



(21)申請案號：112140518 (22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 13 日

(51)Int. Cl. : C07K16/42 (2006.01) C12N15/85 (2006.01)  
G01N33/53 (2006.01) G01N33/68 (2006.01)

(30)優先權：2012/11/14 美國 61/726,040

(71)申請人：美商再生元醫藥公司(美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)  
美國

(72)發明人：戴席潘德 迪帕利 DESHPANDE, DIPALI (US)；陳 剛 CHEN, GANG (US)；布  
拉科沃 達雅 BURAKOV, DARYA (US)；芬朵 詹姆士 FANDL, JAMES (US)；  
艾德里奇 湯瑪士 ALDRICH, THOMAS (US)；卡瑪特 威席 KAMAT, VISHAL  
(IN)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：28 項 圖式數：0 共 130 頁

## (54)名稱

重組細胞表面捕捉蛋白質

## (57)摘要

本發明提供用於分離並偵測生產經分泌感興趣蛋白質(POI)的細胞之重組細胞表面捕捉蛋白質以及偵測分子，經分泌感興趣蛋白質為諸如具有免疫球蛋白 CH3 域及/或經置換 CH3 域的某些雜二聚體蛋白質。亦提供分離並偵測雙特异性抗體之重組細胞表面捕捉蛋白質以及偵測分子。本發明亦提供能夠辨識並結合至含有在 H95 與 Y96 (IMGT)處有或沒有胺基酸置換的 CH3 域之感興趣蛋白質的重組抗原-結合蛋白質。

Recombinant cell surface capture proteins and detection molecules that are useful for isolating and detecting cells that produce a secreted protein of interest (POI) such as certain heterodimeric proteins that have an immunoglobulin CH3 domain and/or substituted CH3 domain. Recombinant cell surface capture proteins and detection molecules that isolate and detect bispecific antibodies are also provided. The invention also provides recombinant antigen-binding proteins that are capable of recognizing and binding to proteins of interest that contain a CH3 domain with or without amino acid substitutions at H95 and Y96 (IMGT).

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 重組細胞表面捕捉蛋白質

【英文發明名稱】 RECOMBINANT CELL SURFACE CAPTURE PROTEINS

### 【中文】

本發明提供用於分離並偵測生產經分泌感興趣蛋白質(POI)的細胞之重組細胞表面捕捉蛋白質以及偵測分子，經分泌感興趣蛋白質為諸如具有免疫球蛋白CH3域及/或經置換CH3域的某些雜二聚體蛋白質。亦提供分離並偵測雙特異性抗體之重組細胞表面捕捉蛋白質以及偵測分子。本發明亦提供能夠辨識並結合至含有在H95與Y96 (IMGT)處有或沒有胺基酸置換的CH3域之感興趣蛋白質的重組抗原-結合蛋白質。

### 【英文】

Recombinant cell surface capture proteins and detection molecules that are useful for isolating and detecting cells that produce a secreted protein of interest (POI) such as certain heterodimeric proteins that have an immunoglobulin CH3 domain and/or substituted CH3 domain. Recombinant cell surface capture proteins and detection molecules that isolate and detect bispecific antibodies are also provided. The invention also provides recombinant antigen-binding proteins that are capable of recognizing and binding to proteins of interest that contain a CH3 domain with or without amino acid substitutions at H95 and Y96 (IMGT).

【指定代表圖】 無

【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】 重組細胞表面捕捉蛋白質

【英文發明名稱】 RECOMBINANT CELL SURFACE CAPTURE PROTEINS

【技術領域】

【0001】 本發明領域是有關於重組細胞表面捕捉蛋白質以及用以鑑定、分離與濃化生產含有雜二聚體之經分泌蛋白質(例如雙特異性蛋白質)的細胞的方法。更具體而言，該等細胞表面捕捉蛋白質以及方法容許快速並有效分離高表現量重組抗體-生產細胞株，包括快速並有效分離分泌雜二聚體蛋白質(例如雙特異性蛋白質)的特定融合瘤以及細胞，從而濃化該雜二聚體成分(雙特異性分子)且優先將雜二聚體成分與同二聚體成分予以分離。

【先前技術】

【0002】 用以在宿主細胞中表現感興趣基因(GOI)的先前技藝方法為熟知的。簡言之，帶有GOI的表現載體被引入細胞中。在穩定併入後，用以分離高表現量細胞的標準方法涉及收集細胞池、由盤手選集落、藉由限制性稀釋分離單顆細胞，或技藝中已知的其他方法。接著，池或單獨純系被擴張並藉由直接測量POI活性、藉由免疫偵測POI，或藉由其他適當技術來篩選感興趣的蛋白質(POI)的產量。此等程序費力、費時、昂貴且可分析的純系數目通常囿限於幾百個。

【0003】 在穩定併入之後，因為細胞之蛋白質表現為高度不均性，需要努力篩選許多個別純株以鑑定出有穩定高表現量之細胞株的稀少併入結果。這個

需求需要能夠快速鑑定並分離表現蛋白質產量水準最高之細胞的方法。此外，收集純系池或手選集落是冒著損失高表現量細胞的風險，相對於生長較快但表現量低的細胞，這些細胞通常生長地較慢。因此，對於容許快速篩選並分離能夠高度表現經分泌POI之個別細胞的方法存在有需要。若POI含有超過一個次單元，則相對於同二聚體成分需要優先篩選所要雜二聚體成分。

**【0004】** 將流式細胞分析併入用以分離穩定表現細胞株的方法能夠增進篩選大量個別純系的能力，但是，現有方法因為種種原因仍無法勝任。POI在具有不同性質之細胞間擴散也是一個問題。

#### **【發明內容】**

**【0005】** 本發明說明一種藉由直接篩選感興趣蛋白質(POI)用以快速分離分泌蛋白質之彼等細胞的高通量篩選方法。本發明亦容許在單一細胞的基礎上於製造過程期間以習知方法監控POI表現。此外，此技術可直接應用於篩選雙特异性抗體生產細胞，或任何生產雜二聚體蛋白質的細胞。該技術亦可直接應用於篩選生產經修飾T細胞受體的細胞，諸如(例如)生產可溶形式T細胞受體的細胞。

**【0006】** 在一個態樣中，本發明提供一種偵測並分離生產經分泌之感興趣蛋白質(POI)的細胞的方法，其包含：a)構築一個編碼能夠結合POI之細胞表面捕捉分子的核酸分子；b)以步驟a)之該核酸分子轉染表現POI的細胞；c)藉由使該等細胞與偵測分子接觸來偵測細胞表面展示的POI，其中該偵測分子結合該POI；以及d)基於該偵測分子來分離細胞。

【0007】 在不同具體例中，感興趣蛋白質包括配體、可溶性受體蛋白質、生長因子、融合蛋白質、抗體、雙特異性抗體、Fab、單鏈抗體(ScFv)或其片段。若感興趣蛋白質為抗體時，則該抗體是選自由IgM、IgG、IgA、IgD或IgE組成之群，以及此等之各種亞型或變體。在一個特定具體例中，該抗體為抗-Dll4抗體、抗-ErbB3抗體、抗-EGFR抗體、雙特異性抗-ErbB3/EGFR雙特異性抗體，或抗-IL-6受體抗體。

【0008】 在更特定具體例中，感興趣蛋白質為選自由介白素(IL)-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-13、IL15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、睫狀神經滋養因子(CNTF)、紅血球生成素、血管內皮生長因子(VEGF)、血管生長素1 (Ang-1)、血管生長素2 (Ang-2)、TNF、干擾素 $\gamma$ 、GM-CSF、TGF $\beta$ 以及TNF受體組成之群的生長因子。

【0009】 在不同具體例中，感興趣蛋白質包含T細胞受體的可變域。在特定具體例中，感興趣蛋白質為可溶性T細胞受體(sTCR)，或包含融合至Fc之T細胞受體胞外域的蛋白質(TCR-Fc)。在一個特定具體例中，Fc為人類Fc。在不同具體例中，該蛋白質包含T細胞受體胞外域的可變域。在不同具體例中，該蛋白質包含T細胞受體胞外域的一可變域以及一恆定區。

【0010】 編碼感興趣蛋白質的核酸可以是來自任何來源，天然或透過重組技術構築，且可以從DNA庫中篩選。

【0011】 在不同具體例中，細胞表面捕捉分子為配體-特異性受體、受體-特異性配體、抗體-結合蛋白質、抗體或抗體分子(諸如ScFv)或肽。當捕捉分子為肽時，該肽是分離自噬菌體展示庫。在更特定具體例中，該捕捉分子可以是Ang1、Ang2、VEGF、Tie1、Tie2、VEGFRI (Flt1)、VEGFRII (Flk1或KDR)、CNTF、

CNTRF- $\alpha$ 、細胞激素受體組分、兩個或更多個細胞激素受體組分的融合物，或其片段。當捕捉分子為抗體-結合蛋白質時，抗體-結合蛋白質可以是Fc受體、抗-免疫球蛋白抗體、抗-免疫球蛋白(抗-Ig) ScFv、抗-Fc抗體、抗-Fc\*抗體、蛋白質A、蛋白質L、蛋白質G、蛋白質H或其功能片段。更確切地說，在一些具體例中，捕捉分子為包含融合至穿膜域或GPI連結子之抗原、蛋白質A或抗-Ig ScFv的融合蛋白質。

**【0012】** 在不同具體例中，若感興趣蛋白質為T細胞受體可變域，則該細胞表面捕捉分子包含Fc受體或能夠被T細胞受體的可變域辨識之膜締合抗原。

**【0013】** 在一些具體例中，若感興趣蛋白質為異二聚體蛋白質，諸如具有第一次單元以及第二次單元的異二聚體蛋白質，則該細胞表面捕捉分子包含能夠結合該第一次單元而非第二次單元的抗原、蛋白質A，或ScFv。

**【0014】** 在不同具體例中，若感興趣蛋白質為IgG1、IgG2、IgG4或具有一個包含一個消除結合至蛋白質A之突變的CH3域以及另一個能夠結合至蛋白質A之CH3域的雙特異性蛋白質；或包含IgG1、IgG2、IgG4之Fc區，或具有一個包含一個消除結合至蛋白質A之突變的CH3域以及另一個能夠結合至蛋白質A之CH3域之Fc區的融合蛋白質，則該細胞表面捕捉分子包含抗-免疫球蛋白ScFv，諸如抗-Fc或抗-Fc\* ScFv。

**【0015】** 在一些具體例中，本發明方法進一步包含將POI錨定至細胞膜、暴露於細胞外側，且因此作為細胞表面捕捉分子的膜錨定體。在特定具體例中，該膜錨定體是穿膜錨定體或GPI連結子。具體穿膜錨定體的實例包括Fc受體的穿膜域，諸如人類Fc $\gamma$ RI的穿膜域，其實例列舉於SEQ ID NO：17中。膜錨定體對細胞可以是天然的、重組的或合成的。

【0016】 在不同具體例中，感興趣蛋白質包含T細胞受體可變區，且該細胞表面捕捉分子包含膜締合抗原。在一個特定具體例中，該膜締合抗原為重組融合蛋白質，其包含可被融合至膜錨定體之T細胞受體可變區辨識的抗原，其中該抗原與細胞表面締合。在一個特定具體例中，該重組融合蛋白質包含融合至穿膜錨定體或GPI連結子的抗原。在另一個特定具體例中，該細胞表面捕捉分子包含含有膜錨定體及能夠結合至主要組織相容性(MHC)分子之抗原的重組融合蛋白質，其包括(但不限於)例如腫瘤抗原以及經轉形表現型的自身抗原。

【0017】 在其他具體例中，將訊號序列添加至POI的胺基端，使得該蛋白質被運輸至細胞表面，並且如同細胞表面捕捉分子般作用。該訊號序列對細胞可以是天然的、重組的或合成的。

【0018】 在不同具體例中，添加結合細胞表面捕捉分子的阻斷分子以減少POI從表現細胞擴散至相鄰細胞。在另一個具體例中，藉由增加培養基黏度減少POI從表現細胞擴散至相鄰細胞及其對相鄰細胞的附著。

【0019】 藉由本發明方法分離的細胞可以是融合至不朽細胞的抗體-生產細胞。在更特定的具體例中，該抗體-生產細胞為B-細胞或其衍生細胞。B-細胞衍生細胞可以是漿細胞、融合瘤、骨髓瘤或重組細胞。

【0020】 此外，本發明方法可用於鑑定表現具有所要特異性、親和力或同型之經分泌抗體的B細胞及其衍生細胞，或融合瘤。本發明亦用於分離表現所要含量之抗體或抗體片段的細胞。

【0021】 使用所展示之POI偵測細胞可以透過採用任一種能夠直接或間接結合所展示之POI的分子而達成。此等偵測分子可幫助偵測及/或分離展示POI的



細胞。在一個具體例中，使用彼此結合且標定不同的兩個分子。偵測及/或分離可以透過技藝中熟知的標準技術來完成。

**【0022】** 在另一個態樣中，本發明特徵為一種偵測以及分離生產經分泌之感興趣蛋白質(POI)之細胞的方法，其包含：a)以編碼細胞表面捕捉分子的核酸轉染細胞，其中該細胞表面捕捉分子能夠結合該POI；b)同時或依序以編碼POI的第二核酸轉染a)之細胞，其中該POI被表現並分泌；c)藉由使細胞與一結合POI之偵測分子接觸來偵測細胞表面展示的POI；以及d)基於該偵測分子來分離細胞。

**【0023】** 在另一個態樣中，本發明特徵為一種偵測以及分離生產POI之細胞的方法，其包含：a)偵測以高產量表現細胞表面捕捉分子的細胞；b)分離並培養在(a)中偵測到的細胞；(c)以編碼POI之核酸轉染(b)中之細胞，其中該POI被分泌；d)藉由使細胞與一結合該POI之偵測分子接觸來偵測表面展示的POI；以及(e)基於該偵測分子來分離細胞。

**【0024】** 在另一個態樣中，本發明提供一種偵測以及分離生產高含量感興趣蛋白質(POI)之細胞的方法，其包含：a)以編碼能夠結合POI之細胞表面捕捉分子的核酸轉染細胞，其中該細胞表現POI；b)偵測(a)之以高產量表現該細胞表面捕捉分子的細胞；c)分離並培養高產量細胞；d)藉由使細胞與一結合POI之偵測分子接觸來偵測表面展示的POI；以及(e)分離偵測到的細胞。

**【0025】** 在另一個態樣中，本發明提供一種偵測以及分離生產高含量雜二聚體蛋白質之細胞的方法，其包含：(a)以編碼細胞表面捕捉分子的核酸轉染細胞，其為包含膜錨定體域的融合蛋白質且能夠結合該雜二聚體蛋白質的第一次單元，其中該細胞表現該雜二聚體蛋白質；(b)偵測(a)之以高產量表現該表面捕

捉分子的細胞；(c)分離並培養以高產量表現該表面捕捉分子的細胞；(d)以結合該雜二聚體蛋白質之第二次單元的偵測分子偵測步驟(c)之經分離且培養的細胞表面上的雜二聚體蛋白質；以及(e)分離在步驟(d)中偵測到之在其表面上帶有所偵測雜二聚體蛋白質的細胞。

**【0026】** 在另一個態樣中，本發明提供一種偵測以及分離生產高含量免疫球蛋白之細胞的方法，其包含：(a)以編碼能夠結合免疫球蛋白之細胞表面捕捉分子的核酸轉染細胞，其中該細胞表現該免疫球蛋白；(b)偵測(a)之以高產量表現該表面捕捉分子的細胞；(c)分離並培養以高產量表現該表面捕捉分子的細胞；(d)以結合該免疫球蛋白之一偵測分子偵測步驟(c)之經分離且培養的細胞表面上的免疫球蛋白；以及(e)分離在步驟(d)中偵測到之在其表面上帶有所偵測免疫球蛋白的細胞。

**【0027】** 在另一個態樣中，本發明提供一種偵測以及分離生產高含量雙特異性抗體之細胞的方法，其包含：(a)以編碼細胞表面捕捉分子的核酸轉染細胞，其中該細胞表面捕捉分子為包含膜錨定體域的融合蛋白質，諸如ScFv融合蛋白質並且能夠結合該雙特異性抗體，其中該細胞表現該雙特異性抗體；(b)偵測(a)之以高產量表現該表面捕捉分子的細胞；(c)分離並培養以高產量表現該表面捕捉分子的細胞；(d)以結合該雙特異性抗體之一偵測分子偵測步驟(c)之經分離且培養的細胞表面上的雙特異性抗體；以及(e)分離在步驟(d)中偵測到之在其表面上帶有所偵測雙特異性抗體的細胞。

**【0028】** 在另一個態樣中，提供一種偵測生產所要含量之親合劑的細胞的方法，該親合劑包含T-細胞受體(TCR)可變區。

【0029】 在另一個態樣中，提供一種偵測生產所要含量之TCR-Fc之細胞的方法，其包含：(a)以編碼能夠結合TCR-Fc之Fc受體的核酸轉染細胞，其中該細胞表現被TCR-Fc辨識的抗原；(b)偵測(a)之以高產量表現該TCR-Fc的細胞；(c)分離並培養以高產量表現該TCR-Fc的細胞；(d)以一偵測分子偵測步驟(c)之經分離且培養的細胞表面上的抗原；以及(e)分離在步驟(d)中偵測到之在其表面上帶有所偵測抗原的細胞。

【0030】 在不同具體例中，TCR是選自人類TCR以及鼠類TCR，諸如大鼠TCR、小鼠TCR或倉鼠TCR。在一個特定具體例中，該Fc為人類Fc。在另一個特定具體例中，該Fc為人類Fc而該Fc受體為高親和力人類Fc受體。在一個特定具體例中，該高親和力人類Fc受體為人類Fc $\gamma$ RI。

【0031】 在不同具體例中，該細胞表面捕捉蛋白質為表面結合的抗原。在一個特定具體例中，該抗原藉由融合至穿膜域或GPI連結子而結合至表面。

【0032】 在用以篩選增加生產感興趣蛋白質之細胞的方法的一些態樣中，重組抗原-結合蛋白質可用作為細胞表面捕捉蛋白質(CSCP)、偵測分子(DM)，及/或阻斷分子。因此，本發明提供重組抗原-結合蛋白質。

【0033】 在一個態樣中，本發明提供一種重組抗原-結合蛋白質，其結合人類IgG1-Fc域、人類IgG2-Fc域，或人類IgG4-Fc域，或任何包含例如SEQ ID NO：26之編碼人類Fc之胺基酸序列的蛋白質。在一些具體例中，如在表面電漿共振分析中所測，該重組抗原-結合蛋白質以低於約40 nM的K<sub>D</sub>結合該多肽。

【0034】 在一些具體例中，該重組抗原-結合蛋白質包含重鏈可變區(HCVR)的一或多個互補決定區(CDR)，其具有與SEQ ID NO：15至少95%一致的胺基酸序列，或包含輕鏈可變區(LCVR)的一或多個互補決定區，其具有與SEQ

ID NO：16至少95%一致的胺基酸序列。在一個例子中，該蛋白質包含具有胺基酸序列SEQ ID NO：27之重鏈CDR-1 (HCDR-1)、具有胺基酸序列SEQ ID NO：28之HCDR-2、具有胺基酸序列SEQ ID NO：29之HCDR-3、具有胺基酸序列SEQ ID NO：30之輕鏈CDR-1 (LCDR-1)，以及具有胺基酸序列SEQ ID NO：31之LCDR-2。在一些例子中，該蛋白質包含具有與SEQ ID NO：15至少95%一致之胺基酸序列的HCVR (其中一些與SEQ ID NO：15一致)以及具有與SEQ ID NO：16至少95%一致之胺基酸序列的LCVR (其中一些與SEQ ID NO：16一致)。

**【0035】** 重組抗原-結合蛋白質(其為抗體)可用作為偵測分子(DM)。

**【0036】** 在一些具體例中，該重組抗原-結合蛋白質為ScFv融合蛋白質，其在一些例子包含一具有與SEQ ID NO：15至少95%一致(或與其一致)之胺基酸序列的重鏈可變域、一具有與SEQ ID NO：16至少95%一致(或與其一致)之胺基酸序列的輕鏈可變域，以及一膜錨定體域。在一個具體例中，該膜錨定體域衍生自Fc受體，諸如人類FcγRI蛋白質的穿膜域，如SEQ ID NO：17或SEQ ID NO：21所表示，其不僅含有穿膜域，還含有C端細胞質域(SEQ ID NO：18)。在一個特定具體例中，該ScFv融合蛋白質具有SEQ ID NO：19的胺基酸序列。重組抗原-結合蛋白質(其為ScFv融合蛋白質)可用作為CSCP以及作為DM。

**【0037】** 在另一個態樣中，本發明提供一編碼先前態樣之抗原-結合蛋白質的多核苷酸。在一個具體例中，諸如在抗原-結合蛋白質為抗體的例子中，該多核苷酸編碼輕鏈。相同地，該多核苷酸可編碼重鏈。在一個該抗原-結合蛋白質為ScFv融合蛋白質的例子中，該多核苷酸可編碼SEQ ID NO：19之ScFv-FcγRTM-cyto融合蛋白質。舉例而言，SEQ ID NO：的多核苷酸編碼SEQ ID NO：19。

**【0038】** 在另一個態樣中，本發明提供一種包括先前態樣之多核苷酸的核酸載體。在一個具體例中，該載體包含編碼抗原-結合蛋白質的多核苷酸，其可操作地連結至一上游啟動子，且接而為一下游聚腺苷酸化序列。該啟動子可以是任一種啟動子，諸如(例如) **CMV** 啟動子。因此，在一個例子中，該載體可含有SEQ ID NO：25的序列。在一個具體例中，該載體可含有編碼一可篩選標記的核酸序列，該可篩選標記為諸如(例如)新黴素抗性。在一個具體例中，該載體可含有編碼能量轉移蛋白質的核酸序列，該能量轉移蛋白質為諸如綠色螢光蛋白質(**GFP**)或其衍生物(諸如黃色螢光蛋白質(**YFP**))。因此在一個例子中，該載體可含有SEQ ID NO：24的序列。

**【0039】** 該載體可以是環狀或線狀，宿主細胞基因組的游離基因組或併入宿主細胞基因組中。在一些具體例中，該載體為環狀質體，其在一個特定具體例中就**ScFv-FcγR-TM-cyto**-編碼多核苷酸而言具有SEQ ID NO：23的核酸序列，在另一個特定具體例中具有抗體重鏈-編碼多核苷酸的核酸序列，而在又另一個特定具體例中具有抗體輕鏈-編碼多核苷酸的核酸序列。在一些具體例中，該載體為線狀構築體，其可併入宿主細胞染色體中。在一個特定具體例中，該線狀構築體就**ScFv-FcγR-TM-cyto**-編碼多核苷酸而言具有SEQ ID NO：22的核酸序列。在另一個特定具體例中，該線狀構築體包含抗體重鏈-編碼多核苷酸的核酸序列。在又另一個特定具體例中，該線狀構築體包含抗體輕鏈-編碼多核苷酸的核酸序列。

**【0040】** 該宿主細胞可為任一種細胞，原核細胞或真核細胞。但是，在一個特定具體例中，該宿主細胞為**CHO**細胞，諸如**CHO-K1**細胞。

【0041】 在另一個態樣中，本發明提供一種表現先前態樣之抗原-結合蛋白質，及/或含有先前態樣之多核苷酸或核酸載體的宿主細胞。在一些具體例中，該宿主細胞為CHO細胞。在一個特定具體例中，該宿主細胞為CHO-K1細胞。在一個具體例中，依據本申請案中揭示之方法，宿主細胞用來生產感興趣蛋白質，而該抗原-結合蛋白質用作為細胞表面捕捉蛋白質。

【0042】 在一個態樣中，本發明提供一種用於生產感興趣蛋白質的宿主細胞。該宿主細胞帶有先前態樣之多核苷酸或核酸載體，並生產先前態樣之抗原-結合蛋白質，其用作為細胞表面捕捉蛋白質。該細胞表面捕捉蛋白質結合至宿主細胞內之感興趣蛋白質，且透過細胞的分泌機制被運輸，並被表現在宿主細胞的表面上。因此，在一個具體例中，該宿主細胞包含位在宿主細胞細胞膜上之細胞表面捕捉蛋白質，其中捕捉部分面向細胞外側。在一個具體例中，該細胞表面捕捉分子結合至感興趣蛋白質，其位在細胞膜處且朝向細胞外側。

【0043】 在一個具體例中，該宿主細胞生產或能夠生產ScFv融合蛋白質，該融合蛋白質結合至含有Fc域之感興趣蛋白質，其在IMGT位置95處含有一個組胺酸而在IMGT位置96處含有一個酪胺酸。實例包括IgG1、IgG2以及IgG4蛋白質。在一個具體例中，該ScFv融合蛋白質含有SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：29、SEQ ID NO：30，以及SEQ ID NO：31中所列胺基酸序列。在一個特定具體例中，該ScFv融合蛋白質含有SEQ ID NO：19的胺基酸序列。在一個特定具體例中，該宿主細胞包含位在細胞膜處且結合至IgG1、IgG2或IgG4，或含有IgG1、IgG2或IgG4之至少一個重鏈的雙特異性抗體的細胞表面捕捉蛋白質，且其可具有由另一型組成或含有一或多個胺基酸置換的第二重鏈。

【0044】 在一個態樣中，本發明提供一種結合經置換CH3多肽的重組抗原-結合蛋白質，該經置換CH3多肽包含一或多個選自以下組成之群的胺基酸置換：依據IMGT外顯子編號系統的(a) 95R，以及(b) 95R與96F，或依據EU編號系統的(a') 435R與(b') 435R和436F，或含有例如SEQ ID NO：42之胺基酸序列的任一種蛋白質，其編碼經置換人類Fc (亦已知為Fc\*)。在一些具體例中，如在表面電漿共振分析中所測，該重組抗原-結合蛋白質以低於約60 nM的 $K_D$ 結合該多肽。

【0045】 在一些具體例中，該重組抗原-結合蛋白質包含重鏈可變區(HCVR)之一或多個互補決定區(CDR)(其具有與SEQ ID NO：38至少95%一致的胺基酸序列)，或輕鏈可變區(LCVR)之一或多個互補決定區(其具有與SEQ ID NO：39至少95%一致的胺基酸序列)。在一個例子中，該蛋白質包含具有胺基酸序列SEQ ID NO：32之重鏈CDR-1 (HCDR-1)、具有胺基酸序列SEQ ID NO：33之HCDR-2、具有胺基酸序列SEQ ID NO：34之HCDR-3、具有胺基酸序列SEQ ID NO：35之輕鏈CDR-1 (LCDR-1)，以及具有胺基酸序列SEQ ID NO：36之LCDR-2。在一些例子中，該蛋白質含有具有與SEQ ID NO：38至少95%一致之胺基酸序列的HCVR (其中一些與SEQ ID NO：38一致)以及具有與SEQ ID NO：39至少95%一致之胺基酸序列的LCVR (其中一些與SEQ ID NO：39一致)。

【0046】 在一些具體例中，該重組抗原-結合蛋白質為抗體，其包含一重鏈以及一輕鏈。該重鏈可包含與SEQ ID NO：40至少95%一致(或100%一致)的胺基酸序列。該輕鏈可包含與SEQ ID NO：41至少95%一致(或100%一致)的胺基酸序列。重組抗原-結合蛋白質(其為抗體)可用作為偵測分子(DM)。

【0047】 在一些具體例中，該重組抗原-結合蛋白質為ScFv融合蛋白質，其

在一些例子中包含一具有與SEQ ID NO：38至少95%一致(或一致)之胺基酸序列

的重鏈可變域、一具有與SEQ ID NO：39至少95%一致(或一致)之胺基酸序列的輕鏈可變域，以及一膜錨定體域。在一個具體例中，該膜錨定體域是衍生自Fc受體，諸如人類FcγR1蛋白質的穿膜域，如SEQ ID NO：17或SEQ ID NO：21所表示，其不僅含有穿膜域，還含有SEQ ID NO：19的C端細胞質域。在一個特定具體例中，該ScFv融合蛋白質具有SEQ ID NO：43的胺基酸序列。重組抗原-結合蛋白質(其為ScFv融合蛋白質)可用作為CSCP以及作為DM。

