質，特別是衍生自CD3。

【0068】可以使用多種已知技術製備根據本發明的多核苷酸、多肽、載體、宿主細胞、免疫細胞、組成物等。

【0069】本文中還提供包含如上文所述的至少一種核酸分子的呈質體、表現載體、轉錄盒或表現盒形式的表現系統和構建體，以及包含該等表現系統或構建體的宿主細胞。如本文所用，「載體」意指適合用於將資訊編碼蛋白轉移和/或轉運至宿主細胞和/或特定位置和/或宿主細胞內的區室的任何分子或實體（例如，核酸、質體、噬菌體、轉位子、黏粒、染色體、病毒、病毒衣殼、病毒體、裸DNA、複合DNA等）。載體可以包括病毒和非病毒載體、非附加型哺乳動物載體。載體通常被稱為表現載體，例如，重組表現載體和選殖載體。可以將載體引入宿主細胞以允許載體自身的複製，並從而擴增其中包含的多核苷酸的拷貝。選殖載體可含有序列組分，該等序列組分通常包括但不限於複製起點、啟動子序列、轉錄起始序列、增強子序列和選擇性標記物。該等元件可以由熟悉該項技術者適當選擇。

【0070】載體可用於對宿主細胞進行轉化且含有指導及/或控制（連同宿主細胞一起）與其可操作地連接的一個或多個異源編碼區的表現的核酸序列的載體。表現構建體可以包括但不限於影響或控制轉錄、翻譯且在存在內含子時影響與其可操作地連接的編碼區的RNA剪接的序列。「可操作地連接」意指該術語所適用的組分呈允許其執行其固有功能的關係。例如，在與蛋白質編碼序列「可操作地連接」的載體中的控制序列（例如啟動子）的排列使得該控制序列的正常活性導致該蛋白質編碼序列的轉錄，從而導致所編碼的蛋白質的重組表現。

【0071】可選擇在所採用的特定宿主細胞中具有功能性的載體（即，該載體與宿主細胞機構相容，從而允許可發生基因的擴增及/或表現）。在一些實施方式中，所使用的載體採用使用諸如二氫葉酸還原酶的蛋白質報導序列的蛋白質片段互補測定（參見例如美國專利案號6,270,964）。合適的表現載體係本領域已知的，並且也是可商購的。

【0072】典型地，用於任何宿主細胞中的載體均將含有用於質體維持及用於選殖及表現外源核苷酸序列的序列。此類序列典型地將包含以下核苷酸序列中的一個或多個：啟動子、一個或多個增強子序列、複製起點、轉錄和翻譯控制序列、轉錄終止序列、包含供體和受體剪接位點的完整內含子序列、各種改善糖基化或產量的前序列（pre-sequence/pro-sequence）、用於多肽分泌的天然或異源訊號序列（前導序列或訊息肽）、核糖體結合位點、聚腺苷酸序列、內部核糖體進入位點（IRES）序列、表現增強序列元件（EASE）、來自腺病毒2的三聯體前導序列（TPA）和VA基因RNA、用於插入編碼待表現多肽的多核苷酸的多連接子（linker）區域以及選擇性標記元件。可以從起始載體（諸如市售的

載體) 構建載體, 可以單獨獲得其他元件並將其連接到載體中。用於獲得各組分的方法係熟悉該項技術者眾所周知的。

【0073】 載體組分可以是同源的(即, 來自於與宿主細胞相同的物種及/或品系)、異源的(即, 來自於除宿主細胞物種或品系以外的物種)、雜合的(即, 來自於多於一個來源的側接序列的組合)、合成的或天然的。可藉由本領域熟知的方法獲得該等載體中有用的組分的序列, 諸如先前藉由作圖和/或藉由限制性核酸內切酶鑒定的那些。另外, 它們可以藉由聚合酶鏈式反應(PCR)和/或藉由用合適的探針篩選基因組文庫來獲得。

【0074】 核糖體結合位點對於mRNA翻譯起始而言通常為必需的且以Shine-Dalgarno序列(原核生物)或Kozak序列(真核生物)為特徵。該元件典型地位於啟動子的3'且在待表現的多肽的編碼序列的5'。

【0075】 複製的起點有助於宿主細胞中載體的擴增。它們可以作為市售原核載體的一部分包括在內, 也可以基於已知序列化學合成並連接到載體中。各種病毒來源(例如, SV40、多瘤病毒、腺病毒、水泡性口炎病毒(VSV)或乳頭瘤病毒(諸如HPV或BPV))可用於在哺乳動物細胞中選殖載體。

【0076】 哺乳動物宿主細胞表現載體的轉錄和翻譯控制序列可以從病毒基因組中切除。常用的啟動子和增強子序列衍生自多瘤病毒、腺病毒2、猿猴病毒40(SV40)和人巨細胞病毒(CMV)。例如, 可以使用即時早期基因1的人CMV啟動子/增強子。參見, 例如, Patterson等人 (1994), Applied Microbiol. Biotechnol. [應用微生物學與生物技術] 40: 691-98。衍生自SV40病毒基因組的DNA序列, 例如, SV40來源、早期和晚期啟動子、增強子、剪接序列和聚腺苷酸位點可用於提供其他遺傳元件, 用於在哺乳動物宿主細胞中表現結構基因序列。病毒早期和晚期啟動子係特別有用的, 因為它們都容易從病毒基因組中作

為片段獲得，也可以包含病毒複製起點（Fiers等人, (1978), Nature [自然] 273:113；Kaufman (1990), Meth. in Enzymol. [酶方法學] 185:487-511）。也可以使用更小或更大的SV40片段，前提係包括了從Hind III位點向位於SV40病毒複製起點的Bgl I位點延伸的約250 bp序列。

【0077】轉錄終止序列典型地位於多肽編碼區的3'端且用於終止轉錄。通常，原核細胞中的轉錄終止序列為富G-C片段，繼之以聚T序列。雖然序列可自文庫中容易地選殖或甚至作為載體的一部分而購自市面，但其還可使用熟悉該項技術者已知的那些核酸合成方法容易地合成。

【0078】選擇性標記基因編碼在選擇性培養基中生長的宿主細胞的存活及生長所必需的蛋白質。典型的選擇標記基因編碼如下蛋白質：(a) 賦予針對抗生素或其他毒素（例如，對於原核宿主細胞，胺苄青黴素、四環素或康黴素）的抗性；(b) 補充細胞的營養缺陷；或 (c) 提供不可得自複雜培養基或限定培養基的重要營養物。特定選擇性標記物為康黴素抗性基因、胺苄青黴素抗性基因及四環素抗性基因。有利地，新黴素抗性基因還可用於在原核及真核宿主細胞中進行選擇。

【0079】其他可選擇基因可用於擴增將表現的基因。擴增為如下的過程：其中使產生對生長或細胞存活非常重要的蛋白質所需的基因在重組細胞連續世代的染色體內串聯重複。哺乳動物細胞的合適的選擇性標記的實例包括麩醯胺酸合酶（GS）/蛋胺酸亞砒亞胺（MSX）系統、二氫葉酸還原酶（DHFR）和無啟動子的胸苷激酶基因。使哺乳動物細胞轉化株處於選擇壓力下，其中由於載體中存在可選擇基因，故僅轉化株唯一適於存活。藉由在連續增加培養基中選擇劑的濃度的條件下培養經轉化細胞，由此使可選擇基因和編碼目的蛋白的DNA擴增來施加選擇壓力。因此，由經擴增的DNA合成增加量的目的多肽。

【0080】 在一些情況下，諸如在真核宿主細胞表現系統中需要糖基化時，可操縱各種前序列或前序列以改善糖基化或產率。舉例而言，可改變特定訊息肽的肽酶裂解位點，或添加還可影響糖基化的前序列。最終蛋白質產物可以在-1位（相對於成熟蛋白質的第一個胺基酸）具有一個或多個易於表現的另外的胺基酸，該等胺基酸可能未完全移除。舉例而言，最終蛋白質產物可具有一或兩個與胺基末端附接的在肽酶裂解位點發現的胺基酸殘基。可替代地，若酶在成熟多肽內的酶裂解位點區域進行切割，則一些酶裂解位點的使用可產生所要多肽的稍微截短形式。

【0081】 表現和選殖典型地將含有被宿主生物體識別且可操作地連接至編碼目的蛋白的分子的啟動子。啟動子為位於控制結構基因轉錄的結構基因起始密碼子（一般在約100至1000 bp內）上游（即，5'）的非轉錄序列。啟動子通常分組為兩種類別：誘導型啟動子及組成型啟動子。誘導型啟動子起始處於其控制下的DNA響應於培養條件的某種變化（諸如營養素的存在或不存在，或者溫度變化）以提高的水平轉錄。另一方面，組成型啟動子一致地轉錄其可操作地連接的基因，即，對基因表現具有極小控制或無控制。許多由多種潛在宿主細胞識別的啟動子係眾所周知的。

【0082】 用於酵母宿主的適合啟動子在本領域中也是眾所周知的。酵母增強子宜與酵母啟動子一起使用。用於哺乳動物宿主細胞的適合啟動子係眾所周知的，且包括但不限於獲自病毒基因組的那些啟動子，該等病毒為諸如多形瘤病毒、傳染性上皮瘤病毒、腺病毒（諸如腺病毒2）、牛乳頭狀瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨細胞病毒、逆轉錄病毒、B型肝炎病毒及猿猴病毒40（SV40）。其他適合哺乳動物啟動子包括異源哺乳動物啟動子，例如熱休克啟動子及肌動蛋白啟動子。

【0083】可能有意義的其他啟動子包括但不限於：SV40早期啟動子（Benoist和Chambon, 1981, Nature [自然] 290: 304-310）；CMV啟動子（Thornsen等人, 1984, Proc.Natl.Acad.U.S.A.[美國國家科學院院刊] 81: 659-663）；勞斯氏肉瘤病毒3'長末端重複序列中包含的啟動子（Yamamoto等人, 1980, Cell [細胞] 22: 787-797）；疱疹病毒胸苷激酶啟動子（Wagner等人, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. [美國國家科學院院刊] 78: 1444-1445）；甘油醛-3-磷酸脫氫酶（GAPDH）；來自金屬硫蛋白基因的啟動子和調節序列（Prinster等人, 1982, Nature [自然] 296: 39-42）；以及原核啟動子，諸如 β -內醯胺酶啟動子（Villa-Kamaroff等人, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. [美國國家科學院院刊] 75: 3727-3731）；或tac啟動子（DeBoer等人, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. [美國國家科學院院刊] 80:21-25）。有意義的還有以下動物轉錄控制區，它們表現出組織特異性並已用於轉基因動物中：在胰腺腺泡細胞中有活性的彈性蛋白酶I基因控制區（Swift等人, 1984, Cell [細胞] 38: 639-646；Ornitz等人, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. [冷泉港定量生物學研討會] 50: 399-409；MacDonald, 1987, Hepatology [肝臟病學] 7: 425-515）；在胰腺 β 細胞中有活性的胰島素基因控制區（Hanahan, 1985, Nature [自然] 315: 115-122）；在淋巴樣細胞中有活性的免疫球蛋白基因控制區（Grosschedl等人, 1984, Cell [細胞] 38: 647-658；Adames等人, 1985, Nature [自然] 318: 533-538；Alexander等人, 1987, Mol. Cell. Biol. [分子細胞生物學] 7: 1436-1444）；在睪丸細胞、乳腺細胞、淋巴樣細胞和肥大細胞中有活性的小鼠乳腺腫瘤病毒控制區（Leder等人, 1986, Cell [細胞] 45: 485-495）；在肝臟中有活性的白蛋白基因控制區（Pinkert等人, 1987, Genes and Devel. [基因與發育] 1: 268-276）；在肝臟中有活性的甲胎蛋白基因控制區（Krumlauf等人, 1985, Mol. Cell. Biol. [分子細胞生物學] 5: 1639-1648；Hammer等人, 1987, Science

[科學] 253: 53-58)；在肝臟中有活性的 α 1-抗胰蛋白酶基因控制區 (Kelsey等人, 1987, *Genes and Devel.* [基因與發育] 1: 161-171)；在髓樣細胞中有活性的 β -珠蛋白基因控制區 (Mogam等人., 1985, *Nature* [自然] 315: 338-340；Kollias等人., 1986, *Cell* [細胞] 46: 89-94)；在大腦的少突膠質細胞中有活性的髓磷脂鹼性蛋白基因控制區 (Readhead等人, 1987, *Cell* [細胞] 48: 703-712)；在骨骼肌中有活性的肌球蛋白輕鏈-2基因控制區 (Sani, 1985, *Nature* [自然] 314: 283-286)；以及在下丘腦中有活性的促性腺激素釋放激素基因控制區 (Mason等人, 1986, *Science* [科學] 234: 1372-1378)。

【0084】可將增強子序列插入該載體中以增加高等真核生物的轉錄。增強子為DNA的順式作用元件，長度通常為約10-300 bp，作用於啟動子以增加轉錄。增強子在方向及位置方面為相對獨立的，已見於轉錄單元的5'及3'位置。已知可得自哺乳動物基因的若干增強子序列（例如，球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白及胰島素）。然而，典型地使用來自於病毒的增強子。本領域中已知的SV40增強子、巨細胞病毒早期啟動子增強子、多瘤病毒增強子和腺病毒增強子係用於激活真核啟動子的例示性強化元件。儘管增強子可以定位於載體中編碼序列的5'或3'，但其典型地位於啟動子5'的位點處。

【0085】可將編碼適當天然或異源訊號序列（前導序列或訊息肽）的序列併入表現載體中，以促進目的蛋白的細胞外分泌。訊息肽或前導序列的選擇取決於待產生目的蛋白的宿主細胞的類型，且異源訊號序列可替換天然訊號序列。在哺乳動物宿主細胞中具有功能性的訊息肽的實例包括以下：美國專利案號4,965,195中所描述的介白素-7的訊號序列；Cosman等人, 1984, *Nature* [自然] 312:768中所描述的介白素-2受體的訊號序列；歐洲專利案號0367 566中所描述的

介白素-4受體訊息肽；美國專利案號4,968,607中所描述的I型介白素-1受體訊息肽；歐洲專利案號0 460 846中所描述的II型介白素-1受體訊息肽。

【0086】顯示出改善來自哺乳動物表現載體的異源基因表現的其他控制序列包括諸如以下的元件：衍生自CHO細胞的表現增強序列元件(EASE)(Morris等人, Animal Cell Technology [動物細胞技術], 第529-534頁 (1997)；美國專利案號6,312,951 B1、6,027,915和6,309,841 B1)以及來自腺病毒2的三聯體前導序列(TPL)和VA基因RNA(Gingeras等人(1982), J.Biol.Chem. [生物化學雜誌] 257: 13475-13491)。病毒來源的內部核糖體進入位點(IRES)序列使雙順反子mRNA得以有效翻譯(Oh和Sarnow (1993) Current Opinion in Genetics and Development [遺傳學與發育新見] 3: 295-300；Ramesh等人 (1996), Nucleic Acids Research [核酸研究] 24: 2697-2700)。

【0087】在一個實施方式中，本發明提供了載體，其包含編碼如本文所述的piggyBac轉位酶的核酸分子。在一個實施方式中，該載體還包括piggyBac轉位子，該piggyBac轉位子包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種外源核酸分子序列的插入位點。在一個實施方式中，該一種或多種外源核酸分子表現多種目的蛋白。在一個實施方式中，該載體包括雙順反子或多順反子構建體，該等構建體編碼多種目的蛋白。在一個實施方式中，該轉位子至少包含piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在一個實施方式中，提供了如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11、SEQ

ID NO: 13或SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 5的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 13的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。

【0088】 在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，和/或在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147

處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在另一個相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO:

14的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【0089】 在一個實施方式中，可以將單一載體轉染到細胞中，該單一載體包含如本文所述的piggyBac轉位酶和包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種外源核酸序列的插入位點的轉位子。在一個實施方式中，本發明提供了編碼如本文所述的piggyBac轉位酶的核酸分子，進一步包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在一實施方式中，該一種或多種外源核酸分子表現多種目的蛋白。在一個實施方式中，該載體包括雙順反子或多順反子構建體，該等構建體編碼多種目的蛋白。

【0090】 在另一個實施方式中，本發明提供了包含如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的載體和包含piggyBac轉位子的第二載體，該piggyBac轉位子包含編碼至少一種目的蛋白的一種或多種外源核酸分子的插入位點，其中這兩個載體可以共轉染到細胞中。在相關的實施方式中，該轉位子至少包含piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在一個實施方式中，該一種或多種外源核酸分子表現多種目的蛋白。在一個實施方式中，該載體包括雙順反子或多順反子構建體，該等構建體編碼多種目的蛋白。

【0091】 構建後，可將一種或多種載體插入合適的細胞中以進行擴增和/或多肽表現。表現載體向所選細胞的轉化可以藉由熟知的方法完成，包括轉染、感染、磷酸鈣共沈澱、電穿孔、核轉染、顯微注射、DEAE-右旋糖酐介導的轉染、陽離子脂質介導的遞送、脂質體介導的轉染、微彈轟擊、受體介導的基因遞送，聚離胺酸、組蛋白、殼聚糖和肽介導的遞送。所選方法將部分隨待使用的宿主細胞類型而變化。該等方法和其他合適的方法係熟悉該項技術者熟知

的，並且在手冊和其他技術出版物中進行了闡述，例如，Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, [分子選殖：實驗室手冊], 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press [冷泉港實驗室出版社]，紐約州冷泉港 (2001)。

【0092】如本文所用，術語「轉化」係指細胞遺傳特性的改變，當細胞被修飾以含有新的DNA或RNA時，該細胞就被轉化。例如，細胞經由轉染、轉導或其他技術引入新的遺傳材料，由其原始狀態進行基因修飾，則該細胞就被轉化了。轉染或轉導後，轉化DNA可以藉由物理整合進入細胞染色體與細胞的DNA重組，或者可以作為一個不被複製的游離元件被暫時維持，或者可以作為質體獨立複製。當轉化的DNA隨著細胞的分裂而複製時，細胞被認為已經「穩定地轉化」了。

