



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114008212 A

(43) 申请公布日 2022. 02. 01

(21) 申请号 202080044538.6

(22) 申请日 2020.06.17

(30) 优先权数据

19181095.1 2019.06.19 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/066678 2020.06.17

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/254352 EN 2020.12.24

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 J·奥尔 M·波普 U·格普费特

C-L·霍克

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 胡志君 黄革生

(51) Int.Cl.

G12P 21/02 (2006.01)

G12N 15/90 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

G12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

权利要求书11页 说明书55页

序列表4页 附图1页

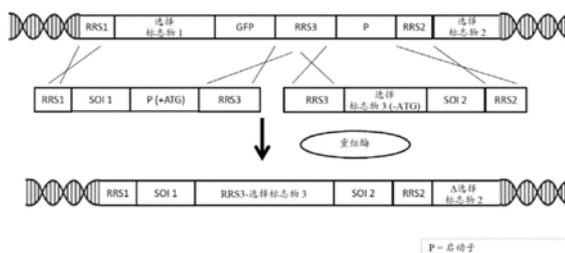
(54) 发明名称

通过以限定的组织形式靶向整合多个表达盒来产生三价抗体表达细胞的方法

(57) 摘要

本文报道了一种用于产生三价抗体的方法,所述方法包括以下步骤:培养包含编码所述三价抗体的脱氧核糖核酸的哺乳动物细胞,以及从细胞或培养基中回收所述三价抗体,其中编码所述三价5抗体的所述脱氧核糖核酸稳定整合到所述哺乳动物细胞的基因组中,并在5'至3'方向包含编码第一重链的第一表达盒、编码第一轻链的第二表达盒、编码第一轻链的第三表达盒、编码第二重链的第四表达盒、编码第二轻链的第五表达盒和编码第二轻链的第六10表达盒,其中所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第一轻链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和15 CH3结构域,所述第一轻链从N末端到C末端包括第二重链可变结构域和CL结构域,并且所述第二轻链从N末

端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域,其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点且所述第二重链可变结构域和所述第一20轻链可变结构域形成第二结合位点。



1. 一种用于产生三价抗体的方法,其包括以下步骤:

- a) 培养包含编码所述三价抗体的脱氧核糖核酸的哺乳动物细胞,以及
- b) 从细胞或培养基中回收所述三价抗体,

其中编码所述三价抗体的所述脱氧核糖核酸稳定地整合到所述哺乳动物细胞的基因组中并且在5'至3'方向上包含

(1)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,和
- 编码第二轻链的第五表达盒,

或 (2)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,

或 (3)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,

或 (4)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,
- 编码第一重链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,

或 (5)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,
- 编码第二重链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,
- 编码第二轻链的第七表达盒,

或 (6)

- 编码第一轻链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一重链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒。

2. 一种编码三价抗体的脱氧核糖核酸,其在5'至3'方向上包含

(1)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,和
- 编码第二轻链的第五表达盒,

或 (2)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,

或 (3)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,

或 (4)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,
- 编码第一重链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,

或 (5)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,

- 编码第二重链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,
- 编码第二轻链的第七表达盒,

或(6)

- 编码第一轻链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一重链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒。

3. 脱氧核糖核酸用于在哺乳动物细胞中表达三价抗体的用途,所述脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含

(1)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,和
- 编码第二轻链的第五表达盒,

或(2)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,

或(3)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,

或(4)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,
- 编码第一重链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,

或(5)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,
- 编码第二重链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,
- 编码第二轻链的第七表达盒,

或 (6)

- 编码第一轻链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一重链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒。

4. 一种重组哺乳动物细胞,其包含整合在细胞的基因组中的编码三价抗体的脱氧核糖核酸,其中所述编码三价抗体的脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含

(1)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,和
- 编码第二轻链的第五表达盒,

或 (2)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,

或 (3)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,

或 (4)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,

- 编码第二轻链的第四表达盒,
- 编码第一重链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,

或 (5)

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,
- 编码第二重链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,
- 编码第二轻链的第七表达盒,

或 (6)

- 编码第一轻链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一重链的第三表达盒,
- 编码第二重链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒。

5. 一种包含两种脱氧核糖核酸的组合物,所述两种脱氧核糖核酸进而包含三种不同的重组识别序列和五至七个表达盒,其中

- 所述第一脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含

(1)

- 第一重组识别序列,
- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,和
- 第三重组识别序列的第一拷贝,

或 (2)

- 第一重组识别序列,
- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,和
- 第三重组识别序列的第一拷贝,

或 (3)

- 第一重组识别序列,
- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,和

-第三重组识别序列的第一拷贝，  
或(4)

-第一重组识别序列，  
-编码第一重链的第一表达盒，  
-编码第二重链的第二表达盒，  
-编码第一轻链的第三表达盒，  
-编码第二轻链的第四表达盒，和  
-第三重组识别序列的第一拷贝，  
或(5)

-第一重组识别序列，  
-编码第一重链的第一表达盒，  
-编码第二重链的第二表达盒，  
-编码第一轻链的第三表达盒，  
-编码第二轻链的第四表达盒，和  
-第三重组识别序列的第一拷贝，  
或(6)

-第一重组识别序列，  
-编码第一轻链的第一表达盒，  
-编码第一轻链的第二表达盒，  
-编码第一重链的第三表达盒，和  
-第三重组识别序列的第一拷贝，  
并且

-所述第二脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含  
(1)

-第三重组识别序列的第二拷贝，  
-编码第二重链的第四表达盒，  
-编码第二轻链的第五表达盒，和  
-第二重组识别序列，

或(2)

-第三重组识别序列的第二拷贝，  
-编码第二重链的第四表达盒，  
-编码第二轻链的第五表达盒，  
-编码第二轻链的第六表达盒，和  
-第二重组识别序列，

或(3)

-第三重组识别序列的第二拷贝，  
-编码第二轻链的第五表达盒，和  
-第二重组识别序列，

或(4)

- 第三重组识别序列的第二拷贝,
- 编码第一重链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,和
- 第二重组识别序列,

或(5)

- 第三重组识别序列的第二拷贝,
- 编码第二重链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,
- 编码第二轻链的第七表达盒,和
- 第二重组识别序列,