【0048】 在另一個態樣中，本發明提供一編碼先前態樣之抗原-結合蛋白質的多核苷酸。在一個具體例中，諸如在抗原-結合蛋白質為抗體的例子中，該多核苷酸編碼輕鏈，諸如(例如) SEQ ID NO：41的輕鏈。相同地，該多核苷酸可編碼重鏈，諸如(例如) SEQ ID NO：40的重鏈。在該抗原-結合蛋白質為ScFv融合蛋白質的例子中，該多核苷酸可編碼SEQ ID NO：43之ScFv-FcγR-TM-cyto融合蛋白質。代表性例示性多核苷酸分別包括SEQ ID NO：49、50與51的彼等多核苷酸。

【0049】 在另一個態樣中，本發明提供一種含括先前態樣之多核苷酸的核酸載體。在一個具體例中，該載體包含編碼抗原-結合蛋白質的多核苷酸，其可操作地連結至一上游啟動子，且接而為一下游聚腺苷酸化序列。該啟動子可以是任一種啟動子，諸如(例如) CMV啟動子。因此，在一個例子中，該載體可含有SEQ ID NO：47的序列。在一個具體例中，該載體可含有編碼一可篩選標記的核酸序列，該可篩選標記為諸如(例如)新黴素抗性。在一個具體例中，該載體可含有編碼能量轉移蛋白質的核酸序列，該能量轉移蛋白質為諸如綠色螢光蛋白質(GFP)或其衍生物(諸如黃色螢光蛋白質(YFP))。因此在一個例子中，該載體可含有SEQ ID NO：46的序列。



【0050】 該載體可以是環狀或線狀，宿主細胞基因組的游離基因組或併入宿主細胞基因組中。在一些具體例中，該載體為環狀載體，其在一個特定具體例中就ScFv-FcγR-TM-cyto-編碼多核苷酸而言具有SEQ ID NO：44的核酸序列，在另一個特定具體例中具有抗體重鏈-編碼多核苷酸的核酸序列，而在又另一個特定具體例中具有抗體輕鏈-編碼多核苷酸的核酸序列。在一些具體例中，該載體為線狀構築體，其可併入宿主細胞染色體中。在一個特定具體例中，該線狀構築體就ScFv-FcγR-TM-cyto-編碼多核苷酸而言具有SEQ ID NO：51的核酸序列。在另一個特定具體例中，該線狀構築體就抗體重鏈-編碼多核苷酸而言包含SEQ ID NO：50的核酸序列。在又另一個特定具體例中，該線狀構築體就抗體輕鏈-編碼多核苷酸而言包含SEQ ID NO：49的核酸序列。

【0051】 該宿主細胞可為任一種細胞，原核細胞或真核細胞。但是，在一個特定具體例中，該宿主細胞為CHO細胞，諸如CHO-K1細胞。

【0052】 在另一個態樣中，本發明提供一種表現先前態樣之抗原-結合蛋白質，及/或含有先前態樣之多核苷酸或核酸載體的宿主細胞。在一些具體例中，該宿主細胞為CHO細胞。在一個特定具體例中，該宿主細胞為CHO-K1細胞。在一個具體例中，依據本申請案中揭示之方法，宿主細胞用來生產感興趣蛋白質，而該抗原-結合蛋白質用作為細胞表面捕捉蛋白質。

【0053】 在一個態樣中，本發明提供一種用於生產感興趣蛋白質的宿主細胞。該宿主細胞帶有先前態樣之多核苷酸或核酸載體，並生產先前態樣之抗原-結合蛋白質，其用作為細胞表面捕捉蛋白質。該細胞表面捕捉蛋白質結合至宿主細胞內之感興趣蛋白質，且透過細胞的分泌機制被運輸，並被表現在宿主細胞的表面上。因此，在一個具體例中，該宿主細胞包含位在宿主細胞細胞膜內

之細胞表面捕捉蛋白質，其中捕捉部分面向細胞外側。在一個具體例中，該細胞表面捕捉分子結合至感興趣蛋白質，其位在細胞膜處且朝向細胞外側。

**【0054】** 在一個具體例中，該宿主細胞生產或能夠生產ScFv融合蛋白質，該融合蛋白質結合至含有Fc域之感興趣蛋白質，其在IMGT位置95處含有一個精胺酸而在IMGT位置96處含有一個苯丙胺酸(Fc\*)。實例包括IgG3與IgG1、IgG2以及IgG4蛋白質之經置換CH3區。在一個具體例中，該ScFv融合蛋白質含有SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：34、SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：36，以及SEQ ID NO：37中所列胺基酸序列。在一個特定具體例中，該ScFv融合蛋白質含有SEQ ID NO：43的胺基酸序列。在一個特定具體例中，該宿主細胞包含位在細胞膜處且結合至IgG3或經置換IgG1、IgG2或IgG4(其在IMGT位置95處含有精胺酸而在IMGT位置96處含有苯丙胺酸("Fc\*"))，或含有Fc\*型的至少一個重鏈與另一重鏈為IgG1、IgG2或IgG4野生型之雙特異性抗體的細胞表面捕捉蛋白質。

**【0055】** 在另一個態樣中，本發明提供一種偵測、分離或濃化穩定地表現感興趣蛋白質(POI)之細胞的方法。該方法包括在宿主細胞中表現細胞表面捕捉蛋白質(CSCP)以及POI的步驟。依據本方法，該CSCP結合至POI上的"第一位點"以便在宿主細胞內形成CSCP-POI複合體。這個CSCP-POI複合體接而透過宿主細胞的分泌系統被運輸，且從細胞被分泌。因為CSCP含有膜結合域(例如SEQ ID NO：17)，該CSCP-POI複合體被展示在宿主細胞的表面上，其中POI暴露於細胞外側。依據該方法，該宿主細胞接著與偵測分子(DM)接觸，DM結合至POI的"第二位點"。彼等結合DM的細胞經篩選以供鑑定、分離、集中，及/或濃化之用。在一個具體例中，經DM結合宿主細胞是藉由螢光活化細胞分選來進行篩選。

【0056】 在一個具體例中，該方法亦包括在篩選宿主細胞之前使細胞與阻斷分子接觸的步驟。阻斷分子結合至未結合POI之任一CSCP。阻斷分子不會結合至CSCP-POI複合體。

【0057】 在一些具體例中，該POI含有多個次單元，諸如含有兩個重鏈以及兩個輕鏈的抗體。在那樣的例子中，POI上的第一位點可以位在第一次單元上，而POI的第二位點位在第二次單元上。在一些具體例中，該POI含有多個次單元，諸如雜二聚體蛋白質。在雜二聚體蛋白質的例子中，POI上的第一位點可以位在第一次單元(諸如第一受體)上，而POI的第二位點可以位在第二受體上。在一些具體例中，該等雜二聚體蛋白質是可以交互作用以形成雜二聚體的不同受體。若POI為抗體，則POI上的第一位點可以位在第一重鏈上，而POI上的第二位點可以位在第二重鏈上。在一些具體例中，該抗體含有因為至少一個胺基酸差異而有所不同的次單元，諸如具有至少一個帶有野生型CH3域之重鏈以及在CH3域中帶有至少一個胺基酸置換之另一個重鏈的抗體。在這個例子中，CSCP可以是如本文所述的抗原-結合蛋白質，諸如抗原或抗-Ig ScFv融合蛋白質。在此，偵測分子(DM)可包含如本文所述經標記重組抗原-結合蛋白質，諸如經標記抗原或抗-Ig抗體或ScFv分子。

【0058】 在一些例子中，例如POI為雙特異性抗體時，該第一位點可以位在具有CH3域的重鏈上，該CH3域在依據IMGT外顯子編號系統的位置95處含有一個組胺酸殘基，且依據IMGT外顯子編號系統的位置96處含有一個酪胺酸殘基(Fc)。接而，該第二位點可以位在具有CH3域的重鏈上，該CH3域在依據IMGT外顯子編號系統的位置95處含有一個精胺酸殘基，且依據IMGT外顯子編號系統的位置96處含有一個苯丙胺酸殘基(Fc\*)。在這個例子中，CSCP可以是先前態樣

中所述的抗原-結合蛋白質，諸如含有SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：29、SEQ ID NO：30以及SEQ ID NO：31的胺基酸序列的ScFv融合蛋白質；其在一個特定具體例中包含SEQ ID NO：19。在此，該偵測分子(DM)亦可包含先前態樣中所述經標記重組抗原-結合蛋白質，諸如抗體或含有SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：34、SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：36，以及SEQ ID NO：37之胺基酸序列的ScFv分子；其在一個特定具體例中包含SEQ ID NO：40或SEQ ID NO：41 (抗-Fc\*抗體)、或SEQ ID NO：43 (ScFv\*)。在此，該阻斷分子可以是Fc多肽(例如單鏈)，諸如hFc，或可結合至CSCP但卻不會結合至DM的任一種分子。在一個具體例中，該偵測分子可以是經標記抗-人類IgG F(ab')<sub>2</sub>。

**【0059】** 在POI為雙特異性抗體的其他例子中，該第一位點可以位在具有CH3域的重鏈上，該CH3域在依據IMGT外顯子編號系統的位置95處含有一個精胺酸殘基，且依據IMGT外顯子編號系統的位置96處含有一個苯丙胺酸殘基(Fc\*)。接而，該第二位點可以位在具有CH3域的重鏈上，該CH3域在依據IMGT外顯子編號系統的位置95處含有一個組胺酸殘基，且依據IMGT外顯子編號系統的位置96處含有一個酪胺酸殘基。在這個例子中，CSCP可以是先前態樣中所述的抗原-結合蛋白質，諸如含有SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：34、SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：36，以及SEQ ID NO：37的胺基酸序列的ScFv融合蛋白質；其在一個特定具體例中包含SEQ ID NO：43。在此，該偵測分子(DM)亦可包含先前態樣中所述經標記重組抗原-結合蛋白質，諸如抗體或含有SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：29、SEQ ID NO：30，以及SEQ ID NO：31之胺基酸序列的ScFv分子；其在一個特定具體例中包含重鏈或輕鏈(抗-hFc抗體)，或SEQ ID NO：19 (ScFv)。在此，該阻斷分子可以是Fc\*多肽(例如單鏈)，

或可結合至CSCP但卻不會結合至DM的任一種分子。在一個具體例中，該偵測分子可以是經標記抗-人類IgG F(ab')<sub>2</sub>。

**【0060】** 在一些具體例中，本發明提供一種偵測或分離穩定地表現雜二聚體蛋白質之細胞的方法，其包含以下步驟(a)在宿主細胞中表現細胞表面捕捉蛋白質(CSCP)以及雜二聚體蛋白質，其中(i)該CSCP結合至該雜二聚體蛋白質上的第一位點以便在宿主細胞內形成CSCP-雜二聚體蛋白質複合體、(ii)該CSCP-雜二聚體蛋白質複合體透過宿主細胞被運輸，以及(iii)接著被展示在宿主細胞的表面上；(b)使宿主細胞與偵測分子接觸，其中該偵測分子結合至POI上的第二位點；以及(c)篩選結合該偵測分子的宿主細胞。在一些具體例中，該雜二聚體蛋白質包含多個次單元且在POI上之第一位點位於第一次單元上，而在POI上之第二位點位於第二次單元上。在一些具體例中，該細胞表面捕捉分子包含能夠結合該第一次單元但不結合第二次單元的抗原、蛋白質A，或ScFv。

**【0061】** 在一個態樣中，本發明提供一種生產雙特異性抗體的方法，其包含在宿主細胞中表現細胞表面捕捉蛋白質(“CSCP”)、抗體輕鏈、第一抗體重鏈(其包含在IMGT位置95處含有組胺酸而在IMGT位置96處含有酪胺酸的CH3域)，以及第二抗體重鏈(其包含在IMGT位置95處含有精胺酸而在IMGT位置96處含有苯丙胺酸的CH3)的步驟。儘管是在宿主細胞內，CSCP結合至第一抗體重鏈但不結合至第二抗體重鏈，該第二抗體重鏈結合至該第一抗體重鏈，而該等輕鏈結合至該等重鏈，因而形成CSCP-抗體三級複合體。這個三級複合體被分泌並呈現在宿主細胞表面上。宿主細胞可以與阻斷分子接觸，阻斷分子結合至細胞表面上的CSCP，但僅有在CSCP未結合至感興趣抗體的彼等情況下，亦即”空的”CSCP。接著，宿主細胞與結合至或能夠結合至第二抗體重鏈的DM接觸。結

合DM的宿主細胞經鑑定、篩選，及/或集中。在一些具體例中，結合DM的宿主細胞經篩選、集中、培養以及擴張，然後進入另一回合的表現、偵測、篩選、集中及擴張。這個程序可以重複數次而濃化，以供生產高效價(titer)的雙特異性抗體。

【0062】 在一個具體例中，本方法中所採用的CSCP為ScFv-融合蛋白質，其含有SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：29、SEQ ID NO：30，以及SEQ ID NO：31的胺基酸序列。在一個具體例中，該CSCP含有SEQ ID NO：19的胺基酸序列。在一個具體例中，本方法中所採用的DM為含有SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：34、SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：36，以及SEQ ID NO：37之胺基酸序列的蛋白質。在一個具體例中，該DM為包含SEQ ID NO：40之重鏈序列以及SEQ ID NO：41之輕鏈序列的抗體。在另一個具體例中，該DM為含有SEQ ID NO：43之胺基酸序列的ScFv融合蛋白質。標記(例如螢光部分，像是FITC或Alexa Fluor®488)可附接至DM。螢光活化細胞分選可用作為偵測以及篩選的方法。

【0063】 在一個替代性具體例中，生產雙特異性抗體的方法包含在宿主細胞中表現細胞表面捕捉蛋白質(“CSCP”)、抗體輕鏈、第一抗體重鏈(其包含在IMGT位置95處含有精胺酸而在IMGT位置96處含有苯丙胺酸的CH3域(Fc\*))，以及第二抗體重鏈(其包含在IMGT位置95處含有組胺酸而在IMGT位置96處含有酪胺酸的CH3域)的步驟。儘管是在宿主細胞內，CSCP結合至第一抗體重鏈但不結合至第二抗體重鏈，該第二抗體重鏈結合至該第一抗體重鏈，而該等輕鏈結合至該等重鏈，因而形成CSCP-抗體三級複合體。這個三級複合體被分泌並呈現在宿主細胞表面上。宿主細胞可以與阻斷分子接觸，阻斷分子結合至細胞表面

上的CSCP，但僅有在CSCP未結合至感興趣抗體的彼等情況下，亦即”空的”CSCP。接著，宿主細胞與結合至或能夠結合至第二抗體重鏈的DM接觸。結合DM的宿主細胞經鑑定、篩選，及/或集中。在一些具體例中，結合DM的宿主細胞經篩選、集中、培養以及擴張，然後進入另一回合的表現、偵測、篩選、集中及擴張。這個程序可以重複數次而濃化，以供生產高效價的雙特異性抗體。

**【0064】** 在這個替代性具體例的一個具體例中，本方法中所採用的CSCP為ScFv-融合蛋白質，其含有SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：34、SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：36，以及SEQ ID NO：37的胺基酸序列。在一個具體例中，該CSCP含有SEQ ID NO：43的胺基酸序列。在一個具體例中，本方法中所採用的DM為含有SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：28、SEQ ID NO：29、SEQ ID NO：30，以及SEQ ID NO：31之胺基酸序列的蛋白質。在一個具體例中，該DM為包含重鏈序列以及輕鏈序列的抗體。在另一個具體例中，該DM為含有SEQ ID NO：19之胺基酸序列的ScFv融合蛋白質。標記(例如螢光部分，像是FITC或Alexa Fluor®488)可附接至DM。螢光活化細胞分選可用作為偵測以及篩選的方法。

**【0065】** 在第一個具體例以及替代性具體例中，身為重複篩選、集中及擴張之產物的宿主細胞能夠生產，或確實生產雙特異性抗體，效價為至少2 g/L，其中該雙特異性抗體成分(Fc/Fc\*)相當於由宿主細胞(Fc/Fc + Fc\*/Fc\* + Fc/Fc\*)生產之總抗體的至少40% (以質量計)。

**【0066】** 其他目的以及益處在檢視以下詳細說明後將變得清楚。

## **【實施方式】**

**【0067】** 相關申請案的交叉參考

**【0068】** 本申請案請求在2012年11月14日申請之美國臨時專利申請案第61/726,040號的35 USC § 119(e)的權益，該申請案以其整體特別併入本文做為參考資料。

**【0069】** 在說明本發明之前，要理解本發明不限於所述特定方法以及實驗條件，因為這些方法以及條件可能會改變。亦要理解本文中所用術語僅供說明特定具體例之用，而不是限制性的，因為本發明的範疇將僅會受到隨附申請專利範圍所限制。

**【0070】** 如本說明書以及隨附申請專利範圍中所使用，除非在本文內另有清楚指明，否則單數形式”一”以及”該”包括複數指涉對象。因此，例如提及”一種方法”包括一或多種方法，及/或本文所述類型及/或對於習於技藝者來說在讀過本揭示內容等之後將變得清楚的步驟。

**【0071】** 除非另有定義，否則本文所使用的全部技術以及科學術語具有本發明所屬技術領域中具有通常技術者一般所理解的相同意思。儘管與本文所述方法以及材料相似或相同者可用於實施或測試本發明，現將說明較佳方法以及材料。本文提及的所有公開文獻以其整體併入本文做為參考資料。

**【0072】 一般性說明**

**【0073】** 就分離以及鑑定蛋白質-分泌細胞而言，本發明方法提供更甚於現有方法的實質優點。舉例而言，分泌抗體的細胞可基於所要特異性、結合性或同型快速地並按習知方式被分離。此外，不同於先前技術中的許多方法(其中分泌蛋白質的產量是間接地被量化)，所生產之經分泌蛋白質數量可以直接被量化。



【0074】近來，針對高通量分離高表現量之穩定細胞株，已開發出兩種使用流式細胞分析的其他方法。第一個方法涉及修飾表現質體以針對GOI mRNA 納入一個轉錄讀出本。這大部分是藉由在GOI的停止密碼子以及末端聚A位點之間插入一個內部核糖體進入位點(IRES)以及其蛋白質產物能藉由流式細胞分析簡易篩選之基因(最常見是綠色螢光蛋白質(GFP))而達致(Meng et al. (2000) *Gene* 242:201)。IRES的存在容許POI以及GFP由同一個mRNA被轉譯。因此，GFP基因表現含量與GOI的mRNA含量是間接相關的。藉由流式細胞分析分離以高含量累積GFP的純系接著針對POI產量來進行篩選。因為在重組構築時使用IRES，這個方法取決於GOI表現與受體基因的偶合，其不適用於分離融合瘤。

【0075】在分離表現純系時使用流式細胞分析容許以高通量的形式快速分析大量純系。此外，使用流式細胞分析會明顯降低細胞的直接操作。可惜，GFP的含量不是POI生產含量的一個直接測量法。各種機制可能使得經分泌POI產量與GFP的累積不相關聯。POI與GFP報導子的產量差異是因為兩個基因的轉譯效率、POI的分泌效率，或多順反子mRNA的穩定性有別所致。

【0076】使用流式細胞分析來分離表現純系的另一個方法涉及將細胞囊封在瓊脂糖微滴中(Weaver et al. (1990) *Methods Enzymol.* 2:234)。在這個方法中，對POI具有特異性之經生物素化抗體透過卵白素結合至經生物素化瓊脂糖，而使得經分泌POI被捕捉且留置在微滴中(Gray et al., (1995) *J. Immunol. Methods* 182:155)。被捕獲的POI是藉由使用對POI具有特異性之抗體的免疫染色而被偵測。為了要降低囊封瓊脂糖吸收由相鄰細胞所分泌的POI，該等細胞被安置在低滲透率培養基中。藉由流式細胞分析鑑別並分離在包埋瓊脂糖中之帶有POI最高抗體染色的彼等細胞。凝膠微滴法直接地針對細胞分泌POI的能力來進行篩選，

而不是針對GOI mRNA表現量來進行間接篩選，但需要適當抗體供捕獲以及染色。經分泌POI的可利用性且程序需要特殊儀器來產生瓊脂糖凝膠微滴。此外，一些細胞對囊封程序可能有敏感性。

【0077】 這個方法的一個變化形式規避需要藉由將對POI具有特異性的抗體直接結合至細胞表面而將細胞包埋在基質中的必要性(Manz et al. (1995) PNAS 92:1921-1925)。在這個方法中，細胞表面蛋白質以生物素-羥基琥珀醯亞胺酯予以非特異性生物素化接而為與能夠結合POI的經卵白素-接合抗體接觸。分泌POI的細胞變成經POI修飾，其接而使用經適當標定的第二抗體來偵測。但是，POI在相鄰細胞間擴散會是個問題，而且這個方法也需要高黏度培養基來降低POI從表現細胞擴散出去。因為這些高黏度培養基對於區別細胞來說是必須的，因此必須洗滌細胞並放置在適於細胞分選的培養基中(若需要這樣的話)。

【0078】 與鑑定以及分離高表現量重組細胞株有關的問題尤其適用於分離表現感興趣抗體的融合瘤。但是，鑑定可用融合瘤還有數種其他問題；它們必須先篩選抗原-結合活性，然後是免疫球蛋白同型。此外，以GFP為主的方法不適用鑑定以及分離融合瘤，因為融合瘤的構築不包括重組構築體，以使得抗體基因的表現可與諸如GFP的轉錄報導子連結。融合瘤篩選是一個緩慢費力的努力，因為現有技術，經篩選的純系數目有限。

【0079】 本發明描述一種新穎且前所未知之鑑定並分離生產經分泌蛋白質之細胞的方法。本發明基於生產表現定位在細胞表現之分子的細胞株，而該分子結合POI。細胞表面展示的POI接而藉由以各種偵測分子標定而被偵測。在細胞表面上展示之POI數量於特定條件下是經分泌之POI總量的一個直接測量

法。接著將POI生產者與非POI生產者分離，並且區分出生產含量或POI特性。本發明的優勢在於其直接量化經分泌的POI而非間接測量mRNA。

**【0080】** 本發明是有關於構築或使用表現細胞表面捕捉分子的細胞，該細胞表面捕捉分子在生產POI的同一細胞中結合各種經分泌POI。因為細胞分泌POI，此等細胞表面捕捉分子結合POI，或可在細胞內形成POI與細胞表面捕捉分子的複合體，且接而被分泌。結合可以自泌的方式或在被分泌同時發生。繼而鑑定並分離生產經分泌POI的細胞。此鑑定以及分離可以是基於POI特徵、生產POI或缺乏生產POI，或依據特定生產含量。細胞表面捕捉分子及/或POI可以藉由呈其天然狀態的細胞生產，或細胞表面捕捉分子及/或POI可以重組方式生產。透過構築或使用這樣的一個細胞，任何經分泌蛋白質可以被細胞表面捕捉分子所捕捉，限制條件為兩者之間的對應親和力。如進一步說明，任一種分子可被操作以使得其可用作為細胞表面捕捉分子。因此，本發明可用來分離分泌蛋白質的任一種細胞。

**【0081】** 任何蛋白質大多具有作為如本文所述細胞表面捕捉分子的能力。需要的是所要蛋白質錨定至細胞膜並暴露於細胞外空間的能力。若所要細胞具有訊號序列，則僅需要將膜錨定體(包括，但不限於穿膜錨定體或GPI連結訊號)添加至細胞表面捕捉分子，以使其維持錨定在細胞膜中並暴露於細胞外側。此外，若所要蛋白質缺少訊號序列，則訊號序列可以被添加至所要蛋白質的胺基端，使其被運輸至細胞表面。訊號序列以及膜錨定體對細胞來說可以是天然的、重組的或合成的。

**【0082】** 細胞通常分泌各式各樣的蛋白質，以內生性的方式或在引入重組DNA之後。任何經分泌蛋白質可以經鑑定且生產經分泌蛋白質的細胞可以依據

本發明方法被分離。此等經分泌蛋白質包括(但不限於)生長因子、生長因子受體、配體、可溶性受體組分、抗體、雙特異性抗體、重組Trap分子、含Fc融合蛋白質、sTCR、TCR-Fc，以及肽激素。此等經分泌蛋白質可或可不為重組的。也就是，從所要細胞分泌一些感興趣蛋白質可能不需要引入其他核苷酸序列。舉例而言，由B細胞或漿細胞分泌抗體並非因為將重組核苷酸序列引入B細胞或漿細胞。經分泌的重組蛋白質可以藉由習於技藝者熟知的標準分子生物學技術來製造(參見例如，Sambrook, J., E. F. Fritsch And T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Vols 1, 2, and 3, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Ausubel et al., Greene Publ. Assoc., Wiley Interscience, NY)。這些經分泌蛋白質可供許多商業與研究用。本發明含括透過本發明方法生產此等經分泌蛋白質。使用展示之POI偵測細胞可以透過使用能夠直接或間接結合展示POI的任一種分子來達致。此等偵測分子可有助於偵測及/或分離展示POI的細胞。

**【0083】** 本發明尤其適用於a)藉由使用配體-特異性受體做為細胞表面捕捉分子分離配體-生產細胞、b)藉由使用表面結合受體-特異性抗體作為細胞表面捕捉分子分離可溶性受體-生產細胞、c)藉由使用抗體-結合蛋白質作為細胞表面捕捉分子來分離抗體-生產細胞、d)藉由使用s-TCR-結合蛋白質(例如以及被TCR辨識的抗原)作為細胞表面捕捉分子來分離TCR、e)藉由使用Fc-結合蛋白質作為細胞表面捕捉分子來分離TCR-Fc，或f)藉由使用融合蛋白質捕捉分子來分離在其CH3域的一者中帶有消除蛋白質A結合的突變的雙特異性抗體，該融合蛋白質捕捉分子包含融合至FcγR穿膜以及細胞質域的ScFv域。

**【0084】** 依據本發明方法學，首先在細胞表面捕捉分子被表現的條件下以含有編碼細胞表面捕捉分子之核苷酸序列的載體轉染細胞，該細胞表面捕捉分子能夠結合經分泌POI。本身為此等細胞表面捕捉分子之適當生產者的經轉染細胞接著被偵測並分離，且培養此等細胞。此等細胞可以天然方式生產POI，或POI可以重組方式生產。若細胞以天然方式生產POI，則它們可即用以偵測與分離。若POI是以重組方式被生產，則表現指定細胞表面捕捉分子的經分離與培養的細胞在經分泌POI被表現的條件下以編碼經分泌POI之第二核苷酸序列轉染。在表現之後，經分泌POI結合至細胞表面捕捉分子且偵測並分離展示結合POI的細胞。

**【0085】** 若POI是細胞以天然方式生產，則不以編碼POI的核苷酸序列轉染細胞。因此，本發明的這個態樣可適用於生產POI的任一種以及所有細胞。此外，若細胞表面捕捉分子是細胞以天然方式生產，則不需要以編碼細胞表面捕捉分子的核苷酸序列轉染細胞。因此，本發明的這個態樣適用於生產細胞表面捕捉分子的任一種以及所有細胞。

**【0086】** 可轉染廣泛多樣的宿主細胞。此等細胞可以是真核來源的細胞或原核來源的細胞。該等細胞通常將會是不朽的真核細胞，且具體而言是哺乳動物細胞，例如猴腎細胞(COS)、中國倉鼠卵巢細胞(CHO)、HeLa細胞、乳倉鼠腎細胞(BHK)、人類胚腎細胞(HEK293)、白血球、骨髓瘤、經腺病毒基因轉染的細胞株(例如AD5 E1，包括但不限於經腺病毒基因轉染的不朽人類視網膜細胞，例如PER.C6™細胞)，以及胚幹細胞。該等細胞也可以是非哺乳動物細胞，包括細菌、真菌、酵母菌以及昆蟲細胞，包括但不限於例如大腸桿菌、枯草桿菌、麴菌屬、啤酒酵母菌，以及畢赤酵母菌。所有細胞可在培養盤介質中於適當條件下或於協同宿主中生長。最樂見的細胞將會是能夠培養的哺乳動物細胞。

**【0087】** 結合至細胞表面捕捉分子的經分泌POI可以藉由各種技藝中已知的技術來偵測並分離。展示經分泌POI的培養細胞可以與能夠直接或間接結合經分泌POI的分子接觸，其中此等偵測分子可含有偵測標記，諸如(例如)顯色、螢光、著色、螢光或磁性標記。結合至偵測分子的標記可以使用各種方法偵測並分離細胞。最佳地，在一個細胞群中採用流式細胞分析來偵測標記並分離細胞。或者，偵測分子可用於直接分離展示該POI的細胞。這可以藉由使偵測分子與培養盤、順磁性分子或任何其他顆粒或固體載體結合而達致。此外，經展示的POI可以因為偵測分子或POI的特性而被直接偵測。