【0093】如本文所用，術語「轉染」係指藉由細胞吸收外來或外源性DNA。許多轉染技術在本領域中係熟知的，並在本文中揭露。參見，例如，Graham等人, 1973, *Virology* [病毒學] 52: 456；Sambrook等人, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [分子選殖：實驗室手冊], 同上；Davis等人, 1986, *Basic Methods in Molecular Biology* [分子生物學基本方法], 愛思唯爾；Chu等人, 1981, *Gene* [基因] 13: 197。

【0094】如本文所用，術語「轉導」係指外來DNA經由病毒載體被引入細胞的過程。參見Jones等人, (1998). *Genetics: principles and analysis*. [遺傳學：原理與分析]. Boston: Jones & Bartlett Publ.[波士頓：鐘斯和巴特利特出版社]。

【0095】一種或多種「細胞」包括任何原核或真核細胞。細胞可以是離體細胞、體外細胞或體內細胞，可以是單獨的或作為高級結構（諸如組織或器官）的一部分。細胞包括「宿主細胞」，也稱為「細胞系」，它們經基因工程化以表現具有商業或科學意義的多肽。宿主細胞典型地源自來自原代培養物的譜

系，其可在培養中維持無限時間。基因工程化宿主細胞涉及用重組多核苷酸分子轉染、轉化或轉導細胞，和/或以其他方式改變（例如，藉由同源重組和基因激活或重組細胞與非重組細胞的融合）以引起宿主細胞表現所需的重組多肽。用於遺傳工程細胞和/或細胞系以表現目的多肽的方法和載體係熟悉該項技術者熟知的；例如，各種技術在Current Protocols in Molecular Biology[分子生物學現代方法]，Ausubel等人編輯(Wiley & Sons，紐約，1990，以及季度更新)；Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual[分子選殖：實驗室手冊]（冷泉實驗室出版社，1989）；Kaufman, R. J.， Large Scale Mammalian Cell Culture[大規模哺乳動物細胞培養]，1990，第15-69頁。

【0096】 宿主細胞可以是任何原核細胞（例如大腸桿菌）或真核細胞（例如酵母、昆蟲或動物細胞（例如CHO細胞））。可經由常規轉化或轉染技術將載體DNA引入原核或真核細胞中。原核宿主細胞包括真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物，例如，腸桿菌科（*Enterobacteriaceae*）諸如埃希氏桿菌屬（*Escherichia*）例如大腸桿菌（*E. coli*）、腸桿菌屬（*Enterobacter*）、歐文氏菌屬（*Erwinia*）、克雷白氏桿菌屬（*Klebsiella*）、變形桿菌屬（*Proteus*）、沙門氏菌屬（*Salmonella*）例如鼠傷寒沙門氏菌（*Salmonella typhimurium*）、沙雷氏菌屬（*Serratia*）諸如黏質沙雷氏菌（*Serratia marcescans*）、和志賀氏桿菌（*Shigella*）、還有芽孢桿菌屬（*Bacillus*）例如枯草桿菌（*B. subtilis*）和地衣芽孢桿菌（*B. licheniformis*）、假單胞菌屬（*Pseudomonas*）、以及鏈黴菌屬（*Streptomyces*）。釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）或普通麵包酵母係低等真核宿主微生物中最常用的。但是，許多其他屬、種和菌株在本文中通常是可得到的和有用的，諸如畢赤酵母屬（*Pichia*），例如巴斯德畢赤酵母（*P. pastoris*），粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）；克魯維酵母屬（*Kluyveromyces*），

耶氏酵母屬 (*Yarrowia*) ; 假絲酵母屬 (*Candida*) ; 瑞氏木黴 (*Trichoderma reesia*) ; 粗糙脈孢菌 (*Neurospora crassa*) ; 許旺酵母屬 (*Schwanniomyces*) , 諸如西方許旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*) ; 以及絲狀真菌, 諸如脈孢菌屬 (*Neurospora*) 、青黴屬 (*Penicillium*) 、彎頸黴屬 (*Tolypocladium*) 和麴黴屬 (*Aspergillus*) 宿主, 諸如構巢麴黴 (*A. nidulans*) 和黑麴黴 (*A. niger*) 。

【0097】動物細胞系衍生自其祖細胞來源於多細胞動物的細胞。一種動物細胞系係哺乳動物細胞系。適用於在培養中生長的多種哺乳動物細胞系可從美國模式培養物集存庫 (*American Type Culture Collection*) (維吉尼亞州馬納薩斯) 和商業供應商處獲得。行業中通常使用的細胞系的實例包括由 SV40 (COS-7、ATCC CRL 1651) 轉化的猴腎 CV1 系; 人胚胎腎系(293 細胞或亞選殖用於在懸浮培養中生長 293 細胞, (Graham 等人, *J. Gen Virol.*[普通病毒學雜誌]36: 59, 1977); 幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10); 小鼠塞托利細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*[生殖生物學]23: 243-251, 1980); 猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70); 非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2); 犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34); 布法羅大鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺細胞(W138, ATCC CCL 75); 人肝癌細胞 (Hep G2, HB 8065) ; 小鼠乳腺腫瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51) ; TRI 細胞 (Mather 等人, *Annals N.Y Acad. Sci.* [紐約科學院年報] 383: 44-68, 1982) ; MRC 5 細胞或 FS4 細胞; 哺乳動物骨髓瘤細胞, 以及許多其他細胞系和中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞。CHO 細胞廣泛用於生產複合重組蛋白。二氫葉酸還原酶 (DHFR) 缺陷突變細胞系 (Urlaub 等人 (1980), *Proc Natl Acad Sci USA* [美國國家科學院院刊] 77: 4216-4220) DXB11 和 DG-44 係理想的 CHO 宿主細胞系, 因為有效的 DHFR 可選擇和可擴增基因表現系統允許在該等細胞中高水平表現重組蛋白 (Kaufman R.

J. (1990), *Meth Enzymol* [酶方法學] 185: 537-566)。還包括利用基於麩醯胺酸合成酶 (GS) 的甲硫胺酸亞磺亞胺 (MSX) 選擇的麩醯胺酸合成酶 (GS)-敲除 CHOK1SV 細胞系。還包括 CHOK1 細胞 (ATCC CCL61)。此外，該等細胞易於作為貼壁培養或懸浮培養操作，並表現出相對良好的遺傳穩定性。CHO 細胞和在其中重組表現的蛋白質已被廣泛表徵，並已被批准用於監管機構的臨床商業製造。

【0098】細胞還可包括單核細胞、外周血單核細胞、骨髓衍生的單核細胞、臍帶血衍生的單核細胞、淋巴細胞、單核細胞、樹突狀細胞、巨噬細胞、T 細胞、幼稚 T 細胞、記憶 T 細胞、CD28⁺細胞、CD4⁺細胞 CD8⁺細胞、CD45RA⁺細胞、CD45RO⁺細胞、自然殺傷細胞、造血幹細胞、多能胚胎幹細胞、誘導性多能幹細胞或其組合。特別地，可以從供體或受試者中收集該等細胞，用以將該等細胞進行基因修飾並重新引入至供體或受試者的目的。

【0099】在一個實施方式中，提供了用由如本文所述核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶轉染的細胞。在一個實施方式中，本發明提供了用由 SEQ ID NO: 17 或 18 的核酸序列編碼的 piggyBac 轉位酶轉染的細胞。在一個實施方式中，本發明提供了用載體轉染的細胞，該載體包含如本文所述的編碼 piggyBac 轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，本發明提供了用如本文所述的編碼 piggyBac 轉位酶的工程化核酸分子與包含編碼目的蛋白的核酸分子的載體轉染的細胞，該編碼目的蛋白的核酸分子的側翼至少是 piggyBac 轉位子的 5' 和 3' 反向重複元件。在另一個實施方式中，本發明提供了用包含如本文所述的編碼 piggyBac 轉位酶的工程化核酸分子的載體與包含編碼目的蛋白的核酸序列的載體共轉染的細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是 piggyBac 轉位子的 5' 和 3' 反向重複元件。在一個實施方式中，本發明提供了用包含如本文所述的編碼 piggyBac 轉位

酶的工程化核酸分子的載體與編碼目的蛋白的核酸分子轉染的細胞，該編碼目的蛋白的核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在相關的實施方式中，該細胞係細胞系。在相關的實施方式中，該細胞係宿主細胞。在相關的實施方式中，該細胞係CHO細胞。在相關的實施方式中，該細胞係免疫細胞。在相關的實施方式中，與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的目的重組蛋白的滴定度相比，由工程化piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的目的重組蛋白的滴定度得到了改善。在一個實施方式中，提供了如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 5的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 13的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的

piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。

【0100】 在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，和/或在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在另一個相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO:

12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 14的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【0101】 在一個實施方式中，本發明提供了對編碼piggyBac轉位酶的核酸分子進行工程化以增加其在細胞中的穩定性，並用包含編碼該工程化piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的載體與編碼目的蛋白的核酸分子（該編碼目的蛋白的核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件）轉染該細胞，其中與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的目的重組蛋白的滴定度相比，由用工程化piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的目的重組蛋白的滴定度得到了改善。在一個實施方式中，提供了如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，提供了由SEQ ID NO:

3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 5的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 13的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。

【0102】 在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該

piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，和/或在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在另一個相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具

有SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 14的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【0103】 在一個實施方式中，本發明提供了對編碼piggyBac轉位酶的核酸分子進行工程化以增加其在細胞中的穩定性，並用包含編碼該工程化piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的載體與包含編碼目的蛋白的核酸分子（該編碼目的蛋白的核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件）的載體轉染該細胞，其中與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的目的重組蛋白的滴定度相比，由用工程化piggyBac轉位酶轉染的細胞表現的目的重組蛋白的滴定度得到了改善。

【0104】 還提供了用載體轉染的宿主細胞，該載體包括編碼目的蛋白且在適當條件下培養時表現目的蛋白的核酸。隨後可以從培養基中收集表現的蛋白質（如果宿主細胞將其分泌到培養基中），或者直接從產生蛋白質的宿主細胞中收集（如果沒有分泌）。適當宿主細胞的選擇將取決於多種因素折疊，諸如所要表現水平、活性所需要或必需的多肽修飾（諸如糖基化或磷酸化）以及折疊成生物活性分子的容易性。

【0105】 在一個實施方式中，本發明提供了由用載體轉染的細胞表現的目的重組蛋白，該載體包含如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，本發明提供了用包含如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的載體轉染的細胞，該載體進一步包含編碼目的蛋白的核酸序

列，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在一個實施方式中，本發明提供了用包含如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的載體與包含編碼目的蛋白的核酸分子（該編碼目的蛋白的核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件）的載體共轉染的細胞表現的目的重組蛋白。

【0106】 在一個實施方式中，本發明提供了藥物組成物，該藥物組成物包含由用載體轉染的細胞宿主表現的目的重組蛋白，該載體包含如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，本發明提供了用包含如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的載體轉染的宿主細胞，該載體進一步包含編碼目的蛋白的核酸序列，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在一個實施方式中，本發明提供了藥物組成物，該藥物組成物包括用包含如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的載體與包含編碼目的蛋白的核酸分子的載體共轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白，該編碼目的蛋白的核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

【0107】 「培養」（「culture」或「culturing」）係指細胞在多細胞生物體或組織外部的生長和繁殖。哺乳動物細胞的合適培養條件係本領域已知的。細胞培養基和組織培養基可互換地用於指在體外細胞培養期間適合宿主細胞生長的培養基。典型地，細胞培養基包含緩衝液、鹽、能源、胺基酸、維生素和痕量必需元素。可以使用能夠支持適當宿主細胞在培養中生長的任何培養基。可以將細胞培養基進一步補充其他組分以最大化特定培養的宿主細胞中的細胞生長、細胞活力和/或重組蛋白生產，這樣的細胞培養基係可商購的，並且包括RPMI-1640培養基、RPMI-1641培養基、杜爾貝科改良伊格爾培養基（DMEM）、

伊格爾最低必需培養基、F-12K培養基、哈姆F12培養基、伊思考夫改良的杜爾貝科培養基、麥考伊5A培養基、Leibovitz L-15培養基以及無血清培養基，諸如EX-CELL™300系列等，該等培養基可以從美國模式培養物集存庫（American Type Culture Collection）或SAFC生物科學公司（SAFC Biosciences）以及其他供應商處獲得。細胞培養基可以是無血清、無蛋白質、無生長因子和/或無蛋白酶的培養基。還可以藉由添加營養來富集細胞培養物，並以高於其通常的、推薦的濃度使用。

【0108】 在培養過程中可以使用各種培養基配方，例如，以促進從一個階段（例如，生長階段或生長期）過渡到另一階段（例如，生產階段或生產期）和/或優化細胞培養期間的條件（例如在灌注培養過程中提供的濃縮培養基）。生長培養基配方可用於促進細胞生長並使蛋白質表現最小化。生產培養基配方可用於促進目的蛋白的生產和細胞的維持，同時使新細胞的生長減至最少。飼料培養基，典型地是包含在細胞培養物生產過程中消耗的較高濃度組分（諸如營養素和胺基酸）的培養基，可用於補充和維持活性培養物，特別是分批進料、半灌注或灌注模式的培養物。這種濃縮的飼料培養基可以包含大多數細胞培養基組分，例如，其正常量的約5x、6x、7x、8x、9x、10x、12x、14x、16x、20x、30x、50x、100x、200x、400x、600x、800x或甚至約1000x。

【0109】 生長期可以在比生產期更高的溫度下進行。例如，生長期可以在約35°C至約38°C的第一溫度下進行，並且生產期可以在約29°C至約37°C，視需要約30°C至約36°C或約30°C至約34°C的第二溫度下進行。可以在溫度變化之前和/或之後，或代替溫度變化的同時添加蛋白質產生的化學誘導劑，諸如像咖啡因、丁酸酯和六亞甲基雙乙醯胺（HMBA）。如果在溫度變化後添加誘導劑，則可以在溫度變化後1小時至5天，視需要在溫度變化後1至2天添加誘導劑。

宿主細胞可以懸浮或黏附形式培養，附著在固體基質上。可以在帶有或不帶有微載體的流化床生物反應器、中空纖維生物反應器、滾瓶、搖瓶或攪拌式生物反應器中建立細胞培養

【0110】細胞培養可以分批、補料、連續、半連續或灌注模式進行。哺乳動物細胞（諸如CHO細胞）可以在生物反應器中以小於100 ml至小於1000 ml的小規模培養，容量達2,000升以上的較中等範圍規模培養，和以容量超過20,000升的更大規模培養。中等和大規模細胞培養，諸如用於蛋白質治療劑的臨床和/或商業規模生物製造的細胞培養，可維持數周甚至數月，在此期間細胞產生所需的一種或多種蛋白質。

【0111】然後可以從細胞培養基中收穫所產生的表現的重組蛋白。從懸浮細胞中收穫蛋白質的方法係本領域已知的，並且包括但不限於酸沈澱、加速沈降（諸如絮凝）、使用重力分離、離心、聲波分離、過濾（包括使用超濾器、微濾器、切向流過濾器、替代切向流過濾器、深度過濾器和沖積過濾器的膜過濾）。藉由包含本領域已知的氧化還原折疊過程的方法，從細胞質中的包涵體中回收由原核生物表現的重組蛋白。

【0112】然後，可以使用一個或多個單元操作從任何雜質，諸如剩餘的細胞培養基、細胞提取物、不需要的組分、宿主細胞蛋白、表現不正確的蛋白等中純化或部分純化收穫的蛋白。術語「單元操作」係指作為純化目的重組蛋白的過程的一部分而執行的功能步驟。例如，單元操作可包括，諸如但不限於捕獲、純化、精製、病毒滅活、病毒過濾、濃縮和/或配製目的重組蛋白的步驟。可以將單元操作設計為實現單個目標或多個目標，諸如捕獲和病毒滅活步驟。單元操作還可以包括加工步驟之間的保持或存儲步驟。

【0113】捕獲單元操作可包括利用樹脂和/或含有與目的重組蛋白結合的試劑的膜進行捕獲層析，例如親和層析、尺寸排阻層析、離子交換層析、疏水相互作用層析（HIC）、固相金屬親和層析（IMAC）等。這樣的材料係本領域已知的並且可以是商購的。親和層析，例如可以利用抗體或抗體片段結合的捕獲機制，諸如蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L結合。目的重組蛋白可以用聚組胺酸標籤標記隨後使用咪唑藉由IMAC純化，或者使用表位（諸如FLAG[®]）標記隨後使用針對該表位的特異性抗體進行純化。

【0114】包括滅活、減少和/或消除病毒污染物的單元操作可以包括操縱環境和/或過濾的過程。實現病毒滅活的一種方法係在低pH（例如，pH < 4）或其他溶液條件（諸如溫度或化學組成）下孵育，以實現病毒滅活。在低pH病毒滅活之後，可以進行中和單元操作，該操作將重新調節經過病毒滅活的溶液至更符合後續單元操作要求的pH值。隨後還可以進行過濾，諸如深度過濾，以除去任何產生的渾濁或沈澱。可以使用微濾器或納濾器進行病毒過濾，諸如可以從旭化成株式會社（Plavona[®]）和EDM Millipore（VPro[®]）獲得的那些。

【0115】精製單元操作可以利用各種層析方法來純化目的蛋白並清除污染物和雜質，諸如DNA，宿主細胞蛋白；去除產物特異性雜質、變體產物和聚集體、病毒吸附等。精製層析儀單元操作使用的樹脂和/或膜含有可以以「流通模式」（其中目的蛋白包含在洗脫液中並且污染物和雜質結合到層析介質上）或「結合並洗脫模式」使用的試劑，其中目的蛋白結合到層析介質上並且在污染物和雜質流過層析介質或從層析介質上洗掉後洗脫。這樣的層析方法的實例包括離子交換層析（IEX），諸如陰離子交換層析（AEX）和陽離子交換層析（CEX）；疏水相互作用層析（HIC）；混合模式或多模式層析（MM）、羥基磷灰石層析（HA）；反相層析和凝膠過濾，僅舉幾例來說。