或(6)

- 第三重组识别序列的第二拷贝,
- 编码第二重链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,和
- 第二重组识别序列。

6. 一种用于产生包含编码三价抗体的脱氧核糖核酸并且分泌所述三价抗体的重组哺乳动物细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 提供包含整合在哺乳动物细胞的基因组的基因座内的单个位点处的外源核苷酸序列的所述哺乳动物细胞,其中所述外源核苷酸序列包含侧接至少一个第一选择标志物的第一重组识别序列和第二重组识别序列,以及位于所述第一重组识别序列与所述第二重组识别序列之间的第三重组识别序列,并且所有的所述重组识别序列都不同;

b) 向a)中所提供的细胞中引入两种脱氧核糖核酸的组合物,所述两种脱氧核糖核酸包含三种不同的重组识别序列和五至七个表达盒,其中

- 所述第一脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含

(1)

- 第一重组识别序列,
- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,和
- 第三重组识别序列的第一拷贝,

或(2)

- 第一重组识别序列,
- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,和
- 第三重组识别序列的第一拷贝,

或(3)

- 第一重组识别序列,

- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,和
- 第三重组识别序列的第一拷贝,

或 (4)

- 第一重组识别序列,
- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,和
- 第三重组识别序列的第一拷贝,

或 (5)

- 第一重组识别序列,
- 编码第一重链的第一表达盒,
- 编码第二重链的第二表达盒,
- 编码第一轻链的第三表达盒,
- 编码第二轻链的第四表达盒,和
- 第三重组识别序列的第一拷贝,

或 (6)

- 第一重组识别序列,
- 编码第一轻链的第一表达盒,
- 编码第一轻链的第二表达盒,
- 编码第一重链的第三表达盒,和
- 第三重组识别序列的第一拷贝,

并且

- 所述第二脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含

(1)

- 第三重组识别序列的第二拷贝,
- 编码第二重链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,和
- 第二重组识别序列,

或 (2)

- 第三重组识别序列的第二拷贝,
- 编码第二重链的第四表达盒,
- 编码第二轻链的第五表达盒,
- 编码第二轻链的第六表达盒,和
- 第二重组识别序列,

或 (3)

- 第三重组识别序列的第二拷贝，
- 编码第二轻链的第五表达盒，和
- 第二重组识别序列，

或 (4)

- 第三重组识别序列的第二拷贝，
- 编码第一重链的第五表达盒，
- 编码第二轻链的第六表达盒，和
- 第二重组识别序列，

或 (5)

- 第三重组识别序列的第二拷贝，
- 编码第二重链的第五表达盒，
- 编码第二轻链的第六表达盒，
- 编码第二轻链的第七表达盒，和
- 第二重组识别序列，

或 (6)

- 第三重组识别序列的第二拷贝，
- 编码第二重链的第四表达盒，
- 编码第二轻链的第五表达盒，
- 编码第二轻链的第六表达盒，和
- 第二重组识别序列，

其中所述第一脱氧核糖核酸和所述第二脱氧核糖核酸的所述第一重组识别序列至所述第三重组识别序列与整合的外源核苷酸序列上的所述第一重组识别序列至所述第三重组识别序列匹配，

其中编码一个第二选择标志物的表达盒的5'末端部分和3'末端部分在合在一起时形成所述一个第二选择标志物的功能性表达盒；

c)

- i) 与b)的所述第一脱氧核糖核酸和所述第二脱氧核糖核酸同时引入；

或

- ii) 在其后依次引入

一种或多种重组酶，

其中所述一种或多种重组酶识别所述第一脱氧核糖核酸和所述第二脱氧核糖核酸的所述重组识别序列；(并且任选地其中所述一种或多种重组酶进行两次重组酶介导的盒交换；)

以及

d) 选择表达所述第二选择标志物并且分泌所述三价抗体的细胞，从而产生包含编码所述三价抗体的脱氧核糖核酸并且分泌所述三价抗体的重组哺乳动物细胞。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的用于产生三价抗体的方法、或脱氧核糖核酸、或用途、或重组哺乳动物细胞、或组合物、或用于产生重组哺乳动物细胞的方法，其中所述第一重链在CH3结构域中包含突变T366W(根据Kabat编号)，并且所述第二重链在CH3结构域中

包含突变T366S、L368A和Y407V(根据Kabat编号),反之亦然。

8. 根据权利要求7所述的用于产生三价抗体的方法、或脱氧核糖核酸、或用途、或重组哺乳动物细胞、或组合物、或用于产生重组哺乳动物细胞的方法,其中所述重链中的一条进一步包含突变S354C并且相应的另一条重链包含突变Y349C(根据Kabat编号)。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的用于产生三价抗体的方法、或脱氧核糖核酸、或用途、或重组哺乳动物细胞、或组合物、或用于产生重组哺乳动物细胞的方法,其中所述第一重链是包含额外经结构域交换Fab片段的延伸重链。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的用于产生三价抗体的方法、或脱氧核糖核酸、或用途、或重组哺乳动物细胞、或组合物、或用于产生重组哺乳动物细胞的方法,其中所述第一轻链为经结构域交换轻链VH-VL或CH1-CL。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的用于产生三价抗体的方法、或脱氧核糖核酸、或用途、或重组哺乳动物细胞、或组合物、或用于产生重组哺乳动物细胞的方法,其中

- 所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第一轻链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,

- 所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,

- 所述第一轻链从N末端到C末端包含第二重链可变结构域和CL结构域,并且

- 所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域,

其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点,并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。

12. 根据权利要求1、3、4和权利要求6至11中任一项所述的用于产生三价抗体的方法、或脱氧核糖核酸、或用途、或重组哺乳动物细胞、或组合物、或用于产生重组哺乳动物细胞的方法,其中所述脱氧核糖核酸在单个位点或基因座稳定整合到所述哺乳动物细胞的基因组中。