**【0088】** 在一個具體例中，使用彼此結合且標記不同的兩種偵測分子來偵測展示的經分泌POI，該POI阻斷交互作用。若細胞展示會結合第一偵測分子並阻斷第一偵測分子與第二偵測分子交互作用的經分泌POI，則那個細胞可基於在其表面僅存在第一偵測分子而被分離。另一方面，若細胞展示結合第一偵測分子但不阻斷第一偵測分子與第二偵測分子交互作用的經分泌POI，則那個細胞可基於在其表面存在兩種偵測分子而被分離。舉例而言，可鑑定出表現特異地阻斷或不阻斷受體-配體複合體形成之抗體的抗體生產細胞。若偵測分子為受體以及其經標定不同的配體，則表現阻斷受體-配體複合體形成之抗體的抗體生產細胞可藉由於其表面上存在一種標記來偵測，而表現不阻斷受體-配體複合體形成之抗體的抗體生產細胞可藉由於其表面上存在兩種標記來偵測。

**【0089】** 在具體例的任一者中以及就將表現細胞與非表現細胞或較不表現細胞分離而言，主要難處之一為當POI為分泌蛋白質時，POI在相鄰細胞間擴散。因此，任一種被設計成在細胞表面上捕捉經分泌POI的系統必須要防止POI從表現細胞擴散至相鄰細胞還有附著至相鄰細胞。若容許擴散發生，相鄰細胞

變成被經分泌POI修飾，則基於POI修飾程度來分離細胞將無法區別出高表現量細胞以及低表現含量的細胞，且可能無法有效地分離表現細胞與非表現細胞。

**【0090】** 因此，本發明的一個具體例是阻斷經分泌POI在相鄰細胞間擴散。這可以藉由添加結合細胞表面捕捉分子或POI的阻斷分子並防止經分泌POI結合至細胞表面捕捉分子而達致。在這個態樣中，該偵測分子不結合阻斷分子。舉例而言，若細胞表面受體為hFcγRI而經分泌POI具有人類IgG Fc片段，則可藉由添加外源性大鼠IgG至培養基中可阻斷經分泌POI擴散至相鄰細胞之間。展示經分泌POI且未結合大鼠IgG的細胞的偵測可藉由使用對人類IgG Fc具有特異性但不辨識大鼠IgG的抗體而達致。在另一個具體例中，藉由增加培養基的黏度來減少相鄰細胞間的經分泌POI結合。

**【0091】** 在本發明的一個具體例中，經分泌POI不被允許在培養基中累積。這可以藉由調節經分泌POI及/或細胞表面捕捉分子的表現量而達致，使得POI的短暫表現產生足夠的POI以結合細胞表面捕捉分子，但就擴散來說數量還不足夠。在另一個具體例中，將細胞從含有累積POI的培養基移除，結合至細胞的POI被除去，且容許POI表現持續一段有限時間期間，使得經分泌POI不會累積在培養基中。蛋白質可以藉由技藝中已知的方法除去，例如以低pH緩衝液洗滌細胞。

**【0092】** 依據本發明，彼等在細胞群中結合大多數偵測分子的細胞也表現大部分經分泌POI。事實上，一個單獨細胞分泌的POI越多，則在細胞表面上所展示的POI越多。在彼細胞中表面展示POI數量與POI表現含量的這個關聯性容許吾人從一個細胞群快速鑑定出帶有所要相對表現含量的細胞。

【0093】 在一個具體例中，DNA庫可用來表現經分泌蛋白質，其可藉由細胞表面捕捉分子展示在細胞表面上。舉例而言，DNA庫也可以從自經免疫動物分離而來的B細胞的抗體可變域的編碼區產生。然後DNA庫可以在表現對抗體具有特異性之細胞表面捕捉分子的細胞中表現，使得具有所要特異性、同型或結合性的純系得以藉由本發明方法被鑑別並分離。在另一個具體例中，DNA庫可以從T細胞之T細胞受體可變域的編碼區產生，並且融合至(例如)能夠結合至Fc-結合蛋白質的Fc。DNA庫接而可以在表現Fc-結合蛋白質的細胞中被表現，使得具有所要特異性、同型或結合性的純系得以如本文所述被鑑別並分離。

【0094】 在另一個具體例中，可創造在一或多種細胞類型中表現特定細胞表面捕捉分子的轉殖哺乳動物。此等轉殖哺乳動物的細胞接著可直接針對POI產量來進行篩選。舉例而言，在漿細胞中表現對抗體具有特異性的細胞表面捕捉分子可能是所要的。因此，可自經免疫小鼠收取漿細胞並可藉由本發明方法分離生產彼等對所要抗原具有特異性之抗體的細胞。

【0095】 在本發明的又一個具體例中，透過使用表現結合特定抗體或TCR-Fc (其為POI)之人類FcγR1受體(FcγR1)的CHO細胞株測量抗體生產。

【0096】 在本發明的另一個態樣中，感興趣蛋白質包含一或多個T細胞受體可變域或可溶性T細胞受體。該一或多個T細胞受體可變域可以共價連結至可結合細胞表面捕捉蛋白質的部分。在一個特定具體例中，該一或多個T細胞受體可變域融合至Fc序列，例如人類Fc序列，而細胞表面捕捉蛋白質為Fc受體，例如FcγR。

【0097】 TCR可變域的一般性結構為已知(參見，例如Lefranc and Lefranc (2001) The T Cell Receptor FactsBook, Academic Press，併入本文做為參考資料；



參見，例如pp. 17-20；亦參見Lefranc et al. (2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains, *Developmental and Comparative Immunology* 27:55-77，以及Lefranc et al. (2005) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains, *Developmental and Comparative Immunology* 29:185-203，各自併入本文做為參考資料)。在一個具體例中，TCR-Fc的TCR可變域包含一個具有104-125個胺基酸之可變域的N端區。在另一個具體例中，該TCR-Fc進一步包含TCR恆定區，其含有91-129個胺基酸。在另一個具體例中，該TCR-Fc進一步包含一個含有21-62個胺基酸的連接肽。

**【0098】** 在一個具體例中，該Fc序列直接或透過連結子融合至TCR可變域。在另一個具體例中，該TCR-Fc包含一個TCR可變區以及一個TCR恆定區，而該Fc序列直接或透過連結子融合至TCR恆定區。在另一個具體例中，該TCR-Fc包含TCR可變區、TCR恆定區，以及連接肽，而Fc序列直接或透過連結子融合至連接肽。

**【0099】** 可選擇sTCR、TCR-Fc或包含一或多個T細胞受體可變區的融合蛋白質以特異地結合感興趣抗原，例如由腫瘤細胞所生產的某個物質，例如能夠在宿主中產生免疫反應的腫瘤細胞物質。在一個特定具體例中，該抗原為存在於腫瘤細胞表面上的抗原(亦即腫瘤抗原)，其被T細胞所辨識，且在宿主中產生免疫反應。腫瘤抗原包括，例如 $\alpha$ 胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、MUC-1、上皮腫瘤抗原(ETA)、酪胺酸酶(例如關於惡性黑色素瘤)、黑色素瘤相關抗原(MAGE)，以及其他蛋白質(諸如例如ras、p53等)的突變或異常形式。

**【0100】** 在一個具體例中，該POI為TCR-Fc，而該TCR-Fc包含融合至Fc序列的TCR  $\alpha$ 鏈可變區以及融合至Fc序列的TCR  $\beta$ 鏈(各自直接地或透過一個連結子)，其中該TCR  $\alpha$ 鏈-Fc融合體以及TCR  $\beta$ 鏈-Fc融合體相締合而形成 $\alpha\beta$  TCR-Fc。在一個特定具體例中，該 $\alpha\beta$  TCR-Fc包含下列兩個多肽：(1)融合至TCR  $\alpha$ 鏈恆定區的TCR  $\alpha$ 鏈可變區，TCR  $\alpha$ 鏈恆定區融合至一Fc序列，以及(2)融合至TCR  $\beta$ 鏈恆定區的TCR  $\beta$ 鏈可變區，TCR  $\beta$ 鏈恆定區融合至一Fc序列。

**【0101】** 在另一個具體例中，該POI為具有一TCR  $\alpha$ 可變區以及一TCR  $\beta$ 可變區，以及視情況選用一TCR  $\alpha$ 恆定區及/或TCR  $\beta$ 恆定區的TCR-Fc。在一個特定具體例中，該TCR-Fc是由包含(5'至3') TCR  $\alpha$ 可變區序列、接著是視情況選用之TCR  $\alpha$ 恆定區序列、TCR  $\beta$ 可變區序列、接著是視情況選用之TCR  $\beta$ 恆定區序列、視情況選用之連結子，接著是Fc序列的核酸所編碼。在一個特定具體例中，該TCR-Fc是由包含(5'至3') TCR  $\beta$ 可變區序列、接著是視情況選用之TCR  $\beta$ 恆定區序列、TCR  $\alpha$ 可變區序列、接著是視情況選用之TCR  $\alpha$ 恆定區序列、視情況選用之連結子，接著是Fc序列的核酸所編碼。在各種具體例中，訊號序列(例如分泌訊號序列)在編碼TCR-Fc的構築體之前，以使得它們可分泌。

**【0102】** 在另一個具體例中，該POI為TCR-Fc，而該TCR-Fc包含融合至Fc序列的TCR  $\gamma$ 鏈以及融合至Fc序列的TCR  $\delta$ 鏈可變區而形成 $\gamma\delta$  TCR-Fc。在一個特定具體例中，該 $\gamma\delta$  TCR-Fc包含下列兩個多肽：融合至TCR  $\gamma$ 鏈恆定區的TCR  $\gamma$ 可變區，TCR  $\gamma$ 鏈恆定區融合至一Fc序列，以及(2)融合至TCR  $\delta$ 鏈恆定區的TCR  $\delta$ 鏈可變區，TCR  $\delta$ 鏈恆定區融合至一Fc序列。

**【0103】** T細胞受體可變區可以藉由技藝中已知的任一種方法鑑定及/或選殖。感興趣蛋白質的T細胞受體可變區可藉由在細胞中表現經再重排的T細胞受

體可變區DNA(例如融合至人類Fc序列)而獲得。經再重排的T細胞受體可變區對特定抗原具有特異性，可藉由技藝中已知的任何適當方法獲得(餐見下文參考文獻)，例如藉由將小鼠暴露於抗原並分離小鼠的T細胞、做出小鼠T細胞的融合瘤，以及篩選帶有感興趣抗原的融合瘤而獲得感興趣的融合瘤。對感興趣抗原具有特異性的經再重排T細胞可變區可以從感興趣融合瘤選殖而來。對某個抗原具有特異性的T細胞受體可變區也可以使用噬菌體展示技術來鑑別，例如在下文參考文獻中所提供，可變區可以接而被選殖並融合(例如)至人類Fc以做出可結合至細胞表面補捉分子(其為FcγR)的感興趣蛋白質。

**【0104】** 例如在以下中說明用以鑑定及/或選殖T細胞受體可變區的方法：美國專利第5,635,354號(引子以及選殖方法)；Genevée et al. (1992) An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (Vα1-w29/Vβ1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction, Eur. J. Immunol. 22:1261-1269 (引子以及選殖方法)；Gorski et al. (1994) Circulating T Cell Repertoire Complexity in Normal Individuals and Bone Marrow Recipients Analyzed by CDR3 Size Spectratyping, J. Immunol. 152:5109-5119 (引子以及選殖方法)；Johnston, S. et al. (1995) A novel method for sequencing members of multi-gene families, Nucleic Acids Res. 23/15:3074-3075 (引子以及選殖方法)；Pannetier et al. (1995) T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples, Immunology Today 16/4:176-181 (選殖方法)；Hinz, T. and Kabelitz, D. (2000) Identification of the T-cell receptor alpha variable (TRAV) gene(s) in T-cell malignancies, J. Immunol. Methods 246:145-148 (選殖方法)；van Dongen et al. (2002) Design and standardization of PCR

primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: US Patent No. 6,623,957 (選殖方法以及引子) ; Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936, *Leukemia* 17:2257-2317 (引子以及選殖方法) ; Hodges et al. (2002) Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes, *J. Clin. Pathol.* 56:1-11 (選殖方法) ; Moysey, R. et al. (2004) Amplification and one-step expression cloning of human T cell receptor genes, *Anal. Biochem.* 326:284-286 (選殖方法) ; Fernandes et al. (2005) Simplified Fluorescent Multiplex PCR Method for Evaluation of the T-Cell Receptor V $\beta$ -Chain Repertoire, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12/4:477-483 (引子以及選殖方法) ; Li, Y. et al. (2005) Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display, *Nature Biotech.* 23/3:349-354 (引子以及選殖方法) ; Wlodarski et al. (2005) Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia, *Blood* 106/8:2769-2780 (選殖方法) ; Wlodarski et al. (2006) Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome, *Blood* 108/8:2632-2641 (引子以及選殖方法) ; Boria et al. (2008) Primer sets for cloning the human repertoire of T cell Receptor Variable regions, *BMC Immunology* 9:50 (引子以及選殖方法) ; Richman, S. and Kranz, D. (2007) Display, engineering, and applications of antigen-specific T cell receptors, *Biomolecular Engineering* 24:361-373 (選殖方法)。sTCR的實例提供於例如美國專利第6,080,840號與第7,329,731號；和Laugel, B et al. (2005) Design of Soluble Recombinant T Cell Receptors for Antigen Targeting and T Cell Inhibition, *J. Biol.*

Chem. 280:1882-1892；併入本文做為參考資料。Fc序列揭示於本文中，Fc序列的實例及其在融合蛋白質中的用途提供於例如Stahl et al的美國專利第6,927,044號中。所有前述參考資料併入本文做為參考資料。

**【0105】** 在本發明的又一個具體例中，該細胞表面捕捉分子被設計成與感興趣蛋白質接合並展示彼等蛋白質，該等蛋白質一般無法以充分親和力結合至FcγR捕捉分子或以低親和力結合至FcγR捕捉分子。彼等感興趣蛋白質包括IgG4與IgG2分子。因此，一種組合式捕捉分子是依據融合至FcγR穿膜與細胞質域的ScFv域而被設計並建構。ScFv域是衍生自高親和力抗-人類Fc抗體，且含有融合至輕鏈可變域的重鏈可變域。FcγR-TM-細胞質域用於使在細胞膜中適當插入以及指向成為可能。ScFv-FcγR-TM-cyto融合蛋白質能夠結合IgG4以及其他含Fc分子，和IgG2和IgG1亞型，以及彼等含有至少一個野生型CH3域(其中另一個CH3域可含有Fc\*-型置換)的雜二聚體(例如雙特異性抗體)。

**【0106】** 在本發明的又一個具體例中，該細胞表面捕捉分子被設計成與感興趣蛋白質接合並展示彼等蛋白質，該等蛋白質含有經修飾CH3域，諸如Fc\*多肽，其含有H95R與Y96F胺基酸置換(編號是依據IMGT系統)，例如SEQ ID NO：42。彼等感興趣蛋白質包括雙特異性抗體，諸如可用於製造雙特異性抗體的抗體雜二聚體大體上說明於2010年12月30日的美國專利申請公開案第US 2010/0331527 A1中，其以其整體併入本文中做為參考資料。因此，一種組合式捕捉分子是依據融合至FcγR穿膜與細胞質域的ScFv\*域而被設計並建構。ScFv\*域是衍生自高親和力抗-Fc\*抗體，且含有融合至輕鏈可變域的重鏈可變域。FcγR-TM-細胞質域用於使在細胞膜中適當插入以及指向成為可能。

ScFv\*-FcγR-TM-cyto融合蛋白質結合任一種含Fc\*分子，諸如野生型IgG3，以及IgG4、IgG2和IgG1的雜二聚體，其含有至少一個Fc\*多肽序列。

## 實例

**【0107】** 提出下列實施例俾以將如何製造與使用本發明方法和組成物之完整揭示內容以及發明說明提供給技藝中具有通常技術者，且不欲限制發明人就其發明所視為的範疇。已盡力確保所用數字的正確性(例如數量、溫度等)，但可能產生某些實驗誤差與偏差。除非另有指明，否則份為以重量計的份，分子量為平均分子量，溫度為攝氏度，而壓力為大氣壓或近乎大氣壓。

### **【0108】 實例1**

**【0109】 構築pTE084。** pTE084是藉由將pCAE100的1,436 bp Xba I 片段(其編碼人類FcγRI (hFcγRI; GenBank存取編號M21091)接合至pRG821的Xba I位點中而被構築。hFcγRI在因為接合所產生之所要質體中的位向是藉由使用Not I、Pst I、Eco RI，以及Stu I的限制圖譜繪製來進行檢驗。pTE084是針對高含量表現hFcγRI來設計，其為針對人類IgG的Fc域的高親和力細胞表面受體。其含有兩個獨立的表現匣。一個表現匣為由CMV-MIE啟動子所驅動的hFcγRI基因，而第二個表現匣為新黴素磷酸轉移酶II (*npt*)基因，其賦予對G418的抗性，由SV40晚期啟動子所驅動。

**【0110】 構築表現hFcγRI的CHO K1衍生物。** 遵循製造商的建議，以pTE084使用Lipofectamine<sup>TM</sup> (Life Technologies; Rockville, MD)轉染CHO K1細胞( $4 \times 10^6$ )。將細胞置於含有500 μg/ml G418 (Life Technologies)的培養基(10%胎牛血清、90% Ham's F-12、2 mM L-麩醯胺酸；所有試劑均來自Life Technologies, Rockville, MD)中歷時15天。G418篩選存留下來的細

胞經胰蛋白酶處理、集中，並且以FITC-接合人類IgG、Fc片段(FITC-hFc；Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)染色。簡言之，以不含氯化鈣以及氯化鎂的杜貝可氏磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)(Life Technologies)洗滌生長在10 cm培養盤上的細胞一次。將三毫升的0.25%胰蛋白酶(Life Technologies)添加至各盤中。將盤打轉直到細胞自盤脫離。立刻將十毫升培養基添加至已脫離細胞的各盤。接著藉由在1,000 x g下離心歷時4分鐘來收集細胞。在移除上清液之後，將細胞再懸浮於4 ml之稀釋在培養基中的2 µg/ml FITC-hFc。將細胞置於平台式震盪器並在室溫下染色歷時一個小時。為了要移除未結合的FITC-hFc，以20 ml PBS洗滌細胞兩次。細胞上的FITC-hFc標記程度是藉由流式細胞分析在MOFLO™細胞分選器(Cytomation; Fort Collins, CO)上測量。FITC-hFc不會使假轉染的親代CHO K1細胞染色，但會在G418-抗性經pTE084轉染的池中產生螢光分佈。所選池中螢光最亮的前1%細胞藉由流式細胞分析以1個細胞/孔被置放到96孔盤中。九天後，將96孔盤中的88個細胞純系擴張至24孔盤中。3天後，將個別孔中的細胞以1 ml PBS洗滌一次、以0.5 ml 2 µg/ml FITC-hFc染色歷時1小時、以1 ml PBS洗滌兩次並在螢光顯微鏡下針對細胞表面染色進行檢驗。三十三個螢光最亮的純系被挑出、擴張，接著依據流式細胞分析來篩選。

**【0111】** 經分泌蛋白質在細胞中的表現細胞以及非表現細胞之間的擴散是藉由添加IgG而被阻斷：因為hFcγRI純系細胞株中的所有細胞表現細胞表面hFcγRI，它們全具有結合IgG或由IgG之Fc域組成之融合蛋白質的能力。因為hFcγRI結合不同物種的IgG (van de Winkel and Anderson, 1991)，測試一組動物IgG阻斷含有人類IgG1 (hIgG1) Fc標誌(4SC622)的蛋白質結

合至hFc $\gamma$ RI-表現細胞的能力。4SC622是一種嵌合分子，由融合至hIL-4R $\gamma$ 胞外域的IL-2R $\gamma$ 胞外域組成，而hIL-4R $\gamma$ 胞外域復而融合至hIgG1-Fc域。在本實驗中，RGC1 (一種選自於CHO K1培養物之hFc $\gamma$ RI-表現細胞株，其經pTE084穩定轉染)的培養物在1 mg/ml不同物種IgG存在或不存在下於37°C組織培養物培養箱中與1  $\mu$ g/ml 4SC622培育歷時18小時。

**【0112】** 4SC622的細胞表面結合是藉由流式細胞分析在洗滌細胞以藻紅素-接合小鼠IgG1單株AG184 (PE-AG184)(對4SC622的hIL-2R $\gamma$ 組分具有特異性) (BD Pharmingen; San Diego, CA)來染色之後，遵循以FITC-hFc細胞染色列出的程序來測定。

**【0113】** 發現hIgG完全阻斷4SC622結合至表現在RGC1表面上的hFc $\gamma$ RI。大鼠、兔及犬衍生的IgG也有效地阻斷結合，而牛以及綿羊衍生的IgG則不阻斷。外源地添加的大鼠IgG能夠阻斷外源地添加hIgG1 Fc經標定蛋白質(4SC622)結合至細胞表面hFc $\gamma$ RI，暗示大鼠IgG亦可以不同程度阻斷在表現hIgG1 Fc-經標定蛋白質的細胞間轉移。為了測試這點，由RGC1生成兩個可藉由存在或不存在綠色螢光蛋白質(EGFP)來區別的細胞株。簡言之，為了將RGC1細胞標記EGFP，以0.5 mg PET 073 (其編碼受到磷酸甘油酯激酶啟動子所驅動的潮黴素B磷酸轉移酶基因)以及5 mg pRG816-EGFT (其編碼受CMV-MIE啟動子所驅動的EGFP基因)共轉染2 x 10<sup>6</sup> RGC1細胞。以200  $\mu$ g/ml潮黴素B (Sigma; St. Louis, MO)篩選經轉染細胞歷時兩週。藉由流式細胞分析分離綠色螢光細胞。一個EGFP以及hFc $\gamma$ RI-表現純系RGC2被用於細胞混合實驗中。另一個用於這些實驗中的細胞株RGC4是藉由以質體pEE14.1-622穩定轉染RGC1而生成。pEE14.1-622是一個4SC622的表現



受到CMV-MIE啟動子所驅動且包括麩醯胺酸合成酶袖珍基因(其賦予對類似物甲硫胺酸磺醯亞胺(MSX)的抗性且容許篩選穩定併入結果)的質體。RGC4細胞在細胞表面上表現hFcγRI並分泌hIgG1 Fc-標定蛋白質4SC622。在以PE-AG184染色之前，以1 mg/ml大鼠IgG培育一盤包含50% RGC2以及50% RGC4細胞的混合細胞歷時18小時，然後藉由流式細胞分析檢驗。RGC2細胞的EGFP螢光顯示RGC2細胞也結合外源地添加的4SC622 (1 μg/ml)，如同依據PE-AG184螢光增加所指明。RGC4不會在EGFP圈圍中發出螢光。明顯地，外源地添加的大鼠IgG不會降低RGC4細胞針對細胞表面4SC622為染色陽性的百分比，暗示4SC622結合至hFcγRI發生了，同時蛋白質轉移至細胞表面。當RGC2以及RGC4細胞混合時，由RGC4細胞分泌的4SC622蛋白質累積在培養基中並結合大部分的RGC2細胞。但是，添加1 mg/ml大鼠IgG明顯降低結合4SC622的RGC2細胞百分比，證明大鼠IgG阻斷經分泌hIgG1 Fc-標定蛋白質從表現細胞轉移至非表現細胞。

#### 【0114】 實例2：細胞表面螢光與4SC622的表現含量相關聯

【0115】 以pEE14.1-622轉染RGC1細胞( $4 \times 10^6$ )並且在含有10%經透析胎牛血清、90%無麩醯胺酸杜貝可氏改良依格式培養基(DMEM)、1 x GS補充劑，以及25 μM MSX (所有試劑來自JRH Biosciences, Lenexa, KS)的培養基中歷時2週的篩選後得到一池穩定轉染株。在免疫染色前18小時，大鼠IgG被添加至培養基達1 mg/ml。細胞經胰蛋白酶處理、以PBS洗滌，以及在室溫下遵循如實例1中關於FITC-hFc染色所述程序使用1.5 μg/ml多株FITC-接合抗-人類IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub>片段(Jackson ImmunoResearch Laboratories)染色歷時一小時。細胞染色接而是藉由流式細胞分析來進行分

析。螢光分佈暗示，選定池包含帶有4SC622表現含量範圍廣泛的細胞。就其免疫螢光而言，將前3% (R3類)、7-11% (R5類)以及15-19% (R7類)的細胞分選至三個不同的池並擴張歷時9天。該等池之每個細胞的平均4SC622產量是在3天生長之後透過免疫為主的Pandex分析(Idexx; Westbrook, ME) 遵循製造商建議藉由測量培養基中的細胞數目以及4SC622含量來決定。在Pandex分析中，塗覆以山羊抗-人類IgG、g-鏈特異性抗體的fluoricon聚苯乙烯分析顆粒(Sigma)被用來捕捉培養基的4SC622，而FICT接合山羊抗-人類IgG、Fc特異性(Sigma)被用來偵測珠粒結合的4SC622。已知數量的經純化4SC622被納入分析中以供校正。前3%、7-11%以及15-19%池中的細胞被發現分別以1.42、0.36以及0.22 pg/細胞/天生產4SC622。因此，細胞表面4SC622染色以及特定蛋白質產量之間有相關性。這個結果暗示，以高含量表現4SC622的個別細胞可以藉由分離被多株FITC-接合抗-人類IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub>片段染成最亮的細胞而獲得。

### 【0116】 實例3：在RGC1：IL-4捕獲中分離表現純系

【0117】 為了直接證實依據吾等方法學生成帶有高含量經分泌蛋白質產量之細胞株的效率，由RGC1生成純系4SC622生產細胞株。以pEE14.1-622轉染RGC1細胞( $4 \times 10^6$ )，並使用25  $\mu$ M MSX篩選歷時兩週以獲得一池穩定的轉染株。在以PE-AG184染色之前，MSX-抗性細胞被集中並與1 mg/ml人類IgG一起培育歷時18小時。分離並擴張如藉由細胞表面4SC622染色的流式細胞分析所測定之前5%圈閘的六個細胞。測定六個純系株的4SC622產量並與藉由手挑選定的集落所得之純系的4SC622產量相比較，然後稀釋選殖並擴增。一個RGC1-衍生的純系RGC4以12 pg/細胞/天生

產4SC622。這個含量與藉由手挑分離並分析2,700個純系的最佳4SC622生產者相似。因此，與手挑集落相較之下，本發明所概述的方法學在篩選以及選殖高生產者方面證明更為有效率。

**【0118】 VEGF捕獲。**質體pTE080以及pTE081編碼VEGF捕獲用的基因，hVEGF-R1R2以及hVEGF-R1R3。hVEGF-R1R2是一個嵌合分子，由融合至hVEGFR2之第二Ig域的hVEGFR1的第一Ig域，hVEGFR2之第二Ig域接而融合至hIg1Fc域而組成。hVEGF-R1R3是一個嵌合分子，由融合至hVEGFR3之第二Ig域的hVEGFR1的第一Ig域，hVEGFR3之第二Ig域接而融合hIgG1-Fc域而組成。在這些質體中，VEGF捕獲的基因是受到CMV-MIE啟動子所驅動且表現一個麩醯胺酸合成酶袖珍基因(其賦予對MSX的抗性)以供篩選穩定併入結果之用。以此等質體之一者轉染RGC1細胞並在含有25  $\mu$ M MSX的生長培養基中生長歷時2週以篩選已穩定併入質體的細胞。在以1.5  $\mu$ /ml多株FITC-接合抗-人類IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub>片段染色之前，將MSX-抗性細胞與0.1  $\mu$ g/ml IgG2a以及小鼠IgG3一起培育歷時18小時。細胞染色歷時1小時，然後在流式細胞分析之前以PBS洗滌兩次。單個細胞從其螢光為最高1%的細胞池中被分選至96孔組織培養盤中。擴張個別孔中的細胞並藉由Pandex分析測定其生產力。表現hVEGF-R1R2以及hVEGF-R1R3之RGC-衍生的純系具有較高的比生產力且藉由篩選與最高表現手挑MSX-抗性集落相比還要更少的純系分離。參見表1。