【0116】 可以藉由超濾和滲濾來實現目的蛋白的產物濃縮和緩衝液交換成所需的配製物緩衝液以用於原料藥的大量儲存。

【0117】 可以測量關鍵屬性和性能參數，以更好地指導有關製造過程中每個步驟性能的決策。該等關鍵屬性和參數可以即時監測、近即時監測和/或事後監測。可以測量主要的關鍵參數，諸如消耗的培養基組分（諸如葡萄糖）、累積的代謝副產物（諸如乳酸和氨）的水平、以及與細胞維持和存活相關的參數，諸如溶解氧含量。關鍵屬性，諸如比生產率、活細胞密度、pH、莫耳滲透壓濃度、外觀、顏色、聚集、產率百分比和滴定度，可在過程中和過程後進行監測。可以使用已知技術和可商購的設備進行監測和測量。

【0118】 滴定度可以使用本領域已知的方法來測量。例如，滴定度可以藉由使用親和層析的反相HPLC分析來測量，其中蛋白A被固定在柱載體上。在中性pH值下，抗體分子藉由Fc區與蛋白A結合，而宿主細胞蛋白、條件培養基組分和緩衝液則在流通中從層析柱中洗脫出來。捕獲的抗體在酸性pH下洗脫，並藉由280 nm處的UV吸收進行檢測。可以使用線性回歸分析從通用抗體標準品和相應的峰面積獲得校準曲線。然後，根據校準曲線以及通用抗體標準品和所測試抗體的消光係數之比，計算出測試樣本中抗體的濃度。

【0119】 其他方法包括但不限於ELISA；HTRF（均相時差式螢光）（美國希思公司（Cisbio US），麻塞諸塞州貝德福德）；和Berkley Lights Beacon平台（加利福尼亞州埃默里維爾）。

【0120】 還提供了包含由細胞宿主表現的目的重組蛋白的藥物組成物，該宿主細胞用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的載體轉染。此類藥物組成物包括目的蛋白或表現目的蛋白的細胞，諸如表現CAR和TCR的免疫細胞，以及一種或多種藥學或生理上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑。此類組成物可

以包含緩衝劑，諸如中性緩衝鹽溶液、磷酸鹽緩衝鹽溶液等；碳水化合物，諸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇；蛋白質；多肽或胺基酸，諸如甘胺酸；抗氧化劑；螯合劑，諸如EDTA或麩胱甘肽；佐劑（例如，氫氧化鋁）；以及防腐劑。

【0121】該等藥物組成物（溶液、懸浮液等）可包含以下一種或多種：無菌稀釋劑，諸如注射用水、鹽溶液，較佳的是生理鹽水、林格氏溶液、等滲氯化鈉，固定油，諸如可用作溶劑或懸浮介質的合成的單甘油酯或二甘油酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇，或其他溶劑；抗菌劑，諸如苯甲醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑，諸如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，諸如乙二胺四乙酸；緩衝劑，諸如乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽；以及用於調節張力的試劑，諸如氯化鈉或葡萄糖。胃腸外製劑可以被封裝在由玻璃或塑膠製成的安瓿、一次性注射器或多劑量小瓶中。

【0122】在一個實施方式中，本發明提供了用於改善由宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度之方法，該方法包括對編碼piggyBac轉位酶的核酸分子進行工程化以增加在宿主細胞中的穩定性，用編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子與包含編碼目的蛋白的核酸序列（該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件）的載體共轉染宿主細胞，以及培養該等細胞以表現目的重組蛋白質，其中與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度相比，由用工程化piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度得到了改善。在相關的實施方式中，用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的第一載體與包含編碼目的蛋白的核酸序列的第二載體轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在相關的實施方式

中，用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的單個載體與編碼目的蛋白的核酸序列轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在一個實施方式中，提供了如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 5的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 13的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。

【0123】 在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個

處的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，和/或在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在另一個相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有

SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 14的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【0124】 在一個實施方式中，本發明提供了用於增加表現重組蛋白的哺乳動物細胞培養物中重組蛋白的產生之方法，該方法包括使用宿主細胞在生物反應器中建立細胞培養物，該宿主細胞已經用經工程化以增加在該宿主細胞中的穩定性的核酸分子與包含編碼目的蛋白的核酸分子的載體共轉染，該編碼目的蛋白的核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的反向重複元件；以及表現目的重組蛋白；其中與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度相比，由用工程化piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度得到了改善。在相關的實施方式中，用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的第一載體與包含編碼目的蛋白的核酸序列的第二載體轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在相關的實施方式中，用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的單個載體與編碼目的蛋白的核酸序列轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'

反向重複元件。在一個實施方式中，提供了如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 5的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 13的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。

【0125】 在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代。

在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，和/或在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在另一個相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4的胺基酸序列。在另一個

方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 14的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【0126】 在一個實施方式中，本發明提供了用於生產分離、純化的目的重組蛋白之方法，該方法包括用表現目的重組蛋白的宿主細胞在生物反應器中建立細胞培養物，其中該細胞系已經用編碼piggyBac轉位酶的核酸序列與包含編碼目的蛋白的核酸序列的載體共轉染，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在該宿主細胞中的穩定性，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件；對該等細胞進行培養以表現該目的重組蛋白；收穫目的重組蛋白，藉由一個或多個單元操作加工該目的重組蛋白，並獲得分離、純化的目的重組蛋白。在相關的實施方式中，用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的第一載體與包含編碼目的蛋白的核酸序列的第二載體轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在相關的實施方式中，用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的單個載體與編碼目的蛋白的核酸序列轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。在相關的實施方式中，至少一個單元操作係選自親和層析、離子交換層析、陰離子交換層析、陽離子交換層析、多模式層析、疏水相互作用層析和羧基磷灰石層析。

的捕獲層析步驟。在另一個實施方式中，至少一個單元操作係選自離子交換層析、陰離子交換層析、陽離子交換層析、多模式層析、疏水相互作用層析和羥基磷灰石層析的精製層析步驟。在另一個實施方式中，至少一種單元操作選自病毒滅活、病毒過濾、深度過濾和UF/DF。在相關的實施方式中，與由用野生型piggyBac轉位酶轉染或無piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度相比，由用工程化piggyBac轉位酶轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度得到了改善。在另一個實施方式中，提供了藉由該方法產生的分離、純化的目的重組蛋白。在另一個實施方式中，提供了包含分離的目的蛋白的藥物組成物。在一個實施方式中，提供了如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 5的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID

NO: 13的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。

【0127】 在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，和/或在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在另一個相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶

具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 14的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【0128】 在一個實施方式中，本發明提供了用於轉染細胞的套組，該套組包含含有編碼piggyBac轉位酶的核酸序列的載體，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在該宿主細胞中的穩定性；以及至少包含piggyBac轉位子的最小反向重複元件的載體，該piggyBac轉位子中插入了編碼目的蛋白的核酸序列。在一個實施方式中，提供了如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO:

17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 5的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 13的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。

【0129】 在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處

白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，和/或在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在另一個相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，

該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 14的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【0130】 本文所述的piggyBac轉位酶可以用作piggyBac轉位子系統的一部分用於基因轉移；生產細胞系；與基因工程有關的應用，諸如基因修飾細胞、產生基因組修飾；用於種系或體細胞誘變；用於介導基因轉移；表徵基因；確定基因功能；致癌基因篩選；基因治療；多能幹細胞的產生；以及非人類轉基因動物（參見，例如US 2013/0209426；US 2010/0311116；Vanden Driessche等人, Blood [血液] 114 (8): 1461-1468, 2009；Yusa K,等人, Nat. Methods. [自然方法] 6(5):363-369, 2009；Wilson等人, Mol. Ther. [分子療法] 15(1):139-145, 2007；Landrette等人, PLoS ONE [公共科學圖書館·綜合] 6(10): 1-12, 2011；Nakanishi等人, Molecular Therapy [分子療法] 18(4): 707-714, 2010)；Zhao等人, Transl Lung Cancer Res.[肺癌轉化研究], 5(1): 120-125, 2016；Wilson等人, Molecular Therapy [分子療法] 15(1): 139-145, 2007）。

【0131】 本文所述的piggyBac轉位酶可用於基因組編輯。本文所述的piggyBac轉位酶可以用作piggyBac轉位子/轉位酶系統的一部分，其益處在於它提供了有效的非病毒遞送以整合入原代細胞類型或幹細胞。本文所述的piggyBac轉位酶可用於非病毒遞送編碼嵌合抗原受體（CAR）、T細胞受體（TCR） α 和 β 鏈的基因，以及編碼蛋白質（諸如細胞介素、檢查點抑制劑和其他蛋白質）的其他基因以工程化細胞。多個基因可以在單個基因構建體中遞送。與病毒轉導相比的優勢在於可以容納更大的基因運載量，並且該轉位酶可提高非病毒轉染

中整合的效率。這種系統還可以與其他非病毒基因組編輯技術結合使用，諸如鋅指核酸酶（ZFN）、轉錄激活因子樣效應物核酸酶（TALEN）、規律間隔成簇短回文重複序列-（CRISPR-）相關蛋白9（Cas9）、整合酶（諸如PhiC3相整合酶）、轉錄激活子樣效應物（TALES）、序列特異性重組酶和其他轉位子/轉位酶系統（諸如Sleeping Beauty），以實現在多種細胞中的轉導（US 2015/0031132；WO2018/098671；Ivics等人, Cell [細胞] 91(4): 501-510, 1997；Boch等人, Science [科學] 326(5959): 1509-1512, 2009；Christian等人, Genetics [遺傳學] 186(2): 757-761, 2010；Wilber等人, Stem Cells Int [國際幹細胞研究]; 卷: 2011: 文章編號717069, 2011；Yusa等人, Nature [自然] 478, 10月20日, 391-396, 2011；Silva等人, Curr Gene Ther [當今基因療法] 11(1): 11-27, 2011；Cong等人, Science [科學] 339(6121): 819-823, 2013；Mali等人, Science [科學] 339(6121): 823-826, 2013. Li等人, Molecular Therapy: Nucleic Acids [分子療法：核酸] 第8卷 9月, 64-76, 2017；以及Ishida等人, www.nature/Scientific Reports 8, 文章編號310, 2018）。

【0132】 本文所述的piggyBac轉位酶可以用作piggyBac轉位子系統的一部分，以穩定地以非病毒方式用編碼CAR、TCR和/或其他蛋白質的基因構建體轉染細胞。天然T細胞可以 (i) 從患者（受試者）或供體中除去，(ii) 使用包含本文所述的piggyBac轉位酶的piggyBac轉位子/轉位酶系統進行基因工程化，以表現一種或多種嵌合抗原受體、T細胞受體和/或與至少一種目的抗原結合的其他蛋白質，(iii) 藉由細胞培養擴展為更多的工程化T細胞群體，以及 (iv) 重新引入患者體內。在將工程化的T細胞重新引入患者體內後，它們介導針對表現該抗原的細胞的免疫應答。參見，例如美國專利案號7,741,465和6,319,494；美國專利公開號2017/0355957；Nakazawa等人, J. Immunotherapy [免疫治療雜誌] 32(8): 826-836; 2009；Nakazawa等人, Molecular Therapy [分子療法] 19(12): 2133-2143,

2011；Eshhar等人, *Cancer Immunol Immunotherapy* [癌症免疫學免疫療法] (1997) 45: 131-136；Finney等人, *Journal of Immunology* [免疫學雜誌], 161: 2791-2797, 1998；Krause等人, *J. Exp. Med.* [實驗醫學雜誌], 188(4): 619-626, 1998; 該免疫應答包括T細胞分泌IL-2和其他細胞介素，識別該抗原的T細胞的選殖擴增，以及T細胞介導的陽性靶細胞的特異性殺傷。參見Hombach等人, *Journal of Immunol.* [免疫學雜誌] 167: 6123-6131 (2001)。

【0133】免疫細胞可從受試者中獲得。在一些實施方式中，免疫細胞包含T細胞。T細胞可以從許多來源獲得，包括外周血單核細胞（PBMC）、骨髓、淋巴結組織、臍帶血、胸腺組織、來自感染部位的組織、腹水、胸腔積液、脾組織和腫瘤。在某些實施方式中，T細胞可以使用熟悉該項技術者已知的任何數量的技術（諸如FICOLL™分離）從受試者收集的血液單位獲得。細胞可較佳的是藉由單採從個體的循環血液中獲得。單採產物典型地含有淋巴細胞（包括T細胞）、單核細胞、粒細胞、B細胞、其他有核白血球、紅血球、和血小板。在某些實施方式中，可以洗滌藉由單採收集的細胞以除去血漿級分，並將其置於合適的緩衝液或培養基中用於後續處理。可以用PBS洗滌細胞。應當認識到的是，可以使用洗滌步驟，諸如藉由使用半自動流通式離心機 - 例如Cobe™ 2991細胞處理器，Baxter CytoMate™等。洗滌後，可將細胞重懸於多種生物相容性緩衝液或含有或不含緩衝液的其它鹽水溶液中。在某些實施方式中，可以去除單採樣本的不希望的組分。

【0134】在某些實施方式中，藉由裂解紅血球和耗盡單核細胞從PBMC分離T細胞，例如，使用藉由PERCOLL™梯度的離心。可以藉由本領域已知的陽性或陰性選擇技術進一步分離T細胞的特定子群，諸如CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺ T細胞。例如，藉由陰性選擇富集T細胞群可以用針對陰性

選擇的細胞特有的表面標誌物的抗體組合來實現。本文使用的一種方法係經由陰性磁免疫黏附或流式細胞術進行細胞分選和/或選擇，其使用針對陰性選擇的細胞上存在的細胞表面標誌物的單株抗體混合物。例如，為了藉由陰性選擇富集CD4⁺細胞，單株抗體混合物典型地包括針對CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗體。流式細胞術和細胞分選也可用於分離用於本發明的目的細胞群。

【0135】 可以直接使用PBMC用於使用如本文所述的方法採用基因構建體（諸如CAR或TCR）進行基因修飾。在某些實施方式中，在分離PBMC後，可以進一步分離T淋巴細胞，並且可以在遺傳修飾和/或擴增之前或之後將細胞毒性和輔助性T淋巴細胞分選為初始、記憶和效應T細胞亞群。

【0136】 在一些實施方式中，藉由鑒定與該等類型的CD8⁺細胞中的每一種相關的細胞表面抗原，將CD8⁺細胞進一步分選為初始、中樞記憶和效應細胞。在一些實施方式中，中樞記憶T細胞的表型標誌物的表現包括CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和CD127，並且對於顆粒酶B係陰性的。在一些實施方式中，中樞記憶T細胞為CD45RO⁺、CD62L⁺、CD8⁺ T細胞。在一些實施方式中，效應T細胞對CD62L、CCR7、CD28和CD127係陰性的，對於顆粒酶B和穿孔素係陽性的。在某些實施方式中，CD4⁺ T細胞進一步分選為亞群。例如，藉由鑒定具有細胞表面抗原的細胞群，可以將CD4⁺ T輔助性細胞分選為初始、中樞記憶和效應細胞。

【0137】 該等免疫細胞，諸如T細胞，可以在分離後使用一種或多種載體進行基因修飾，該一種或多種載體包含編碼一種或多種CAR和本文所述的piggyBac轉位酶的一種或多種核苷酸序列，作為piggyBac轉位子/轉位酶系統的一部分。非病毒基因修飾免疫細胞可以藉由用包含如本文所述的編碼piggyBac

轉位酶的工程化核酸分子的載體與編碼至少一種CAR、TCR和/或其他目的蛋白的至少一種核酸序列（該至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件）轉染細胞而獲得。基因修飾免疫細胞也可以藉由用包含如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的第一載體和包含編碼至少一種CAR、TCR和/或其他目的蛋白的至少一種核酸序列（該至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件）的第二載體共轉染免疫細胞而獲得。可以使用本領域已知的任何合適方法將該等載體引入宿主細胞，諸如藉由電穿孔或核轉染。在另外的一個實施方式中，不同表現載體的混合物可用於基因修飾供體免疫效應細胞群，其中每個載體編碼不同CAR、TCR或其他目的蛋白。得到的轉化的免疫效應細胞形成混合的工程化的細胞群，其中一部分工程化的細胞表現多於一種不同的CAR、TCR和/或其他目的蛋白。

【0138】還包括藉由編碼導致功能性活性有毒產物的酶來允許在前驅藥施用後選擇性消除經修飾的細胞的自殺基因，該功能性活性有毒產物有利於細胞凋亡的激活或抑制細胞增殖，從而使不良事件減到最少。還可以包括可誘導「開啟」或「加速器」開關。合適的技術包括用CAR或TCR構建體轉染細胞之前、之後或同時使用誘導型胱天蛋白酶-9（美國公開申請2011/0286980）或胸苷激酶。用於引入自殺基因和/或「開啟」開關的另外的方法包括TALENS、鋅指、RNAi、siRNA、shRNA、反義技術和本領域已知的其他技術。

【0139】在進行基因修飾之前，可以在體外激活和擴增免疫細胞（或者如果係祖細胞的情況則進行分化）。激活和擴增T細胞的方法係本領域已知的，並且描述於，例如美國專利案號6,905,874；美國專利案號6,867,041；美國專利案號6,797,514；以及PCT WO2012/079000。通常，此類方法包括在具有適當細胞介素諸如IL-2的培養基中使PBMC或分離的T細胞與刺激劑和共刺激劑接觸，諸

如抗CD3和抗CD28抗體，通常附著於珠子或其他表面。附著於相同珠子的抗CD3和抗CD28抗體充當「替代」抗原呈遞細胞（APC）。一個實例係Dynabeads[®]系統，一種用於人T細胞生理激活的CD3/CD28激活劑/刺激系統。

【0140】 在其他實施方式中，可以用飼養細胞和適當的抗體和細胞介素使用諸如如下所述的那些的方法激活和刺激T細胞增殖：美國專利案號6,040,177；美國專利案號5,827,642；和WO 2012129514，其內容藉由引用以其整體併入本文。

【0141】 PBMC可進一步包括其他細胞毒性淋巴細胞，諸如NK細胞、NKT細胞或造血幹細胞。攜帶如本文揭露的嵌合受體的編碼序列的表現載體可以引入人供體T細胞、NK細胞、NKT細胞、單核細胞或造血幹細胞的群中。

【0142】 使用標準程序用於冷藏保存表現CAR或TCT的細胞，用於儲存和/或製備用於在人受試者中使用。這涉及冷藏保存免疫細胞，使細胞在解凍後保持活力。表現CAR的一部分免疫細胞可以藉由本領域已知的方法冷藏保存，以提供此類細胞的永久來源，用於將來治療患有惡性腫瘤的患者。需要時，冷藏保存的轉化免疫細胞可以解凍、生長和擴增以獲得更多此類細胞。