13. 根据权利要求1至5和权利要求7至12中任一项所述的用于产生三价抗体的方法、或脱氧核糖核酸、或用途、或重组哺乳动物细胞、或组合物、或用于产生重组哺乳动物细胞的方法,其中编码所述三价抗体的所述脱氧核糖核酸包含另外的编码选择标志物的表达盒,其中所述编码选择标志物的表达盒部分位于所述第三重组识别序列的5'并且部分位于所述第三重组识别序列的3',其中所述表达盒的位于5'的部分包含启动子和起始密码子,并且所述表达盒的位于3'的部分包含没有起始密码子的编码序列和多聚A信号,其中所述起始密码子与所述编码序列可操作地连接。

14. 根据权利要求1至5和权利要求7至13中任一项所述的用于产生三价抗体的方法、或脱氧核糖核酸、或用途、或重组哺乳动物细胞、或组合物、或用于产生重组哺乳动物细胞的方法,其中对于除所述选择标志物的所述表达盒之外,所述启动子为具有内含子A的人CMV启动子,所述多聚腺苷酸化信号序列为bGH多聚腺苷酸化信号序列,并且所述终止子为hGT终止子,其中对于所述选择标志物的所述表达盒,所述启动子为SV40启动子,所述多聚腺苷酸化信号序列为SV40多聚腺苷酸化信号序列,并且不存在终止子。

15. 根据权利要求1、3、4和权利要求6至14中任一项所述的用于产生三价抗体的方法、或脱氧核糖核酸、或用途、或重组哺乳动物细胞、或组合物、或用于产生重组哺乳动物细胞

的方法,其中所述哺乳动物细胞是CHO细胞。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的用于产生三价抗体的方法、或脱氧核糖核酸、或用途、或重组哺乳动物细胞、或组合物、或用于产生重组哺乳动物细胞的方法,其中如果在5'至3'方向的组织形式具有作为第一表达盒的编码第一重链的表达盒,则所有盒都单向布置。

17.根据权利要求1至15中任一项所述的用于产生三价抗体的方法、或脱氧核糖核酸、或用途、或重组哺乳动物细胞、或组合物、或用于产生重组哺乳动物细胞的方法,其中如果在5'至3'方向的组织形式是编码第一轻链的第一表达盒、编码第一轻链的第二表达盒、编码第一重链的第三表达盒、编码第二重链的第四表达盒、编码第二轻链的第五表达盒、编码第二轻链的第六表达盒,则所述第一表达盒至所述第三表达盒单向布置并且所述第四表达盒至所述第六表达盒单向布置,由此所述第一表达盒至所述第三表达盒布置在所述第四表达盒至所述第六表达盒的相反方向上。

## 通过以限定的组织形式靶向整合多个表达盒来产生三价抗体 表达细胞的方法

[0001] 本发明属于细胞系产生和多肽生产领域。更准确地说,本文报道了重组哺乳动物细胞,其已通过双重组酶介导的盒交换反应获得,导致特异性表达盒序列整合到哺乳动物细胞的基因组中。所述细胞可以用于产生三价抗体的方法。

### 背景技术

[0002] 分泌的和糖基化的多肽(诸如抗体)通常通过在真核细胞中重组表达(稳定表达或瞬时表达)而产生。

[0003] 用于产生表达感兴趣的外源性多肽的重组细胞的一种策略涉及随机整合编码感兴趣多肽的核苷酸序列,随后是选择步骤和分离步骤。然而,这种方法具有若干缺点。第一,核苷酸序列照此功能性整合到细胞基因组中不仅是罕见的事件,而且考虑到核苷酸序列整合的随机性,这些罕见事件导致多种基因表达表型和细胞生长表型。此类变化称为“位置效应变化”,至少部分地源于真核细胞基因组中存在的复杂基因调控网络以及用于整合和基因表达的某些基因组基因座的可及性。第二,随机整合策略通常无法提供对整合到细胞基因组中的核苷酸序列拷贝数的控制。事实上,通常采用基因扩增方法来获得高产量细胞。然而,这种基因扩增还可能导致不需要的细胞表型,诸如不稳定的细胞生长和/或产物表达。第三,由于随机整合过程中固有的整合基因座异质性,在转染后筛选数千个细胞以分离那些表现出期望的感兴趣多肽表达水平的重组细胞既耗时又费力。即使在分离出此类细胞后,也不能保证感兴趣多肽的稳定表达,并且可能需要进一步筛选以获得稳定的商业化生产细胞。第四,由通过随机整合获得的细胞产生的多肽表现出高度的序列变异,这可能部分是由于用于选择高水平的多肽表达的选择剂的致突变性。最后,要生产的多肽的复杂性越高,即在细胞内形成感兴趣多肽所需的不同多肽或多肽链的数目越高,控制不同多肽或多肽链彼此的表达比就越重要。需要控制该表达比以使感兴趣多肽能够以高表达产量有效表达、正确组装和成功分泌。

[0004] 通过重组酶介导的盒交换(RMCE)进行的靶向整合是将外源DNA特异性和有效地引导至真核宿主基因组中的预定位点的方法(Turan等人,J.Mol.Biol.407(2011)193-221)。

[0005] WO 2006/007850公开了抗恒河猴D重组多克隆抗体,以及使用位点特异性整合到单独的宿主细胞的基因组中的制造方法。

[0006] Crawford,Y.,et al.(Biotechnol.Prog.29(2013)1307-1315)报道了使用phiC31整合酶和CRE-Lox技术的组合从有限基因组筛选中快速鉴定用于靶细胞系发育的可靠宿主。

[0007] WO 2013/006142公开了几乎同质的遗传改变的真核细胞群,其基因组中稳定掺入了供体盒,该供体盒包含可操作地连接至分离的核酸片段的强多聚腺苷酸化位点,该分离的核酸片段包含靶向核酸位点和选择性标记蛋白质编码序列,其中该分离的核酸片段侧接第一重组位点和不同的第二重组位点。

[0008] WO 2018/162517公开了依赖于i)表达盒序列和ii)不同表达载体之间表达盒的分

布,观察到表达产量和产物质量的高度变化。

[0009] Tadauchi, T., et al. 公开了利用受调控的靶向整合细胞系开发方法来系统地研究使抗体难以表达的原因 (Biotechnol. Prog. 35 (2019) No. 2, 1-11)。