表 I					
比生產力比較					
蛋白質	暫時 ( $\mu\text{g/ml}$ )	手挑 CHO K1 穩定細胞株 s		RGC1-衍生 穩定細胞株	
		比生產力 ( $\text{pg}/\text{細胞}/$ 天)	#篩選純系	比生產力 ( $\text{pg}/\text{細胞}/$ 天)	#篩選純系
4SC622	1.1	12	2700	12	6
hVEGF-R1R2	33	68	190	77	62
hVEGF-R1R3	27	5	100	22.6	42

【0119】 實例4：細胞表面結合之hIgG1 Fc標定蛋白質因為RGC而內化

【0120】 hFc $\gamma$ RI已知會誘導其細胞表面結合配體的內化。為了分析RGC1細胞可否內化細胞表面結合的4SC622，將1  $\mu\text{g/ml}$  4SC622添加至RGC1細胞歷時1小時，接著立即處理細胞供使用PE-AG184之4SC622免疫染色以及流式細胞分析之用。九十三百分比的細胞就細胞表面4SC622而言染色為陽性。或者，將1  $\mu\text{g/ml}$  4SC622添加至RGC1細胞歷時1小時，接著洗滌細胞並在沒有4SC622但有PE-AG184的培養基中培育歷時18小時。4SC622免疫染色然後流式細胞分析顯示，9%細胞在細胞表面上保有4SC622。為了進一步鑑定表面結合4SC622的損失，將經純化4SC622蛋白質添加至RGC1以及親代CHO K1細胞的培養基中，然後隨著時間測量培養

基中的4SC622含量。相較於CHO K1對照，被添加至10 cm盤的培養基中達2 µg/ml的4SC622在3天培育之後於RGC1條件培養基中明顯較低。這些結果顯示，4SC622在培養基中的濃度會因為細胞表面上存在hFcγRI而降低。該等結果暗示，hFcγRI-4SC622複合體內化作用會耗盡培養基的4SC622。這個受體-配體複合體的內化有助於在阻斷IgG存在下於18小時阻斷步驟期間有效從非表現細胞移除所有4SC622。

### 【0121】 實例5：構築帶有誘導性hFcγRI表現的CHO K1細胞株

【0122】 採用hFcγRI之以流式細胞分析為主的自體分泌捕獲(FASTR™)方法容許快速分離高表現量純系。但是，要是hFcγRI媒介Fc標定蛋白質的轉換(turnover)，若hFcγRI表現於生產受到抑制，則由經工程化hFcγRI表現細胞所實現的分泌蛋白質產量可能會更高。為此，構築hFcγRI表現受四環素或類似物多西環素誘導的CHO K1細胞株。在這個系統中，CHO K1細胞首先經工程化以表現四環素抑制子蛋白質(TetR)且使hFcγRI受啟動子的轉錄控制，啟動子活性是受到TetR所調控。兩個連續TetR操縱子(TetO)於pTE084中就在CMV-MIE啟動子/增強子下游以生成pTE158。在pTE158中，於四環素或一些其他適當誘導劑不存在下，從CMV-MIE啟動子到hFcγRI的轉錄是受到TetR所阻斷。在誘導劑存在下，TetR蛋白質無法結合TetO而hFcγRI轉錄發生。

【0123】 以pcDNA6/TR轉染CHO K1細胞，pcDNA6/TR是一種賦予對殺稻瘟菌素抗性的質體，其中TetR的表現源於CMV-MIE啟動子(Invitrogen; Carlsbad, CA)。在使用2.5 µg/ml殺稻瘟菌素(Invitrogen)篩選歷時兩週之後，集中穩定的轉染株。這個池接著以pTE158轉染，pTE158是一種賦予對

G418抗性的質體，其中hFcγRI的表現取決於CMV-MIE/TetO混合啟動子。經pcDNA6/TR以及pTE158組成性地轉染的細胞是使用400 μg/ml G418以及2.5 μg/ml殺稻瘟菌素來進行篩選歷時12天，然後集中。透過添加1 μg/ml多西環素誘導該池歷時兩天，然後以FITC-hFC染色以鑑定出表現hFcγRI的細胞。收集表現hFcγRI的前5%細胞為一池，於多西環素不存在下擴張歷時6天，並於hFcγRI存在下再次以FITC-hFC染色。收集就hFcγRI而言未染色的細胞並且在含有1 μg/ml多西環素的培養基中擴張歷時三天。該池接而於hFcγRI存在下染色並藉由流式細胞分析來分離。以每孔一個細胞將hFcγRI表現含量最高的細胞(前1%)分選至96孔盤。此等細胞推測包含具有少數非誘導型表現含量FcγRI的細胞，以及高誘導含量FcγRI的細胞。在擴張後，藉由以FITC-hFc免疫染色以及流式細胞分析確認在20個純系中多西環素誘導hFcγRI。挑出某一個純系進一步特徵鑑定並且命名為RGC10。

**【0124】** 於多西環素不存在的情況下，RGC10不表現可偵測到的hFcγRI含量，而在以1 μg/ml多西環素誘導歷時三天在細胞中觀察到高含量hFcγRI。RGC10細胞的平均螢光在多西環素誘導之後增加達超過1,000倍。

**【0125】 實例6：由RGC10分離4SC622-生產細胞株**

**【0126】** 以pEE14.1-622轉染RGC10細胞，並且在以25 mM MSX篩選歷時兩週之後集中MSX-抗性細胞。hFcγRI的表現是藉由將1 μg/ml多西環素添加至培養基中歷時三天而被誘導。在以多株FITC-接合抗-人類IgG (H+L) F(ab'<sub>2</sub>)片段染色且藉由流式細胞分析來分析之前將一mg/ml大鼠IgG添加至含有多西環素的培養基。表現最高含量4SC622 (前1%)的細胞以每孔1個細胞被分選至96孔盤中。在沒有多西環素誘導hFcγRI表現的情況下，以多株

FITC-接合抗-人類IgG (H+L) F(ab'<sub>2</sub>)片段染色無法偵測細胞表面結合4SC622。於多西環素不存在下擴張六十個純系。13個最高生產者的比生產力是藉由Pandex分析來測定。純系1C2的比生產力為17.8 pg/細胞/天，明顯優於先前使用未經調控hFcγRI細胞株RGC1所分離之最佳4SC622細胞株所觀察到的12 pg/細胞/天。

### 【0127】 實例7：Sp2/0骨髓瘤細胞可經工程化以表現細胞表面捕捉蛋白質

【0128】 在本實例中，Sp2/0-Ag14骨髓瘤細胞株經工程化以穩定地表現hFcγRI，俾以證實自體分泌捕獲方法可應用於CHO以外的細胞株。hFcγRI的基因藉由逆轉錄病毒感染被引入骨髓瘤細胞中。質體pLXRN (Clontech; Palo Alto, CA)(一種逆轉錄病毒DNA載體，其中感興趣基因由上游莫洛尼鼠肉瘤病毒長端重複序列(MoMuSV LTR)啟動子表現)被用來生成編碼hFcγRI基因的逆轉錄病毒。pTE084的1,363 bp Xho I片段(編碼人類FcγRI基因)被選殖至pLXRN的Xho I位點中。選定hFcγRI cDNA表現是取決於MoMuSV LTR的質體並命名為pTE255。

【0129】 基本上遵循製造商的指引生成用以表現hFcγRI之泛熱帶逆轉錄病毒。包裝細胞株GP-293 (一種穩定表現病毒gag以及pol蛋白質之以HEK 293為主的細胞株(Clontech; Palo Alto, CA))與10 mg的pVSV-G或pTE255一起共轉染。質體pVSV-G容許表現病毒膜套蛋白質VSV-G，其賦予感染顆粒廣泛的宿主範圍。

【0130】 構築Sp2-hFcγRI-4。泛熱帶hFcγRI逆轉錄病毒以約每個細胞10個感染顆粒的倍數性被用來感染 $1 \times 10^7$  Sp2/0-Ag14骨髓瘤細胞(美國典型培養物保存中心：Manassas, VA)。感染後三天，在藉由流式細胞分析來分

析之前，細胞染色歷時1小時，接著以PBS洗滌兩次。根據流式細胞分析將彼等表現hFcγRI的細胞(如藉由結合FITC-hFc所標明)收集為一個池。該池擴張歷時13天，接著再次以FITC-hFc染色，並根據流式細胞分析將表現hFcγRI的細胞收集為一個池。在10%胎牛血清90%杜貝可氏改良依格式培養基(DMEM)(具有4.5 g/l葡萄糖與4 mM麩醯胺酸)中培養此等經分選的細胞歷時3週、以FITC-hFc染色，並且藉由單一細胞分選來選殖在該群體中帶有前1%的平均螢光之細胞。在擴張之後，如上所述藉由流式細胞分析檢驗24個純系的hFcγRI表現，並挑出某一個純系Sp2-hFcγRI-4供進一步特徵鑑定。

**【0131】 分離表現4SC622蛋白質的Sp2-hFcγRI-4細胞。**以pTE209轉染Sp2-hFcγRI-4細胞( $1 \times 10^7$ )，pTE209是一種容許CMV-MIE啟動子的4SC622組成性表現並賦予對潮黴素的抗性之抗體。經轉染細胞安置於含有10% FCS、90% D-MEM以及400 μg/ml潮黴素的培養基中歷時14天。在以多株FITC-接合抗-人類IgG (H+L) F (ab')<sub>2</sub>片段染色之前，潮黴素-抗性細胞與1 mg/ml兔IgG一起培育歷時十八小時。細胞染色歷時1小時，接著以PBS洗滌兩次，然後藉由流式細胞分析來分析。依據流式細胞分析將經標定細胞收集為一個池，然後如上所述培養歷時5天並分選。前1%群體結合最多多株FITC-接合抗-人類IgG (H+L) F (ab')<sub>2</sub>片段之經擴張池的細胞是藉由單一細胞分選而被選殖。藉由ELISA分析來自十個純系的4SC622產量，且全部10個純系被發現表現4SC622；純系5H11以每個細胞每天0.5 pg生產4SC622。這些數據顯示，分泌4SC622的純系是有效率地藉由自體分泌捕獲方法由衍生自以pTE209穩定轉染的Sp2-hFcγRI-4細胞的異源性細胞池被分離。



**【0132】** 為了確認4SC622是自體展示在表現4SC622以及hFc $\gamma$ RI的骨髓瘤細胞表面上，將純系5H11與1 mg/ml兔IgG一起培育歷時18小時，接著以FITC-接合抗-人類IgG (H+L) F (ab')<sub>2</sub>片段染色，發現展示細胞表面4SC622。經分泌蛋白質在兔IgG阻斷交互提供(cross-feeding)的條件下被展示，證明自體展示4SC622。這些數據指明，上述自體分泌捕獲方法不限於CHO細胞且可推展至骨髓瘤以及其他類型細胞。

**【0133】 實例8：蛋白質G嵌合蛋白質可作為細胞表面捕捉蛋白質作用**

**【0134】** 為了證實自體分泌捕獲方法適用於hFc $\gamma$ RI以外的細胞表面捕捉蛋白質，構築表現蛋白質G的細胞株。鏈球菌菌株G148的蛋白質G結合至所有人類與小鼠IgG亞類，而且也應用於分離表現抗體或IgG Fc融合蛋白質的重組細胞。為了證明蛋白質G IgG結合域可用做為能夠結合至所有人類與小鼠細胞IgG亞類的表面捕捉蛋白質，吾人構築一個表現嵌合蛋白質的CHO株，該嵌合蛋白質含有融合至hFc $\gamma$ RI穿膜與細胞內域的蛋白質G之Fc結合域。蛋白質G之Fc結合域含有三個55個胺基酸長的同源重複序列(Guss et al., (1986) EMBO 5:1567 and Sjobring et al., (1991) J. Biol. Chem. 266:399)，而各個重複序列能夠結合一個IgG Fc。為增加這個嵌合蛋白質在CHO細胞中的表現，吾人構築一個合成DNA，其中小鼠ROR1基因的訊號序列被融合至Fc結合域，蛋白質G的胺基酸303至497 (存取# X06173)(SEQ ID NO：1)。這個合成DNA是透過寡核苷酸接合、空位填滿，以及PCR擴增的組合而產生。接著，該合成DNA透過PCR被融合至編碼穿膜與細胞內域的DNA，hFc $\gamma$ RI (存取M21091)的胺基酸279至374 (SEQ ID NO：2)。所得編

碼蛋白質G/hFcγRI嵌合蛋白質的DNA被選殖至pTE158的CMV-MIE啟動子下游，取代編碼hFcγRI的基因而生成質體pTE300。

**【0135】** 以pTE300轉染被用來在無血清培養基中生長的CHO K1細胞株RGC14，且在三天後將400 μg/ml G418添加至培養基中以篩選穩定併入的pTE300。開始篩選後兩週，以FITC-hFc染色細胞來鑑別表現hFcγRI的細胞。這些細胞是藉由流式細胞儀分析且表現hFcγRI的細胞被收集為一個池。擴張細胞歷時10天，並藉由流式細胞分析再次分離表現hFcγRI的細胞群。再次擴張細胞、以FITC-hFc染色，並且藉由流式細胞分析分離表現高含量蛋白質G/hFcγRI嵌合蛋白質的單一細胞。FITC-hFc結合染色為陽性的單一細胞被分選至含有10%胎牛血清、90% Ham's F12以及400 μg/ml G418的培養基中。在兩週培育之後，針對結合至存在於培養基中的牛IgG，藉由以FITC-接合抗-牛IgG F(ab')<sub>2</sub>片段(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)染色來檢驗48個純系。挑出某一個被這個抗體染為陽性的純系RGC18進一步特徵鑑定。

**【0136】** 分離RGC18中的表現純系：以pTE209轉染RGC18細胞( $6 \times 10^6$ )並藉由在400 μg/ml潮黴素中生長歷時18天來篩選質體併入。在以多株FITC-接合抗-人類IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub>片段染色之前，潮黴素-抗性細胞與1 mg/ml兔IgG一起培育歷時十八小時。細胞染色歷時1小時，接著以PBS洗滌兩次，然後藉由流式細胞分析來分析。藉由單一細胞分選來分離螢光最亮的細胞(前5%)並擴張歷時3週。檢驗十個純系的4SC622分泌。所有測試純系皆以高含量分泌4SC622，而最佳的純系RGC19具有比生產力為6.4 pg/細胞天。這個結果證實，4SC622-表現細胞是有效率地藉由自體分泌捕獲方法由

衍生自以pTE209穩定轉染的RGC18細胞的異源性細胞池被分離。此外，這些數據清楚證實，蛋白質G的片段可經工程化以納入訊號序列以及穿膜域，並作為細胞表面捕捉蛋白質來發揮作用。

**【0137】** 為了確認4SC622是自體展示在表現蛋白質G/hFcγRI嵌合蛋白質與4SC622的RGC19細胞表面上，將RGC19與1 mg/ml兔IgG一起培育歷時18小時，接著以FITC-接合抗-人類IgG (H+L) F (ab')<sub>2</sub>片段染色，並藉由流式細胞分析來分析。RGC19細胞被發現在兔IgG阻斷交互提供的條件下具有細胞表面4SC622，暗示自體展示4SC622。兔IgG有效地阻斷外源性4SC622蛋白質結合至RGC18細胞，但不阻斷4SC622展示在表現4SC622之細胞的細胞表面上。此等數據證明，蛋白質G/hFcγRI嵌合蛋白質作為細胞表面捕捉蛋白質的特性類似於hFcγRI的特性，且暗示自體分泌捕獲方法可採其他蛋白質作為細胞表面捕捉蛋白質。

#### **【0138】 實例9：從RGC10分離抗體-生產細胞**

**【0139】** 為了證實自體分泌捕獲方法能用於分離表現重組抗體的CHO細胞株，吾人選殖編碼KD5融合瘤之可變輕基因與可變重基因的DNA。KD5是一種表現對人類Tie-2受體具有特異性之單株抗體的融合瘤。

**【0140】** 由500 ng小鼠脾臟聚A+ RNA (Clontech, Palo Alto, CA)選殖小鼠IgG恆定區基因序列。使用針對RT-PCR的SuperScript First-Strand Synthesis System合成單股cDNA，以50ng的隨機六聚體(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)為引導。小鼠κ輕恆定DNA序列(存取# Z37499)是由這個cDNA藉由PCR使用引子5' mCLK1 (Z37499) (5'-CGGGCTGATG CTGCACCAAC TGTATCCATC TTC-3') (SEQ ID NO: 3)以及3' mCLK1(Z37499)

(5'-ACACTCTCCC CTGTTGAAGC TCTTGACAAT GGG-3') (SEQ ID NO : 4)而被擴增。小鼠IgG2a恆定區DNA序列(存取# AJ294738)亦由此DNA藉由PCR使用引子5' mCH2a(AJ294738) (5'-GCCAAAACAA CAGCCCCATC GGTCTATCCA C-3') (SEQ ID NO : 5)以及3' mCH2a(AJ294738) (5'-TCATTTACCC GGAGTCCGGG AGAAGCTCTT AGTCG-3') (SEQ ID NO : 6)而被擴增。使用TOPO TA Cloning套組(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)將PCR產物選殖至pCR2.1-TOPO中並確認恆定區的序列。

【0141】 使用來自Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ)的重鏈與輕鏈可變區引子混合物，藉由RT-PCR由KD5融合瘤mRNA擴增KD5可變區基因並選殖至pCR2.1-TOPO中。可變重鏈基因是使用經pCR2.1-TOPO選殖的可變區作為模版以引子5' BspMI/KD5VH N- term (5'-GAGAGTACCT GCGTCATGCA GATGTGAAAC TGCAGGAGTC TGGCCCT-3') (SEQ ID NO : 7)與3' BspMI/KD5VH C- term (5'-GAGAGACCTG CGTCAGCTGA GGAGACGGTG ACCGTGGT-3') (SEQ ID NO : 8)來進行PCR擴增、經BspMI消化並接合至經BsaI-消化的IgG2恆定重基因PCR片段，該IgG2恆定重基因PCR片段是使用引子5' BsaI/CH2a N- term (5'-GAGAGGGTCT CACAGCCAAA ACAACAGCCC CATCG-3') (SEQ ID NO : 9)與3' BsaI/ CH2a C- term (5'-GAGAGGGTCT CCGCCGCTC ATTTACCCGG AGTCCGGG AGAA-3') (SEQ ID NO : 10)來擴增。此片段接而被接合至pRG882的BspMI以及NotI位點。所得質體pTE317能夠因為CMV-MIE啟動子而表現KD5重組重鏈基因，其融合至mROR1訊號序列。可變輕鏈基因是使用經pCR2.1-TOPO選殖的可變區作為模版以引子5' BsmBI/KD5VL N- term (5'-GAGAGCGTCT CATGCAGACA TCCAGATGAC

CCAGTCTCCA-3') (SEQ ID NO : 11)與3' BsmBI/KD5VL C- term

(5'-GAGAGCGTCT CACAGCCCGT TTTATTTCCA GCTTGGTCCC-3') (SEQ ID NO : 12)來進行PCR擴增、經BsmBI消化並接合至經BsaI-消化的κ恆定輕鏈基因

PCR片段，該κ恆定輕鏈基因PCR片段是使用引子5' BsaI/CLK N- term

(5'-GAGAGGGTCT CAGCTGATGC TGCACCAACT GTATCC-3') (SEQ ID NO : 13)與3' BsaI/CLK C- term (5'-GAGAGGGTCT CAGGCCGCTC

AACACTCTCC CCTGTTGAAG CTCTTGAC-3') (SEQ ID NO : 14)來擴增。此片

段接而被接合至pRG882的BspMI以及NotI位點。所得質體pTE316能夠因為

CMV-MIE啟動子而表現KD5重組輕鏈基因，其融合至mROR1訊號序列。

**【0142】** 將pTE317的1450 bp EcoRI-NotI片段(編碼KD5重鏈基因)選殖至pRG980的EcoRI以及NotI位點中以生成質體pTE322，pRG980是一個賦予對潮黴素之抗性且容許UbC啟動子的重組基因表現的載體。同樣地，將pTE316的750 bp EcoRI-NotI片段(編碼KD5輕鏈基因)選殖至pRG985的EcoRI以及NotI位點中以生成以生成質體pTE324，pRG985是一個賦予對嘌呤黴素之抗性且容許UbC啟動子的重組基因表現的載體。以3 μg pTE322以及3 μg pTE322轉染RGC10細胞( $5 \times 10^6$ )並藉由在補充有10%胎牛血清與20 μg嘌呤黴素加上400 μg/ml潮黴素的F12培養基中生長歷時14天篩選併入質體。hFcγRI的表現是藉由將1 μg/ml多西環素添加至培養基中歷時三天而被誘導。將雙重-抗性細胞與1 mg/ml兔IgG一起培育歷時十八小時，然後以山羊多株FITC-接合抗-小鼠IgG (Fcγ) F (ab')<sub>2</sub>片段(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)染色。細胞染色歷時1小時，然後在藉由流式細胞分析來分析之前以PBS洗滌兩次。螢光最亮的細胞(前5%)被分離為一個

池並被擴張歷時10天，之後重複程序，除了分離螢光最亮的1%細胞為一個池。這個池被擴張歷時10天，然後將螢光最亮的0.1%細胞以單一細胞分離至96孔盤中。藉由ELISA分析純系的抗體表現，並從53個分析的純系中挑出七個純系。這些純系的平均比生產力為35 pg/細胞/天，而最佳的純系以54 pg/細胞/天表現重組KD5單株抗體。

**【0143】 實例10：FASTR™篩選不受CSCP表現含量影響**

**【0144】** 為了證實CSCP表現含量不會明顯影響分離表現締合sPOI之細胞的能力，比較相同sPOI在兩個不同宿主細胞株中的FASTR™篩選，該兩個不同宿主細胞株各別表現相同CSCP，但一者呈高含量或低含量。

**【0145】** 針對藉由穩定併入pTE158以高含量表現hFcγRI蛋白質來選定FASTR™宿主細胞株RGC10並發現含有40個hFcγRI併入基因複本。一個新的細胞株RS527是在穩定轉染並篩選單一複本基因併入之後由CHO K1生成，其以較低的含量表現hFcγRI蛋白質。RS527細胞表現明顯比RGC10細胞還少的hFcγRI蛋白質，如藉由FASTR™細胞株之總細胞溶解物的西方墨點分析所測定。

**【0146】** 簡言之，以pTE462轉染RGC10以及RS527細胞，pTE462是一個能夠表現經分泌hFc-融合蛋白質Rc1-hFc且賦予對潮黴素之抗性的質體。以潮黴素篩選經轉染培養物歷時兩週。以1 μg/ml多西環素(Dox)誘導潮黴素-抗性細胞並以兔IgG阻斷過夜，接著是本文所述的FASTR™方法。次日，藉由對hFc具有特異性的FITC-接合抗體對RGC10/pTE462以及RS527/pTE462培養物染色，然後藉由流式細胞分析來分析。由各個宿主株分選分別標示細胞為低、中以及高螢光的三個細胞容器R4、R5以及R6並在組織培養中擴張。

**【0147】** 為了比較六種細胞容器的Rc1-hFc蛋白質生產含量，針對每一容器使用等數目細胞來建立六個培養物。三天後，收集條件培養基。條件培養基中的Rc1-hFc蛋白質效價是藉由ELISA來測定並且相對於個別細胞容器的平均螢光來做圖。就RGC10以及RS527宿主株兩者來說，經單離細胞池的平均螢光(展示於細胞表面上的Rc1-hFc數量)以及sPOI蛋白質生產含量之間有類似的相關性。更值得注意的是，兩種衍生自RGC10以及RS527之高螢光R6容器的sPOI效價相似。這些數據證實，CSCP在FASTR™宿主細胞株中的表現含量不會顯著影響到宿主依據sPOI之表現含量來分離經轉染細胞的用途。

**【0148】 實例11：Tie2受體做為細胞表面捕捉蛋白質**

**【0149】** FcγR1以外的細胞表面捕捉蛋白質(CSCP)可用於本文所述方法中。在這個實例中，Tie2受體做為CSCP發揮功能並用來分離表現由C1b單株抗體所做出之Tie-特異性ScFv<sub>C1b</sub>-Fc融合蛋白質的細胞，C1b單株抗體特異地結合Tie2受體的細胞外域。儘管針對ScFv<sub>C1b</sub>-Fc的CSCP可以是hFcγRI，本實施例證明Tie2也可以用作為ScFv<sub>C1b</sub>-Fc的CSCP。

**【0150】** 為了構築可誘導Tie2 CSCP細胞株，首先以TetR質體pcDNA6/TR穩定地轉染CHO K1。接著pTE259穩定地轉染殺稻瘟菌素-抗性細胞池，pTE259為一種容許包含Tie2的細胞外域與穿膜域之蛋白質可誘導表現的質體。在以對Tie2具有特異性的抗體染色之後，藉由流式細胞分析分離可誘導細胞純系。選定RGC54純系來研究FASTR™表現ScFv<sub>C1b</sub>-Fc的可行性。

**【0151】** 以pTE988穩定地轉染RGC54細胞，pTE988是一種能夠表現經分泌hFc-融合蛋白質ScFv<sub>C1b</sub>-Fc且賦予對潮黴素之抗性的質體。使用潮黴

素篩選經轉染培養物歷時兩週。以Dox誘導潮黴素-抗性細胞並以1 mg/ml經純化C1b mAb予以阻斷。C1b單株抗體為ScFv<sub>C1b</sub>-Fc中可變區的來源。次日，以對hFc具有特異性的FITC-接合抗體染色該細胞池且接而藉由流式細胞分析來分析。分選三個分別將細胞標記高、中及低螢光之細胞容器R6、R7以及R8並在組織培養物中擴張。針對每一容器使用等數目細胞來建立三個培養物以測定ScFv<sub>C1b</sub>-Fc蛋白質產量，如藉由ELISA所測定。經單離細胞池的平均螢光(於細胞表面上結合至Tie2的ScFv<sub>C1b</sub>-Fc數量)及ScFv<sub>C1b</sub>-Fc蛋白質產量含量之間有相關性。

**【0152】** 這些數據顯示，hFcγRI以外的CSCP可充作用CSCP，且亦暗示任一種受體可藉由將其細胞質域移除而被轉換成CSCP。這些數據也證實，抗原可建製至CSCP中並用於FASTR™篩選表現抗原特異性抗體-相關分子的細胞。

### **【0153】 實例12：使用具有低親和力的CSCP：sPOI對的有效FASTR™篩選**

**【0154】** 血管生長素-1是Tie2受體的配體。包含血管生長素-1受體結合域以及hFc (FD1-hFc)的嵌合蛋白質以174 nM的親和常數結合至Tie2，如藉由BIAcore™所測定。選擇FD1-hFc以及Tie2分別作為sPOI以及CSCP，以決定CSCP與sPOI間的最小親和力對FASTR™篩選是否為必須。

**【0155】** 在細胞修飾實驗中，外源性添加的FD1-hFc透過Tie2特異地結合至RGC54細胞。為了測定Tie以及FD1-hFc之間的親和力是否足以允許FASTR™篩選，以pTE942穩定地轉染RGC54細胞，pTE942是一種能夠表現經分泌hFc-融合蛋白質FD1-hFc的質體且賦予對潮黴素的抗性。使用潮黴



素篩選經轉染培養物歷時兩週。以Dox誘導潮黴素-抗性細胞並以1 mg/ml經純化C1b-mFc(含有小鼠IgG1 Fc)予以阻斷。次日，以對hFc具有特異性的FITC-接合抗體染色該細胞池且接而藉由流式細胞分析來分析。收集三個分別將細胞標記高、中及低螢光之細胞容器R6、R7以及R8。針對每一容器使用等數目細胞來建立培養物以測定FD1-hFc蛋白質產量，如藉由ELISA所測定。經單離細胞池的平均螢光(結合至細胞表面結合之Tie2的FD1-Fc)及FD1-hFc蛋白質產量之間有相關性。具有最高螢光的容器產生最多FD1-hFc。

**【0156】** 這些數據證明，具有低親和力(174 nM KD)的CSCP：sPOI對可用於有效的FASTR™篩選。重要的是，FD1-Fc：Tie2結合的解離 $t_{1/2}$ 少於2分鐘，暗示任一種具有可測得親和力的CSCP：sPOI對可在FASTR™篩選中發揮作用。此外，這個實驗也顯示，非Fc $\gamma$ RI受體可用做為CSCP來分離表現其配體的細胞。