【0143】 如本文所用，「冷藏保存」係指藉由冷卻至零下的溫度來保存細胞，諸如（典型地）77開爾文或-196°C。低溫保護劑通常在零下的溫度下使用，以保護細胞免受因低溫冷凍或升溫至室溫而受到損壞。冷凍保存劑和最佳的冷卻速率可以防止細胞損傷，並且是本領域已知的。防凍劑包括但不限於二甲基亞砷（DMSO）（Lovelock & Bishop, Nature [自然] (1959); 183: 1394-1395；Ashwood-Smith, Nature [自然] (1961); 190: 1204-1205）、甘油、聚維酮（Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci. [紐約科學院年報] (1960); 85: 576）和聚乙二醇（Sloviter & Ravdin, Nature [自然] (1962); 196: 48）。

【0144】 然後配製細胞以重新引入受試者。藉由首先從細胞培養基中收穫細胞，然後將細胞洗滌並濃縮在適於給藥的培養基和容器系統（「藥學上可接受的」載體）中以治療有效量來配製細胞。合適的輸注介質可以是任何等滲培養基配製物，典型地是生理鹽水，Normosol™ R（Abbott）或Plasma-Lyte™ A（Baxter），但也可以使用5%葡萄糖水溶液或林格氏乳酸鹽。輸注介質可以補充人血清白蛋白。

【0145】 組成物中所希望的治療量的細胞通常為至少2個細胞（例如，至少1個CD8⁺中樞記憶T細胞和至少1個CD4⁺輔助性T細胞亞群）或更典型地大於10²個細胞，並且高達10⁶個，多達並且包括10⁸或10⁹個細胞，並且可以超過10¹⁰個細胞。細胞數量取決於組成物所希望的用途，以及其中包含的細胞類型。對於在進行治療的患者，該細胞可以是自體、同種異體或異源的。

【0146】 表現CAR、TCR和/或其他目的蛋白的細胞群可以單獨施用，或作為藥物組成物與稀釋劑和/或與其他組分如IL-2或其他細胞介素或細胞群組合施用。

【0147】 提供了使用該等工程化細胞治療病症、疾病或障礙的方法。此類病症、疾病或障礙包括癌症、腫瘤、實體瘤、血液疾病、白血病、淋巴瘤、病毒感染、炎性疾病或障礙和/或自身免疫性疾病或障礙。在一些實施方式中，本發明涉及在受試者中產生T細胞介導的免疫應答，包括向受試者施用有效量的本申請的工程化的免疫細胞。在一些實施方式中，T細胞介導的免疫應答直接針對靶細胞或細胞。在一些實施方式中，該工程化免疫細胞包含表現一種或多種嵌合抗原受體（CAR）、T細胞受體（TCR）和/或其他目的蛋白的基因構建體。在一些實施方式中，該靶細胞係腫瘤細胞。在一些方面，本發明包括治療或預防惡性腫瘤之方法，所述方法包括向有需要的受試者施用有效量的至少一種本文

所述的分離的抗原結合分子。在一些實施方式中，本發明包括用於治療或預防惡性腫瘤之方法，所述方法包括向有需要的受試者施用有效量的至少一種免疫細胞，其中該免疫細胞包含編碼至少一種如本文所述的嵌合抗原受體、T細胞受體和/或分離的抗原結合分子的基因構建體。在一些方面，本發明包括用於治療或預防炎性和/或自身免疫性疾病之方法。本發明還提供了使用支持移植程序的方法，諸如針對移植組織/器官上錯配的HLA分子的細胞療法。在一些實施方式中，該靶細胞係胰島。

【0148】 在一個實施方式中，本發明提供了產生非病毒基因修飾細胞之方法，該方法包括：(a) 建立包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的載體，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件；(b) 從供體或受試者中分離天然免疫細胞；(b) 使用編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子與包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的載體共轉染該等宿主細胞，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件；以及 (c) 藉由細胞培養將該等細胞擴增成更大的非病毒基因修飾細胞群。在一個實施方式中，用包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的載體與包含編碼piggyBac轉位酶的核酸序列的載體轉染該等細胞，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序列經工程化以增加在細胞中的穩定性。在一個實施方式中，提供了如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，用包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的載體與編碼piggyBac轉位酶的核酸序列轉染該等細胞，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件，該編碼piggyBac轉位酶的核酸序

列經工程化以增加在細胞中的穩定性。在一個實施方式中，提供了如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。在一個實施方式中，提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 5的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 13的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。

【0149】 在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2

的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，和/或在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在另一個相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了

piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 14的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【0150】 在一個實施方式中，本發明提供了用非病毒基因修飾細胞治療受試者之方法，該方法包括：(a) 工程化編碼piggyBac轉位酶的核酸分子以增加在細胞中的穩定性並將其插入載體中；(b) 從受試者或供體中分離天然免疫細胞；(c) 使用編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子與包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的載體共轉染該等宿主細胞，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件；(d) 藉由細胞培養將細胞擴增成更大的基因修飾細胞群；(e) 從細胞培養物中分離轉化的細胞以獲得包含基因修飾細胞的細胞群；以及(f) 將該等非病毒基因修飾細胞重新引入受試者。在一個實施方式中，提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本

發明提供了由SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 3的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 5的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 7的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 9的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 11的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 13的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 15的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 17的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。在另一個方面，本發明提供了由SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼的piggyBac轉位酶。

【0151】 在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221、247、429、533和573中一個或多個處的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147、176、221和247中一個或多個處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，和/或在SEQ ID NO: 2的位置429、533和573中一個或多個處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白

胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。在另一個相關的實施方式中，該piggyBac轉位酶包含SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。在一個實施方式中，提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、或SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 8的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 10的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 12的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO:

14的胺基酸序列。在另一個方面，本發明提供了piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【0152】 在相關的實施方式中，該天然免疫細胞係單核細胞。在相關的實施方式中，該天然免疫細胞係T細胞。在另一個實施方式中，該目的蛋白係抗原受體、T細胞受體或嵌合抗原受體。在另一個實施方式中，還用編碼自殺基因即可誘導開啟或加速器開關或者兩者的核酸分子轉染該細胞。在一個實施方式中，提供了如本文所述的編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子。

【0153】 在一個實施方式中，該等天然免疫細胞用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的載體與包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的載體轉染，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

【0154】 在一個實施方式中，該等天然免疫細胞用包含編碼piggyBac轉位酶的工程化核酸分子的單個載體與編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列轉染，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

【0155】 在一個實施方式中，該載體包括雙順反子或多順反子構建體，該等構建體編碼多種目的蛋白。

【0156】 本發明還提供了根據本文所述方法製備的非病毒基因修飾細胞、細胞群或細胞培養物。還提供了包含藉由本文描述的方法製備的基因修飾細胞或細胞群的配製物。

【0157】 還提供了治療或預防供體或有需要的受試者中的疾病或障礙之方法，該方法包括向該供體或受試者施用有效量的藉由本文描述之方法製備的

基因修飾細胞或細胞群。在另一個實施方式中，提供了藥物組成物，該藥物組成物包含根據本文所述的方法製備的分離、純化的目的蛋白。

【0158】 儘管在本申請中使用的術語係本領域中的標準術語，但是本文提供了某些術語的定義以確保申請專利範圍的含義的清楚性和確定性。單位、前綴和符號可能會用它們的國際單位制 (SI) 接受形式表示。本文列舉的數字範圍包括定義範圍的數字，並且包括並支持所定義範圍內的每個整數。除非另外指示，否則本文所述的方法及技術可根據本領域中眾所周知的常規方法且如貫穿本說明書所引用及論述的各種通用及更特定參考文獻中所描述來進行。參見，例如，Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [分子選殖：實驗室手冊], 第3版, 冷泉港實驗室出版社, 紐約州冷泉港 (2001) 和 Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology* [分子生物學實驗指南], 格林出版公司 (1992), 以及 Harlow 和 Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* [抗體：實驗室手冊] Cold Spring Harbor Laboratory Press [冷泉港實驗室出版社], 紐約州冷泉港 (1990)。在本申請中所引用的所有文件或文件的部分，包括但不局限於專利、專利申請、論文、書籍、和專著，都藉由引用清楚地併入本文。在本發明的一個方面或實施方式中描述的內容可以與本發明的其他方面和/或實施方式組合。

【0159】 本發明在範圍上不受本文所述的特定實施方式的限制，該等特定實施方式旨在作為本發明各個方面的單個說明，並且功能上等效的方法和組分也在本發明的範圍內。實際上，除了本文中顯示和描述的那些之外，根據前述描述和附圖，本發明的各種修改對於熟悉該項技術者將變得顯而易見。這類修改旨在包含在所附申請專利範圍的範圍內。

實例

實例1 突變的鑒定和測試

【0160】 尚不清楚piggyBac轉位酶和其他相關轉位酶的結構。我們使用稱為DSC的電腦方法（King, RD等人, Protein Sci. [蛋白質科學] 5(11): 2298-2310, 1996）預測了野生型粉紋夜蛾piggyBac轉位酶（SEQ ID NO: 2）的二級結構模體。參見圖1。我們發現該piggyBac轉位酶主要是 α 螺旋蛋白。我們設計了可能穩定 α 螺旋的突變，該等突變可以改善該轉位酶的整體穩定性，進而可以對該轉位酶的表現產生積極影響。我們將I147、I176、I221、I247鑒定為可以潛在突變以改善piggyBac轉位酶的 α 螺旋穩定性的殘基。

【0161】 我們還在轉位酶序列中鑒定出了推定的N聯糖基化位點（即NXS/T模體）。由於通常而言，與NXS模體相比，NXT模體會進行更完全的糖基化，因此我們假設將NXS模體突變為NXT模體可能會改善piggyBac上的整體糖基化，進而可能改善轉位酶的穩定性。設計了以下N聯糖基化位點的Ser到Thr突變：N427ES、N531IS和N571AS。N531IS位點存在於疏水段中，因此在改善糖基化作用後可能會帶來最大的穩定性改善。目前尚不清楚piggyBac轉位酶是否被糖基化或其激活是否需要糖基化。

【0162】 總共產生了八個質體，其中包括編碼野生型piggyBac轉位酶與具有編碼單突變、雙重突變或三重突變的核酸序列的七種轉位酶的核酸序列（參見表3）。除突變的序列外，該等選殖的轉位酶質體共有相同的DNA密碼子。將該等轉位酶質體轉化到一個細胞系中，挑選菌落，擴大規模培養並確認序列。

表3

SEQ ID NO		突變
DNA	蛋白質	
1	2	野生型（WT）粉紋夜蛾piggyBac轉位酶
3	4	I147L異白胺酸到白胺酸
5	6	I247L異白胺酸到白胺酸

7	8	S533T絲胺酸到蘇胺酸
9	10	LLT (I247L I147L S533T)
11	12	ILT (I247 I147L S533T)
13	14	LIT (I247L I147 S533T)
15	16	LLS (I247L I147L S533)

【0163】 測試了四種目的蛋白、兩種單株抗體（AB1和AB2）、一種融合蛋白和一種雙特異性T細胞銜接器。將每個編碼目的蛋白的基因選殖到一個單獨的質體中，該質體至少包含piggyBac轉位子的5’和3’反向重複元件。將這四個質體按比例放大並確認序列。

【0164】 使用電穿孔將環狀突變型轉位酶質體與包含編碼四種蛋白質之一的基因的環狀質體之一一起共轉染到麩醯胺酸合酶敲除CHO細胞中。轉位酶與目的蛋白質體的比率為1：4。讓該等細胞在補充有麩醯胺酸的培養基中在36°C和5%CO₂的條件下恢復三天，然後更換為不含麩醯胺酸的選擇性培養基。將該等細胞每3至4天在36°C和5%CO₂的選擇性培養基中傳代直至恢復至 > 90%的活率。

【0165】 在 24 個深孔板中進行補料分批生產，以評估來自穩定細胞系的表現蛋白的表現。將培養物以 1 x 10⁶細胞/mL 的濃度接種在不含麩醯胺酸的基礎生產培養基中，並在第 3、6 和 8 天補充營養物。在第 10 天收穫培養物，並分析上清液的滴定度。

【0166】 藉由親和 UPLC 層析測量滴定度，其中將蛋白 A 以 20 ug 的目標負載固定在柱載體上。在中性 pH 值下，測試樣本中的蛋白質藉由 Fc 區與蛋白質 A 結合，而宿主細胞蛋白質、條件培養基組分和緩衝液則在流通中從層析柱中洗脫出來。將捕獲的蛋白質在酸性 pH 1.9 的 1X DPBS 上洗脫，並藉由 280 nm 處的 UV 吸收進行檢測。使用線性回歸分析從通用抗體標準品和相應的峰面積獲

得校準曲線。然後，根據校準曲線以及通用抗體標準品和測試樣本的消光係數之比，計算出測試樣本中該蛋白質的濃度。

【0167】 突變型轉位酶的使用顯示出與 WT 轉位酶或缺少針對所測試的單株抗體和融合蛋白的轉位酶的對照相比更高或相似的滴定度。通常，雙特異性 T 細胞銜接器的滴定度低於單株抗體，並且在該系統中使用時通常也不會以高水平表現。對於此特定分子，表現瓶頸可能與轉錄或基因整合位點無關，而可能與蛋白質分泌瓶頸有關。如果其他雙特異性 T 細胞銜接器在表現上沒有相同的挑戰，它們可能會產生不同的結果，因此，將不同的支架與雙特異性 T 細胞銜接子分子一起使用可能會產生更好的滴定度。

實例2：添加MSX的GS KO宿主細胞中雙重和三重轉位酶突變體的表現

【0168】 使用電穿孔法（伯樂實驗室（Bio-Rad），加利福尼亞州赫拉克勒斯）用編碼 1) 雙突變體「ILT」DNA piggyBac 轉位酶（ITR，SEQ ID NO: 11），2) 三重突變體「LLT」DNA piggyBac 轉位酶（LLT，SEQ ID NO: 9）和 3) 不編碼 piggyBac 轉位酶（無）的環狀質體轉染麩醯胺酸合酶敲除 CHO 細胞（GSKO 細胞），所有情況下均與包含目的基因和粉紋夜蛾 piggyBac 轉位子的 5'和 3'反向重複元件的環狀質體結合。測試了三個目的基因，雙特異性 T 細胞銜接器異源性 Fc（T cell engager heteroFc）、IgG-scFv 和單株抗體（mAb）。

【0169】 轉染後第 3 天（25），在初始池恢復至 > 90%的活率（0-25）或根本不恢復（0）後，添加 25 μ M 的蛋胺酸亞砒醯亞胺（MSX）（EDM 密理博公司（EDM Millipore），麻塞諸塞州柏林頓）。麩醯胺酸合成酶的抑制劑蛋胺酸亞砒醯亞胺（MSX）的添加用於增加 GSKO CHO 細胞系中目的基因的表現。

【0170】 在 MSX 處理的細胞恢復後，將它們在 24 個深孔板或旋轉管中進行小規模批量補料生產，以評估來自穩定細胞系的表現蛋白的表現。將培養物

以 1×10^6 細胞/mL 的濃度接種在不含麩醯胺酸的基礎生產培養基中，並在第 3、6 和 8 天補充營養物。如實例 1 所述，在第 10 天收穫培養物，並分析上清液的滴定度。

【0171】 與未接受MSX處理（0 μ M MSX）的那些轉位酶池相比，用突變轉位酶（ILT或LLT）轉染的那些池顯示出表現增加。對於未添加轉位酶（無）的該等池，表現不會隨著MSX的添加而增加。

【0172】 轉位子賦予半靶向轉染機制，該機制靶向開放的染色質，該等染色質係基因組中活性轉錄的區域。當轉位子與轉位酶結合整合時，就會整合該轉位子的5'和3'反向重複元件之間的完整載體序列。無轉位酶的轉位子的轉染會導致隨機整合到染色體中，並且作為結果，轉位子5'和3'反向重複元件之間的完整載體序列可能不會整合到活性位點中。此外，如果沒有轉位酶，則不能保證完全整合，這可能會導致目的基因和選擇標記（在這種情況下為麩醯胺酸合酶）之間的連接斷開，並且因此MSX不會影響目的基因的表現。

【0173】 在所測試的載體系統的背景中，與無轉位酶的對照相比，經工程化的轉位酶具有在添加和不添加MSX的情況下均增加表現的額外優勢。（圖5）。來自piggyBac的拷貝數增加也可能有助於改善MSX的選擇。

實例3 使用DNA或mRNA piggyBac轉位酶的轉染。

【0174】 用於整合目的基因的轉位酶可以是基於DNA或mRNA的。使用DNA轉錄的轉位酶的一個問題係轉位酶基因整合到基因組中的潛在可能，這可能導致轉位酶在轉染的細胞系中活躍轉錄/翻譯。由於潛在的隱性轉位酶識別位點的轉位酶活性，這可能導致基因組不穩定。一種替代方案係使用mRNA進行轉染，因為它不會整合到基因組中。

【0175】針對雙突變體「ILT」和三重突變體「LLT」的piggyBac轉位酶，製備了使用野生型鹼基的未修飾mRNA轉錄物以及具有25%的偽U和5-甲基-C封端取代的修飾合成mRNA轉錄物。

【0176】進行了兩組實驗以評估轉染中的mRNA翻譯轉位酶。在第一個實驗中，測試了piggyBac轉位酶雙突變體（ILT，SEQ ID NO: 17）和三重突變體（LLT，SEQ ID NO: 18）的mRNA轉錄物。在第二個實驗中，除了該mRNA轉錄物外，還測試了具有25%的偽U和5-甲基C封端取代的雙突變體「ILT」的合成mRNA轉錄物。

【0177】使用電穿孔法或基於脂質的轉染方法將mRNA和合成的mRNA轉錄物以及包含粉紋夜蛾piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件和編碼單株抗體的基因的環狀質體一起轉染到GSKO細胞系中。