[0010] WO 2016/079076 公开了针对 Fo1R1 和 CD3 的 T 细胞活化双特异性抗原结合分子。在实例 29 中,描述了双特异性 Fo1R1/CD3- $\kappa$ - $\lambda$  抗体的产生,使用瞬时转染并且三种表达载体的质粒比率为 1:1:1。在实例 36 中,DP47 GS TCB 的制备描述为通过用相应的表达载体共转染 HEK293-EBNA 细胞,以 1:2:1:1 的比例(“载体重链 Fc (孔)” : “载体轻链” : “载体轻链 CrossFab” : “载体重链 Fc (杆) - FabCrossFab”)。WO 2017/055389 和 WO 2016/020309 中提供了类似的公开。

[0011] WO 2014/033074 公开了一种血脑屏障穿梭载体。在实例 2 中,公开了在转染时使用等摩尔质粒比率的三个表达质粒瞬时产生三价 MAb31-scFab (8D3)。

[0012] WO 2017/184831 据称公开了重组蛋白在真核细胞中的位点特异性整合和表达,特别是通过使用表达增强基因座来改善包括双特异性抗体在内的抗体在真核细胞,特别是中国仓鼠 (*Cricetulus griseus*) 细胞系中的表达的方法。该文中的数据以匿名方式呈现,因此无法对实际显示的内容做出结论。

[0013] Rajendra, Y., et al. 公开了单个四元载体是用于生成稳定 CHO 细胞系的一种简单而有效的替代方法,并且可以加速用于临床异源 mAb 治疗的细胞系生成 (Biotechnol. Prog. 33 (2017) 469-477)。

## 发明内容

[0014] 本文报道了表达三价抗体,具体是双特异性三价抗体,例如 T 细胞双特异性抗体 (TCB) 的重组哺乳动物细胞。三价抗体是不由所述哺乳动物细胞天然表达的异源多聚体多肽。更具体地,三价抗体是由四条多肽或多肽链组成的异源多聚体蛋白:一条轻链,其是全长轻链;另一条轻链,其是经结构域交换轻链;一条重链,其是全长重链;以及另一条重链,其是包含附加的经结构域交换重链或轻链 Fab 片段的延伸重链。为了实现三价抗体的表达,已将在特异性和限定的序列中包含多个不同表达盒的重组核酸整合到哺乳动物细胞的基因组中。

[0015] 特别地,根据本发明的方法可用于产生 T 细胞双特异性抗体 (TCB)。这些可以具有所描述的格式,例如在 WO 2013/026831 中。这些分子可以同时结合 T 细胞上的 CD3 (第一特异性) 和靶 (例如肿瘤) 细胞上的抗原 (第二特异性),从而诱导对靶细胞的杀伤。

[0016] 本文还报道了一种产生表达三价抗体,具体是三价双特异性抗体,更具体地是 TCB 的重组哺乳动物细胞的方法,以及一种使用所述重组哺乳动物细胞生产三价抗体,具体是三价双特异性抗体,更具体地是 TCB 的方法。

[0017] 在一个优选的实施例中,双特异性三价抗体包含

[0018] a) 各自特异性结合第一抗原的第一和第二 Fab 片段,

[0019] b) 一个经结构域交换 Fab 片段,其特异性结合第二抗原,在所述 Fab 片段中 CH1 和 CL 结构域彼此交换,

[0020] c) 一个 Fc 区,其包含第一重链 Fc 区多肽和第二重链 Fc-区多肽,

[0021] 其中第一 Fab 片段的 CH1 结构域的 C 末端连接到重链 Fc 区多肽的 N 末端,而经结构域

交换Fab片段的CL结构域的C末端连接到另一重链Fc区多肽的N末端,并且

[0022] 其中第二Fab片段的CH1结构域的C末端连接到第一Fab片段的VH结构域的N末端或连接到经结构域交换Fab片段的VH结构域的N末端,并且

[0023] 其中第一抗原或第二抗原是人CD3。

[0024] 在一个优选的实施例中,双特异性三价抗体包含

[0025] a) 各自特异性结合第一抗原的第一和第二Fab片段,

[0026] b) 一个经结构域交换Fab片段,其特异性结合第二抗原,在所述Fab片段中VH和VL结构域彼此交换,

[0027] c) 一个Fc区,其包含第一重链Fc区多肽和第二重链Fc-区多肽,

[0028] 其中第一Fab片段的CH1结构域的C末端连接到重链Fc区多肽的N末端,而经结构域交换Fab片段的CH1结构域的C末端连接到另一重链Fc区多肽的N末端,并且

[0029] 其中第二Fab片段的CH1结构域的C末端连接到第一Fab片段的VH结构域的N末端或连接到经结构域交换Fab片段的VL结构域的N末端,并且

[0030] 其中第一抗原或第二抗原是人CD3。

[0031] 在一个优选的实施例中,三价双特异性抗体的第一轻链和第二轻链都不是共同轻链或通用轻链。

[0032] 本发明至少部分基于以下发现:异源多聚体三价抗体表达所需的不同表达盒的序列(即表达盒组织形式)在整合到哺乳动物细胞的基因组中时影响三价抗体(例如TCB)的表达产量。

[0033] 本发明至少部分基于以下发现:通过将具有特异性表达盒组织形式的编码异源多聚体三价抗体(例如TCB)的核酸整合到哺乳动物细胞的基因组中,可以实现三价抗体(例如TCB)的有效重组表达和产生。

[0034] 已经发现,通过双重重组酶介导的盒交换反应,可以将限定的表达盒序列有利地整合到哺乳动物细胞的基因组中。

[0035] 根据本发明的一个方面是用于生产三价抗体(例如TCB)的方法,所述方法包括以下步骤:

[0036] a) 任选地在适合于表达三价抗体(例如TCB)的条件下培养包含编码所述三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸的哺乳动物细胞,和

[0037] b) 从细胞或培养基中回收所述三价抗体(例如TCB),

[0038] 其中所述编码三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸稳定地整合到所述哺乳动物细胞的基因组中并且在5'至3'方向上包含

[0039] 或者

[0040] 1)

[0041] -编码第一重链的第一表达盒,

[0042] -编码第一轻链的第二表达盒,

[0043] -编码第一轻链的第三表达盒,

[0044] -编码第二重链的第四表达盒,

[0045] -编码第二轻链的第五表达盒,和

[0046] -任选地,编码第二轻链的第六表达盒,

[0047] 或

[0048] 2)