**【0157】 實例12：將穿膜域融合至ScFv產生一個功能性CSCP**

**【0158】** CSCP可以是任一種細胞表面-結合的蛋白質，其對sPOI具有可測得的親和力。為了證明此點，藉由將PDGF受體的穿膜域融合至含有鼠 $\kappa$ 鏈-特異性單株抗體HB58之可變區的ScFv來構築完全合成的CSCP。建構表現這個嵌合蛋白質(ScFv<sub>HB58</sub>-TM<sub>PDGFR</sub>)的FASTR™宿主並用來分離表現血管生長素-2 FD域-特異性P12抗體的細胞。

**【0159】** 衍生自CHO K1的RS655細胞株組成性地表現ScFv<sub>HB58</sub>-TM<sub>PDGFR</sub>。表現ScFv<sub>HB58</sub>-TM<sub>PDGFR</sub>的細胞可藉由依序與P12 mAb、FD2-hFc，和FITC-接合抗-hIgG一起培育而染色，因為HB58 ScFv而被被捕

捉在細胞表面上之P12是藉由其對FD2的親和力而被偵測，FD2又藉由hFc標誌辨識而被偵測。在以編碼eYFP之基因的質體穩定轉染之後，RS656細胞由RS655細胞衍生而來。幾乎100%的RS656細胞為eYFP-陽性，而大部分(76%)如藉由結合至FD2-hFc所偵測維持表現ScFv<sub>HB58</sub>-TM<sub>PDGFR</sub>。

**【0160】** 以pTE693穩定地轉染RS655細胞，pTE693是一種能夠表現P12抗體之重鏈與輕鏈且賦予對嘌呤黴素之抗性的質體。使用嘌呤黴素篩選經轉染培養物歷時兩週以得到一個細胞池，該細胞池就P12 mAb表現而言為異源性(RS655/pTE693)。

**【0161】** 為了測定ScFv<sub>HB58</sub>-TM<sub>PDGFR</sub>能否作為CSCP來發揮作用並促使抗體-生產細胞與非生產者分離，將等數目RS656細胞與RS655/pTE693細胞混合並共培養。當由RS655/pTE693細胞表現的P12容許擴散並結合至RS656細胞表面上的ScFv<sub>HB58</sub>，就結合FD2-hFc來說，一大群黃色細胞為陽性。但是，若RS656表面上的ScFv<sub>HB58</sub>與過量鼠IgG結合，則就結合FD2-hFc而言，僅有非黃色細胞為陽性，證明表現細胞有效地從非表現細胞被分離。

**【0162】** 這些數據證明，ScFv可藉由將其靶定至細胞膜而建製在功能性CSCP中。該數據也顯示，FASTR™容許使用抗體之抗原來偵測表現經分泌抗體的細胞。

### **【0163】 實例13：包含T細胞受體可變區的感興趣蛋白質**

**【0164】** 以類似於製備表現感興趣抗體之細胞株的方式來製備以流式細胞分析為主的自體分泌捕獲(FASTR™)方法以供分離細胞株的高表現量純系，其表現感興趣的蛋白質(TCR-Fc)。高表現量純系是藉由篩選在其表面上展現結合至hFc $\gamma$ R之感興趣TCR-Fc的細胞而被鑑定。

【0165】 在這些實例中，使用包含可誘導hFc $\gamma$ R1作為細胞表面捕捉分子的CHO K1細胞株RGC10。RGC10藉由將TCR可變區以框架內的方式(直接在框架內或在TCR可變區與人類Fc區之間使用連結子序列)選殖到人類Fc區中被製成表現重組TCR-Fc。

【0166】 為了製造本身為二聚體的感興趣蛋白質(其包含Fc-連結TCR  $\alpha$ 可變域以及Fc-連結TCR  $\beta$ 可變域)，以兩種載體轉染RGC10：第一種載體能夠表現帶有人類Fc序列的TCR  $\alpha$ 可變域融合蛋白質，而第二種載體能夠表現帶有相同人類Fc序列的TCR  $\beta$ 域融合蛋白質。各個載體在TCR可變區的5'包括引導序列(例如分泌訊號序列)以及本身為藥物抗性基因的可篩選標記。在各個載體轉染之後，藉由適當藥物篩選來篩選含有載體的細胞。篩選產生具有第一種載體以及第二種載體的RGC10細胞株。可以藉由針對 $\beta$ 可變域的抗體、針對 $\alpha$ 可變域的抗體，以及針對Fc域的抗體中的一或多者來偵測表現感興趣蛋白質的細胞。

【0167】 為了製造本身為二聚體的感興趣蛋白質(其包含融合至Fc的 $\alpha$ 與 $\beta$ TCR可變域)，以單一種載體轉染RGC10，該載體編碼如下構築的感興趣蛋白質：引導序列(例如分泌訊號序列)，接著是融合至連結子的TCR可變 $\beta$ 域，其中連結子又融合至TCR可變 $\alpha$ 域，TCR可變 $\alpha$ 域復而融合至Fc序列。或者，如下構築該單一載體：引導序列(例如分泌訊號序列)，接著是融合至連結子的TCR可變 $\alpha$ 域，其中連結子又融合至TCR可變 $\beta$ 域，TCR可變 $\beta$ 域復而融合至Fc序列。可以藉由針對 $\beta$ 可變域的抗體、針對 $\alpha$ 可變域的抗體，以及針對Fc域的抗體中的一或多者來偵測表現感興趣蛋白質的細胞。

【0168】 為了製造如上感興趣蛋白質(其亦包含TCR  $\alpha$ 及/或TCR  $\beta$ 恆定域)，TCR可變域( $\alpha$ 或 $\beta$ )融合至TCR恆定域(例如TCR可變域 $\alpha$ 融合至TCR恆定域

$\alpha$ ，而TCR可變域 $\beta$ 融合至TCR恆定域)，而TCR可變+恆定域是直接融合或透過一連結子融合至Fc域。可以藉由針對 $\beta$ 可變域的抗體、針對 $\alpha$ 可變域的抗體，以及針對Fc域的抗體中的一或多者來偵測表現感興趣蛋白質的細胞。

**【0169】** 使用與如本文所述分離4SC622-生產細胞株時所用相同程序，使用針對 $\alpha$ 可變域的抗體、針對 $\beta$ 可變域的抗體、針對 $\alpha$ 恆定域的抗體，以及針對 $\beta$ 恆定域的抗體，與針對Fc域的抗體中的一或多者分離表現所要數量之TCR-Fc的細胞。表現最高含量TCR-Fc的細胞被篩選作為TCR-Fc-生產細胞株。

#### **【0170】 實例14：以ScFv為主的CSCP供分離多種IgG同型與雙特異性抗體用**

**【0171】** 以人類IgG4蛋白質的Fc片段(hFc，或簡稱為Fc；SEQ ID NO：26)，或含有二肽突變(依據IMGT為H95R、Y96F，亦已知為Fc\*；SEQ ID NO：42)的人類 $\Delta$ AdpFc多肽免疫經基因改造的小鼠，該小鼠之基因組的免疫球蛋白重鏈VDJ區及免疫球蛋白 $\kappa$ 鏈VJ區被人類同系物(亦即Velocimmune®小鼠；參見美國專利第7,105,348號，其以其整體併入本文做為參考資料)所取代。由小鼠取得單株抗體並篩選它們結合Fc、Fc\*的能力或包含Fc及/或Fc\*的抗體。測試能夠結合Fc (Ab1、Ab2、Ab3)的三種抗體以及能夠結合Fc\* (Ab4、Ab5、Ab6)的三種抗體結合具有下列形式之一者之分子的能力：Fc/Fc、Fc/Fc\* (其可為雙特異性抗體)，以及Fc\*/Fc\*。

**【0172】** 測定結合親和力以及動力學常數的測量法是在Biacore 2000儀器上完成。抗體(Ab1-Ab8的每一者)被捕捉至抗-小鼠-Fc感測表面(Mab捕捉形式)，以及人類Fc (SEQ ID NO 26)同二聚體上，將人類Fc\*同二聚體(SEQ ID NO：42)或Fc/Fc\*雜二聚體注射通過該表面。動力學締合( $k_a$ )以及解離( $k_d$ )速率常數是使用

Scrubber 2.0曲線擬合軟體藉由處理數據並將數據擬合至1：1結合模型而被決定。結合解離平衡常數( $K_D$ )以及解離半衰期( $t_{1/2}$ )是由動力學速率常數計算為： $K_D (M) = k_d / k_a$ ；且 $t_{1/2} (min) = (\ln 2 / (60 * k_d))$ 。如表2中所示，抗體有3種不同種類：Fc特異性、Fc\*特異性，以及彼等在Fc與Fc\*之間顯示沒有差別者(非特異性)。Fc特異性抗體是取決於胺基酸His 95及/或Tyr 96，因為這些抗體不結合其二肽具有突變(H95R、Y96F)的Fc\*。相對地，Fc\*特異性抗體取決於Arg 95及/或Phe 96，因為這些抗體不結合野生型人類Fc。

### 【0173】 實例15：生產Ab2以及Ab2-衍生之ScFv-FcγR融合蛋白質的細胞株

【0174】 將Fc-特異性Ab2的重鏈以及輕鏈定序。為了製造重組Ab2抗體，構築一個編碼重鏈的表現載體質體並構築一個編碼輕鏈的表現載體質體。兩個載體能夠在CHO細胞中表現並分泌各自的次單元。為了表現抗體，兩個質體被轉染至CHO-K1細胞中並分離穩定的轉形株。抗體鏈的表現是由組成性CMV啟動子所驅動。

### 【0175】 表2：抗體的親和力-表面電漿共振研究

抗體	POI-標靶	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$KD (M)$	$t_{1/2} (min)$	特異性
Ab1	Fc/Fc	1.07E+05	3.79E-04	3.54E-09	30	Fc
	Fc/Fc*	8.16E+04	3.01E-04	3.69E-09	38	
	Fc*/Fc*	NB	NB	NB	NB	
Ab2	Fc/Fc	7.86E+04	3.50E-05	4.45E-10	330	Fc
	Fc/Fc*	5.45E+04	1.00E-06	1.84E-11	11550	

第 58 頁，共 67 頁(發明說明書)

	Fc*/Fc*	NB	NB	NB	NB	
Ab3	Fc/Fc	1.77E+05	4.08E-02	2.30E-07	0.3	Fc
	Fc/Fc*	4.51E+04	2.60E-02	5.77E-07	0.4	
	Fc*/Fc*	NB	NB	NB	NB	
Ab4	Fc/Fc	NB	NB	NB	NB	Fc*
	Fc/Fc*	6.00E+03	1.00E-06	2.00E-10	11550	
	Fc*/Fc*	2.22E+04	9.56E-06	4.50E-10	1209	
Ab5	Fc/Fc	NB	NB	NB	NB	Fc*
	Fc/Fc*	3.11E+05	1.00E-06	3.21E-12	11550	
	Fc*/Fc*	5.57E+05	1.00E-06	1.79E-12	11550	
Ab6	Fc/Fc	NB	NB	NB	NB	Fc*
	Fc/Fc*	4.48E+05	7.43E-04	1.66E-09	16	
	Fc*/Fc*	8.73E+05	5.93E-04	6.79E-10	19	
Ab7	Fc/Fc	6.02E+05	2.42E-04	4.02E-10	48	非特異性
	Fc/Fc*	4.90E+05	2.15E-04	4.39E-10	54	
	Fc*/Fc*	4.46E+05	3.20E-02	7.18E-08	0.4	
Ab8	Fc/Fc	2.59E+05	4.88E-04	1.88E-09	24	非特異性
	Fc/Fc*	1.88E+05	4.02E-04	2.14E-09	29	
	Fc*/Fc*	4.10E+04	3.90E-02	9.60E-07	0.3	

【0176】 使用重鏈以及輕鏈序列來開發抗-Fc ScFv表面捕捉分子。為了製造編碼Ab2-衍生之抗-Fc ScFv-FcγR表面捕捉分子的核酸，將Ab2免疫球蛋白重鏈可變域(SEQ ID NO：15)以及Ab2免疫球蛋白輕鏈可變域(SEQ ID NO：16)胺基酸序列逆轉譯並針對CHO細胞表現將密碼子最佳化。同樣地，人類FcγRI的C-端部

分亦針對CHO細胞表現將密碼子最佳化。經由聚合酶鏈反應擴增密碼子經最佳化的核苷酸序列並且接合而形成編碼SEQ ID NO：19之ScFv-FcγR融合蛋白質的連續核酸序列(SEQ ID NO：20)。

**【0177】** 使用標準PCR以及限制內核酸酶選殖技術將編碼ScFv-FcγR-TM-cyto融合蛋白質的核酸插入至表現載體中。SEQ ID NO：23中例示的所得環狀質體包含β-內醯胺酶-編碼核酸序列，以及兩個操縱子。第一個操縱子包含編碼黃色螢光蛋白質(YFP)、綠色螢光蛋白質變體，與新黴素抗性標記一起在框架內的核酸序列，其是受到SV40啟動子所驅動(例如SEQ ID NO：24)。第二個操縱子，就本發明的這個態樣來說其為載體的”運作部分”，包含編碼密碼子經最佳化之ScFv-FcγR融合蛋白質的核酸序列，該第二操縱子是受到hCMV-IE啟動子以及hCMV-內含子所驅動(例如SEQ ID NO：25)。

**【0178】** 以SEQ ID NO：23的質體轉染CHO-K1細胞。分離SEQ ID NO：22的線狀構築體已被併入其基因組的整合體。

**【0179】** 環狀質體含有兩個在第一操縱子以及第二操縱子兩側的Lox位點，以容許彼等操縱子併入宿主細胞的基因組作為線狀構築體。從第一個Lox位點橫跨至第二個Lox位點的線狀構築體例示於SEQ ID NO：22中且從5'端至3'端包含：SV40啟動子、編碼新黴素-抗性的核酸、IRES、編碼eYFP的核酸、SV40聚腺苷酸化序列、hCMV-IE啟動子、hCMV內含子、Tet-操作子序列(用以ScFv-FcγR-TM-cyto融合蛋白質的控制表現)、編碼mROR訊號序列的核酸、編碼Ab2 ScFv的核酸、編碼FcγR穿膜與細胞質部分的核酸(SEQ ID NO：21)，以及SV40聚腺苷酸化序列。

**【0180】 實例16：ScFv-FcγR-TM-cyto表面捕捉標靶**

【0181】以編碼各種亞型(例如，IgG1、IgG2、IgG4、含有一個帶有95R/435R-96F/436F雙重置換的CH3域而另一個CH3域為野生型的IgG4雙特異性抗體(IgG4 Fc/Fc\*)，以及IgG1 Fc/Fc\*形式之IgG1雙特異性抗體)之抗體的質體轉染含有併入SEQ ID NO：22之序列的CHO-K1細胞。使用多西環素處理細胞以誘導捕捉分子與抗體的生成。在抗體與捕捉分子共表現之後，在一些情況下以hFc阻斷蛋白質以及偵測分子(FITC-標記的抗-hFab)處理細胞。表3歸納結果，且大體上顯示ScFv-FcγR表面捕捉融合蛋白質結合IgG4、IgG2與IgG1分子，而野生型FcγR表面捕捉分子結合IgG1，但不結合IgG4或IgG2。



【0182】 表3：阻斷分子競爭分析

抗體	任意 FITC 單位(有或沒有 hFc 阻斷分子) – 類型					hFc 替代?
	無 hFc	hFc (1 hr)	hFc (2 hr)	hFc (20 hr)	無塗覆	
	捕捉分子 = ScFv-FcγR-TM-cyto 偵測分子 = FITC-抗-hFab					
IgG1 mAb-3	250	120	80	20	10	是
IgG4 mAb-4	250	100	55	20	10	是
IgG4 mAb-5	250	70	40	20	10	是
IgG2 mAb-6	200 <sup>1</sup>	ND	ND	ND	12 <sup>2</sup>	是
	捕捉分子 = hFcγR 偵測分子 = FITC-抗-hFab					
IgG1 mAb-3	300	80	30	9	3.5	是
IgG4 mAb-4	100	2	2	2	2	否
IgG4 mAb-5	35	5	5	5	5	否

<sup>1</sup>+Dox <sup>2</sup>-Dox

【0183】 實例17：生產Ab6以及Ab6-衍生之ScFv\*-FcγR-TM-cyto的細胞株

【0184】 對Fc\*-特異性Ab6的重鏈與輕鏈進行定序。輕鏈的胺基酸序列測定為SEQ ID NO：41。重鏈的胺基酸序列測定為SEQ ID NO：40。為了製造重組Ab6抗體，構築一個編碼重鏈的表現載體質體並構築一個編碼輕鏈的表現載體質體。為了表現抗體，兩個質體被轉染至CHO-K1細胞中並分離穩定的轉形株，而表現是由組成性CMV啟動子所驅動。

【0185】 為了製造編碼Ab6-衍生的抗-Fc\*-特異性ScFv\*-FcγR表面捕捉分子的核酸，Ab6抗體的免疫球蛋白重鏈可變域(SEQ ID NO：38)以及Ab6的免疫

球蛋白輕鏈可變域(SEQ ID NO : 39)胺基酸序列逆轉譯並針對CHO細胞表面將密碼子最佳化。同樣地，人類FcγRI的C-端部分(SEQ ID NO : 21)係針對CHO細胞表現將密碼子最佳化。經由聚合酶鏈反應擴增密碼子經最佳化的核苷酸序列並且接合而形成編碼抗-Fc\* ScFv\*-FcγR融合蛋白質(SEQ ID NO : 43)的連續核酸序列(SEQ ID NO : 45)。

**【0186】** 使用標準PCR以及限制內核酸酶選殖技術將編碼 ScFv\*-FcγR-TM-cyto融合蛋白質的核酸插入至表現載體中。SEQ ID NO : 44中例示的所得環狀質體包含β-內醯胺酶-編碼核酸序列，以及兩個操縱子。第一個操縱子包含編碼黃色螢光蛋白質(YFP)、綠色螢光蛋白質變體，與新黴素抗性標記一起在框架內的核酸序列，其是受到SV40啟動子所驅動(例如SEQ ID NO : 46)。第二個操縱子，就本發明的這個態樣來說其為載體的”運作部分”，包含編碼密碼子經最佳化之抗-Fc\* ScFv\*-FcγR融合蛋白質的核酸序列，其是受到hCMV-IE啟動子以及hCMV-內含子(例如SEQ ID NO : 47)所驅動。

**【0187】** 以SEQ ID NO : 44的質體轉染CHO-K1細胞。分離SEQ ID NO : 48線狀構築體已被併入的穩定整合體。

**【0188】** 環狀質體含有兩個在第一操縱子以及第二操縱子兩側的Lox位點，以容許彼等操縱子併入宿主細胞的基因組作為線狀構築體。從第一個Lox位點橫跨至第二個Lox位點的線狀構築體例示於SEQ ID NO : 48中且從5端至3端包含：SV40啟動子、編碼新黴素-抗性的核酸、IRES、編碼eYFP的核酸、SV40聚腺苷酸化序列、hCMV-IE啟動子、hCMV內含子、Tet-操作子序列(用以抗-Fc\* ScFv\*-FcγR融合蛋白質的控制表現)、編碼mROR訊號序列的核酸，編碼Ab6-衍

生之抗-Fc\*-特異性ScFv\*的核酸、編碼FcγR穿膜與細胞質域多肽的核酸(SEQ ID NO: 21)，以及SV40聚腺苷酸化序列。

### 【0189】 實例18：分選雙特異性抗體

#### 抗-Fc捕捉&抗-Fc\*偵測

【0190】 測試Ab2-衍生之抗-Fc-特異性ScFv-FcγR表面捕捉系統偵測並濃化生產雙特異性抗體之細胞的能力。為了評估偵測雙特異性抗體(其在CH3域的一者(稱為Fc\*)中帶有95R/435R-96F/436F置換)的能力，在Ab2-衍生之抗-Fc-特異性ScFv-FcγR表面捕捉細胞株中表現各種抗體，使用hFc作為阻斷分子，而FITC-標定Ab6抗-Fc\*抗體(例如帶有SEQ ID NO: 40之HC，以及SEQ ID NO: 41之LC的mAb)作為偵測分子。使用Fc\*-特異性Ab6作為偵測分子，Ab2-衍生之抗-Fc-特異性ScFv-FcγR表面捕捉細胞株能夠偵測並區別雙特異性抗體(Fc/Fc\*)與任一種Fc\*/Fc\*或Fc/Fc單特異性抗體(表4)。野生型FcγR表面捕捉細胞株不能區別Fc/Fc\*、Fc\*/Fc\*，以及Fc/Fc IgG4成分，因為FcγR無法結合，或以非常低的親和力結合至IgG4。

#### 抗-Fc\*捕捉&抗-Fc偵測

【0191】 相反地，測試Ab6-衍生之抗-Fc\*-特異性ScFv\*-FcγR表面捕捉系統偵測並濃化生產雙特異性抗體之細胞的能力。為了評估偵測雙特異性抗體(其在CH3域的一者(稱為Fc\*)中帶有95R/435R-96F/436F置換)的能力，在Ab6-衍生之抗-Fc\*-特異性ScFv\*-FcγR表面捕捉細胞株中表現各種抗體，使用hFc作為阻斷分子，而Alexa 488-標定Ab2抗-Fc抗體(其辨識非經置換CH3)作為偵測分子。使用Fc-特異性Ab2作為偵測分子，Ab6-衍生之抗-Fc\*-特異性ScFv\*-FcγR表面捕捉細胞系能夠偵測並區別雙特異性抗體

(Fc/Fc\*)與任一種Fc\*/Fc\*或Fc/Fc單特異性抗體(表4)。FcγR表面捕捉細胞系不能區別Fc/Fc\*、Fc\*/Fc\*，以及Fc/Fc IgG4成分。

【0192】 表4：雙特異性抗體的偵測-平均螢光強度(MFI)

<sup>1</sup> CSCP	<sup>2</sup> DM	IgG1			IgG4			Fc/Fc*特異性
		Fc/Fc*	Fc*/Fc*	Fc/Fc	Fc/Fc*	Fc*/Fc*	Fc/Fc	
FcγR	Ab2	500	ND	350	200	200	200	否
	Ab6	200	200	200	ND	ND	ND	否
	抗-hFc	1800	ND	1000	ND	ND	ND	否
ScFv-FcγR	Ab6	500	15	15	500	15	15	是
	抗-hFc	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ScFv*-FcγR	Ab2	150	10	10	ND	ND	ND	是
	抗-hFc	200	ND	10	ND	ND	ND	是

<sup>1</sup>細胞表面捕捉蛋白質 <sup>2</sup>偵測分子

【0193】 實例19：濃化Fc/Fc\*雙特異性抗體

【0194】 為了評估(Ab2-衍生) ScFv-FcγR CSCP/(Ab6)抗-Fc\* DM以及(Ab6-衍生) ScFv\*-FcγR CSCP/(Ab2)抗-Fc DM系統分選並濃化雙特異性抗體的能力，使用hFc作為阻斷分子而FITC-標定的抗-Fc\*(Ab6)抗體作為偵測分子，使共表現Fc/Fc\* IgG4單株抗體(IgG4-mAb-2)以及抗-Fc ScFv-FcγR融合蛋白質的細胞株進行連續螢光活化細胞分選以及集中，以濃化Fc/Fc\*成分的產量。分析由第五及第六連續池生成Fc/Fc\*的細胞的總抗體效價以及各別抗體形式的效價：Fc/Fc\*、Fc/Fc，以及Fc\*/Fc\*。因為細胞編碼編碼未經置換CH3域之重鏈(“Fc”，亦即在

IMGT位置95處包含組胺酸而在IMGT位置96處包含酪胺酸)和編碼經置換CH3域之重鏈("Fc\*"),亦即在IMGT位置95處包含精胺酸而在IMGT位置96處包含苯丙胺酸),藉由單純數學潘乃特氏方格分析,細胞在理論上預期會生產25% Fc/Fc、50% Fc/Fc\*,以及25% Fc\*/Fc\*。但是,在生物學上,吾人(預濃化)預期大多數生成的抗體為Fc/Fc。

【0195】如表5中所示,針對雙特異性抗體生產所選定、集中以及濃化的細胞生成多達49% Fc/Fc\*成分,其中Fc/Fc\*雙特異性抗體的效價為至少約3.2 g/L。

【0196】表5：濃化Fc/Fc\*雙特異性抗體IgG4-mAb-2

池	細胞株	Fc/Fc*		Fc/Fc		Fc*/Fc*	
		效價 (g/L)	%	效價 (g/L)	%	效價 (g/L)	%
5	1	1.2	28	2.2	50	0.99	23
	2	1.9	<b>49</b>	1.3	32	0.73	19
	3	1.5	47	1.2	40	0.40	13
	4	1.6	37	1.3	31	1.3	32
	5	1.5	48	1.1	35	0.58	18
	6	1.8	47	1.3	33	0.75	20
6	7	2.6	44	2.0	34	1.3	23
	8	<b>3.2</b>	42	2.4	31	2.0	27
	9	2.1	45	1.5	33	1.0	22
	10	2.8	43	2.0	31	1.7	28

	11	2.3	44	1.6	31	1.3	24
--	----	-----	----	-----	----	-----	----

【0197】 儘管已藉由說明以及例示的方式仔細說明前述發明，對於彼等習於技藝者來說，可在不偏離隨附申請專利範圍的精神或範疇下對本發明教示做出某些改變以及修飾。

## 序列表

<110> 美商再生元醫藥公司(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)

<120> 重組細胞表面捕捉蛋白質

<130> 8600A

<150> US 61/726,040

<151> 2012-11-14

<160> 51

<170> PatentIn 第 3.5 版

<210> 1

<211> 195

<212> PRT

<213> 鏈球菌

<400> 1

Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr  
1 5 10 15

Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr  
20 25 30

Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr  
35 40 45

Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu  
50 55 60

Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr  
65 70 75 80

Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu  
85 90 95

Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp  
100 105 110

Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu  
115 120 125

Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu  
130 135 140

第 1 頁，共 48 頁(序列表)

Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val  
 145 150 155 160

Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn  
 165 170 175

Gly Val Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr  
 180 185 190

Val Thr Glu  
 195

<210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro Val Trp Phe His Val Leu  
 1 5 10 15

Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu Val Asn Thr Val Leu Trp  
 20 25 30

Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys Lys Lys Trp Asp Leu Glu  
 35 40 45

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

Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln Lys Glu  
 65 70 75 80

Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly Ala Thr  
 85 90 95

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成



<400> 3  
 cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc ttc 33

<210> 4  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 4  
 acactctccc ctgttgaagc tcttgacaat ggg 33

<210> 5  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 5  
 gccaaaacaa cagccccatc ggtctatcca c 31

<210> 6  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 6  
 tcatttaccg ggagtccggg agaagctctt agtcg 35

<210> 7  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 7  
 gagagtacct gcgtcatgca gatgtgaaac tgcaggagtc tggccct 47

<210> 8  
 <211> 38  
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 8

gagagacctg cgtcagctga ggagacggtg accgtggt

38

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 9

gagagggtct cacagccaaa acaacagccc catcg

35

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 10

gagagggtct ccggccgctc atttaccgg agtccgggag aa

42

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 11

gagagcgtct catgcagaca tccagatgac ccagtctcca

40

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 12

gagagcgtct cacagcccgt tttatttcca gcttgggtccc

40

<210> 13  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 13  
 gagagggtct cagctgatgc tgcaccaact gtatcc 36

<210> 14  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 14  
 gagagggtct caggccgctc aacactctcc cctgttgaag ctcttgac 48

<210> 15  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 15

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala Ser Val  
 1 5 10 15

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile  
 20 25 30

His Trp Glu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr  
 35 40 45

Ile Asn Pro Asn Thr Gly His Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp  
 50 55 60

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln  
 65 70 75 80

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
 85 90 95

Thr Tyr Ser Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Leu

<210> 16  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 16

Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Pro Val Ser Leu  
 1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His  
 20 25 30

Asn Asn Gly Asp Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys  
 65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln  
 85 90 95

Thr Thr Leu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110

<210> 17  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 17

Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu Val Asn Thr Val  
 1 5 10 15

Leu Trp Val Thr Ile  
 20

<210> 18  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 18

Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu  
 1 5 10 15

Asp Ser Gly His Glu Lys Lys Val Thr Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg  
 20 25 30