【0178】對於電穿孔法，將等重量的線性化轉位酶和轉位子載體DNA添加到懸浮在比色皿中的培養基中的 2×10^7 個細胞中。使用Bio-Rad電穿孔儀（伯樂實驗室）對DNA細胞混合物進行電穿孔。然後將該等電穿孔的細胞添加到溫生長培養基中，並在37°C和5%CO₂下孵育3天，之後將該等細胞重懸於選擇性培養基中以建立穩定的池。對於脂質轉染法，使用的試劑係脂染胺LTX（吉博科公司（Gibco）/賽默飛世爾公司（ThermoFisher），馬薩諸塞州沃爾瑟姆）。轉染前一天，將細胞以1e6細胞/mL的速度接種，於懸浮中振盪。轉染當天，將細胞接種在轉染培養基中至6孔板中。製備Mab DNA/轉位酶/脂染胺LTX複合物並孵育。然後將複合物添加到該等細胞中並孵育5-8小時。孵育後，添加生長培養基，並讓該等細胞恢復2-3天。如果存在黏附，則使用胰蛋白酶去除該等細胞，將該等細胞離心並重懸於選擇性培養基中以建立穩定的池。

【0179】 將mRNA轉染與對照條件進行比較，該對照條件係用編碼轉位酶的相應DNA轉染的GSKO細胞系。將包含編碼雙突變體（ILT，SEQ ID NO: 11）或三重突變體（LLT，SEQ ID NO: 9）的DNA的環狀質體，以及包含粉紋夜蛾piggyBac轉位子的5’和3’反向末端重複元件的環狀質體在與該mRNA相同的條件下轉染，該粉紋夜蛾piggyBac轉位子含有單株抗體。

【0180】 改變mRNA和DNA轉位酶的量、目的基因、目的基因DNA或RNA與轉位酶的比率以及轉染的細胞數量以測試最佳條件，見表4。

表4 電穿孔和脂質轉染的條件。

轉位酶	Mab DNA（μg）	轉位酶DNA或mRNA（μg）	Mab與轉位酶比率
實驗1 電穿孔2e7個宿主細胞			
DNA對照	20	5	4：1
無	20	0	
mRNA	20	5	4：1
mRNA	20	10	2：1
mRNA	20	20	1：1
mRNA	14	100	1：7
mRNA	28	200	1：7
實驗2 脂染胺LXT 1.2e6個宿主細胞			
DNA對照	2	0.5	4：1
DNA對照	2	2	1：1
DNA對照	4	4	1：1
mRNA	2	0.5	4：1
mRNA	2	2	1：1
mRNA	4	4	1：1
實驗3 電穿孔2e7個宿主細胞			
DNA對照	30	15	2：1
mRNA	30	15	2：1
合成mRNA	30	15	2：1

【0181】 讓該等轉染的細胞在補充有麩醯胺酸的培養基中在36°C和5% CO₂的條件下恢復三天，然後更換為不含麩醯胺酸的選擇性培養基。將該等細胞

每3至4天在36°C和5% CO₂的選擇性培養基中傳代直至恢復至> 90%的活率，並按實例1所述測定滴定度。

【0182】 使用基於電穿孔或基於脂質的轉染方法，採用mRNA的轉染達到了與採用piggyBac轉位酶雙突變體「ILT」的DNA的轉染相比相當的表現水平。圖6顯示了使用電穿孔或基於脂質的方法，來自用雙突變體「ILT」轉位酶DNA或mRNA轉染的細胞中的單株抗體的表現水平。圖6A顯示了使用電穿孔轉染的結果。與DNA對照相比，表現增加了，因為mRNA的量增加了。三重突變體「LLT」給出了相似的結果，數據未顯示。圖6B顯示了使用基於脂質的方法轉染的結果。該單株抗體的表現水平更好或至少與DNA對照相當。

【0183】 將合成版mRNA的結果與使用電穿孔的mRNA進行比較。兩種形式的表現均高於未用轉位酶（-）轉染的對照。

【0184】 圖7顯示了與來自電穿孔的雙突變體轉位酶「ILT」DNA以及兩個mRNA轉染池的表現相關的單株抗體的表現水平。合成的mRNA和mRNA轉染池的滴定度與基於DNA的轉位酶池的滴定度相似，並且滴定度高於沒有轉位酶對照池。

轉位酶基因的基因組DNA水平整合的分析。

【0185】 還分析了 piggyBac 轉位酶雙突變體「ILT」和三重突變體「LLT」基因的基因組 DNA 水平整合。使用了該轉位酶核苷酸序列 5'和 3'末端的寡核苷酸引物，該等引物擴增了約 1.7 kb 的片段，以檢查轉位酶是否存在。使用血液和細胞培養 DNA Maxi 套組（凱傑公司（Qiagen），加利福尼亞州瓦倫西亞）從在用 mRNA 或 DNA 轉染的恢復細胞系中收集的 1e7 個細胞的細胞團塊中提取基因組 DNA。質體 DNA 被用作陽性對照。使用 NanoDrop 分光光度計（賽默飛世爾公司，麻塞諸塞州沃爾瑟姆）藉由 260/280 吸光度比率對該基因組 DNA 進

行定量和品質檢查 (≥ 1.8 為良好品質)。使用來自新英格蘭生物實驗室 (New England Biolab) (麻塞諸塞州伊普斯維奇) 的 Q5 高保真聚合酶在 ProFlex PCR 系統 (生命技術公司 (Life Technologies), 加利福尼亞州嘉士伯) 上進行 PCR 擴增。該反應在瓊脂糖凝膠上進行以便於觀察。

轉位酶基因的 cDNA 水平整合的分析

【0186】還分析了 piggyBac 轉位酶雙突變體「ILT」基因的轉錄水平整合。再次使用上述寡核苷酸引物擴增約 1.7 kb 的片段，以檢查該轉位酶轉錄物是否存在於細胞中。使用 RNeasy minikit (凱傑公司) 從在添加了 mRNA 或 DNA 轉位酶轉染的恢復細胞系中收集的 $1e7$ 個細胞的細胞團塊中提取 mRNA。質體 DNA 被用作對照。定量 mRNA，並使用 NanoDrop 分光光度計藉由 260/280 吸光度比率檢查其品質。使用帶有 Platinum *Taq* 高保真 DNA 聚合酶的 SuperScript III 一步式 RT-PCR 系統 (賽默飛世爾公司) 在轉錄水平上檢查轉位酶，在該系統上進行 cDNA 合成並隨後根據製造商的建議在 ProFlex PCR 系統 (生命技術公司) 上擴增靶序列 (即轉位酶)。該反應在瓊脂糖凝膠上進行以便於觀察。

【0187】檢查了 DNA 和 mRNA 轉染的細胞系池的基因組和轉錄水平整合，見圖 8。約 1.7 kb 帶的存在表明轉位酶在該細胞系的基因組中存在，見圖 8A。用雙突變體「ILT」DNA 轉位酶轉染的所有池細胞系均具有轉錄水平整合，而用 mRNA 轉染的那些細胞系沒有在基因組或轉錄水平整合，見圖 8B。

拷貝數的 ddPCR 測定

【0188】為了測定拷貝數，使用 DNeasy 血液和組織套組 (凱傑公司) 從每個菌株和池的 5×10^6 個細胞中提取基因組 DNA。根據製造商的建議，使用 ddPCR Supermix for Probes (無 dUTP) 套組 (伯樂) 進行數位液滴 PCR。每個反應包含 1 個單位的 HindIII、10 ng 的模板 DNA 以及 900 nm 正向和反向引物，

以及 250 nm 螢光探針，設計用於靶標雙突變體「ILT」編碼序列和內源 CHO 參考基因 Gcg。使用 AutoDG 系統（伯樂）產生液滴，並在 ProFlex PCR 系統（生命技術公司）上以 95°C 下 10 分鐘的熱循環條件進行 PCR 擴增，隨後進行 94°C 下 30 s 和 60°C 下 1 分鐘的 40 個循環，然後在 98°C 下進行 10 分鐘。在 QX200 Droplet Reader 系統（伯樂）上讀取液滴，並使用 Quantasoft 軟體（伯樂）進行拷貝數數據分析。

【0189】為了確定池中的所有殖株是否都整合了轉位酶，將用DNA轉位酶轉染的池進行單細胞選殖，並檢查基因組DNA (gDNA) 水平整合。還使用ddPCR 測定該庫和該等殖株的轉位酶拷貝數。

【0190】該池具有較低的拷貝數，並且包含沒有整合該轉位酶的殖株。如上所述，藉由使用基於PCR的方法篩選殖株來鑒定無轉位酶整合的殖株。池群中存在無轉位酶整合的殖株，見圖9。

實例4：使用piggyBac轉位酶產生TCR-T細胞

【0191】使用雙突變型piggyBac轉位酶「ILT」成功修飾了原代T細胞以表現T細胞受體（TCR），見圖10A。由PiggyBac產生的TCR-T細胞表現出穩健的靶標殺傷力以及抗原特異性增殖（圖10B和10C）。

【0192】首先藉由Ficoll-Paque（通用電氣醫療集團（GE Healthcare），伊利諾州芝加哥）分離從健康供體白血球單採物（leukopak）中分離出外周血單核細胞（PBMC），隨後使用EasySep人T細胞分離套組（幹細胞技術公司（Stemcell Technologies），加拿大溫哥華）從PBMC中分離T細胞。然後激活T細胞，並在激活後兩天，使用4-D核轉染系統（龍沙公司（Lonza），南卡羅來納州格林伍德）將該等T細胞與質體共同電穿孔，其中該質體包含含有編碼TCR-IRES-EGFP

的基因和編碼雙突變體「ILT」轉位酶（SEQ ID NO: 18）的mRNA的piggyBac轉位子的5'和3'反向末端重複元件。每2-3天給細胞補充IL2細胞介素。

TCR整合的確定

【0193】 激活後第7天，藉由使用識別TCR的右旋抗體（Immudex，丹麥哥本哈根）以及CD3、CD4和CD8螢光團綴合的抗體（百進公司（Biolegend），加利福尼亞州聖地牙哥）對細胞進行表面染色，評估T細胞的TCR表現和細胞表型。藉由在BD LSRII流式細胞儀上運行來分析樣本的表現。

功能測定

【0194】 在激活後第9-14天，對T細胞計數並進行收集以用於功能測定。

細胞裂解和增殖測定

【0195】 於96孔U形底板中，將1E5 CellTrace Violet（賽默飛世爾科技公司（Thermo Fisher Scientific），麻塞諸塞州沃爾瑟姆）染色的T細胞與5e4個靶細胞在150 μ L培養基中共同孵育5天。藉由CellTrace Violet評估靶細胞的裂解和T細胞增殖，藉由在BD LSRFortessa流式細胞儀（華盛頓州利伯蒂湖）上運行樣本對稀釋液進行定量。

【符號說明】

【0196】 無

【生物材料寄存】

【0197】 無

【序列表】

<110> 美商安進公司（AMGEN INC.）

<120> 突變型piggyBac轉位酶

<130> A-2320-WO-PCT

<150> US62/777,325

<151> 2018-12-10

<160> 18

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 1786

<212> DNA

<213> 粉紋夜蛾

<400> 1

atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa	60
ctggtgggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag	120
tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc	180
tccgagatcc tggacgagca gaacgtgacg gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac	240
agaatcctga ccctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc	300
tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc	360
cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac cccctgctgt gcttcaagct gttcttcacc	420
gacgagatca tcagcgagat cgtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
gagagcatga ccggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc	540
ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
gacagatecc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttcctg	660
atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagaccca ccctgcggga gaacgacgtg	720
ttacccccg tgcggaagat ctgggacctg ttcateccacc agtgcateca gaactacacc	780
cctggcgccc acctgaccat cgatgagcag ctgctgggct tcagaggcag atgccccctc	840

agaatgtaca tccccaacaa gcccagcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac 900

agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac 960

ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc 1020

aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatcccc tggccaagaa cctgctgcag 1080

gaaccttaca agctgaccat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag 1140

gtgctgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc 1200

ctgaccctgg tgtcctacaa gcccagccc gccaaagtgg tgtacctgct gtccagctgc 1260

gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac 1320

cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga 1380

aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac 1440

agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaaggtgca gagccggaag 1500

aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa 1560

gccccaccc tgaagagata cctgcgggac aacatcagca acatcctgcc caacgaagtg 1620

ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc 1680

tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg 1740

atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctggt tctagc 1786

<210> 2

<211> 594

<212> PRT

<213> 粉紋夜蛾

<400> 2

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp
20 25 30

His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile
35 40 45

Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
50 55 60

Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn
65 70 75 80

Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His
85 90 95

Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu
100 105 110

Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile
115 120 125

Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile
130 135 140

Ser Glu Ile Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg
145 150 155 160

Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile
165 170 175

Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn
180 185 190

His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr
195 200 205

Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu
210 215 220

Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val
225 230 235 240

Phe	Thr	Pro	Val	Arg	Lys	Ile	Trp	Asp	Leu	Phe	Ile	His	Gln	Cys	Ile	
				245					250					255		
Gln	Asn	Tyr	Thr	Pro	Gly	Ala	His	Leu	Thr	Ile	Asp	Glu	Gln	Leu	Leu	
			260					265					270			
Gly	Phe	Arg	Gly	Arg	Cys	Pro	Phe	Arg	Met	Tyr	Ile	Pro	Asn	Lys	Pro	
		275						280					285			
Ser	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Ile	Leu	Met	Met	Cys	Asp	Ser	Gly	Thr	Lys	
		290					295					300				
Tyr	Met	Ile	Asn	Gly	Met	Pro	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gly	Thr	Gln	Thr	Asn	
305					310					315					320	
Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Pro	Val	
				325						330				335		
His	Gly	Ser	Cys	Arg	Asn	Ile	Thr	Cys	Asp	Asn	Trp	Phe	Thr	Ser	Ile	
			340						345					350		
Pro	Leu	Ala	Lys	Asn	Leu	Leu	Gln	Glu	Pro	Tyr	Lys	Leu	Thr	Ile	Val	
		355						360					365			
Gly	Thr	Val	Arg	Ser	Asn	Lys	Arg	Glu	Ile	Pro	Glu	Val	Leu	Lys	Asn	
		370					375					380				
Ser	Arg	Ser	Arg	Pro	Val	Gly	Thr	Ser	Met	Phe	Cys	Phe	Asp	Gly	Pro	
385						390					395				400	
Leu	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Lys	Pro	Lys	Pro	Ala	Lys	Met	Val	Tyr	Leu	
				405						410				415		
Leu	Ser	Ser	Cys	Asp	Glu	Asp	Ala	Ser	Ile	Asn	Glu	Ser	Thr	Gly	Lys	
			420						425					430		
Pro	Gln	Met	Val	Met	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Thr	Lys	Gly	Gly	Val	Asp	Thr	
		435						440					445			

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480

Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
485 490 495

Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
500 505 510

Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525

Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
530 535 540

Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
545 550 555 560

Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
565 570 575

Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
580 585 590

Cys Phe

<210> 3
<211> 1786
<212> DNA
<213> 粉紋夜蛾

<400> 3
atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa

ctggtgggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag	120
tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc	180
tccgagatcc tggacgagca gaacgtgac gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac	240
agaatcctga cctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc	300
tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc	360
cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac cccctgtgtg gcttcaagct gttcttcacc	420
gacgagatca tcagcgagct ggtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
gagagcatga ccggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc	540
ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttctg	660
atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagacca cctgcggga gaacgacgtg	720
ttcacccccg tgcggaagat ctgggacctg ttcattccacc agtgcattca gaactacacc	780
cctggcgccc acctgaccat cgatgagcag ctgctgggct tcagaggcag atgccccctc	840
agaatgtaca tccccaaaca gcccagcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac	900
agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac	960
ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc	1020
aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatcccc tggccaagaa cctgctgcag	1080
gaaccctaca agctgaccat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag	1140
gtgctgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc	1200
ctgacctgg tgtcctacaa gcccagccc gccaaagtgg tgtacctgct gtccagctgc	1260
gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac	1320
cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga	1380
aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac	1440
agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaagggtgca gagccggaag	1500
aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa	1560

gccccaccc tgaagagata cctgcgggac aacatcagca acatcctgcc caacgaagtg 1620

ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc 1680

tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg 1740

atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctgtt tctagc 1786

<210> 4

<211> 594

<212> PRT

<213> 粉紋夜蛾

<400> 4

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp
20 25 30

His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile
35 40 45

Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
50 55 60

Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn
65 70 75 80

Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His
85 90 95

Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu
100 105 110

Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile
115 120 125

Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile
130 135 140

Ser Glu Leu Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg
145 150 155 160

Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile
165 170 175

Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn
180 185 190

His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr
195 200 205

Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu
210 215 220

Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val
225 230 235 240

Phe Thr Pro Val Arg Lys Ile Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile
245 250 255

Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu
260 265 270

Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro
275 280 285

Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys
290 295 300

Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn
305 310 315 320

Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val
325 330 335

His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
340 345 350

Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
355 360 365

Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
370 375 380

Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
385 390 395 400

Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
405 410 415

Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
420 425 430

Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
435 440 445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480

Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
485 490 495

Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
500 505 510

Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525

Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
530 535 540

Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
545 550 555 560

Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
565 570 575

Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
580 585 590

Cys Phe

<210> 5
<211> 1786
<212> DNA
<213> 粉紋夜蛾

<400> 5	
atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa	60
ctggtgggcy aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag	120
tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc	180
tccgagatcc tggacgagca gaacgtgatc gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac	240
agaatcctga ccctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc	300
tccaagagca ccagcgggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc	360
cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac ccctgtctgt gcttcaagct gttcttcacc	420
gacgagatca tcagcgagat cgtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
gagagcatga ccggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc	540
ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttcttg	660
atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagacca ccctgcggga gaacgacgtg	720
ttacccccg tgcggaagct gtgggacctg ttcatccacc agtgcacca gaactacacc	780

cctggcgccc acctgaccat cgatgagcag ctgctgggct tcagaggcag atgccccctt	840
agaatgtaca tccccaacaa gcccagcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac	900
agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac	960
ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc	1020
aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatcccc tggccaagaa cctgctgcag	1080
gaaccctaca agctgaccat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag	1140
gtgctgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc	1200
ctgacctggg tgtcctacaa gcccagccc gccaagatgg tgtacctgct gtccagctgc	1260
gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac	1320
cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga	1380
aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac	1440
agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaagggtgca gagccggaag	1500
aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa	1560
gccccaccc tgaagagata cctgcgggac aacatcagca acatcctgcc caacgaagtg	1620
ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc	1680
tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg	1740
atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctggt tctagc	1786