[0049] -编码第一轻链的第一表达盒，

[0050] -编码第一轻链的第二表达盒，

[0051] -编码第一重链的第三表达盒，

[0052] -编码第二重链的第四表达盒，

[0053] -编码第二轻链的第五表达盒，和

[0054] -编码第二轻链的第六表达盒，

[0055] 其中第一至第三表达盒单向排列，第四至第六表达盒单向排列且与第一至第三表达盒方向相反；

[0056] 或

[0057] 3)

[0058] -编码第一重链的第一表达盒，

[0059] -编码第一轻链的第二表达盒，

[0060] -编码第二轻链的第三表达盒，

[0061] -编码第二重链的第四表达盒，

[0062] -编码第二轻链的第五表达盒，和

[0063] -编码第一轻链的第六表达盒，

[0064] 或

[0065] -编码第一重链的第一表达盒，

[0066] -编码第一轻链的第二表达盒，

[0067] -编码第二轻链的第三表达盒，

[0068] -编码第二重链的第四表达盒，

[0069] -编码第二轻链的第五表达盒，和

[0070] -编码第二轻链的第六表达盒。

[0071] 在一个优选实施例中，第一重链在CH3结构域中包含突变T366W(根据Kabat编号)并且第二重链在CH3结构域中包含突变T366S、L368A和Y407V，反之亦然(根据Kabat编号)。在一个实施例中，重链中的一条进一步包含突变S354C，并且相应的另一条重链包含突变Y349C(根据Kabat编号)。在一个实施例中，第一重链是包含附加经结构域交换Fab片段的延伸重链。在一个实施例中，第一轻链是经结构域交换轻链。

[0072] 在一个实施例中，脱氧核糖核酸在编码第二重链的第一和第二表达盒之间包含另外的表达盒。

[0073] 在一个实施例中

[0074] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第一轻链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，

[0075] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，

[0076] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第二重链可变结构域和CL结构域，并且

[0077] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域，

[0078] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点,并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。

[0079] 在一个实施例中

[0080] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第二重链可变结构域、CL结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,

[0081] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,

[0082] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第一轻链可变结构域和CH1结构域,和

[0083] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域,

[0084] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点,并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。

[0085] 在一个实施例中,所述脱氧核糖核酸在单个位点或基因座处稳定地整合到所述哺乳动物细胞的基因组中。

[0086] 本发明的一个方面是编码三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸,其在5'至3'方向上包含

[0087] 或者

[0088] 1)

[0089] -编码第一重链的第一表达盒,

[0090] -编码第一轻链的第二表达盒,

[0091] -编码第一轻链的第三表达盒,

[0092] -编码第二重链的第四表达盒,

[0093] -编码第二轻链的第五表达盒,和

[0094] -任选地,编码第二轻链的第六表达盒,

[0095] 或

[0096] 2)

[0097] -编码第一轻链的第一表达盒,

[0098] -编码第一轻链的第二表达盒,

[0099] -编码第一重链的第三表达盒,

[0100] -编码第二重链的第四表达盒,

[0101] -编码第二轻链的第五表达盒,和

[0102] -编码第二轻链的第六表达盒,

[0103] 其中第一至第三表达盒单向排列,第四至第六表达盒单向排列且与第一至第三表达盒方向相反;

[0104] 或

[0105] 3)

[0106] -编码第一重链的第一表达盒,

[0107] -编码第一轻链的第二表达盒,

[0108] -编码第二轻链的第三表达盒,

[0109] -编码第二重链的第四表达盒,

- [0110] -编码第二轻链的第五表达盒,和
- [0111] -编码第一轻链的第六表达盒,
- [0112] 或
- [0113] -编码第一重链的第一表达盒,
- [0114] -编码第一轻链的第二表达盒,
- [0115] -编码第二轻链的第三表达盒,
- [0116] -编码第二重链的第四表达盒,
- [0117] -编码第二轻链的第五表达盒,和
- [0118] -编码第二轻链的第六表达盒。
- [0119] 在一个优选实施例中,第一重链在CH3结构域中包含突变T366W(根据Kabat编号)并且第二重链在CH3结构域中包含突变T366S、L368A和Y407V,反之亦然(根据Kabat编号)。在一个实施例中,重链中的一条进一步包含突变S354C,并且相应的另一条重链包含突变Y349C(根据Kabat编号)。在一个实施例中,第一重链是包含附加经结构域交换Fab片段的延伸重链。在一个实施例中,第一轻链是经结构域交换轻链。
- [0120] 在一个实施例中,脱氧核糖核酸在编码第二重链的第一和第二表达盒之间包含另外的表达盒。
- [0121] 在一个实施例中
- [0122] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第一轻链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,
- [0123] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,
- [0124] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第二重链可变结构域和CL结构域,并且
- [0125] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域,
- [0126] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点,并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。
- [0127] 在一个实施例中
- [0128] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第二重链可变结构域、CL结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,
- [0129] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,
- [0130] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第一轻链可变结构域和CH1结构域,和
- [0131] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域,
- [0132] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点,并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。
- [0133] 本发明的一个方面是脱氧核糖核酸用于在哺乳动物细胞中表达三价抗体(例如TCB),该脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含
- [0134] 1)
- [0135] -编码第一重链的第一表达盒,
- [0136] -编码第一轻链的第二表达盒,