His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu  
 35 40 45

Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly Ala Thr  
 50 55 60

<210> 19  
 <211> 334  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 19

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Trp Ile His Trp Glu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Thr Gly His Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 第 7 頁，共 48 頁(序列表)

85

90

95

Ala Arg Thr Tyr Ser Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Ile Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Val Ser  
130 135 140

Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser  
145 150 155 160

Gln Ser Leu Val His Asn Asn Gly Asp Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu  
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn  
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val  
210 215 220

Tyr Phe Cys Ser Gln Thr Thr Leu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly  
225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Val Leu Phe Tyr  
245 250 255

Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr  
260 265 270

Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser  
275 280 285

Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys Val Thr Ser Ser Leu Gln Glu Asp  
290 295 300

Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln

第 8 頁，共 48 頁(序列表)

305

310

315

320

Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly Ala Thr  
 325 330

<210> 20  
 <211> 1005  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 20  
 caagtacaac tgcaacaaag cggagctgaa ctggccaaac caggcgcttc cgtgaagatg 60  
 tcttgtaaag ccagcgggta tacatttact aattactgga ttacttgga gaagcaaaga 120  
 cctgaacagg gattggaatg gattggatac attaatccta acaccggaca cacagagtat 180  
 aatcaaaaat tcaaggataa ggccaccctc acagccgaca gatcttcttc aaccgcctat 240  
 atgcaacttt ctccctcac ttctgaagac tccgcagttt acttttgcgc acgaacttat 300  
 tctggaagct ccatttcga ctactggggt caaggaaca cactgatcgt gtctagcggc 360  
 ggccggagggt ccggcggggg cggtagcggg ggcggagggt ctgatattgt catgactcaa 420  
 acacctgtct ctctgcctgt ttactttgga gatcaagcta gcatttcttg ccgctctagt 480  
 caatctctcg tccacaaca cggcgatact ttcttgcatt ggtatctgca gaaaccaggt 540  
 cagtcaccta aactgcttat atacaaagtc tctaatagat tctcaggggg gccagatcga 600  
 ttcagtggtt ctgggtccgg tacagatfff aactcaaga tatccagagt agaagcagaa 660  
 gatctgggcg tgtatttctg cagtcaaaca acatttattc ctctactttt tggaggcggg 720  
 aaaaaactgg agatcaagcg tggaggcggg gggagtgttt tgttttatct ggccgttggg 780  
 ataatgtttc tcgtaaatac agtactttgg gtaacaataa ggaaggaact gaagagaaag 840  
 aaaaaatggg atctggaat atcattggac agtggacacg aaaaaaagt cacatcatca 900  
 ttgcaagaag accggcactt ggaggaggaa ctgaaatgtc aagagcaaaa agaagaacaa 960  
 ctgcaagaag gcgtacatag aaaagaacca caggagcaa catag 1005

<210> 21  
 <211> 82  
 <212> PRT  
 <213> 智人

&lt;400&gt; 21

Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu Val Asn Thr Val  
 1 5 10 15

Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys Lys Lys Trp Asp  
 20 25 30

Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys Val Thr Ser Ser  
 35 40 45

Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln  
 50 55 60

Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly  
 65 70 75 80

Ala Thr

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 5759

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成

&lt;400&gt; 22

acaacttcgt atagcataca ttatacgaag ttatggtacc aagcctaggc ctccaaaaaa 60  
 gcctctcac tacttctgga atagctcaga ggcagaggcg gcctcggcct ctgcataaat 120  
 aaaaaaatt agtcagccat ggggcggaga atgggcggaa ctgggcggag ttaggggcgg 180  
 gatgggcgga gttagggcg ggactatggt tgctgactaa ttgagatgca tgctttgcat 240  
 acttctgcct gctggggagc ctggggactt tccacacctg gttgctgact aattgagatg 300  
 catgctttgc atacttctgc ctgctgggga gcttggggac ttccacacc ggatccacca 360  
 tgggttcagc tattgagcag gatgggttgc atgctggtag tcccgcgca tgggtcgaac 420  
 gactgtttgg atacgattgg gccaacaga ctataggctg tccgacgct gctgtcttcc 480  
 gtctttctgc acaaggtcgt ccagttctgt tcgtgaaaac cgacttgtcc ggagccctca 540  
 atgagttgca agacgaagct gcacgactga gttggcttgc caccactggt gtcccatgtg 600  
 ccgcagtact tgacgtcgtc acagaggctg gtcgcgattg gttgctcctt ggagaagtgc 660

第 10 頁，共 48 頁(序列表)



ccggccaaga tcttctcagt tcccaccttg cccctgccga aaaagtttca ataatggctg	720
acgctatgag aaggctgcac acccttgacc ctgccacatg tccattcgat caccaagcca	780
aacaccgaat tgaacgagct agaaccgcga tggaaagccgg cctcgttgat caagacgatt	840
tggatgagga acaccagggt ctgcacccg ctgaactctt cgctcgctc aaagcacgaa	900
tgccagacgg agatgacttg gtcgtaacct acggagatgc ctgccttctt aacataatgg	960
tagagaatgg aagatttagc ggcttcattg attgtggacg acttggagtt gcagatcggt	1020
accaagatat cgctctcgct accagagata ttgctgaaga attgggcgga gaatgggctg	1080
atcggtttct cgtactctac ggaattgccg cacctgattc ccaacgcatt gctttttacc	1140
gtcttctgga tgagtcttc taaacgcgtc cccctctcc ctccccccc cctaacttta	1200
ctggccgaag ccgcttgaa taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgtta tttccacca	1260
tattgccgtc ttttggcaat gtgagggccc ggaaacctgg cctgtcttc ttgacgagca	1320
ttctagggg tctttccct ctgccaaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg	1380
aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc	1440
agcggaaacc cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt gtataagata	1500
cacctgcaa ggcggcaca cccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag	1560
tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc	1620
attgtatggg atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt	1680
taaaaaacgt ctaggcccc cgaaccacgg ggacgtggtt ttctttgaa aaacacgatt	1740
gctcgaatca ccatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatctg	1800
gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc	1860
gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg	1920
ccctggcca cctcgtgac caccttcggc tacggcctgc agtgcttcgc ccgctacccc	1980
gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgcatgc ccgaaggcta cgtccaggag	2040
cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacct gcgccgaggt gaagttcgag	2100
ggcgacacc tggatgaacc catcgagctg aagggcacg acttcaagga ggacggcaac	2160
atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac	2220
aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc	2280
gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg	2340

cccgacaacc actacctgag ctaccagtcc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc	2400
gateacatgg tectgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcg catggacgag	2460
ctgtacaagt aatcgccgc taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt	2520
aaaaaacctc ccacacctc cctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgtttgtt	2580
taacttgttt attgcagctt ataatggfta caaataaagc aatagcatca caaatttcac	2640
aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc	2700
ttatcatgtc ggcgcgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg	2760
ggtcattagt tcatagccca tataatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaattggcc	2820
cgcttgctg accgcccac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca	2880
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg	2940
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg	3000
acggtaaatg gcccgctgg cattatgcc agtacatgac cttatgggac tttcctactt	3060
ggcagtacat ctacgtatta gtcategcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca	3120
tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatctcc aagtctccac cccattgacg	3180
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact	3240
ccgccccatt gacgcaaagc ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag	3300
ctctccctat cagtgataga gatctcccta tcaatgatag agatcgtcga cgttttagtga	3360
accgtcagat cgcctggaga cgccatccac gctgttttga cctccataga agacaccggg	3420
accgatccag cctccgcggc cgggaacggt gcattggaac gcggattccc cgtgccaaga	3480
gtgacgtaag taccgctat agagtctata ggcccacccc cttggcttct tatgcatgct	3540
atactgtttt tggcttgggg tctatacacc cccgcttctt catgttatag gtgatggtat	3600
agcttagcct ataggtgtgg gttattgacc attattgacc actcccctat tggtgacgat	3660
actttccatt actaatccat aacatggctc ttgcccacaa ctctctttat tggctatatg	3720
ccaatacact gtcttcaga gactgacacg gactctgtat ttttacagga tggggtctca	3780
tttattattt acaaattcac atatacaaca ccaccgtccc cagtgccgc agtttttatt	3840
aaacataacg tgggatctcc acgcgaatct cgggtacgtg ttccggacat ggtctcttct	3900
ccggtagcgg cggagcttct acatccgagc cctgctccca tgccctccagc gactcatggt	3960
cgctcggcag ctctttgctc ctaacagtgg aggccagact taggcacagc acgatgccc	4020

ccaccaccag tgtgccgcac aaggccgtgg cggtagggta tgtgtctgaa aatgagctcg	4080
gggagcgggc ttgcaccgct gacgcatttg gaagacttaa ggcagcggca gaagaagatg	4140
caggcagctg agttgtttgt ttctgataag agtcagaggt aactcccgtt gcggtgctgt	4200
taacggtgga gggcagtgta gtctgagcag tactcgttgc tgccgcgcgc gccaccagac	4260
ataatagctg acagactaac agactgttcc ttccatggg tctttctgag agtcaccgtc	4320
cttgacacga agcttatact cgagctctag attgggaacc cgggtctctc gaattcgaga	4380
tctccacat gcacagacct agacgtcgtg gaactcgtcc acctccactg gcaactgctc	4440
ctgctctct cctggctgca cgtgggtgctg atgcacaagt acaactgcaa caaagcggag	4500
ctgaactggc caaaccaggc gcttccgtga agatgtcttg taaagccagc ggggtatacat	4560
ttactaatta ctggattcac tgggagaagc aaagacctga acagggattg gaatggattg	4620
gatacattaa tccaacacc ggacacacag agtataatca aaaattcaag gataaggcca	4680
ccctcacagc cgacagatct tcttcaaccg cctatatgca actttcttcc ctcaactctg	4740
aagactccgc agtttacttt tgcgcacgaa cttattctgg aagctcccat ttcgactact	4800
ggggtcaagg aacaacactg atcgtgtcta gcggcggcgg agggctccggc gggggcggta	4860
gcggtgccgg aggttctgat attgtcatga ctcaaacc tgtctctctg cctgtttcac	4920
ttggagatca agctagcatt tctgcccgt ctagtcaatc tctcgtccac aacaacggcg	4980
atactttctt gcattgggat ctgcagaaac caggctcagtc acctaaactg cttatataca	5040
aagtctctaa tagattctca ggggtgccag atcgattcag tggttctggg tccggtacag	5100
atthtact caagatatcc agagtagaag cagaagatct gggcgtgtat ttctgcagtc	5160
aaacaacact tattcctcgt acttttggag gcggtacaaa actggagatc aagcgtggag	5220
gcggagggag tgttttgttt tatctggccg ttgggataat gtttctcgta aatacagtac	5280
tttgggtaac aataaggaag gaactgaaga gaaagaaaa atgggatctg gaaatcat	5340
tggacagtgg acacgaaaa aaagtcacat catcattgca agaagaccgg cacttggagg	5400
aggaactgaa atgtcaagag caaaaagaag aacaactgca agaaggcgtc catagaaaag	5460
aaccacagg agcaacatag gcggccccta atcagccata ccacatttgt agaggttta	5520
cttgctttaa aaaacctccc acacctccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt	5580
gttgtttgta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca	5640
aatttcacaa ataaagcatt ttttctactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcact	5700

aatgtatctt atcatgtcta ccggtataac ttcgtataat gtataactata cgaagttag 5759

<210> 23  
 <211> 7627  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 23

aagcttatac tcgagctcta gattgggaac ccgggtctct cgaattcgag atctccacca 60

tgcacagacc tagacgtcgt ggaactcgtc cacctccact ggcaactgctc gctgctctcc 120

tcttggtcgc acgtggtgct gatgcacaag tacaactgca acaaagcggg gctgaactgg 180

ccaaaccagg cgcttccgtg aagatgtctt gtaaagccag ccgggtataca ttactaatt 240

actggattca ctgggagaag caaagacctg aacagggatt ggaatggatt ggatacatta 300

atcctaacac cggacacaca gagtataatc aaaaattcaa ggataaggcc accctcacag 360

ccgacagatc ttcttcaacc gcctatatgc aactttcttc cctcacttct gaagactccg 420

cagtttactt ttgcgcacga acttattctg gaagctccca ttctgactac tggggtaag 480

gaacaacact gatcgtgtct agcggcggcg gagggctccg cgggggcggt agcggtggcg 540

gaggttctga tattgtcatg actcaaacac ctgtctctct gcctgtttca cttggagatc 600

aagctagcat ttcttcccgc tctagtcaat ctctcgtcca caacaacggc gatactttct 660

tgcattggta tctgcagaaa ccaggtcagt cacctaaact gcttatatac aaagtctcta 720

atagattctc aggggtgcca gatcgattca gtggttctgg gtccggtaca gattttacac 780

tcaagatata cagagtagaa gcagaagatc tgggcgtgta ttcttgcagt caaacaacac 840

ttattcctcg tacttttggg ggcgggtacaa aactggagat caagcgtgga ggcggaggga 900

gtgttttgtt ttatctggcc gttgggataa tgtttctcgt aaatacagta ctttgggtaa 960

caataaggaa ggaactgaag agaaagaaaa aatgggatct ggaaatatca ttggacagtg 1020

gacacgaaaa aaaagtcaca tcatcattgc aagaagaccg gcacttggag gaggaactga 1080

aatgtcaaga gcaaaaagaa gaacaactgc aagaaggcgt acatagaaaa gaaccacagg 1140

gagcaacata ggcggcccgt aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta 1200

aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt 1260

aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataagca atagcatcac aaatttcaca 1320

第 14 頁，共 48 頁(序列表)

aataaagcat ttttttact gcatttctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct	1380
tatcatgtct accggtataa ctfcgtataa tgtatactat acgaagttag ccggttagggc	1440
ccctctcttc atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt	1500
gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag	1560
tcagagggtg cgaaaccgga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc	1620
cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc	1680
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt	1740
cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagccccgacc gctgcgcctt	1800
atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc	1860
agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa	1920
gtgggtggcct aactacggct aactagaag aacagtatctt ggtatctgcg ctctgctgaa	1980
gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg	2040
tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga	2100
agatcccttg atcttttcta cggggtctga cgctcagttg aacgaaaact cacgttaagg	2160
gattttggtc atgggcgcgc ctcatactcc tgcaggcatg agattatcaa aaaggatctt	2220
cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta	2280
aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct	2340
atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgctcgtgtag ataactacga tacgggaggg	2400
cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga	2460
tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt	2520
atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt	2580
taatagttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtgggtgtcac gctcgtcgtt	2640
tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat	2700
gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcttccgata gttgtcagaa gtaagttggc	2760
cgcagtgtta tcaactatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgceate	2820
cgtaagatgc ttttctgtga ctgggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat	2880
gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgctc aatacgggat aatactgcgc cacatagcag	2940
aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt	3000

accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc	3060
ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg cgccaaaaaa	3120
gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttccTTTTTc aatattattg	3180
aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata ttTgaatgta tttagaaaaa	3240
taaacaataa ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tcaggTcac	3300
aacttcgtat agcatacatt atacgaagtt atggtaccaa gcctaggcct ccaaaaaage	3360
ctctcacta cttctggaat agctcagagg cagaggcggc ctccggcctct gcataaataa	3420
aaaaaattag tcagccatgg ggcggagaat gggcggaaact gggcggagtt aggggcggga	3480
tgggcggagt taggggcggg actatggttg ctgactaatt gagatgcatg ctttgcatc	3540
ttctgcctgc tggggagcct ggggactttc cacacctggt tgctgactaa ttgagatgca	3600
tgctttgcat acttctgcct gctggggagc ctggggactt tccacaccgg atccaccatg	3660
ggttcagcta ttgagcagga tgggttgcac gctggtagtc ccgccgcatg ggtcgaacga	3720
ctgtttggat acgattgggc ccaacagact ataggctggt ccgacgctgc tgtctttcgt	3780
ctttctgcac aaggtegtcc agttctgttc gtgaaaaccg acttgtccgg agccctcaat	3840
gagttgcaag acgaagctgc acgactgagt tggcttgcca ccaactggtgt cccatgtgcc	3900
gcagtacttg acgtcgtcac agaggctggt cgcgattggt tgctccttgg agaagtgccc	3960
ggccaagatc ttctcagttc ccaccttgcc cctgccgaaa aagtttcaat aatggctgac	4020
gctatgagaa ggctgcacac ccttgaccct gccacatgtc cattegatca ccaagccaaa	4080
caccgaattg aacgagctag aaccgcgatg gaagccggcc tcgttgatca agacgatttg	4140
gatgaggaac accagggtct cgcaccgcct gaactcttcg ctccctcaa agcacgaatg	4200
ccagacggag atgacttggT cgtaaccac ggagatgcct gccttccTaa cataatggta	4260
gagaatggaa gatttagcgg cttcattgat tgtggacgac ttggagttgc agatcggTac	4320
caagatatcg ctctcgctac cagagatatt gctgaagaat tgggcggaga atgggctgat	4380
cggtttctcg tactctacgg aattgccgca cctgattccc aacgcattgc tttttaccgt	4440
cttctggatg agttcttcta aacgcgtccc cctctccct ccccccccc taacgttact	4500
ggccgaagcc gcttggaaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt ttccaccata	4560
ttgccgtctt ttggcaatgt gagggccccg aaacctggcc ctgtcttctt gacgagcatt	4620
cctaggggtc tttccctctc cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt cgtgaaggaa	4680

gcagttcctc	tggaagcttc	ttgaagacaa	acaacgtctg	tagcgaccct	ttgcaggcag	4740
cggaaccccc	cacctggcga	caggtgcctc	tgcggccaaa	agccacgtgt	ataagataca	4800
cctgcaaagg	cggcacaacc	ccagtgccac	gttgtgagtt	ggatagtgtt	ggaaagagtc	4860
aatggctct	cctcaagcgt	attcaacaag	gggctgaagg	atgccagaa	ggtaccccat	4920
tgtatgggat	ctgatctggg	gcctcgggtg	acatgcttta	catgtgttta	gtcgaggtta	4980
aaaaacgtct	aggcccccg	aaccacgggg	acgtggtttt	cctttgaaaa	acacgattgc	5040
tcgaatcacc	atggtgagca	agggcgagga	gctgttcacc	ggggtggtgc	ccatcctggt	5100
cgagctggac	ggcgacgtaa	acggccacaa	gttcagcgtg	tccggcgagg	gcgagggcga	5160
tgccacctac	ggcaagctga	ccctgaagtt	catctgcacc	accggcaagc	tgcccgtgcc	5220
ctggcccacc	ctcgtgacca	ccttcggcta	cggcctgcag	tgcttcgccc	gctaccccga	5280
ccacatgaag	cagcacgact	tcttcaagtc	cgccatgccc	gaaggctacg	tccaggagcg	5340
caccatcttc	ttcaaggacg	acggcaacta	caagaccgcg	gccgaggtga	agttcgaggg	5400
cgacaccctg	gtgaaccgca	tcgagctgaa	gggcatcgac	ttcaaggagg	acggcaacat	5460
cctggggcac	aagctggagt	acaactacaa	cagccacaa	gtctatatca	tggccgacaa	5520
gcagaagaac	ggcatcaagg	tgaacttcaa	gatccgccac	aacatcgagg	acggcagcgt	5580
gcagctcgcc	gaccactacc	agcagaacac	ccccatcggc	gacggccccg	tgctgctgcc	5640
cgacaaccac	tacctgagct	accagtccgc	cctgagcaaa	gacccccacg	agaagcgcga	5700
tcacatggtc	ctgctggagt	tcgtgaccgc	cgccgggata	actctcgga	tggacgagct	5760
gtacaagtaa	tcggccgcta	atcagccata	ccacatttgt	agaggtttta	cttgctttaa	5820
aaaacctccc	acacctccc	ctgaacctga	aacataaaat	gaatgcaatt	gttgtttgta	5880
acttgtttat	tgcagcttat	aatggttaca	aataaagcaa	tagcatcaca	aatttcacaa	5940
ataaagcatt	tttttactg	cattctagtt	gtggtttgtc	caaactcadc	aatgtatctt	6000
atcatgtcgg	cgcgttgaca	ttgattattg	actagttatt	aatagtaatc	aattacgggg	6060
tcattagttc	atagcccata	tatggagttc	cgcgttacat	aacttacggt	aaatggcccc	6120
cctggctgac	cgcccacga	ccccgccc	ttgacgtcaa	taatgacgta	tgttcccata	6180
gtaacgccc	tagggacttt	ccattgacgt	caatgggtgg	agtatttacg	gtaaactgcc	6240
cacttggcag	tacatcaagt	gtatcatatg	ccaagtacgc	cccctattga	cgteaagac	6300
ggtaaatggc	ccgcctggca	ttatgcccag	tacatgacct	tatgggactt	tectacttgg	6360

cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatgggtga tgcggttttg gcagtacatc 6420  
 aatgggcgctg gatagcgggtt tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc 6480  
 aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc 6540  
 gccccattga cgcaaattggg cggtaggcgt gtacgggtggg aggtctatat aagcagagct 6600  
 ctccctatca gtgatagaga tctccctatc agtgatagag atcgtcgacg tttagtgaac 6660  
 cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac 6720  
 cgatccagcc tccgcggccg ggaacgggtgc attggaacgc ggattccccg tgccaagagt 6780  
 gacgtaagta ccgcctatag agtctatagg cccaccccct tggtctctta tgcattgctat 6840  
 actgtttttg gcttggggctc tatacacccc cgcttctca tgttataggt gatggtatag 6900  
 cttagcctat aggtgtgggt tattgacct tattgaccac tcccctattg gtgacgatac 6960  
 tttccattac taatccataa catggctctt tgccacaact ctctttattg gctatatgcc 7020  
 aatacactgt ccttcagaga ctgacacgga ctctgtattt ttacaggatg gggctctcatt 7080  
 tattatttac aaattccat atacaacacc accgtcccca gtgcccgcag tttttattaa 7140  
 acataacgtg ggatctccac gcgaatctcg ggtacgtgtt cggacatgg tctcttctcc 7200  
 ggtagcggcg gagcttctac atccgagccc tgctcccatg cctccagcga ctcatggctc 7260  
 ctggcagct ccttgctct aacagtggag gccagactta ggcacagcac gatgcccacc 7320  
 accaccagtg tgccgcacaa ggccgtggcg gtaggggatg tgtctgaaaa tgagctcggg 7380  
 gagcgggctt gcaccgctga cgcatttggg agacttaagg cagcggcaga agaagatgca 7440  
 ggcagctgag ttgttgtgtt ctgataagag tcagaggtaa ctcccgttgc ggtgctgtta 7500  
 acggtggagg gcagtgtagt ctgagcagta ctcgttgctg ccgcgcgcgc caccagacat 7560  
 aatagctgac agactaacag actgttccct tccatgggtc tttctgcag tcaccgtcct 7620  
 tgacacg 7627

<210> 24  
 <211> 2669  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 24  
 agcctaggcc tccaaaaag cctcctcact acttctggaa tagctcagag gcagagggcg 60



cctcggcctc	tgataaata	aaaaaatta	gtcagccatg	gggcggagaa	tgggcggaac	120
tgggcggagt	taggggcggg	atgggcggag	ttagggcggg	gactatgggt	gctgactaat	180
tgagatgcat	gctttgcata	cttctgcctg	ctggggagcc	tggggacttt	ccacacctgg	240
ttgctgacta	attgagatgc	atgctttgca	tacttctgcc	tgctggggag	cctggggact	300
ttccacaccg	gatccacat	gggttcagct	attgagcagg	atgggttgca	tgctggtagt	360
cccgccgcat	gggtcgaacg	actgtttgga	tacgattggg	cccaacagac	tataggctgt	420
tccgacgctg	ctgtctttcg	tctttctgca	caaggtcgtc	cagttctggt	cgtgaaaacc	480
gacttgtccg	gagccctcaa	tgagttgcaa	gacgaagctg	cacgactgag	ttggcttgcc	540
accactgggtg	tcccatgtgc	cgcagtactt	gacgtcgtca	cagaggctgg	tcgcgattgg	600
ttgctccttg	gagaagtgcc	cggccaagat	cttctcagtt	cccaccttgc	ccctgccgaa	660
aaagtttcaa	taatggctga	cgctatgaga	aggctgcaca	cccttgacct	tgccacatgt	720
ccattcgatc	accaagccaa	acaccgaatt	gaacgagcta	gaaccgcgat	ggaagccggc	780
ctcgttgatc	aagacgattt	ggatgaggaa	caccagggtc	tcgcacccgc	tgaactcttc	840
gctcgctca	aagcacgaat	gccagacgga	gatgacttgg	tcgtaacca	cggagatgcc	900
tgcttctca	acataatggt	agagaatgga	agatttagcg	gcttcattga	ttgtggacga	960
cttgagattg	cagatcggtg	ccaagatata	gctctcgcta	ccagagatat	tgctgaagaa	1020
ttgggcggag	aatgggctga	tcggtttctc	gtactctacg	gaattgccgc	acctgattcc	1080
caacgcattg	ctttttaccg	tcttctggat	gagttcttct	aaacgcgtcc	cccctctccc	1140
tcccccccc	ctaacgttac	tggccgaagc	cgcttggaat	aaggccggtg	tgcgtttgtc	1200
tatatgttat	ttccacat	attgccgtct	tttggcaatg	tgagggcccg	gaaacctggc	1260
cctgtcttct	tgacgagcat	tcttaggggt	ctttcccctc	tcgccaagg	aatgcaaggt	1320
ctgttgaatg	tcgtgaagga	agcagttcct	ctggaagctt	cttgaagaca	aacaacgtct	1380
gtagcgacct	tttgcaggca	gcggaacccc	ccacctggcg	acaggtgcct	ctgcggccaa	1440
aagccacgtg	tataagatac	acctgcaaag	gcggcacaac	cccagtgcca	cgttgtgagt	1500
tggatagtgtg	tggaaagagt	caaatggctc	tctcaagcg	tattcaaca	gggctgaag	1560
gatgcccaga	aggtacccca	ttgtatggga	tctgatctgg	ggcctcggtg	cacatgcttt	1620
acatgtgttt	agtcgaggtt	aaaaaacgtc	taggcccccc	gaaccacggg	gacgtggttt	1680
tctttgaaa	aacacgattg	ctcgaatcac	catggtgagc	aaggcgagg	agctgttcaac	1740

cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt 1800  
 gtccggcgag ggcgagggcg atgccacctt cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac 1860  
 caccggcaag ctgcccgtgc cctggccccac cctcgtgacc accttcggct acggcctgca 1920  
 gtgcttcgcc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc 1980  
 cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt ctccaaggac gacggcaact acaagaccgg 2040  
 cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga 2100  
 ctccaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa 2160  
 cgtctatata atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca 2220  
 caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg 2280  
 cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc taccagtccg ccctgagcaa 2340  
 agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttctgtaccg ccgccgggat 2400  
 cactctcggc atggacgagc tgtacaagta atcgcccgct aatcagccat accacatttg 2460  
 tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 2520  
 tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 2580  
 atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact gcattctagt tgtggtttgt 2640  
 ccaaactcat caatgtatct tatcatgtc 2669

<210> 25  
 <211> 3003  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 25  
 gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60  
 gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tgccccgcct ggctgaccgc 120  
 ccaacgacc cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tccatagta acgccaatag 180  
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccccac ttggcagtac 240  
 atcaagtgta tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc 300  
 cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360  
 tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 420