- <210> 6
- <211> 594
- <212> PRT
- <213> 粉紋夜蛾

<400> 6

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp
20 25 30

His	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Val	Gln	Ser	Asp	Thr	Glu	Glu	Ala	Phe	Ile
35				40				45							
Asp	Glu	Val	His	Glu	Val	Gln	Pro	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Ile	Leu
50				55				60							
Asp	Glu	Gln	Asn	Val	Ile	Glu	Gln	Pro	Gly	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Asn
65				70				75				80			
Arg	Ile	Leu	Thr	Leu	Pro	Gln	Arg	Thr	Ile	Arg	Gly	Lys	Asn	Lys	His
85				90				95							
Cys	Trp	Ser	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Arg	Arg	Ser	Arg	Val	Ser	Ala	Leu
100				105				110							
Asn	Ile	Val	Arg	Ser	Gln	Arg	Gly	Pro	Thr	Arg	Met	Cys	Arg	Asn	Ile
115				120				125							
Tyr	Asp	Pro	Leu	Leu	Cys	Phe	Lys	Leu	Phe	Phe	Thr	Asp	Glu	Ile	Ile
130				135				140							
Ser	Glu	Ile	Val	Lys	Trp	Thr	Asn	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Lys	Arg	Arg
145				150				155				160			
Glu	Ser	Met	Thr	Gly	Ala	Thr	Phe	Arg	Asp	Thr	Asn	Glu	Asp	Glu	Ile
165				170				175							
Tyr	Ala	Phe	Phe	Gly	Ile	Leu	Val	Met	Thr	Ala	Val	Arg	Lys	Asp	Asn
180				185				190							
His	Met	Ser	Thr	Asp	Asp	Leu	Phe	Asp	Arg	Ser	Leu	Ser	Met	Val	Tyr
195				200				205							
Val	Ser	Val	Met	Ser	Arg	Asp	Arg	Phe	Asp	Phe	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu
210				215				220							
Arg	Met	Asp	Asp	Lys	Ser	Ile	Arg	Pro	Thr	Leu	Arg	Glu	Asn	Asp	Val
225				230				235				240			

Phe Thr Pro Val Arg Lys Leu Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile
245 250 255

Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu
260 265 270

Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro
275 280 285

Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys
290 295 300

Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn
305 310 315 320

Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val
325 330 335

His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
340 345 350

Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
355 360 365

Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
370 375 380

Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
385 390 395 400

Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
405 410 415

Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
420 425 430

Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
435 440 445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480

Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
485 490 495

Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
500 505 510

Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525

Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
530 535 540

Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
545 550 555 560

Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
565 570 575

Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
580 585 590

Cys Phe

<210> 7
<211> 1786
<212> DNA
<213> 粉紋夜蛾

<400> 7

atgggctcta gacctgacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa	60
ctggtgggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag	120
tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc	180
tccgagatcc tggacgagca gaacgtgacg gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac	240
agaatcctga ccttgcctca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc	300
tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc	360
cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac cccctgctgt gcttcaagct gttcttcacc	420
gacgagatca tcagcgagat cgtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
gagagcatga ccggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc	540
ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttctg	660
atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagaccca cctgcggga gaacgacgtg	720
ttcacccccg tgcggaagat ctgggacctg ttcatccacc agtgcattca gaactacacc	780
cctggcgccc acctgacct cgtatgacg ctgctgggct tcagaggcag atgccccctc	840
agaatgtaca tccccaaaca gcccagcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac	900
agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac	960
ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc	1020
aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatcccc tggccaagaa cctgctgcag	1080
gaaccctaca agctgacct cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag	1140
gtgtgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc	1200
ctgacctgg tgctctacaa gcccagccc gccaagatgg tgtacctgct gtccagctgc	1260
gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac	1320
cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga	1380
aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac	1440
agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaaggtgca gagccggaag	1500

aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa 1560

gccccccacc tgaagagata cctgcgggac aacatcacca acatcctgcc caacgaagtg 1620

ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc 1680

tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg 1740

atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctggt tctagc 1786

<210> 8

<211> 594

<212> PRT

<213> 粉紋夜蛾

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Tyr	Asp	Pro	Leu	Leu	Cys	Phe	Lys	Leu	Phe	Phe	Thr	Asp	Glu	Ile	Ile
130				135				140							
Ser	Glu	Ile	Val	Lys	Trp	Thr	Asn	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Lys	Arg	Arg
145				150				155				160			
Glu	Ser	Met	Thr	Gly	Ala	Thr	Phe	Arg	Asp	Thr	Asn	Glu	Asp	Glu	Ile
165				170				175							
Tyr	Ala	Phe	Phe	Gly	Ile	Leu	Val	Met	Thr	Ala	Val	Arg	Lys	Asp	Asn
180				185				190							
His	Met	Ser	Thr	Asp	Asp	Leu	Phe	Asp	Arg	Ser	Leu	Ser	Met	Val	Tyr
195				200				205							
Val	Ser	Val	Met	Ser	Arg	Asp	Arg	Phe	Asp	Phe	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu
210				215				220							
Arg	Met	Asp	Asp	Lys	Ser	Ile	Arg	Pro	Thr	Leu	Arg	Glu	Asn	Asp	Val
225				230				235				240			
Phe	Thr	Pro	Val	Arg	Lys	Ile	Trp	Asp	Leu	Phe	Ile	His	Gln	Cys	Ile
245				250				255							
Gln	Asn	Tyr	Thr	Pro	Gly	Ala	His	Leu	Thr	Ile	Asp	Glu	Gln	Leu	Leu
260				265				270							
Gly	Phe	Arg	Gly	Arg	Cys	Pro	Phe	Arg	Met	Tyr	Ile	Pro	Asn	Lys	Pro
275				280				285							
Ser	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Ile	Leu	Met	Met	Cys	Asp	Ser	Gly	Thr	Lys
290				295				300							
Tyr	Met	Ile	Asn	Gly	Met	Pro	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gly	Thr	Gln	Thr	Asn
305				310				315				320			
Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Pro	Val
325				330				335							

His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
340 345 350

Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
355 360 365

Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
370 375 380

Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
385 390 395 400

Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
405 410 415

Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
420 425 430

Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
435 440 445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480

Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
485 490 495

Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
500 505 510

Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525

Arg Asp Asn Ile Thr Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
530 535 540

Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
545 550 555 560

Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
565 570 575

Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
580 585 590

Cys Phe

<210> 9
<211> 1786
<212> DNA
<213> 粉紋夜蛾

<400> 9	
atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa	60
ctggtgggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag	120
tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc	180
tccgagatcc tggacgagca gaacgtgacg gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac	240
agaatcctga ccctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc	300
tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc	360
cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac cccctgctgt gcttcaagct gttcttcacc	420
gacgagatca tcagcgagct ggtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
gagagcatga ccggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc	540
ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttcctg	660
atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagaccca ccctgcggga gaacgacgtg	720

ttcacccccg tgcggaagct gtgggacctg ttcattccacc agtgcattcca gaactacacc 780

cctggcgccc acctgacctat cgatgagcag ctgctgggct tcagaggcag atgccccctt 840

agaatgtaca tccccaaaca gccagcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac 900

agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac 960

ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc 1020

aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatcccc tggccaagaa cctgctgcag 1080

gaacctaca agctgacctat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag 1140

gtgctgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc 1200

ctgacctgg tgtcctacaa gcccagccc gccaaagtgg tgtacctgct gtccagctgc 1260

gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac 1320

cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga 1380

aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac 1440

agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaaggcgc agaagggtgca gagccggaag 1500

aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa 1560

gccccaccc tgaagagata cctgcgggac aacatcacca acatcctgcc caacgaagtg 1620

ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc 1680

tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg 1740

atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctggt tctagc 1786

<210> 10
<211> 594
<212> PRT
<213> 粉紋夜蛾

<400> 10

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp
20 25 30

His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile
35 40 45

Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
50 55 60

Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn
65 70 75 80

Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His
85 90 95

Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu
100 105 110

Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile
115 120 125

Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile
130 135 140

Ser Glu Leu Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg
145 150 155 160

Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile
165 170 175

Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn
180 185 190

His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr
195 200 205

Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu
210 215 220

I862531

Arg	Met	Asp	Asp	Lys	Ser	Ile	Arg	Pro	Thr	Leu	Arg	Glu	Asn	Asp	Val
225					230					235					240
Phe	Thr	Pro	Val	Arg	Lys	Leu	Trp	Asp	Leu	Phe	Ile	His	Gln	Cys	Ile
				245					250					255	
Gln	Asn	Tyr	Thr	Pro	Gly	Ala	His	Leu	Thr	Ile	Asp	Glu	Gln	Leu	Leu
			260					265					270		
Gly	Phe	Arg	Gly	Arg	Cys	Pro	Phe	Arg	Met	Tyr	Ile	Pro	Asn	Lys	Pro
	275						280					285			
Ser	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Ile	Leu	Met	Met	Cys	Asp	Ser	Gly	Thr	Lys
290						295				300					
Tyr	Met	Ile	Asn	Gly	Met	Pro	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gly	Thr	Gln	Thr	Asn
305					310					315					320
Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Pro	Val
				325					330					335	
His	Gly	Ser	Cys	Arg	Asn	Ile	Thr	Cys	Asp	Asn	Trp	Phe	Thr	Ser	Ile
			340					345						350	
Pro	Leu	Ala	Lys	Asn	Leu	Leu	Gln	Glu	Pro	Tyr	Lys	Leu	Thr	Ile	Val
	355						360					365			
Gly	Thr	Val	Arg	Ser	Asn	Lys	Arg	Glu	Ile	Pro	Glu	Val	Leu	Lys	Asn
370						375				380					
Ser	Arg	Ser	Arg	Pro	Val	Gly	Thr	Ser	Met	Phe	Cys	Phe	Asp	Gly	Pro
385					390					395					400
Leu	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Lys	Pro	Lys	Pro	Ala	Lys	Met	Val	Tyr	Leu
				405					410					415	
Leu	Ser	Ser	Cys	Asp	Glu	Asp	Ala	Ser	Ile	Asn	Glu	Ser	Thr	Gly	Lys
			420					425					430		

Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
435 440 445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480

Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
485 490 495

Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
500 505 510

Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525

Arg Asp Asn Ile Thr Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
530 535 540

Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
545 550 555 560

Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
565 570 575

Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
580 585 590

Cys Phe

<210> 11
<211> 1786
<212> DNA
<213> 粉紋夜蛾

<400> 11	
atgggctcta gcttggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa	60
ctggtgggcy aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag	120
tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc	180
tccgagatcc tggacgagca gaacgtgatc gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac	240
agaatcctga ccctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc	300
tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc	360
cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac cccctgctgt gcttcaagct gttcttcacc	420
gacgagatca tcagcgagat cgtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
gagagcatga ccggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc	540
ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttctg	660
atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagacca ccctgcggga gaacgacgtg	720
ttcacccccg tgcggaagct gtgggacctg ttcattccacc agtgcattca gaactacacc	780
cctggcgccc acctgaccat cgatgagcag ctgctgggct tcagaggcag atgccccctc	840
agaatgtaca tccccaaaca gcccagcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac	900
agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac	960
ggcgtgcccc tgggagagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc	1020
aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatcccc tggccaagaa cctgctgcag	1080
gaaccctaca agctgaccat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag	1140
gtgctgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc	1200
ctgacctgg tgtcttaciaa gcccagccc gccaaagtgg tgtacctgct gtccagctgc	1260
gacgaggacy ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac	1320
cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga	1380
aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac	1440

agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaaggtgca gagccggaag 1500

aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa 1560

gccccacccc tgaagagata cctgcgggac aacatcacca acatcctgcc caacgaagtg 1620

ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc 1680

tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg 1740

atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctggt tctagc 1786

<210> 12

<211> 594

<212> PRT

<213> 粉紋夜蛾

<400> 12

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp
20 25 30

His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile
35 40 45

Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
50 55 60

Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn
65 70 75 80

Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His
85 90 95

Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu
100 105 110

Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile
115 120 125

Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile
130 135 140

Ser Glu Ile Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg
145 150 155 160

Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile
165 170 175

Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn
180 185 190

His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr
195 200 205

Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu
210 215 220

Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val
225 230 235 240

Phe Thr Pro Val Arg Lys Leu Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile
245 250 255

Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu
260 265 270

Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro
275 280 285

Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys
290 295 300

Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn
305 310 315 320

Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val
325 330 335

His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
340 345 350

Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
355 360 365

Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
370 375 380

Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
385 390 395 400

Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
405 410 415

Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
420 425 430

Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
435 440 445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480

Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
485 490 495

Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
500 505 510

Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525

Arg Asp Asn Ile Thr Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
530 535 540

Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
545 550 555 560

Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
565 570 575

Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
580 585 590

Cys Phe

<210> 13
<211> 1786
<212> DNA
<213> 粉紋夜蛾

<400> 13	
atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgccc tgctgcagag cgacgacgaa	60
ctggtgggcy aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag	120
tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc	180
tccgagatcc tggacgagca gaacgtgacg gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac	240
agaatcctga ccctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc	300
tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc	360
cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac ccctgtctgt gcttcaagct gttcttcacc	420
gacgagatca tcagcgagct ggtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
gagagcatga ccggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc	540
ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttctg	660

atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagaccca ccctgcggga gaacgacgtg 720

ttcacccccg tgcggaagat ctgggacctg ttcattccacc agtgcattcca gaactacacc 780

cctggcgccc acctgaccat cgatgagcag ctgctgggct tcagaggcag atgccccctt 840

agaatgtaca tccccaaaca gcccagcaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac 900

agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac 960

ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc 1020

aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatcccc tggccaagaa cctgctgcag 1080

gaaccctaca agctgaccat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag 1140

gtgctgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgctt cgacggcccc 1200

ctgaccctgg tgtcctacaa gcccagccc gccaaagtgg tgtacctgct gtccagctgc 1260

gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac 1320

cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga 1380

aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac 1440

agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaagggtgca gagccggaag 1500

aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa 1560

gccccaccc tgaagagata cctgcgggac aacatcacca acatcctgcc caacgaagtg 1620

ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc 1680

tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg 1740

atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctggt tctagc 1786

<210> 14

<211> 594

<212> PRT

<213> 粉紋夜蛾

<400> 14

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

1 5 10 15

Ser	Asp	Asp	Glu	Leu	Val	Gly	Glu	Asp	Ser	Asp	Ser	Glu	Ile	Ser	Asp
20				25				30							
His	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Val	Gln	Ser	Asp	Thr	Glu	Glu	Ala	Phe	Ile
35				40				45							
Asp	Glu	Val	His	Glu	Val	Gln	Pro	Thr	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Ile	Leu
50				55				60							
Asp	Glu	Gln	Asn	Val	Ile	Glu	Gln	Pro	Gly	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Asn
65				70				75				80			
Arg	Ile	Leu	Thr	Leu	Pro	Gln	Arg	Thr	Ile	Arg	Gly	Lys	Asn	Lys	His
85				90				95							
Cys	Trp	Ser	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Arg	Arg	Ser	Arg	Val	Ser	Ala	Leu
100				105				110							
Asn	Ile	Val	Arg	Ser	Gln	Arg	Gly	Pro	Thr	Arg	Met	Cys	Arg	Asn	Ile
115				120				125							
Tyr	Asp	Pro	Leu	Leu	Cys	Phe	Lys	Leu	Phe	Phe	Thr	Asp	Glu	Ile	Ile
130				135				140							
Ser	Glu	Leu	Val	Lys	Trp	Thr	Asn	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Lys	Arg	Arg
145				150				155				160			
Glu	Ser	Met	Thr	Gly	Ala	Thr	Phe	Arg	Asp	Thr	Asn	Glu	Asp	Glu	Ile
165				170				175							
Tyr	Ala	Phe	Phe	Gly	Ile	Leu	Val	Met	Thr	Ala	Val	Arg	Lys	Asp	Asn
180				185				190							
His	Met	Ser	Thr	Asp	Asp	Leu	Phe	Asp	Arg	Ser	Leu	Ser	Met	Val	Tyr
195				200				205							
Val	Ser	Val	Met	Ser	Arg	Asp	Arg	Phe	Asp	Phe	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu
210				215				220							

Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val
225 230 235 240

Phe Thr Pro Val Arg Lys Ile Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile
245 250 255

Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu
260 265 270

Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro
275 280 285

Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys
290 295 300

Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn
305 310 315 320

Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val
325 330 335

His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
340 345 350

Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
355 360 365

Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
370 375 380

Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
385 390 395 400

Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
405 410 415

Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
420 425 430

Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
435 440 445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480

Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
485 490 495

Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
500 505 510

Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525

Arg Asp Asn Ile Thr Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
530 535 540

Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
545 550 555 560

Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
565 570 575

Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
580 585 590

Cys Phe

<210> 15
<211> 1786

<212> DNA
<213> 粉紋夜蛾

<400> 15	
atgggctcta gcctggacga cgagcacatc ctgagcgcgc tgctgcagag cgacgacgaa	60
ctggtgggcg aggacagcga cagcgagatc agcgaccacg tgtccgagga cgacgtgcag	120
tccgacaccg aggaagcctt catcgacgag gtgcacgaag tgcagcctac cagcagcggc	180
tccgagatcc tggacgagca gaacgtgacg gagcagcctg gcagctccct ggccagcaac	240
agaatcctga ccctgcccca gagaaccatc agaggcaaga acaagcactg ctggtccacc	300
tccaagagca ccaggcggag cagagtgtcc gccctgaaca tcgtgcggag ccagaggggc	360
cccaccagaa tgtgcagaaa catctacgac cccctgctgt gcttcaagct gttcttcacc	420
gacgagatca tcagcgagct ggtgaagtgg accaacgccg agatcagcct gaagaggcgg	480
gagagcatga ccggcgccac cttcagagac accaacgagg acgagatcta cgccttcttc	540
ggcatcctgg tgatgaccgc cgtgagaaag gacaaccaca tgagcaccga cgacctgttc	600
gacagatccc tgagcatggt gtacgtgtcc gtgatgagca gagacagatt cgacttctg	660
atcagatgcc tgagaatgga cgacaagagc atcagacca ccctgcggga gaacgacgtg	720
ttcacccccg tgcggaagct gtgggacctg ttcattccacc agtgcattca gaactacacc	780
cctggcgccc acctgaccat cgatgagcag ctgctgggct tcagaggcag atgccccctc	840
agaatgtaca tccccaaaca gcccgacaag tacggcatca agatcctgat gatgtgcgac	900
agcggcacca agtacatgat caacggcatg ccctacctgg gcagaggcac ccagacaaac	960
ggcgtgcccc tgggcgagta ctacgtgaaa gaactgagca agcctgtgca tggcagctgc	1020
aggaacatca cctgcgacaa ctggttcacc agcatcccc tgccaagaa cctgctgcag	1080
gaaccctaca agctgaccat cgtgggcacc gtgcggagca acaagcggga gatcccagag	1140
gtgtgtgaaga acagcagatc cagacctgtg ggaacaagca tgttctgttt cgacggcccc	1200
ctgaccctgg tgtcctacaa gcccagccc gccaaagtgg tgtacctgct gtccagctgc	1260
gacgaggacg ccagcatcaa cgagagcacc ggcaagcccc agatggtgat gtactacaac	1320
cagaccaagg gcggcgtgga caccctggac cagatgtgca gcgtgatgac ctgcagcaga	1380

aagaccaaca gatggcccat ggccctgctg tacggcatga tcaatatcgc ctgcatcaac 1440

agcttcatca tctacagcca caacgtgtcc agcaagggcg agaagggtgca gagccggaag 1500

aaattcatgc ggaacctgta catgagcctg acctccagct tcatgagaaa gagactggaa 1560

gccccacccc tgaagagata cctgcgggac aacatcagca acatcctgcc caacgaagtg 1620

ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgtgatga agaagaggac ctactgcacc 1680

tactgtccca gcaagatcag aagaaaggcc aacgccagct gcaagaaatg caaaaaagtg 1740

atctgccggg agcacaacat cgacatgtgc cagagctggt tctagc 1786

<210> 16

<211> 594

<212> PRT

<213> 粉紋夜蛾

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn	Ile	Val	Arg	Ser	Gln	Arg	Gly	Pro	Thr	Arg	Met	Cys	Arg	Asn	Ile
115					120					125					
Tyr	Asp	Pro	Leu	Leu	Cys	Phe	Lys	Leu	Phe	Phe	Thr	Asp	Glu	Ile	Ile
130					135					140					
Ser	Glu	Leu	Val	Lys	Trp	Thr	Asn	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Lys	Arg	Arg
145					150					155					160
Glu	Ser	Met	Thr	Gly	Ala	Thr	Phe	Arg	Asp	Thr	Asn	Glu	Asp	Glu	Ile
165					170					175					
Tyr	Ala	Phe	Phe	Gly	Ile	Leu	Val	Met	Thr	Ala	Val	Arg	Lys	Asp	Asn
180					185					190					
His	Met	Ser	Thr	Asp	Asp	Leu	Phe	Asp	Arg	Ser	Leu	Ser	Met	Val	Tyr
195					200					205					
Val	Ser	Val	Met	Ser	Arg	Asp	Arg	Phe	Asp	Phe	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu
210					215					220					
Arg	Met	Asp	Asp	Lys	Ser	Ile	Arg	Pro	Thr	Leu	Arg	Glu	Asn	Asp	Val
225					230					235					240
Phe	Thr	Pro	Val	Arg	Lys	Leu	Trp	Asp	Leu	Phe	Ile	His	Gln	Cys	Ile
245					250					255					
Gln	Asn	Tyr	Thr	Pro	Gly	Ala	His	Leu	Thr	Ile	Asp	Glu	Gln	Leu	Leu
260					265					270					
Gly	Phe	Arg	Gly	Arg	Cys	Pro	Phe	Arg	Met	Tyr	Ile	Pro	Asn	Lys	Pro
275					280					285					
Ser	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Ile	Leu	Met	Met	Cys	Asp	Ser	Gly	Thr	Lys
290					295					300					
Tyr	Met	Ile	Asn	Gly	Met	Pro	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gly	Thr	Gln	Thr	Asn
305					310					315					320

Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val
325 330 335

His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
340 345 350

Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
355 360 365

Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
370 375 380

Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
385 390 395 400

Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
405 410 415

Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
420 425 430

Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
435 440 445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480

Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
485 490 495

Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
500 505 510

Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525

Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
530 535 540

Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
545 550 555 560

Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
565 570 575

Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
580 585 590

Cys Phe

<210> 17
<211> 1786
<212> RNA
<213> 粉紋夜蛾

<400> 17	
augggcucua gccuggacga cgagcacau cugagcgccc ugcugcagag cgacgacgaa	60
cuggugggcy aggacagcga cagcgagauc agcgaccacg uguccgagga cgacgugcag	120
uccgacaccg aggaagccuu caucgacgag gugcacgaag ugcagccuac cagcagcggc	180
uccgagaucc uggacgagca gaacgugauc gagcagccug gcagcucccu ggccagcaac	240
agaauccuga ccugcccca gagaaccauc agaggcaaga acaagcacug cugguccacc	300
uccaagagca ccaggcggag cagagugucc gccugaaca ucgugcggag ccagaggggc	360
cccaccagaa ugugcagaaa caucuacgac cccugcugu gcuucaagcu guucuucacc	420
gacgagauc aacagcgagau cgugaagugg accaacgccg agaucagccu gaagaggcgg	480
gagagcauga ccg'gcgccac cuucagagac accaacgagg acgagaucua cgccuucuc	540
ggcauccugg ugaugaccgc cgugagaaag gacaaccaca ugagcaccga cgaccuguuc	600

gacagauc	cc	ugagcaug	gu	uacguu	cc	gugaugag	ca	gagacaga	uu	cgacuucc	ug	660
aucagaug	cc	ugagaau	gga	cgacaaga	gc	aucagac	cca	cccugc	ggga	gaacgac	gug	720
uucacccc	cg	ugcggaa	gcu	guugga	ccug	uucaucc	acc	agugca	ucca	gaacuac	acc	780
ccuggcg	ccc	accugacc	au	cgau	gagcag	cugcu	gggcu	ucagag	gcag	augcccc	uuc	840
agaau	guaca	ucccca	aaca	gcccag	caag	uacggc	auca	agaucc	ugau	gaugugc	gac	900
agcggc	acca	aguaca	ugau	caacgg	caug	cccuacc	ugg	gcagag	gcac	ccagaca	aac	960
ggcgu	cccc	ugggcg	agua	cuacgu	gaaa	gaacug	agca	agccu	gugca	uggcag	cugc	1020
aggaa	cauca	ccugcg	acaa	cugguu	cacc	agcau	cccc	uggcca	aaga	ccugcu	gcag	1080
gaacc	cuaca	agcu	gacc	au	cguggg	cacc	gugc	ggag	ca	acaagc	ggga	1140
gugcu	gaaga	acagc	agauc	cagacc	ugug	ggaaca	agca	uguuc	ugcuu	cgacgg	cccc	1200
cugacc	cu	gg	uguccu	acaa	gccc	aagccc	gcca	aagugg	uguacc	ugcu	guccag	1260
gacgag	gacg	ccagc	aucaa	cgagag	cacc	ggcaag	cccc	agaugg	ugau	guacu	acaac	1320
cagacc	aagg	gcggc	gu	gga	cacc	cu	ggac	caga	ugug	ca	gcguga	1380
aagacc	aaca	gaug	gcccc	au	ggccc	ugcug	uacgg	cauga	ucauu	aucgc	cugcau	1440
agcuu	cauca	ucuac	agcca	caacgu	uucc	agcaag	ggcg	agaagg	ugca	gagcc	ggaag	1500
aaauu	caugc	ggaacc	ugua	caugag	ccug	accucc	agcu	ucaug	agaaa	gagacu	ggaa	1560
gcccc	accc	ugaag	agaua	ccugc	gggac	aacauc	acca	acaucc	ugcc	caacga	agug	1620
ccagg	aaca	gcgac	gacag	caccg	aggaa	cccgu	auga	agaag	aggac	cuacug	cacc	1680
uacug	uccca	gcaag	aucag	aagaa	aggcc	aacgc	cagcu	gcaag	aaaug	caaaaa	agug	1740
aucug	ccggg	agcaca	acau	cgaca	ugugc	cagag	cuguu	ucuagc				1786

- <210> 18
- <211> 1786
- <212> RNA
- <213> 粉紋夜蛾

<400>	18	
augggcucua gccuggacga cgagcacauc cugagcgccc ugcugcagag cgacgacgaa	60	
cuggugggcg aggacagcga cagcgagauc agcgaccacg uguccgagga cgacgugcag	120	

uccgacaccg aggaagccuu caucgacgag gugcacgaag ugcagccuac cagcagcggc	180
uccgagaucc uggacgagca gaacgugauc gagcagccug gcagcuccu ggccagcaac	240
agaauccuga ccugcccca gagaaccauc agaggcaaga acaagcacug cugguccacc	300
uccaagagca ccagcgggag cagagugucc gcccugaaca ucgugcggag ccagaggggc	360
cccaccagaa ugugcagaaa caucuacgac cccugcugu gcuucaagcu guucuucacc	420
gacgagauca ucagcagcu ggugaagugg accaacgccg agaucagccu gaagaggcgg	480
gagagcauga ccggcggcac cuucagagac accaacgagg acgagaucua cgccuucuc	540
ggcauccugg ugaugaccgc cgugagaaag gacaaccaca ugagcaccga cgaccuguuc	600
gacagaucuu ugagcauggu guacgugucc gugaugagca gagacagauu cgacuuccug	660
aucagaugcc ugagaaugga cgacaagagc aucagacca ccugcggga gaacgacgug	720
uucacccccg ugcggaagcu gugggaccug uucauccacc agugcaucca gaacuacacc	780
ccuggcggcc accugaccu cgaugagcag cugcugggcu ucagaggcag augcccuuc	840
agaauguaca uccccaacaa gccagcaag uacggcauca agauccugau gaugugcgac	900
agcggcacca aguacaugau caacggcaug ccuaccugg gcagaggcac ccagacaaac	960
ggcugcccc ugggcgagua cuacgugaaa gaacugagca agccugugca uggcagcugc	1020
aggaacauc ccugcgacaa cugguucacc agcaucuccc uggccaagaa ccugcugcag	1080
gaaccuaca agcugaccu cgugggcacc gugcggagca acaagcggga gauccagag	1140
gugcugaaga acagcagau cagaccugug ggaacaagca uguucugcu cgacggcccc	1200
cugaccuugg uguccuacaa gccaagccc gccaagaugg uguaccugcu guccagcugc	1260
gacgaggacg ccagcauca cagagcacc ggcaagcccc agauggugau guacuacaac	1320
cagaccaagg gcggcgugga caccuggac cagaugugca gcgugaugac cugcagcaga	1380
aagaccaaca gauggcccau ggcccugcug uacggcauga ucaauaucgc cugcaucaac	1440
agcuucauca ucuacagcca caacgugucc agcaaggcg agaaggugca gagccggaag	1500
aaauucaugc ggaaccugua caugagccug accuccagcu ucaugagaaa gagacuggaa	1560
gccccaccc ugaagagaua ccugcgggac aacaucacca acauccugcc caacgaagug	1620

ccaggaacaa gcgacgacag caccgaggaa cccgugauga agaagaggac cuacugcacc	1680
uacuguccca gcaagaucag aagaaaggcc aacgccagcu gcaagaaug caaaaaagug	1740
aucugccggg agcacaacau cgacaugugc cagagcuguu ucuagc	1786

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少一個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的247位置處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。

【請求項2】 如請求項1之piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含以下胺基酸取代中的至少兩個：在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。

【請求項3】 如請求項1之piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的胺基酸取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的胺基酸取代。

【請求項4】 如請求項1之piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶包含在SEQ ID NO: 2的位置147處白胺酸對異白胺酸的取代，在SEQ ID NO: 2的位置247處白胺酸對異白胺酸的取代，以及在SEQ ID NO: 2的位置533處蘇胺酸對絲胺酸的取代。

【請求項5】 如請求項1之piggyBac轉位酶，其中與由用編碼野生型piggyBac轉位酶或無piggyBac轉位酶的核酸轉染的細胞表現的相同目的蛋白的滴定度相比，由用編碼工程化piggyBac轉位酶的核酸轉染的細胞表現的目的重組蛋白的滴定度係改善。

【請求項6】 如請求項5之piggyBac轉位酶，其中該目的重組蛋白係抗原結合蛋白。

【請求項7】 一種piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶具有SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 16的胺基酸序列。

【請求項8】 一種工程化核酸分子，該核酸分子編碼如請求項1或7之piggyBac轉位酶。

【請求項9】 一種piggyBac轉位酶，該piggyBac轉位酶由SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18的核酸序列編碼。

【請求項10】 一種載體，該載體包含如請求項8之工程化核酸分子。

【請求項11】 如請求項10之載體，該載體進一步包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

【請求項12】 一種細胞，該細胞用由如請求項8之工程化核酸分子轉染。

【請求項13】 一種細胞，該細胞用如請求項10或11之載體轉染。

【請求項14】 如請求項12或13之細胞，其中該細胞係宿主細胞。

【請求項15】 如請求項12或13之細胞，其中該細胞係CHO細胞。

【請求項16】 如請求項12或13之細胞，其中該細胞係免疫細胞。

【請求項17】 一種細胞，該細胞用如請求項8之工程化核酸分子與包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的載體共轉染，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

【請求項18】 一種細胞，該細胞用如請求項10之載體與包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的載體共轉染，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

【請求項19】一種細胞，該細胞用如請求項10之載體且該載體包含編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子共轉染，該編碼至少一種目的蛋白的至少一種核酸分子的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

【請求項20】如請求項12、13、17、18或19之細胞，其中與由用編碼野生型piggyBac轉位酶或無piggyBac轉位酶的核酸轉染的細胞表現的相同目的蛋白的滴定度相比，由用該編碼該piggyBac轉位酶的工程化核酸轉染的細胞表現的目的蛋白的滴定度係改善。

【請求項21】一種用於改善由宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度之方法，該方法包括

用如請求項8的工程化核酸分子與包含編碼目的蛋白的核酸序列的載體共轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件；以及

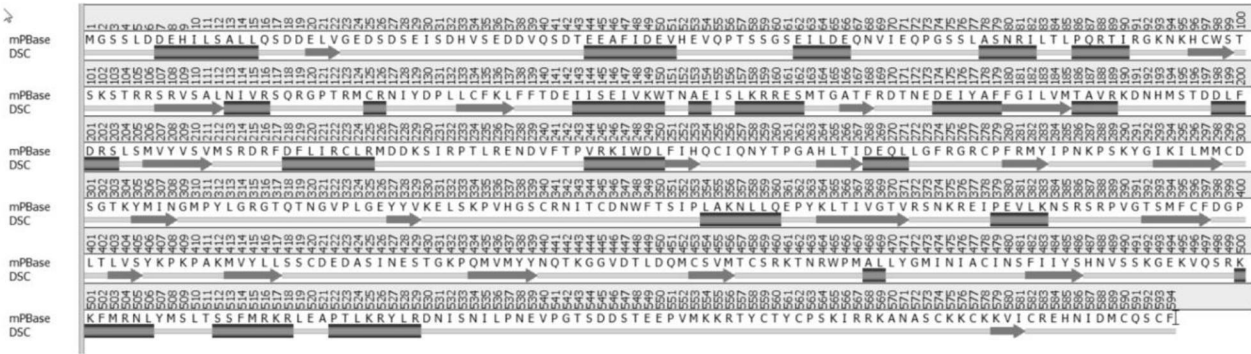
對該等細胞進行培養以表現該目的重組蛋白，

其中與由用編碼野生型piggyBac轉位酶或無piggyBac轉位酶的核酸轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度相比，由用該編碼該piggyBac轉位酶的工程化核酸分子轉染的宿主細胞表現的目的重組蛋白的滴定度係改善。

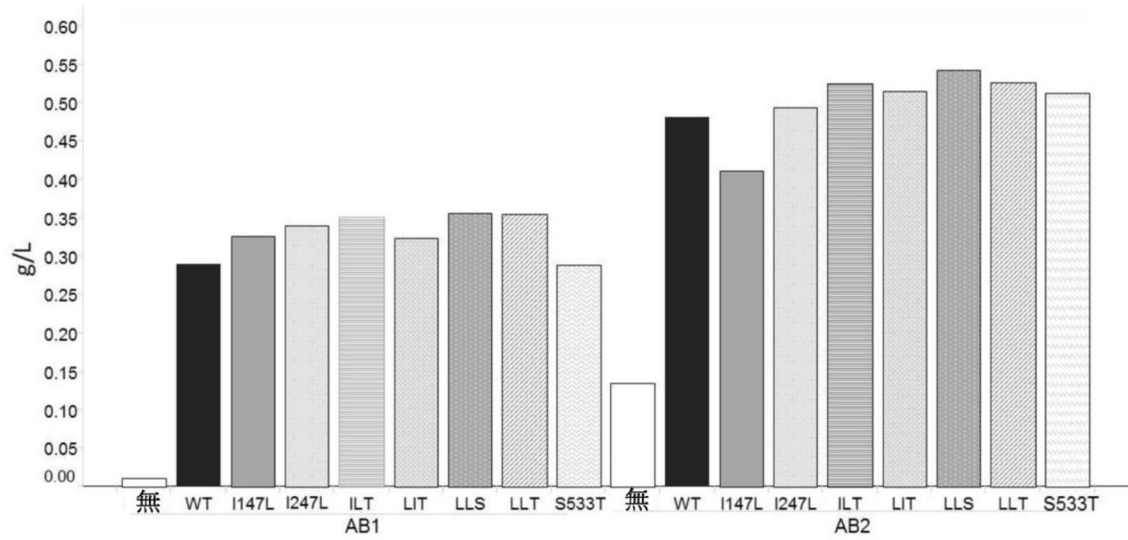
【請求項22】如請求項21之方法，其中用包含如請求項8的工程化核酸分子的第一載體與包含編碼目的蛋白的核酸序列的第二載體轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

【請求項23】如請求項21之方法，其中用包含如請求項8的工程化核酸分子與編碼目的蛋白的核酸序列的單個載體轉染該宿主細胞，該編碼目的蛋白的核酸序列的側翼至少是piggyBac轉位子的5'和3'反向重複元件。