- [0137] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0138] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0139] -编码第二轻链的第五表达盒，和
- [0140] -任选地，编码第二轻链的第六表达盒，
- [0141] 或
- [0142] 2)
- [0143] -编码第一轻链的第一表达盒，
- [0144] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0145] -编码第一重链的第三表达盒，
- [0146] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0147] -编码第二轻链的第五表达盒，和
- [0148] -编码第二轻链的第六表达盒，
- [0149] 其中第一至第三表达盒单向排列，第四至第六表达盒单向排列且与第一至第三表达盒方向相反；
- [0150] 一至第三表达盒方向相反；
- [0151] 或
- [0152] 3)
- [0153] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0154] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0155] -编码第二轻链的第三表达盒，
- [0156] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0157] -编码第二轻链的第五表达盒，和
- [0158] -编码第一轻链的第六表达盒，
- [0159] 或
- [0160] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0161] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0162] -编码第二轻链的第三表达盒，
- [0163] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0164] -编码第二轻链的第五表达盒，和
- [0165] -编码第二轻链的第六表达盒。
- [0166] 在一个优选实施例中，第一重链在CH3结构域中包含突变T366W(根据Kabat编号)并且第二重链在CH3结构域中包含突变T366S、L368A和Y407V，反之亦然(根据Kabat编号)。在一个实施例中，重链中的一条进一步包含突变S354C，并且相应的另一条重链包含突变Y349C(根据Kabat编号)。在一个实施例中，第一重链是包含附加经结构域交换Fab片段的延伸重链。在一个实施例中，第一轻链是经结构域交换轻链。
- [0167] 在一个实施例中，脱氧核糖核酸在编码第二重链的第一和第二表达盒之间包含另外的表达盒。
- [0168] 在一个实施例中
- [0169] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第一轻链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，

- [0170] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，
- [0171] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第二重链可变结构域和CL结构域，并且
- [0172] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域，
- [0173] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点，并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。
- [0174] 在一个实施例中
- [0175] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第二重链可变结构域、CL结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，
- [0176] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，
- [0177] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第一轻链可变结构域和CH1结构域，和
- [0178] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域，
- [0179] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点，并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。
- [0180] 在该用途的一个实施例中，所述脱氧核糖核酸整合到所述哺乳动物细胞的基因组中。
- [0181] 在该用途的一个实施例中，所述脱氧核糖核酸在单个位点或基因座处稳定地整合到所述哺乳动物细胞的基因组中。
- [0182] 本发明的一个方面是重组哺乳动物细胞，其包含整合在该细胞的基因组中的编码三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸，
- [0183] 其中编码三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含或者
- [0184] 1)
- [0185] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0186] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0187] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0188] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0189] -编码第二轻链的第五表达盒，和
- [0190] -任选地，编码第二轻链的第六表达盒，
- [0191] 或
- [0192] 2)
- [0193] -编码第一轻链的第一表达盒，
- [0194] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0195] -编码第一重链的第三表达盒，
- [0196] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0197] -编码第二轻链的第五表达盒，和
- [0198] -编码第二轻链的第六表达盒，
- [0199] 其中第一至第三表达盒单向排列，第四至第六表达盒单向排列且与第一至第三表达盒方向相反；

- [0200] 或
- [0201] 3)
- [0202] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0203] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0204] -编码第二轻链的第三表达盒，
- [0205] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0206] -编码第二轻链的第五表达盒，和
- [0207] -编码第一轻链的第六表达盒，
- [0208] 或
- [0209] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0210] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0211] -编码第二轻链的第三表达盒，
- [0212] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0213] -编码第二轻链的第五表达盒，和
- [0214] -编码第二轻链的第六表达盒。
- [0215] 在一个优选实施例中，第一重链在CH3结构域中包含突变T366W(根据Kabat编号)并且第二重链在CH3结构域中包含突变T366S、L368A和Y407V，反之亦然(根据Kabat编号)。在一个实施例中，重链中的一条进一步包含突变S354C，并且相应的另一条重链包含突变Y349C(根据Kabat编号)。在一个实施例中，第一重链是包含附加经结构域交换Fab片段的延伸重链。在一个实施例中，第一轻链是经结构域交换轻链。
- [0216] 在一个实施例中，脱氧核糖核酸在编码第二重链的第一和第二表达盒之间包含另外的表达盒。
- [0217] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中
- [0218] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第一轻链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，
- [0219] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，
- [0220] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第二重链可变结构域和CL结构域，并且
- [0221] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域，
- [0222] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点，并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。
- [0223] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中
- [0224] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第二重链可变结构域、CL结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，
- [0225] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，
- [0226] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第一轻链可变结构域和CH1结构域，和
- [0227] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域，
- [0228] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点，并

且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。

[0229] 在一个实施例中,所述脱氧核糖核酸在单个位点或基因座处稳定地整合到所述哺乳动物细胞的基因组中。

[0230] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中,编码三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸进一步包含

[0231] -第一重组识别序列,其位于所述第一(最靠近5'的)表达盒的5',

[0232] -第二重组识别序列,其位于所述第六(最靠近3'的)表达盒的3',

[0233] -第三重组识别序列,其位于

[0234] -第一重组识别序列与第二重组识别序列之间,以及

[0235] -所述表达盒中的两者之间,

[0236] 并且

[0237] 其中所有重组识别序列都不同。

[0238] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中,第三重组识别序列位于第三表达盒与第四表达盒之间。

[0239] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中,所述编码三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸包含另外的编码选择标志物的表达盒,并且编码所述选择标志物的表达盒部分地位于所述第三重组识别序列的5'并部分地位于所述第三重组识别序列的3',其中所述表达盒的位于5'的部分包含启动子和起始密码子,并且所述表达盒的位于3'的部分包含没有起始密码子的编码序列和多聚A信号,其中所述起始密码子可操作地连接至所述编码序列。

[0240] 本发明的一个方面是包含两种脱氧核糖核酸的组合物,这两种脱氧核糖核酸进而包含三种不同的重组识别序列和六个表达盒,其中

[0241] -所述第一脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含

[0242] -第一重组识别序列,

[0243] -编码第一重链的第一表达盒,

[0244] -编码第一轻链的第二表达盒,

[0245] -编码第一轻链的第三表达盒,和

[0246] -第三重组识别序列的第一拷贝,

[0247] 并且

[0248] -所述第二脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含

[0249] -第三重组识别序列的第二拷贝,

[0250] -编码第二重链的第四表达盒,

[0251] -编码第二轻链的第五表达盒,

[0252] -编码第二轻链的第六表达盒,和

[0253] -第二重组识别序列。

[0254] 在一个优选实施例中,第一重链在CH3结构域中包含突变T366W(根据Kabat编号)并且第二重链在CH3结构域中包含突变T366S、L368A和Y407V,反之亦然(根据Kabat编号)。在一个实施例中,重链中的一条进一步包含突变S354C,并且相应的另一条重链包含突变Y349C(根据Kabat编号)。在一个实施例中,第一重链是包含附加经结构域交换Fab片段的延伸重链。在一个实施例中,第一轻链是经结构域交换轻链。