第 20 頁，共 48 頁(序列表)

agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt	480
tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc	540
aaatgggagg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctctc cctatcagtg	600
atagagatct ccctatcagt gatagagatc gtcgacgttt agtgaaccgt cagatcgctt	660
ggagacgcca tccacgtgtt tttgacctcc atagaagaca cggggaccga tccagcctcc	720
gcgggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgac gtaagtaccg	780
cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc atgctatact gtttttggct	840
tgggggtctat acacccccgc ttctctatgt tataggtgat ggtatagctt agcctatagg	900
tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattgggtg acgatacttt ccattactaa	960
tccataacat ggctctttgc cacaactctc tttattggct atatgccaat aactgtctct	1020
tcagagactg acacggactc tgtatffffa caggatgggg tctcatttat tatttataaa	1080
ttcacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt ttattaaaca taacgtggga	1140
tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatggtct cttctccggt agcggcggag	1200
cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc atggtcgctc ggcagctcct	1260
tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat gccaccacc accagtgtgc	1320
cgcacaaggc cgtggcggta gggtatgtgt ctgaaaatga gctcggggag cgggcttgca	1380
ccgctgacgc atttggaaga ctttaaggcag cggcagaaga agatgcaggc agctgagttg	1440
ttgtgttctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgcggt gctgttaacg gtggagggca	1500
gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac cagacataat agctgacaga	1560
ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagtca ccgtccttga cacgaagctt	1620
atactcgagc tctagattgg gaaccgggt cttctgaatt cgagatctcc accatgcaca	1680
gacctagacg tcgtggaact cgtccacctc cactggcact gctcgtgct ctcctctgg	1740
ctgcacgtgg tgctgatgca caagtacaac tgcaacaaag cggagctgaa ctggccaaac	1800
caggegttc cgtgaagatg tcttgtaaag ccagcgggta tacatttact aattactgga	1860
ttactggga gaagcaaaga cctgaacagg gattggaatg gattggatac attaatecta	1920
acaccggaca cacagagtat aatcaaaaat tcaaggataa ggccaccctc acagccgaca	1980
gatcttcttc aaccgcctat atgcaacttt ctccctcac ttctgaagac tccgcagttt	2040
acttttgcgc acgaacttat tctggaagct cccatttcca ctactgggggt caaggaacaa	2100

cactgatcgt gtctagcggc ggcggagggt ccggcggggg cggtagcggg ggcggaggtt 2160  
 ctgatattgt catgactcaa acacctgtct ctctgcctgt ttcacttggg gatcaagcta 2220  
 gcatttctcg ccgctctagt caatctctcg tccacaacaa cggcgatact ttcttgcatt 2280  
 ggtatctgca gaaaccaggt cagtcaccta aactgcttat atacaaagtc tctaatagat 2340  
 tctcaggggt gccagatcga ttcagtggtt ctgggtccgg tacagatttt acactcaaga 2400  
 tatccagagt agaagcagaa gatctgggcg tgtatttctg cagtcaaaca acacttatte 2460  
 ctcgactttt tggaggcggg acaaaactgg agatcaagcg tggaggcggg gggagtgttt 2520  
 tgttttatct ggccgttggg ataatgtttc tcgtaaatac agtactttgg gtaacaataa 2580  
 ggaaggaact gaagagaaag aaaaaatggg atctggaaat atcattggac agtggacacg 2640  
 aaaaaaagt cacatcatca ttgcaagaag accggcactt ggaggaggaa ctgaaatgtc 2700  
 aagagcaaaa agaagaacaa ctgcaagaag gcgtacatag aaaagaacca caggagcaaa 2760  
 cataggcggc cgctaactcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac 2820  
 ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg 2880  
 tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa 2940  
 gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat 3000  
 gtc 3003

<210> 26  
 <211> 208  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 26

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 1 5 10 15

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro  
 20 25 30

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 35 40 45

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 50 55 60

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
65 70 75 80

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr  
85 90 95

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
100 105 110

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
115 120 125

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
130 135 140

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
145 150 155 160

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser  
165 170 175

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
180 185 190

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
195 200 205

<210> 27  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 27

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp  
1 5

<210> 28  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 28

Ile Asn Pro Asn Thr Gly His Thr

第 23 頁，共 48 頁(序列表)

1 5

<210> 29  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 29

Cys Ala Arg Thr Tyr Ser Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 30  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 30

Ser Leu Val His Asn Asn Gly Asp Thr Phe  
 1 5 10

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 31

Ser Gln Thr Thr Leu Ile Pro Arg Thr  
 1 5

<210> 32  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 32

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp  
 1 5

<210> 33  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 33

Ile Leu Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr  
 1 5 10

第 24 頁，共 48 頁(序列表)

<210> 34  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 34

Thr Thr Ala Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 35

Gln Ser Leu Leu  
 1

<210> 36  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 36

His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr  
 1 5

<210> 37  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 37

Met Gln Gly Leu Gln Thr Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 38  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Ile Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser His Arg Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala  
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Arg Ile Leu Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
50 55 60

Pro Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Met  
65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Phe Cys Thr Thr Ala Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 39  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 39

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80



Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 40  
<211> 452  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Ile Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser His Arg Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala  
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Arg Ile Leu Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
50 55 60

Pro Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Met  
65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Phe Cys Thr Thr Ala Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro  
115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser  
130 135 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro

第 27 頁，共 48 頁(序列表)

165

170

175

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val  
180 185 190

Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His  
195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro  
210 215 220

Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu  
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu  
245 250 255

Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
260 265 270

Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu  
275 280 285

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr  
290 295 300

Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser  
305 310 315 320

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro  
325 330 335

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln  
340 345 350

Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val  
355 360 365

Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val  
370 375 380

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu

第 28 頁 · 共 48 頁(序列表)



Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 42  
<211> 256  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 42

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser  
1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Pro Gly Asp Lys Thr  
20 25 30

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
35 40 45

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
50 55 60

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
65 70 75 80

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
85 90 95

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 100 105 110

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 115 120 125

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 130 135 140

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 145 150 155 160

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 165 170 175

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 180 185 190

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 195 200 205

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 210 215 220

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 225 230 235 240

Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 245 250 255

<210> 43  
 <211> 336  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Ile Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser His Arg Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala  
 第 31 頁，共 48 頁(序列表)

20

25

30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Leu Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Pro Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Met  
 65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Phe Cys Thr Thr Ala Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser  
 130 135 140

Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys  
 145 150 155 160

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
 165 170 175

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu  
 180 185 190

Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 195 200 205

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp  
 210 215 220

Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe  
 225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Val Leu

第 32 頁，共 48 頁(序列表)

245

250

255

Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu Val Asn Thr Val Leu Trp  
 260 265 270

Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys Lys Lys Trp Asp Leu Glu  
 275 280 285

Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys Val Thr Ser Ser Leu Gln  
 290 295 300

Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln Lys Glu  
 305 310 315 320

Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly Ala Thr  
 325 330 335

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 7633

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成

&lt;400&gt; 44

aagcttatac tcgagctcta gattgggaac ccgggtctct cgaattcgag atctccacca 60  
 tgcacagacc tagacgtcgt ggaactcgtc cacctccact ggcactgctc gctgctctcc 120  
 tcttggctgc acgtggtgct gatgcagagg tgcagctggt ggagtctggg ggagccatag 180  
 taaagccggg ggggtcccat agagtctcct gtgaagcctc tggattcact ttcagtaacg 240  
 cctggatgag ttgggtccgc caggctccag ggagggggct ggagtgggtt ggccgtatit 300  
 taagcaagac tgatggtggg acgacagact acgctgcacc cgtgaaagac agattcacca 360  
 tttcaagaga tgattctaaa aatatgttgt ttctgcaaat ggacagcctg aaaatcgagg 420  
 acacagccgt gtatttctgt accacggccg atttttggag tgcttattct tctgactact 480  
 ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct caggaggtgg aggttccggg ggcgggggct 540  
 ccggcggagg tggatcagat attgtgatga ctcagtctcc actctccctg cccgtcacc 600  
 ctggagagcc ggctccate tctgcaggt ctagtcagag cctcctgcat agtaatgggt 660  
 acaactatit ggattgttac ctacagaagc cagggcagtc tccacaacte ctgatctatt 720

tggtttctaa tggggcctcc ggggtccctg acaggttcag tggcagtgga tcaggcacag	780
atfttacact gaaaatcagc agaatggagg ctgaggatgt tggggttttat tactgcatgc	840
aaggtctaca aactccgtac acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaaggaggcg	900
gaggagtggt tttgttttat ctggccgttg ggataatggt tctcgtaa atcagtacttt	960
gggtaacaat aaggaaggaa ctgaagagaa agaaaaaatg ggatctggaa atatcattgg	1020
acagtggaca cgaaaaaaa gtcacatcat cattgcaaga agaccggcac ttggaggagg	1080
aactgaaatg tcaagagcaa aaagaagaac aactgcaaga aggcgtacat agaaaagaac	1140
cacagggagc aacataggcg gccgctaate agccatacca cattttaga ggttttactt	1200
gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattggt	1260
gttgtaact tgtttattgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat	1320
ttcacaata aagcattttt ttactgcat tctagtgtg gtttgtccaa actcatcaat	1380
gtatcttate atgtctaccg gtataacttc gtataatgta tactatacga agtttagccgg	1440
tagggcccct ctcttcatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc	1500
cgcttctctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg	1560
ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg	1620
aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtecgctt	1680
tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc ttaggtatc tcagttcgg	1740
gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct cccgttcagc cggaccgctg	1800
cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tategccact	1860
ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt	1920
cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct	1980
gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac	2040
cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc	2100
tcaagaagat cctttgatct ttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg	2160
ttaagggatt ttggatcagg gcgcgcctca tactcctgca ggcatgagat tatcaaaaag	2220
gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aatcaatct aaagtatata	2280
tgagtaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat	2340
ctgtctatft cgttcatcca tagttgcctg actccccgct gtgtagataa ctacgatacg	2400



ggagggctta ccactctggcc ccagtgtctgc aatgataccg cgagacccac gctcaccggc	2460
tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggctctgc	2520
aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc	2580
gccagttaat agtttgcga acgtttgttc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc	2640
gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac	2700
ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc ctfcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa	2760
gttgcccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat	2820
gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcat tctgagaata	2880
gtgtatgceg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ctgcgccaca	2940
tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag	3000
gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc	3060
agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc	3120
aaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata	3180
ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta	3240
gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcag	3300
gtacacaact tcgtatagca tacattatac gaagttaatg taccaagcct aggcctccaa	3360
aaaagcctcc tcaactctc tggaatagct cagaggcaga ggcggcctcg gcctctgcat	3420
aaataaaaaa aattagtcag ccatggggcg gagaatgggc ggaactgggc ggagttaggg	3480
gcgggatggg cggagttagg ggcgggacta tggttgctga ctaattgaga tgcattgctt	3540
gcatacttct gcctgctggg gagcctgggg actttccaca cctggttgct gactaattga	3600
gatgcatgct ttgcatactt ctgcctgctg gggagcctgg ggactttcca caccggatcc	3660
accatgggtt cagctattga gcaggatggg ttgcatgctg gtagtcccgc cgcattgggtc	3720
gaacgactgt ttggatacga ttgggccccaa cagactatag gctgttccga cgctgctgtc	3780
tttcgtcttt ctgcacaagg tcgtccagtt ctgttcgtga aaaccgactt gtccggagcc	3840
ctcaatgagt tgcaagacga agctgcacga ctgagttggc ttgccaccac tgggtgcecca	3900
tgtgcccgag tacttgacgt cgtcacagag gctggtcgcg attggttgct ccttggagaa	3960
gtgccccgcc aagatcttct cagttcccac ctgccccctg ccgaaaaagt ttcaataatg	4020
gctgacgcta tgagaaggct gcacaccctt gaccctgcca catgtccatt cgatcaccaa	4080

gccaaacacc gaattgaacg agctagaacc cgcatggaag ccggcctcgt tgatcaagac	4140
gatttggatg aggaacacca gggctctcgca cccgctgaac tcttcgctcg cctcaaagca	4200
cgaatgccag acggagatga cttggctgta acccacggag atgcctgcct tcctaacata	4260
atggtagaga atggaagatt tagcggcttc attgattgtg gacgacttgg agttgcagat	4320
cggtaccaag atategctct cgctaccaga gatattgctg aagaattggg cggagaatgg	4380
gctgatcggt ttctcgctact ctacggaatt gccgcacctg attcecaacg cattgctttt	4440
taccgtcttc tggatgagtt cttctaaacg cgtccccct ctcctcccc cccccetaac	4500
gttactggcc gaagccgctt ggaataaggc cgggtgtcgt ttgtctatat gttattttcc	4560
accatattgc cgtcttttgg caatgtgagg gcccggaac ctggccctgt cttcttgacg	4620
agcattccta ggggtctttc cctctctgcc aaaggaatgc aaggctctgtt gaatgtcgtg	4680
aaggaagcag ttctctgga agcttcttga agacaaaca cgtctgtagc gaccctttgc	4740
aggcagcggg accccccacc tggcgacagg tgccctctcg gccaaaagcc acgtgtataa	4800
gatacacctg caaaggcggc acaaccccag tgccacgttg tgagttggat agttgtggaa	4860
agagtcaaat ggctctctc aagcgtattc aacaaggggc tgaaggatgc ccagaaggta	4920
ccccattgta tgggatctga tctggggcct cgggtgcacat gctttacatg tgttttagtcg	4980
aggttaaaaa acgtctaggc cccccgaacc acggggacgt ggttttctt tgaaaaacac	5040
gattgctcga atcaccatgg tgagcaaggc cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat	5100
cctggctcag ctggacggcg acgtaaaccg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga	5160
ggcgcatgcc acctacggca agctgacct gaagttcctc tgcaccaccg gcaagctgcc	5220
cgtgccctgg cccacctcg tgaccacctt cggctacggc ctgcagtgtc tcgcccgcta	5280
ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtcggcc atgcccgaag gctacgtcca	5340
ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt	5400
cgagggcgac acctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg	5460
caacatcttg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc	5520
cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg	5580
cagcgtgcag ctgcccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgt	5640
gctgcccgac aaccactacc tgagctacca gtccgccttg agcaaagacc ccaacgagaa	5700
gcgcgatcac atggctctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga	5760

cgagctgtac aagtaatcgg ccgctaataca gccataccac atttgtagag gttttacttg	5820
ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg	5880
ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt	5940
tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg	6000
tatcttatca tgtcggcgcg ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt	6060
acgggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat	6120
ggccccctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatggt	6180
cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa	6240
actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc	6300
aatgacggta aatggccccg ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttect	6360
acttggcagt acatctacgt attagtcac gctattacca tggatgatgcg gttttggcag	6420
tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccaccccatt	6480
gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac	6540
aactccgcc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc	6600
agagctctcc ctatcagtga tagagatctc cctatcagtg atagagatcg tcgacgttta	6660
gtgaaccgtc agatcgccctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctca tagaagacac	6720
cgggaccgat ccagcctccg cggccgggaa cgggtgcattg gaacgcggat tccccgtgcc	6780
aagagtgcag taagtaccgc ctatagagtc tataggccca cccccctggc ttcttatgca	6840
tgctatactg tttttggctt ggggtctata ccccccgct tctcatgtt ataggtgatg	6900
gtatagctta gcctataggt gtgggttatt gaccattatt gaccactccc ctattggtga	6960
cgatacttcc cactactaat ccataacatg gctctttgcc acaactctct ttattggcta	7020
tatgccaaata cactgtcctt cagagactga cacggactct gtatTTTTTtac aggatggggt	7080
ctcatttatt atttacaat tcacatatac aacaccaccg tccccagtgc ccgcagtttt	7140
tattaaacat aacgtgggat ctccacgcga atctcgggta cgtgttccgg acatggctctc	7200
ttctccgta gcggcgggagc ttctacatcc gagccctgct cccatgcctc cagegactca	7260
tggtcgctcg gcagctcctt gctcctaaca gtggaggcca gacttaggca cagcacgatg	7320
cccaccacca ccagtgtgcc gcacaaggcc gtggcggtag ggtatgtgtc tgaaaatgag	7380
ctcggggagc gggcttgcac cgctgacgca tttggaagac ttaaggcagc ggcagaagaa	7440

gatgcaggca gctgagttgt tgtgttctga taagagtcag aggtaactcc cgttgcggtg 7500  
 ctgttaacgg tggagggcag tgtagtctga gcagtactcg ttgctgccgc gcgcgccacc 7560  
 agacataata gctgacagac taacagactg ttcctttcca tgggtctttt ctgcagtcac 7620  
 cgtccttgac acg 7633

<210> 45  
 <211> 1011  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 45  
 gaggtgcagc tggaggagtc tgggggagcc atagtaaagc cggggggggtc ccatagagtc 60  
 tcctgtgaag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagtgggt cggccaggct 120  
 ccagggaggg ggctggagtg ggttggccgt attttaagca agactgatgg tgggacgaca 180  
 gactacgctg caccctgaa agacagattc accatttcaa gagatgattc taaaaatag 240  
 ttgtttctgc aaatggacag cctgaaaatc gaggacacag ccgtgtattt ctgtaccacg 300  
 gccgattttt ggagtgtta ttcttctgac tactggggcc agggaaccct ggtcacccgc 360  
 tcctcaggag gtggaggttc cgggggcccgg ggctccggcg gaggtggatc agatattgtg 420  
 atgactcagt ctccactctc cctgcccgtc acccctggag agccggcctc catctctctg 480  
 aggtctagtc agagcctcct gcatagtaat gggtaacaact atttggattg gtacctacag 540  
 aagccagggc agtctccaca actcctgac tatttgggtt ctaatcgggc ctccggggtc 600  
 cctgacaggt tcagtggcag tggatcaggc acagatttta cactgaaaat cagcagaatg 660  
 gaggctgagg atgttgggggt ttattactgc atgcaaggtc taaaactcc gtacactttt 720  
 ggccagggga ccaagctgga gatcaaagga ggcggaggga gtgttttggt ttatctggcc 780  
 gttgggataa tgtttctctg aaatacagta ctttgggtaa caataaggaa ggaactgaag 840  
 agaaagaaaa aatgggatct ggaaatatca ttggacagtg gacacgaaaa aaaagtcaca 900  
 tcatcattgc aagaagaccg gcacttgag gaggaactga aatgtcaaga gcaaaaagaa 960  
 gaacaactgc aagaagcgt acatagaaaa gaaccacagg gagcaacata g 1011

<210> 46  
 <211> 2669  
 <212> DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成

&lt;400&gt; 46

```

agcctaggcc tccaaaaaag cctcctcact acttctggaa tagctcagag gcagaggcgg      60
cctcggcctc tgcataaata aaaaaaatta gtcagccatg gggcggagaa tgggcggaac      120
tgggcggagt taggggcggg atgggcggag ttaggggcgg gactatggtt gctgactaat      180
tgagatgcat gctttgcata cttctgcctg ctggggagcc tggggacttt ccacacctgg      240
ttgctgacta attgagatgc atgctttgca tacttctgcc tgctggggag cctggggact      300
ttccacaccg gatccacat gggttcagct attgagcagg atgggttgca tgctggtagt      360
cccgcgcgat gggtcgaacg actgtttgga tacgattggg cccaacagac tataggetgt      420
tccgacgctg ctgtctttcg tctttctgca caaggtcgtc cagtctctgtt cgtgaaaacc      480
gacttgtccg gagccctcaa tgagttgcaa gacgaagctg cacgactgag ttggcttggc      540
accactggtg tcccatgtgc cgcagtactt gacgtcgtca cagaggctgg tcgcgattgg      600
ttgctccttg gagaagtgcc cggccaagat cttctcagtt cccaccttgc cctgcccga      660
aaagtttcaa taatggctga cgctatgaga aggctgcaca ccttgacce tgccacatgt      720
ccattcgatc accaagccaa acaccgaatt gaacgagcta gaaccgcgat ggaagccggc      780
ctcgttgatc aagacgattt ggatgaggaa caccagggtc tcgcacccgc tgaactcttc      840
gctcgcctca aagcacgaat gccagacgga gatgacttgg tcgtaacca cggagatgcc      900
tgcttcccta acataatggt agagaatgga agatttagcg gcttcattga ttgtggacga      960
cttggagttg cagatcggta ccaagatata gctctcgtca ccagagatat tgctgaagaa     1020
ttgggcggag aatgggctga tcggtttctc gtactctacg gaattgccgc acctgattcc     1080
caacgcattg cttttaccg tcttctggat gaggttctct aaacgcgtcc cccctctccc     1140
tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaat aaggccggtg tgcgtttgtc     1200
tatatgttat ttccacat attgccgtct ttggcaatg tgagggcccg gaaacctggc     1260
cctgtcttct tgacgagcat tctaggggt ctttcccctc tcgccaagg aatgcaaggt     1320
ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt cttgaagaca aacaacgtct     1380
gtagcgacce ttgacaggca gcggaacccc ccacctggcg acaggtgcct ctgcggccaa     1440
aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac cccagtgcc a cgttgtgagt     1500

```

tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg tattcaacaa ggggctgaag 1560  
 gatgcccaga aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg ggccctcggtg cacatgcttt 1620  
 acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaacgtc taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt 1680  
 tcctttgaaa aacacgattg ctgcaatcac catggtgagc aagggcgagg agctgttccac 1740  
 cgggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt 1800  
 gtccggcgag ggcgagggcg atgccacctc cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac 1860  
 caccggcaag ctgcccgtgc cctggccccac cctcgtgacc accttcggct acggcctgca 1920  
 gtgcttcgcc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc 1980  
 cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt ctccaaggac gacggcaact acaagaccgg 2040  
 cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga 2100  
 ctccaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa 2160  
 cgtctatata atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca 2220  
 caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg 2280  
 cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc taccagtccg ccctgagcaa 2340  
 agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttctgtgaccg ccgcccggat 2400  
 cactctcggc atggacgagc tgtacaagta atcggcccgt aatcagccat accacatttg 2460  
 tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 2520  
 tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgctta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 2580  
 atagcatcac aaatttaca aataaagcat ttttttact gcattctagt tgtggtttgt 2640  
 ccaaactcat caatgtatct tatcatgtc 2669

<210> 47  
 <211> 2992  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 47  
 gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 60  
 gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggccccctt ggctgaccgc 120  
 ccaacgacct ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180

ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac	240
atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc	300
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	360
tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat	420
agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt	480
tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc	540
aaatggggcg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctctc cctatcagtg	600
atagagatct ccctatcagt gatagagatc gtcgacgttt agtgaaccgt cagatcgctt	660
ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca ccgggaccga tccagcctcc	720
gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgc gtaagtaccg	780
cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc atgctatact gtttttggct	840
tggggtctat acacccccgc ttctctatgt tataggtgat ggtatagctt agcctatagg	900
tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattggtg acgatacttt ccattactaa	960
tccataacat ggctctttgc cacaactctc tttattggct atatgccaat aactgtctct	1020
tcagagactg acacggactc tgtatTTTTA caggatgggg tctcatttat tatttacaaa	1080
ttcacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt ttattaaaca taacgtggga	1140
tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatggtct cttctccggt agcggcggag	1200
cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc atggtegcctc ggcagctcct	1260
tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat gccaccacc accagtgtgc	1320
cgcacaaggc cgtggcggta gggtatgtgt ctgaaaatga gctcggggag cgggcttgca	1380
ccgctgacgc atttggaaga ctttaaggcag cggcagaaga agatgcaggc agctgagttg	1440
ttgtgttctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgcggt gctgttaacg gtggagggca	1500
gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac cagacataat agctgacaga	1560
ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagaag cttatactcg agctctagat	1620
tgggaaccgg ggtctctcga attcagatc tccacatgc acagacctag acgtcgtgga	1680
actcgtccac ctccactggc actgctcgtc gctctctccc tggtcgcacg tggtgctgat	1740
gcagaggctc agctgggtgga gctctggggga gccatagtaa agccgggggg gtcccataga	1800
gtctcctgtg aagcctctgg attcactttc agtaacgcct ggatgagttg ggtccgccag	1860

gctccagga gggggctgga gtgggttggc cgtattttaa gcaagactga tgggtgggacg 1920  
 acagactacg ctgcaccctgt gaaagacaga ttcaccattt caagagatga ttctaaaaat 1980  
 atgtttgttc tgcaaatgga cagcctgaaa atcgaggaca cagccgtgta tttctgtacc 2040  
 acggccgatt tttggagtgc ttattcttct gactactggg gccagggaac cctggteacc 2100  
 gtctcctcag gaggtggagg ttccgggggc gggggctccg gcggagggtg atcagatatt 2160  
 gtgatgactc agtctccact ctccctgccc gtcaccctg gagagccggc ctccatctcc 2220  
 tgcaggtcta gtcagagcct cctgcatagt aatgggtaca actatttgga ttggtaceta 2280  
 cagaagccag ggcagtctcc acaactcctg atctatttgg gttctaatec ggcctccggg 2340  
 gtcctgaca ggttcagtgg cagtggatca ggcacagatt ttacactgaa aatcagcaga 2400  
 atggaggctg aggatgttgg ggtttattac tgcattgcaag gtctacaaac tccgtacact 2460  
 tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa ggaggcggag ggagtgtttt gttttatctg 2520  
 gccgttggga taatgtttct cgtaaataca gtactttggg taacaataag gaaggaactg 2580  
 aagagaaaga aaaaatggga tctggaaata tcattggaca gtggacacga aaaaaagtc 2640  
 acatcatcat tgcaagaaga ccggcacttg gaggaggaac tgaaatgtca agagcaaaaa 2700  
 gaagaacaac tgcaagaagg cgtacataga aaagaaccac agggagcaac ataggcggcc 2760  
 gctaatecgc cataccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct 2820  
 cccctgaac ctgaaacata aatgaatgc aattgttgtt gtttaacttgt ttattgcagc 2880  
 ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag catttttttc 2940  
 actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tc 2992