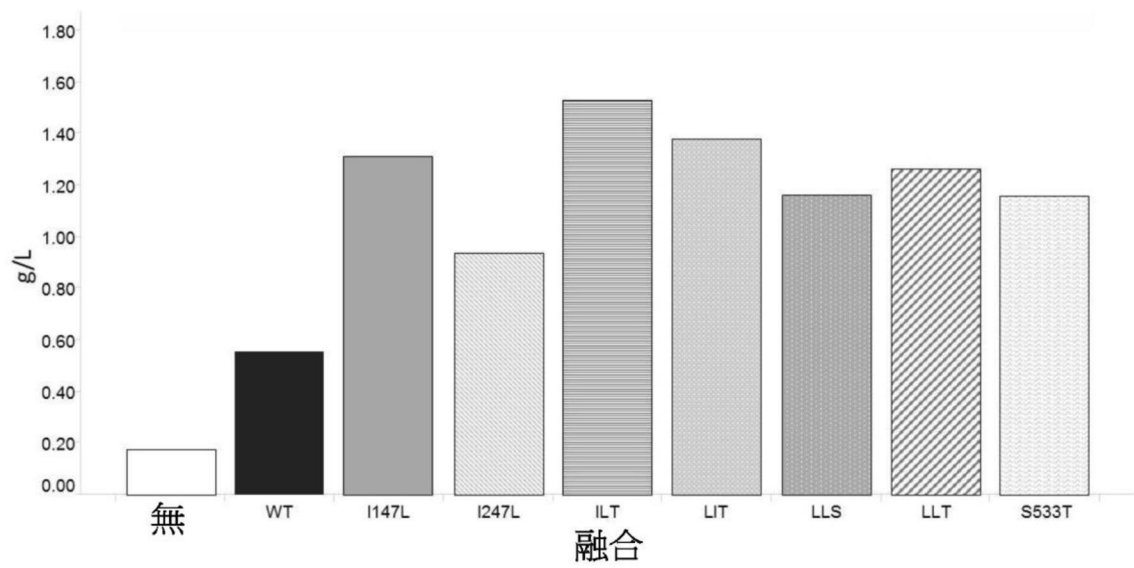
【發明圖式】



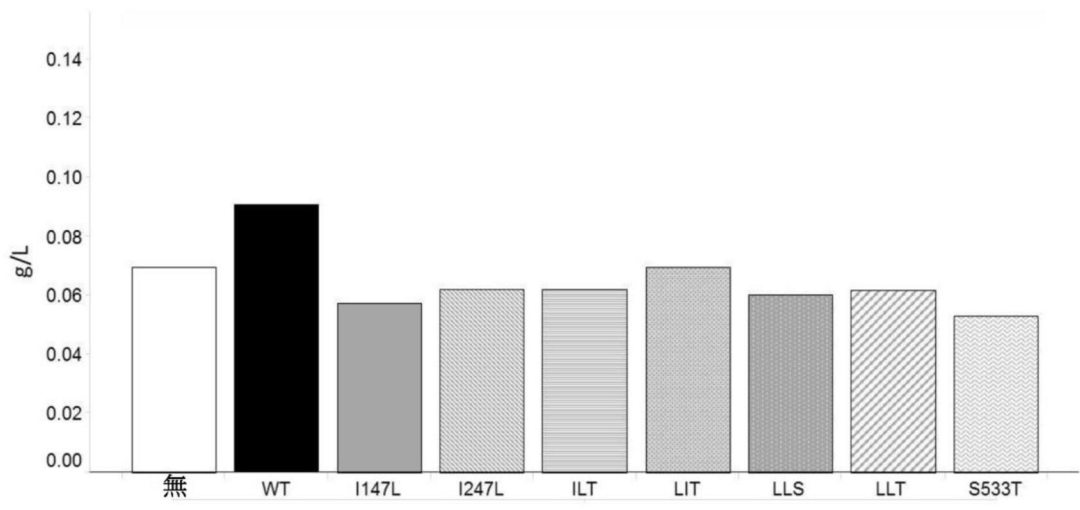
【圖 1】



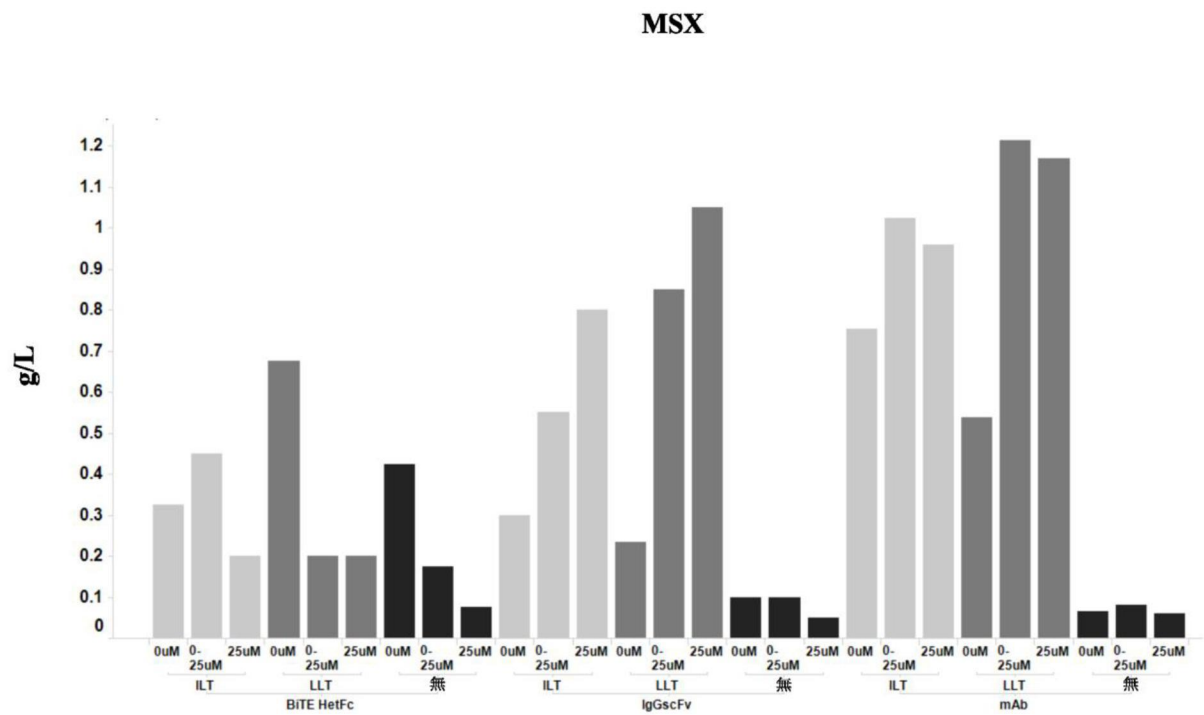
【圖 2】



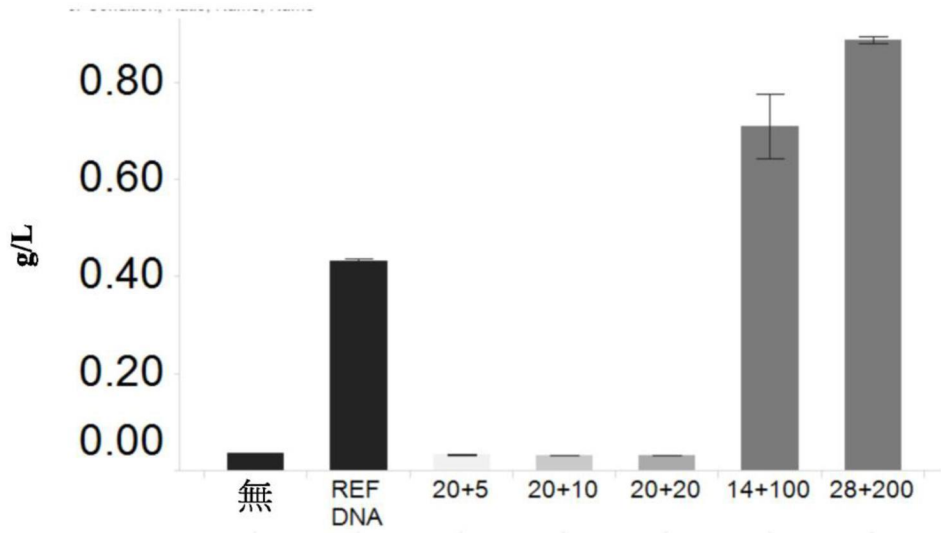
【圖 3】



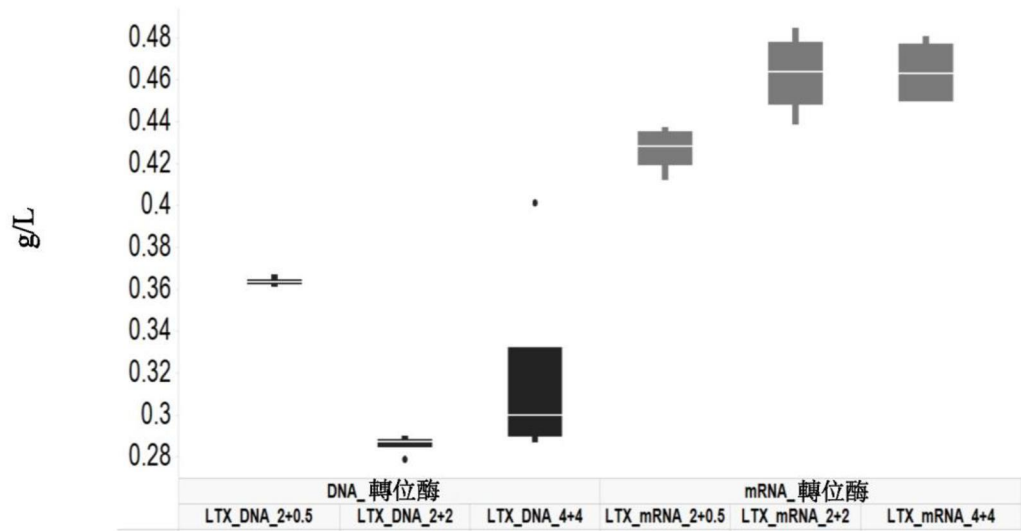
【圖 4】



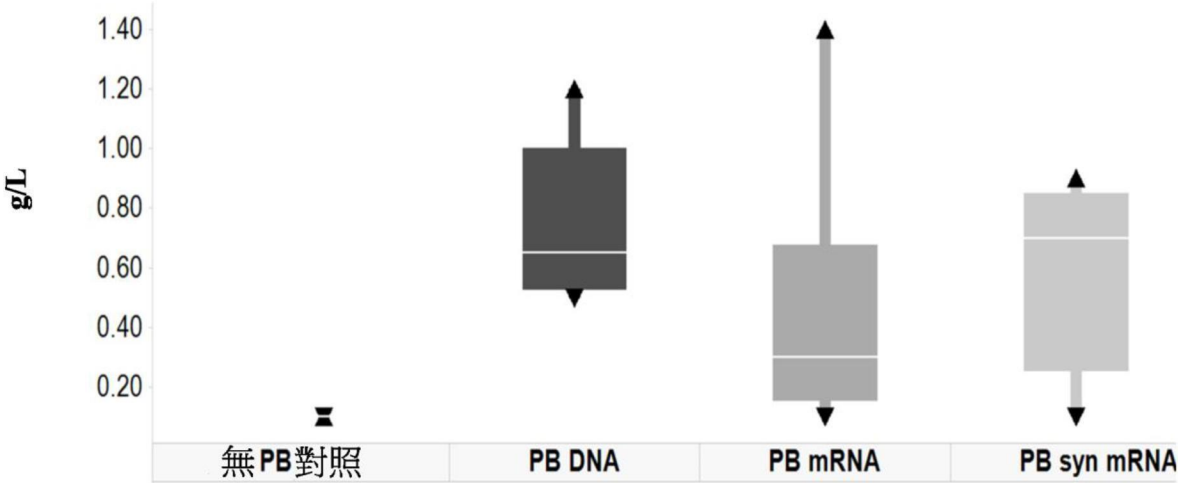
【圖 5】



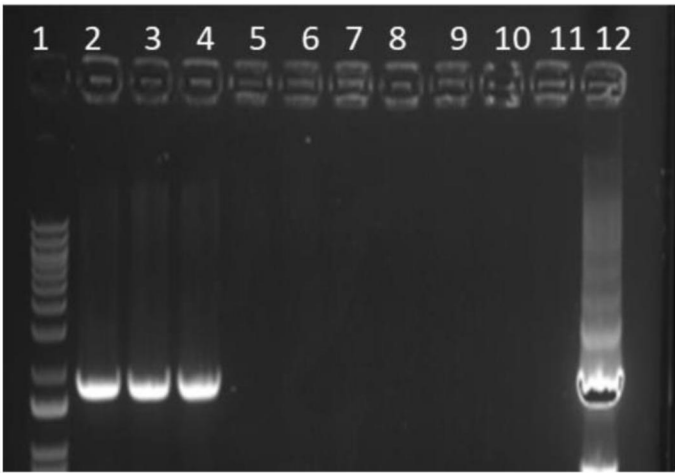
【圖 6A】



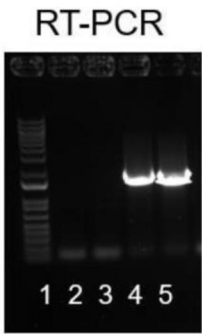
【圖 6B】



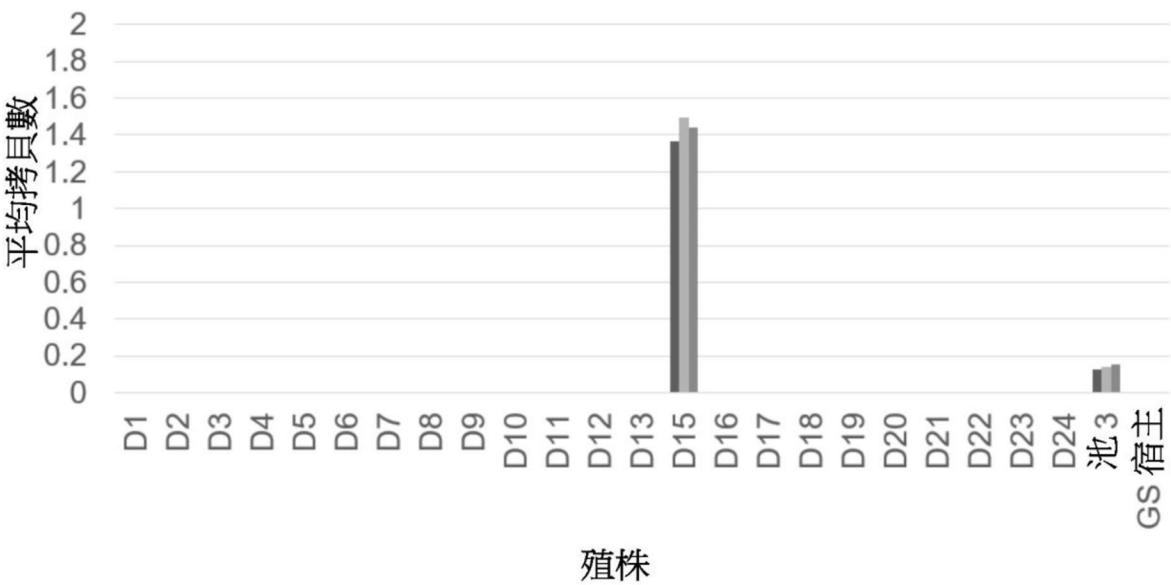
【圖 7】



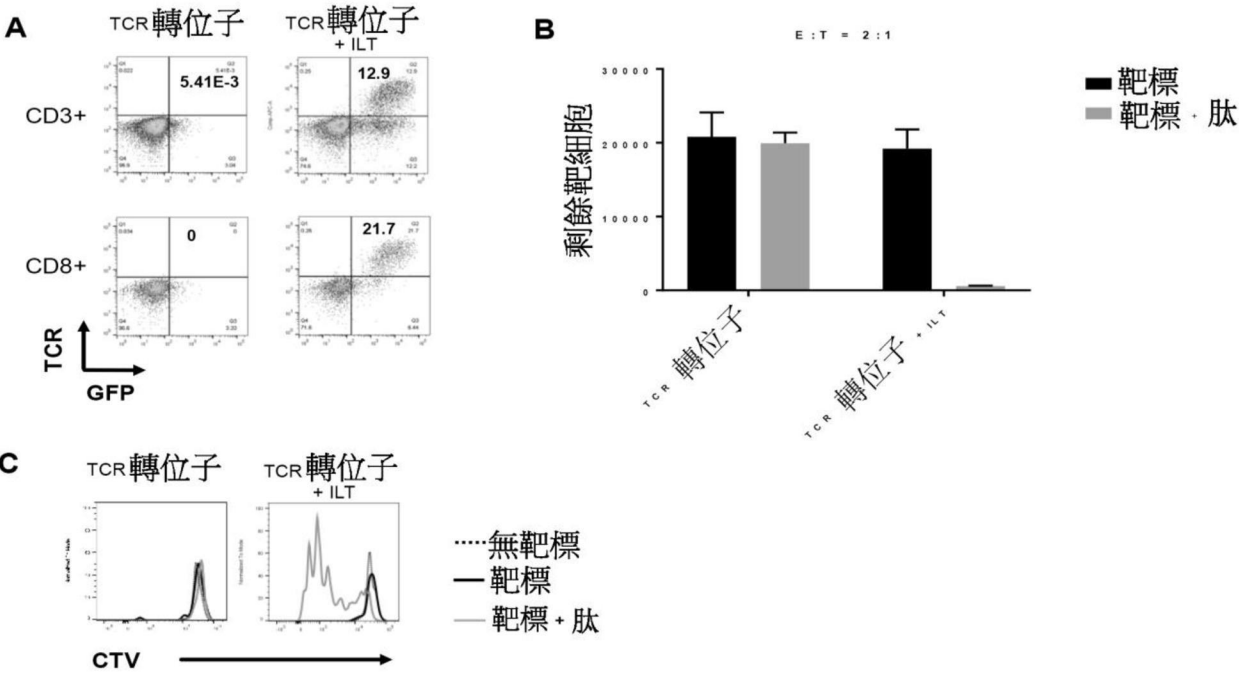
【圖 8A】



【圖 8B】



【圖 9】



【圖 10】