[0255] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中

[0256] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第一轻链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，

[0257] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，

[0258] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第二重链可变结构域和CL结构域，并且

[0259] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域，

[0260] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点，并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。

[0261] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中

[0262] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第二重链可变结构域、CL结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，

[0263] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域，

[0264] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第一轻链可变结构域和CH1结构域，和

[0265] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域，

[0266] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点，并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。

[0267] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中，所述编码三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸包含另外的编码选择标志物的表达盒。

[0268] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中，所述编码选择标志物的表达盒相对于第三重组识别序列

[0269] i) 位于5'，或

[0270] ii) 位于3'，或者

[0271] iii) 部分地位于5' 并且部分地位于3'。

[0272] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中，所述编码选择标志物的表达盒部分地位于第三重组识别序列的5' 并部分地位于第三重组识别序列的3'，其中所述表达盒的位于5' 的部分包含启动子和起始密码子，并且所述表达盒的位于3' 的部分包含没有起始密码子的编码序列和多聚A信号。

[0273] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中，所述编码选择标志物的表达盒的位于5' 的部分包含可操作地连接至起始密码子的启动子序列，由此启动子序列在上游侧接第三表达盒(即定位在第三表达盒的下游)，并且起始密码子在下游侧接第三重组识别序列(即定位在第三重组识别序列的上游)；并且所述编码选择标志物的表达盒的位于3' 的部分包含编码选择标志物的核酸，该核酸缺乏起始密码子，并且在上游侧接第三重组识别序列，在下游侧接第四表达盒。

[0274] 在所有前述方面和实施例中的一个实施例中，所述起始密码子是转录起始密码子。在一个实施例中，所述起始密码子为ATG。

[0275] 本发明的一个方面是重组哺乳动物细胞，其包含整合在该细胞的基因组中的编码三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸，

- [0276] 其中编码三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸包含以下元件:
- [0277] 第一重组识别序列、第二重组识别序列和第三重组识别序列,
- [0278] 第一选择性标记和第二选择性标记,以及
- [0279] 第一表达盒至第六表达盒,
- [0280] 其中所述元件在5'至3'方向上的序列为
- [0281] RRS1-1<sup>st</sup> EC-2<sup>nd</sup> EC-3<sup>rd</sup> EC-RRS3-SM1-4<sup>th</sup> EC-5<sup>th</sup> EC-6<sup>th</sup> EC-RRS2
- [0282] 其中
- [0283] RRS=重组识别序列,
- [0284] EC=表达盒,
- [0285] SM=选择性标记。
- [0286] 本发明的一个方面是用于生产包含编码三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸并且分泌三价抗体(例如TCB)的重组哺乳动物细胞的方法,所述方法包括以下步骤:
- [0287] a) 提供包含整合在哺乳动物细胞的基因组的基因座内的单个位点处的外源核苷酸序列的所述哺乳动物细胞,其中所述外源核苷酸序列包含侧接至少一个第一选择标志物的第一重组识别序列和第二重组识别序列,以及位于所述第一重组识别序列与所述第二重组识别序列之间的第三重组识别序列,并且所有的所述重组识别序列都不同;
- [0288] b) 向a)所提供的细胞中引入两种脱氧核糖核酸的组合物,这两种脱氧核糖核酸包含三种不同的重组识别序列和六个表达盒,其中所述第一脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含
- [0289] -第一重组识别序列,
  - [0290] -编码第一重链的第一表达盒,
  - [0291] -编码第一轻链的第二表达盒,
  - [0292] -编码第一轻链的第三表达盒,
  - [0293] -编码一个第二选择性标记的表达盒的5'端部分,以及
  - [0294] -第三重组识别序列的第一拷贝,
  - [0295] 并且
  - [0296] 所述第二脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含
  - [0297] -第三重组识别序列的第二拷贝,
  - [0298] -编码这一个第二选择性标记的表达盒的3'端部分,
  - [0299] -编码第二重链的第四表达盒,
  - [0300] -编码第二轻链的第五表达盒,
  - [0301] -编码第二轻链的第六表达盒,和
  - [0302] -第二重组识别序列,
- [0303] 其中所述第一脱氧核糖核酸和所述第二脱氧核糖核酸的所述第一重组识别序列至所述第三重组识别序列与整合的外源核苷酸序列上的所述第一重组识别序列至所述第三重组识别序列匹配,
- [0304] 其中编码一个第二选择标志物的表达盒的5'末端部分和3'末端部分在合在一起时形成所述一个第二选择标志物的功能性表达盒;
- [0305] c)

- [0306] i) 与b)的第一脱氧核糖核酸和第二脱氧核糖核酸同时引入,或者
- [0307] ii) 在其后依次引入
- [0308] 一种或多种重组酶,
- [0309] 其中所述一种或多种重组酶识别所述第一脱氧核糖核酸和所述第二脱氧核糖核酸的所述重组识别序列;(并且任选地其中所述一种或多种重组酶进行两次重组酶介导的盒交换;)
- [0310] 以及
- [0311] d) 选择表达第二选择标志物并分泌三价抗体(例如TCB)的细胞,
- [0312] 从而产生包含编码三价抗体(例如TCB)并分泌三价抗体(例如TCB)的脱氧核糖核酸的重组哺乳动物细胞。
- [0313] 在所有前述方面和实施例的一个优选实施例中,第一重链在CH3结构域中包含突变T366W(根据Kabat编号)并且第二重链在CH3结构域中包含突变T366S、L368A和Y407V,或反之亦然(根据Kabat编号)。在一个实施例中,重链中的一条进一步包含突变S354C,并且相应的另一条重链包含突变Y349C(根据Kabat编号)。在一个实施例中,第一重链是包含附加经结构域交换Fab片段的延伸重链。
- [0314] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中,第一轻链是经结构域交换轻链。
- [0315] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中
- [0316] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第一轻链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,
- [0317] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,
- [0318] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第二重链可变结构域和CL结构域,并且
- [0319] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域,
- [0320] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点,并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。
- [0321] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中
- [0322] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第二重链可变结构域、CL结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,
- [0323] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,
- [0324] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第一轻链可变结构域和CH1结构域,和
- [0325] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域,
- [0326] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点,并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。
- [0327] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中,所述编码这一个第二选择标志物的表达盒部分地位于第三重组识别序列的5'并部分地位于第三重组识别序列的3',其中所述表达盒的位于5'的部分包含启动子和起始密码子,并且所述表达盒的位于3'的部分包含这一个第二选择标志物的没有起始密码子的编码序列和多聚A信号。
- [0328] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中,所述编码这一个第二选择标志物的表