<210> 48  
 <211> 5765  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 48  
 acaacttcgt atagcataca ttatacgaag ttatggtacc aagcctagc ctccaaaaaa 60  
 gcctcctcac tacttctgga atagctcaga ggcagaggcg gcctcggcct ctgcataaat 120  
 aaaaaaatt agtcagccat ggggcggaga atgggcggaa ctgggcggag ttagggcgcg 180  
 gatgggcgga gttagggcg ggactatggt tgctgactaa ttgagatgca tgctttgcat 240



acttctgcct gctggggagc ctggggactt tccacacctg gttgctgact aattgagatg	300
catgctttgc atacttctgc ctgctgggga gcctggggac ttccacacc ggatccacca	360
tgggttcagc tattgagcag gatgggttgc atgctggtag tcccgccgca tgggtcgaac	420
gactgtttgg atacgattgg gcccaacaga ctataggctg tccgacgct gctgtcttcc	480
gtctttctgc acaaggtcgt ccagttctgt tcgtgaaaac cgacttgtcc ggagccctca	540
atgagttgca agacgaagct gcacgactga gttggcttgc caccactggt gtcccatgtg	600
ccgcagtact tgacgtcgtc acagaggctg gtcgcgattg gttgctcctt ggagaagtgc	660
ccggccaaga tcttctcagt tcccacctg cccctgccga aaaagtcca ataatggctg	720
acgctatgag aaggctgcac accttgacc ctgccacatg tccattcgat caccaagcca	780
aacaccgaat tgaacgagct agaaccgcga tggaaagccgg cctcgttgat caagacgatt	840
tggatgagga acaccagggt ctgcacccg ctgaactctt cgctcgcctc aaagcacgaa	900
tgccagacgg agatgacttg gtcgtaacc acggagatgc ctgccttcc aacataatgg	960
tagagaatgg aagatttagc ggcttcattg attgtggacg acttggagtt gcagatcggt	1020
accaagatat cgctctcgt accagagata ttgctgaaga attgggcgga gaatgggctg	1080
ateggtttct cgtactctac ggaattgccg cacctgattc ccaacgcatt gctttttacc	1140
gtcttctgga tgagtcttc taaacgcgtc cccctctcc ctccccccc cetaacgtta	1200
ctggccgaag ccgcttgaa taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgtta tttccacca	1260
tattgccgtc ttttgcaat gtgagggccc ggaaacctgg cctgtcttc ttgacgagca	1320
ttctagggg tctttccct ctgcctaaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg	1380
aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc	1440
agcggaaacc cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt gtataagata	1500
cacctgcaa ggcggcacia cccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtgaaagag	1560
tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc	1620
attgtatggg atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacatgtgtt tagtcaggt	1680
taaaaacgt ctaggcccc cgaaccacgg ggacgtggtt ttctttgaa aaacacgatt	1740
gctcgaatca ccatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg	1800
gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc	1860
gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg	1920

ccctggccca ccctcgtgac caccttcggc tacggcctgc agtgcttcgc ccgctacccc	1980
gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccaatgc ccgaaggcta cgtccaggag	2040
cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacct gcgccgaggt gaagttcgag	2100
ggcgacacc tggtgaaccg catcgagctg aagggcacatg acttcaagga ggacggcaac	2160
atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggcccgc	2220
aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc	2280
gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg	2340
cccgacaacc actacctgag ctaccagtcc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc	2400
gatcacatgg tcttgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcg catggacgag	2460
ctgtacaagt aatcgccgc taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcctt	2520
aaaaaacctc ccacacctcc cctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgtttgtgt	2580
taacttgttt attgcagctt ataatggfta caaataaagc aatagcatca caaatttcac	2640
aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc	2700
ttatcatgtc ggcgcgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg	2760
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaattggcc	2820
cgcttgctg accgcccac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca	2880
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg	2940
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg	3000
acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt	3060
ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca	3120
tcaatgggag tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg	3180
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact	3240
ccgccccatt gacgcaaatg ggcggttagc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag	3300
ctctccctat cagtgataga gatctcccta tcaagtatag agatcgtcga cgtttagtga	3360
accgtcagat cgcctggaga cgccatccac gctgttttga cctccataga agacaccggg	3420
accgatccag cctccgcggc cggaacggt gcattggaac gcggattccc cgtgccaaga	3480
gtgacgtaag taccgcctat agagtctata ggcccccccc cttggcttct tatgcatgct	3540
atactgtttt tggcttgggg tctatacacc cccgcttct catgttatag gtgatggtat	3600

agcttagcct ataggtgtgg gttattgacc attattgacc actcccctat tggtgacgat	3660
actttccatt actaatccat aacatggctc tttgccacaa ctctctttat tggctatatg	3720
ccaatacact gtccttcaga gactgacacg gactctgtat ttttacagga tggggctca	3780
tttattattt acaaattcac atatacaaca ccaccgtccc cagtgcccgc agtttttatt	3840
aacataacg tgggatctcc acgcgaatct cgggtacgtg ttccggacat ggtctcttct	3900
ccggtagcgg cggagcttct acatccgagc cctgctccca tgcctccagc gactcatggt	3960
cgctcggcag ctctttgctc ctaacagtgg aggccagact taggcacagc acgatgceca	4020
ccaccaccag tgtgccgcac aaggccgtgg cggtagggta tgtgtctgaa aatgagctcg	4080
gggagcgggc ttgcaccgct gacgcatttg gaagacttaa ggcagcggca gaagaagatg	4140
caggcagctg agttgtttgt ttctgataag agtcagaggt aactcccgtt gcggtgctgt	4200
taacggtgga gggcagtgta gtctgagcag tactcgttgc tgccgcgcgc gccaccagac	4260
ataatagctg acagactaac agactgttcc tttccatggg tcttttctgc agtcaccgtc	4320
cttgacacga agcttatact cgagctctag attgggaacc cgggtctctc gaattcgaga	4380
tctccacat gcacagacct agacgtcgtg gaactcgtcc acctccactg gcaactgctcg	4440
ctgctctct cctggctgca cgtgggtgctg atgcagaggt gcagctggtg gagtctgggg	4500
gagccatagt aaagccgggg gggctccata gagtctcctg tgaagcctct ggattcactt	4560
tcagtaacgc ctggatgagt tgggtccgcc aggctccagg gagggggctg gagtgggttg	4620
gccgtatfff aagcaagact gatgggtggga cgacagacta cgctgcaccc gtgaaagaca	4680
gattcacat ttcaagagat gattctaaaa atatgtttgt tctgcaaatg gacagcctga	4740
aaatcgagga cacagccgtg tatttctgta ccacggccga tttttggagt gcttattctt	4800
ctgactactg gggccaggga accctggtea ccgtctctctc aggaggtgga ggttccgggg	4860
gcgggggctc cggcggaggt ggatcagata ttgtgatgac tcagtctcca ctctccctgc	4920
ccgtcacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtcagagc ctctgcata	4980
gtaatgggta caactatttg gattgggtacc tacagaagcc agggcagctc ccacaactcc	5040
tgatctattt gggttctaata cgggcctccg gggctccctga caggttcagt ggcagtgat	5100
caggcacaga ttttactg aaaatcagca gaatggaggc tgaggatggt ggggtttatt	5160
actgcatgca aggtctacaa actccgtaca cttttggcca ggggaccaag ctggagatca	5220
aaggaggcgg agggagtgtt ttgttttatac tggccgttgg gataatgttt ctcgtaaata	5280

cagtactttg ggtaacaata aggaaggaac tgaagagaaa gaaaaaatgg gatctggaaa 5340  
 tatcattgga cagtggacac gaaaaaaaaag tcacatcadc attgcaagaa gaccggcact 5400  
 tggaggagga actgaaatgt caagagcaaa aagaagaaca actgcaagaa ggcgtacata 5460  
 gaaaagaacc acaggagca acataggcgg ccgctaata gccataccac attttagtag 5520  
 gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat 5580  
 gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc 5640  
 atcacaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgg tttgtccaaa 5700  
 ctcatcaatg tatcttata tgtctaccgg tataacttcg tataatgtat actatacgaa 5760  
 gttag 5765

<210> 49  
 <211> 660  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成

<400> 49  
 gacatcgtga tgaccagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60  
 atctctgca ggtctagtc gagcctctg catagtaatg ggtacaacta tttggattgg 120  
 tacttacaga agccagggca gtctccaca ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180  
 tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240  
 agcagaatgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaggtct acaaactccg 300  
 tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaacgag ctgatgctgc accaactgta 360  
 tccatcttc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420  
 ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga 480  
 caaatggcg tctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 540  
 agcagcacc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 600  
 gccactcaca agacatcaac ttcaccatt gtcaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 50  
 <211> 1359  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成

&lt;400&gt; 50

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagcc atagtaaagc cggggggggtc ccatagagtc 60  
tctgtgaag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagttgggt cggccaggct 120  
ccagggaggg ggctggagtg ggttggccgt attttaagca agactgatgg tgggacgaca 180  
gactacgctg caccctgtaa agacagattc accatttcaa gagatgattc taaaaatatg 240  
ttgtttctgc aaatggacag cctgaaaatc gaggacacag ccgtgtatct ctgtaccacg 300  
gccgattttt ggagtgccta ttcttctgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360  
tctcagcca aaacaacagc cccatcggtc tatccactgg cccctgtgtg tggagataca 420  
actggctcct cggtgactct aggatgcctg gtcaagggtt atttccctga gccagtgacc 480  
ttgacctgga actctggatc cctgtccagt ggtgtgcaca ccttcccagc tgtcctgcag 540  
tctgacctct acaccctcag cagctcagtg actgtaacct cgagcacctg gccagaccag 600  
tccatcact gcaatgtggc ccaccggca agcagcacca aggtggacaa gaaaattgag 660  
cccagagggc ccacaatcaa gccctgtcct ccatgcaaat gcccagcacc taacctcttg 720  
ggtggacat ccgtcttcat ctccctcca aagatcaagg atgtactcat gatctccctg 780  
agcccatag tcacatgtgt ggtggtggat gtgagcgagg atgaccaga tgtccagatc 840  
agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac acagctcaga cacaaacca tagagaggat 900  
tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc ctcccctcc agcaccagga ctggatgagt 960  
ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac aaagacctcc cagcgcccat cgagagaacc 1020  
atctcaaac ccaaagggtc agtaagagct ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagaa 1080  
gaagagatga ctaagaaaca ggtcactctg acctgcatgg tcacagactt catgcctgaa 1140  
gacatttacg tggagtggac caacaacggg aaaacagagc taaactaaa gaacactgaa 1200  
ccagtctgg actctgatgg ttcttacttc atgtacagca agctgagagt ggaaaagaag 1260  
aactgggtgg aaagaaatag ctactcctgt tcagtggctc acgaggggtct gcacaatcac 1320  
cacacgacta agagcttctc ccggactccg ggtaaatga 1359

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 1011

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成

&lt;400&gt; 51

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagcc atagtaaagc cggggggggtc ccatagagtc	60
tcctgtgaag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagttgggt cgcagcagct	120
ccagggaggg ggctggagtg ggttggccgt attttaagca agactgatgg tgggacgaca	180
gactacgctg caccctgtaa agacagattc accatttcaa gagatgattc taaaaatag	240
ttgtttctgc aaatggacag cctgaaaatc gaggacacag ccgtgtattt ctgtaccacg	300
gccgattttt ggagtgccta ttcttctgac tactggggcc agggaaccct ggtcacctgc	360
tcctcaggag gtggaggttc cgggggcggg ggctccggcg gaggtggatc agatattgtg	420
atgactcagt ctccactctc cctgcccgtc acccctggag agccggcctc catctctctgc	480
aggtctagtc agagcctcct gcatagtaat gggtacaact atttggattg gtacctacag	540
aagccagggc agtctccaca actcctgata tatttgggtt ctaatcgggc ctccggggtc	600
cctgacaggt tcagtggcag tggatcaggc acagatttta cactgaaaat cagcagaatg	660
gaggctgagg atgttgggggt ttattactgc atgcaaggtc taaaactcc gtacactttt	720
ggccagggga ccaagctgga gatcaaagga ggcggaggga gtgttttgtt ttatctggcc	780
gttgggataa tgtttctcgt aaatacagta ctttgggtaa caataaggaa ggaactgaag	840
agaaagaaa aatgggatct ggaaatatca ttggacagtg gacacgaaaa aaaagtcaca	900
tcatcattgc aagaagaccg gcacttggag gaggaactga aatgtcaaga gcaaaaagaa	960
gaacaactgc aagaaggcgt acatagaaaa gaaccacagg gagcaacata g	1011

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種偵測及分離產生高含量的具有第一次單元以及第二次單元的雜二聚體蛋白質之細胞的方法，該方法包含：

(a) 以編碼細胞表面捕捉蛋白質(CSCP)的核酸轉染細胞，該蛋白質為包含抗原結合蛋白質和膜錨定體域的融合蛋白質，其中該細胞表現該雜二聚體蛋白質，其中該雜二聚體蛋白質包含多個次單元以及該雜二聚體蛋白質上的第一位點位於包含含有野生型CH3域的重鏈的第一次單元，該CH3域具有在依據IMGT外顯子編號系統的位置95處之組胺酸殘基及依據IMGT外顯子編號系統的位置96處之酪胺酸殘基，以及該雜二聚體蛋白質上的第二位點位於包含含有經取代CH3域的重鏈的第二次單元，該CH3域具有依據IMGT外顯子編號系統的位置95處之精胺酸殘基及依據IMGT外顯子編號系統的位置96處之苯丙胺酸殘基，其中該CSCP包含可結合該雜二聚體蛋白質之第一次單元但不結合該雜二聚體蛋白質之第二次單元之ScFv，以及其中(i)該CSCP結合至該雜二聚體蛋白質上的第一位點以在宿主細胞內形成CSCP-雜二聚體蛋白質複合體，(ii)該CSCP-雜二聚體蛋白質複合體透過宿主細胞被運輸，以及(iii)接著被展示在宿主細胞的表面上；

(b) 偵測(a)之以高產量表現該CSCP的細胞；

(c) 分離並培養以高產量表現該CSCP的細胞；

(d) 以結合該雜二聚體蛋白質之第二位點的偵測分子偵測步驟(c)之經分離且培養的細胞表面上的雜二聚體蛋白質，其中該偵測分子包含重組抗原結合蛋白質，該重組抗原結合蛋白質特異地結合具有依據IMGT外顯子編號系統的位置95處的精胺酸殘基以及依據IMGT外顯子編號系統的位置96處的苯丙胺酸殘基之該經取代CH3域；以及

(e) 分離在步驟(d)中偵測到之在其表面上帶有所偵測雜二聚體蛋白質的細胞。

**【請求項2】** 一種偵測或分離穩定表現具有第一次單元以及第二次單元之雜二聚體蛋白質的細胞的方法，該方法包含下列步驟：

(a) 於宿主細胞表現：

(i) 包含抗原結合蛋白質和膜錨定體域的細胞表面捕捉蛋白質(CSCP)，以及

(ii) 雜二聚體蛋白質，其中該雜二聚體蛋白質包含多個次單元以及該雜二聚體蛋白質上的第一位點位於包含含有野生型CH3域的重鏈的第一次單元，該CH3域具有依據IMGT外顯子編號系統的位置95處之組胺酸殘基及依據IMGT外顯子編號系統的位置96處之酪胺酸殘基，以及該雜二聚體蛋白質上的第二位點位於包含含有經取代CH3域的重鏈的第二次單元，該CH3域具有依據IMGT外顯子編號系統的位置95處之精胺酸殘基及依據IMGT外顯子編號系統的位置96處之苯丙胺酸殘基，其中該CSCP包含可結合該雜二聚體蛋白質之第一次單元但不結合該雜二聚體蛋白質之第二次單元之ScFv，以及

其中(i)該CSCP結合至該雜二聚體蛋白質上的第一位點以在宿主細胞內形成CSCP-雜二聚體蛋白質複合體，(ii)該CSCP-雜二聚體蛋白質複合體透過宿主細胞被運輸，以及(iii)接著被展示在宿主細胞的表面上；



(b) 將該宿主細胞與偵測分子接觸，其中該偵測分子結合該雜二聚體蛋白質上的第二位點，其中偵測分子包含重組抗原結合蛋白質，該重組抗原結合蛋白質特異地結合經取代CH3域，該經取代CH3域具有依據IMGT外顯子編號系統的位置95處的精胺酸殘基以及依據IMGT外顯子編號系統的位置96處的苯丙胺酸殘基；以及

(c) 篩選結合該偵測分子的宿主細胞。

【請求項3】 如請求項1或2之方法，其中該雜二聚體蛋白質包含雙特異性抗體、含Fc融合蛋白質、或TCR-Fc。

【請求項4】 如請求項1或2之方法，其中該CSCP包含重組抗原結合蛋白質，其結合人類IgG1-Fc域、人類IgG2-Fc域、或人類IgG4-Fc域。

【請求項5】 如請求項1或2之方法，其中該方法包括使細胞與阻斷分子接觸，其中該阻斷分子結合至未結合該雜二聚體蛋白質之CSCP，但不結合至CSCP-雜二聚體蛋白質複合體。

【請求項6】 如請求項1或2之方法，其中該細胞係藉由螢光活化細胞分選進行偵測和篩選。

【請求項7】 如請求項1或2之方法，其中該偵測分子(DM)包含經標記重組抗原結合蛋白質，該重組抗原結合蛋白質結合人類IgG1-Fc域、人類IgG2-Fc域、或人類IgG4-Fc域，其中該Fc域包含依據IMGT外顯子編號系統的位置95處的精胺酸殘基以及依據IMGT外顯子編號系統的位置96處的苯丙胺酸殘基。

【請求項8】 如請求項1或2之方法，其中：

(a) 該抗原結合蛋白質包含結合含有SEQ ID NO：42胺基酸序列之多肽之抗體或ScFv；

(b) 該抗原結合蛋白質包含結合含有SEQ ID NO：42胺基酸序列之多肽之抗體或ScFv，依表面電漿共振分析中所測，其 $K_D$ 低於約60 nM；或

(c) 該抗原結合蛋白質係抗體或ScFv，其與包含具有SEQ ID NO：32胺基酸序列之重鏈CDR-1 (HCDR-1)、具有SEQ ID NO：33胺基酸序列之HCDR-2、具有SEQ ID NO：34胺基酸序列之HCDR-3、具有SEQ ID NO：35胺基酸序列之輕鏈CDR-1 (LCDR-1)、具有SEQ ID NO：36胺基酸序列之LCDR-2、以及具有SEQ ID NO：37胺基酸序列之LCDR-3之抗體結合於該經取代CH3多肽上的相同表位。

【請求項9】 如請求項8之方法，其中：

(a) 該偵測分子之抗原結合蛋白質包含重鏈可變區(HCVR)之一或多個互補決定區(CDR)，其具有與SEQ ID NO：38至少95%一致的胺基酸序列，或輕鏈可變區(LCVR)之一或多個互補決定區，其具有與SEQ ID NO：39至少95%一致的胺基酸序列；

(b) 該偵測分子之抗原結合蛋白質包含具有SEQ ID NO：32胺基酸序列之重鏈CDR-1 (HCDR-1)、具有SEQ ID NO：33胺基酸序列之HCDR-2、具有SEQ ID NO：34胺基酸序列之HCDR-3、具有SEQ ID NO：35胺基酸序列之輕鏈CDR-1 (LCDR-1)、具有SEQ ID NO：36胺基酸序列之LCDR-2、以及具有SEQ ID NO：37胺基酸序列之LCDR-3；

(c) 該偵測分子之抗原結合蛋白質包含具有與SEQ ID NO：38至少95%一致的胺基酸序列之HCVR以及具有與SEQ ID NO：39至少95%一致的胺基酸序列之LCVR；或

(d) 該偵測分子之抗原結合蛋白質包含具有SEQ ID NO：38胺基酸序列之HCVR以及具有SEQ ID NO：39胺基酸序列之LCVR；

(e) 該偵測分子之抗原結合蛋白質為抗體，其包含含有與SEQ ID NO：40至少95%一致的胺基酸序列的重鏈以及與含有與SEQ ID NO：41至少95%一致的胺基酸序列的輕鏈；或

(f) 該偵測分子之抗原結合蛋白質為抗體，其包含具有與SEQ ID NO：40一致的胺基酸序列的重鏈以及具有與SEQ ID NO：41一致的胺基酸序列的輕鏈。

【請求項10】如請求項1或2之方法，其中該偵測分子之抗原結合蛋白質係ScFv融合蛋白質，其包含：

(a) (i)與SEQ ID NO：38至少95%一致的胺基酸序列之重鏈可變區；(ii)與SEQ ID NO：39至少95%一致的胺基酸序列之輕鏈可變區；以及(iii)膜錨定體域；

(b) 具有與SEQ ID NO：38一致的胺基酸序列之重鏈可變區以及具有與SEQ ID NO：39一致的胺基酸序列之輕鏈可變區；或

(c) SEQ ID NO:43之胺基酸序列。

【請求項11】一種如請求項1至10中任一項之方法所產生之雙特異性抗體，其包括：

(a) 以下列轉染宿主細胞：

(i) 可操作編碼該雙特異性抗體之核酸序列，或其互補核酸序列；及

(ii) 可操作編碼細胞表面捕捉蛋白質(CSCP)之核酸序列，或其互補核酸序列；

其中該CSCP包含具有抗原結合域的重組抗原結合蛋白質；以及其中該雙特異性抗體包含多個次單元以及該雙特異性抗體上的第一位點位於第一次單元，以及該雙特異性抗體上的第二位點位於第二次單元；

其中：

- (i) 該CSCP結合至該雙特異性抗體上的第一位點以在宿主細胞內形成CSCP-雙特異性抗體複合體，
- (ii) 該CSCP-雙特異性抗體複合體透過宿主細胞被運輸，以及
- (iii) 接著被展示在宿主細胞的表面上；

其中該雙特異性抗體之第一次單元或第二次單元包含：

- (1) CH3域，其具有依據IMGT外顯子編號系統的位置95處之組胺酸殘基(95H)，及依據IMGT外顯子編號系統的位置96處之酪胺酸殘基(96Y)(Fc)；或
- (2) CH3域，其具有依據IMGT外顯子編號系統的位置95處之精胺酸殘基(95R)，且在依據IMGT外顯子編號系統的位置96處之苯丙胺酸殘基(96F)(Fc\*)；

其中第一次單元及第二次單元相異；以及

其中該CSCP之抗原結合域以及該DM之經標記重組抗原結合域相異；

- (b) 於該雙特異性抗體及該CSCP可於胞內表現以及共同展示於宿主細胞表面之條件下培養該宿主細胞；
- (c) 藉由將該宿主細胞與偵測分子(DM)接觸，偵測及鑑定該宿主細胞，其中該DM包含經標記重組抗原結合蛋白質；以及其中該DM結合該雙特異性抗體之第二位點；
- (d) 於可操作該雙特異性抗體表現及分泌至生長培養基條件下在生長培養基中使該宿主細胞生長；以及
- (e) 自該培養基分離該雙特異性抗體。

【請求項12】 如請求項11之雙特異性抗體，其中：

第 6 頁，共 13 頁(發明申請專利範圍)

- (a) 該雙特異性抗體之第一次單元包含含有野生型CH3域之重鏈結構域；或
- (b) 該雙特異性抗體之第一次單元包含在依據IMGT外顯子編號系統的位置

95處之組胺酸殘基及在依據IMGT外顯子編號系統的位置96處之酪胺酸殘基。

【請求項13】 如請求項11之雙特異性抗體，其中該方法進一步包含將該細胞接觸阻斷分子，其中該阻斷分子結合未結合該雙特異性抗體之CSCP，但不結合該CSCP-雙特異性抗體複合體。

【請求項14】 如請求項11之雙特異性抗體，其中該阻斷分子係非人類IgG或人類Fc分子。

【請求項15】 如請求項11之雙特異性抗體，其中該宿主細胞係藉由螢光活化細胞分選進行偵測和鑑定。

【請求項16】 如請求項11之雙特異性抗體，其中該CSCP包含結合人類IgG1-Fc結構域、人類IgG2-Fc結構域、或人類IgG4-Fc結構域之重組抗原結合蛋白質。

【請求項17】 如請求項11之雙特異性抗體，其中該重組抗原結合蛋白質結合至包含與SEQ ID NO:26胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%或100%一致性之胺基酸序列之多肽。

【請求項18】 如請求項11之雙特異性抗體，其中該重組抗原結合蛋白質包含蛋白質A或蛋白質A之功能片段。

【請求項19】 如請求項11之雙特異性抗體，其中該抗原結合域包含：

- (i) 與SEQ ID NO:32胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%或100%一致性之胺基酸序列之重鏈CDR-1 (HCDR-1)；

與SEQ ID NO:33胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之HCDR-2；

與SEQ ID NO:34胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之HCDR-3；

與SEQ ID NO:35胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之輕鏈CDR-1 (LCDR-1)；

與SEQ ID NO:36胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之LCDR-2；及

與SEQ ID NO:37胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之LCDR-3；

(ii) 與SEQ ID NO:27胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之重鏈CDR-1 (HCDR-1)；

與SEQ ID NO:28胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之HCDR-2；

與SEQ ID NO:29胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之HCDR-3；

與SEQ ID NO:30胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之輕鏈CDR-1 (LCDR-1)；及

與SEQ ID NO:31胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之LCDR-2；

(iii) 與SEQ ID NO:27胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之重鏈CDR-1 (HCDR-1)；

與SEQ ID NO:28胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之HCDR-2；

與SEQ ID NO:29胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之HCDR-3；及

與SEQ ID NO:16胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之輕鏈可變區 (LCVR)；

(iv) 與SEQ ID NO:15胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之重鏈可變區 (HCVR)；及

與SEQ ID NO:16胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之LCVR；

(v) 與SEQ ID NO:38胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之HCVR；及

與SEQ ID NO:39胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之LCVR；

(vi) 與SEQ ID NO:43胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之ScFv融合蛋白質；

(vii) 與SEQ ID NO:19胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之ScFv融合蛋白質；

(viii) 包含下列之抗體：

與SEQ ID NO:40胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之重鏈；及

與SEQ ID NO:41胺基酸序列具有95%、96%、97%、97%、98%、99%  
或100%一致性之胺基酸序列之輕鏈；

或

(ix) 由下列組成之抗體：

如SEQ ID NO:40所示之胺基酸序列之重鏈；及

如SEQ ID NO:41所示之胺基酸序列之輕鏈。

**【請求項20】** 如請求項11之雙特異性抗體，其中該CSCP包含ScFv融合蛋白質，該ScFv融合蛋白質包含：

(a) 包含與SEQ ID NO:15具有至少95%一致性之胺基酸序列之重鏈可變區，

(b) 包含與SEQ ID NO:16具有至少95%一致性之胺基酸序列之輕鏈可變區，

(c) 膜錨定體域。

**【請求項21】** 如請求項20之雙特異性抗體，其中該膜錨定體域包含與SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:21具有至少95%一致性之胺基酸序列。

**【請求項22】** 如請求項11之雙特異性抗體，其中該CSCP係包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列之ScFv融合蛋白質。

**【請求項23】** 如請求項11之雙特異性抗體，其中該偵測分子包含重組抗原結合蛋白質，該重組抗原結合蛋白質包含含有與SEQ ID NO:15具有至少95%一致性之胺基酸序列之重鏈可變區以及含有與SEQ ID NO:16具有至少95%一致性之胺基酸序列之輕鏈可變區。

**【請求項24】** 如請求項11之雙特異性抗體，其中：



- (a) 該雙特異性抗體之第二次單元包含含有CH3結構域之重鏈，該CH3結構域包含依據IMGT外顯子編號系統的位置95處之精胺酸殘基及依據IMGT外顯子編號系統的位置96處之苯丙胺酸殘基；及
- (b) 該偵測分子(DM)包含經標記重組抗原結合蛋白質，其結合人類IgG1-Fc域、人類IgG2-Fc域、或人類IgG4-Fc域，其中該Fc域包含在依據IMGT外顯子編號系統的位置95處之精胺酸殘基及在依據IMGT外顯子編號系統的位置96處之苯丙胺酸殘基。

【請求項25】 如請求項11之雙特異性抗體，其中該偵測分子結合至經取代CH3域，該經取代CH3域包含一或多個胺基酸取代，其選自由以下組成之群組：依據IMGT外顯子編號系統的(a) 95R、及(b) 95R和96F，或依據EU編號系統的(a') 435R與(b') 435R和436F，其中：

- (a) 該重組抗原結合蛋白質包含結合含有SEQ ID NO:42胺基酸序列之多肽之抗體或ScFv；
- (b) 該重組抗原結合蛋白質包含結合含有SEQ ID NO:42胺基酸序列之多肽之抗體或ScFv，依表面電漿共振分析中所測，其 $K_D$ 低於約60 nM；或
- (c) 該重組抗原結合蛋白質係抗體或ScFv，其與包含具有SEQ ID NO：32胺基酸序列之重鏈CDR-1 (HCDR-1)、具有SEQ ID NO：33胺基酸序列之HCDR-2、具有SEQ ID NO：34胺基酸序列之HCDR-3、具有SEQ ID NO：35胺基酸序列之輕鏈CDR-1 (LCDR-1)、具有SEQ ID NO：36胺基酸序列之LCDR-2、以及具有SEQ ID NO：37胺基酸序列之LCDR-3之抗體結合於該經取代CH3多肽上的相同表位。

【請求項26】 如請求項11之雙特異性抗體，其中：

- (a) 該重組抗原結合蛋白質包含重鏈可變區(HCVR)之一或多個互補決定區(CDR)，該HCVR具有與SEQ ID NO：38至少95%一致的胺基酸序列，或輕鏈可變區(LCVR)之一或多個互補決定區，該LCVR具有與SEQ ID NO：39至少95%一致的胺基酸序列；
- (b) 該該重組抗原結合蛋白質包含具有SEQ ID NO：32胺基酸序列之重鏈CDR-1 (HCDR-1)、具有SEQ ID NO：33胺基酸序列之HCDR-2、具有SEQ ID NO：34胺基酸序列之HCDR-3、具有SEQ ID NO：35胺基酸序列之輕鏈CDR-1 (LCDR-1)、具有SEQ ID NO：36胺基酸序列之LCDR-2、以及具有SEQ ID NO：37胺基酸序列之LCDR-3；
- (c) 該重組抗原結合蛋白質包含具有SEQ ID NO：38胺基酸序列之HCVR以及具有SEQ ID NO：39胺基酸序列之LCVR；
- (d) 該重組抗原結合蛋白質為抗體，其包含含有與SEQ ID NO：40至少95%一致的胺基酸序列的重鏈以及含有與SEQ ID NO：41至少95%一致的胺基酸序列的輕鏈；或
- (e) 該重組抗原結合蛋白質為抗體，其包含具有與SEQ ID NO：40一致的胺基酸序列的重鏈以及具有與SEQ ID NO：41一致的胺基酸序列的輕鏈。

**【請求項27】** 如請求項11之雙特異性抗體，其中該重組抗原結合蛋白質為ScFv融合蛋白質，其包含：

- (a) 與SEQ ID NO：38至少95%一致的胺基酸序列之重鏈可變區；與SEQ ID NO：39至少95%一致的胺基酸序列之輕鏈可變區，及膜錨定體域；
- (b) 與SEQ ID NO：38一致的胺基酸序列之重鏈可變區及與SEQ ID NO：39一致的胺基酸序列之輕鏈可變區；或

(c) SEQ ID NO:43之胺基酸序列。

【請求項28】 一種組成物，其包含如請求項11至27其中任一項之雙特異性抗體以及一醫藥上可接受之賦形劑。