达盒的5'末端部分包含可操作地连接至起始密码子的启动子序列,由此启动子序列在上游侧接表达盒(即定位在表达盒的下游),并且起始密码子在下游侧接第三重组识别序列(即定位在第三重组识别序列的上游);并且所述编码这一个第二选择标志物的表达盒的3'末端部分包含这一个第二选择标志物的编码序列,该编码序列缺乏起始密码子,并且在上游侧接第三重组识别序列,在下游侧接表达盒。

[0329] 在所有前述方面和实施例中的一个实施例中,所述起始密码子是翻译起始密码子。在一个实施例中,所述起始密码子为ATG。

[0330] 在所有前述方面和实施例中的一个实施例中,第一脱氧核糖核酸整合到第一载体中并且第二脱氧核糖核酸整合到第二载体中。

[0331] 在所有前述方面和实施例中的一个实施例中,所述表达盒中的每一者在5'至3'方向上包含启动子、编码序列和多聚腺苷酸化信号序列,任选地随后是终止子序列。

[0332] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中

[0333] i) 第一表达盒在5'至3'方向上包含启动子、编码第一重链的核酸和多聚腺苷酸化信号序列,以及任选地终止子序列,

[0334] ii) 第二表达盒在5'至3'方向上包含启动子、编码第一轻链的核酸和多聚腺苷酸化信号序列,以及任选地终止子序列,

[0335] iii) 第三表达盒在5'至3'方向上包含启动子、编码第一轻链的核酸和多聚腺苷酸化信号序列,以及任选地终止子序列,

[0336] iv) 第四表达盒在5'至3'方向上包含启动子、编码第二重链的核酸和多聚腺苷酸化信号序列,以及任选地终止子序列,

[0337] v) 第五表达盒在5'至3'方向上包含启动子、编码第二轻链的核酸和多聚腺苷酸化信号序列,以及任选地终止子序列,

[0338] vi) 第六表达盒在5'至3'方向上包含启动子、编码第二轻链的核酸和多聚腺苷酸化信号序列,以及任选地终止子序列,和

[0339] vii) 编码选择标志物的表达盒在5'至3'方向上包含启动子、编码选择标志物的核酸和多聚腺苷酸化信号序列,以及任选地终止子序列。

[0340] 在所有前述方面和实施例中的一个实施例中,所述启动子为具有或不具有内含子A的人CMV启动子,所述多聚腺苷酸化信号序列为bGH多聚A位点,并且所述终止子为hGT终止子。

[0341] 终止子序列防止RNA聚合酶II产生非常长的RNA转录物,即通读到根据本发明的脱氧核糖核酸中的下一个表达盒中,并用于根据本发明的方法中。也就是说,一个目标结构基因的表达是由它自己的启动子控制的。

[0342] 因此,通过聚腺苷酸化信号和终止子序列的组合,实现了有效的转录终止。也就是说,双终止信号的存在阻止了RNA聚合酶II的通读。终止子序列启动复合物解体并促进RNA聚合酶与DNA模板的解离。

[0343] 在所有前述方面和实施例中的一个实施例中,对于除选择标志物的表达盒之外,启动子为具有内含子A的人CMV启动子,所述多聚腺苷酸化信号序列为bGH多聚腺苷酸化信号序列,并且所述终止子为hGT终止子,对于选择标志物的表达盒,其中所述启动子为SV40启动子,并且所述多聚腺苷酸化信号序列为SV40多聚腺苷酸化信号序列并且不存在终止

子。

[0344] 在所有前述方面和实施例中的一个实施例中,所述哺乳动物细胞为CHO细胞。在一个实施例中,所述CHO细胞为CHO-K1细胞。

[0345] 在所有方面和实施例的一个实施例中,三价抗体是治疗抗体。

[0346] 在所有方面和实施例的一个实施例中,双特异性(治疗性)抗体(TCB)包括

[0347] -第一Fab片段和第二Fab片段,其中第一Fab片段和第二Fab片段的每个结合位点与第二抗原特异性结合,

[0348] -第三Fab片段,其中第三Fab片段的结合位点与第一抗原特异性结合,并且其中第三Fab片段包含结构域交叉,使得可变轻链结构域(VL)和可变重链结构域(VH)被彼此替换,以及

[0349] -包含第一Fc区多肽和第二Fc区多肽的Fc区,

[0350] 其中第一Fab片段和第二Fab片段各自包含重链片段和全长轻链,

[0351] 其中第一Fab片段的重链片段的C末端与第一Fc区多肽的N末端融合,

[0352] 其中第二Fab片段的重链片段的C末端与第三Fab片段的可变轻链结构域的N末端融合,且第三Fab片段的重链恒定结构域1的C末端与第二Fc区多肽的N末端融合。

[0353] 在本文所有方面和实施例的一个实施例中,至少一个选择标志物表达盒与抗体重链和轻链表达盒的方向相反。

[0354] 在本文所有方面和实施例的一个实施例中,抗体重链和轻链表达盒相对于彼此单向排列(即具有相同3'-至5'-方向取向),并且至少一个选择标志物表达盒相对于抗体重链和轻链表达盒双向排列。

[0355] 在所有方面和实施例的一个实施例中,三价抗体是抗CD3/CD20双特异性抗体。在一个实施例中,抗CD3/CD20双特异性抗体是以CD20为第二抗原的TCB。在一个实施例中,双特异性抗CD3/CD20抗体是RG6026。此类抗体报告于W0 2016/020309中,该专利以引用方式整体并入本文。

[0356] 在所有方面和实施例的一个实施例中,三价抗体是抗CD3/CEA双特异性抗体。在一个实施例中,抗CD3/CEA双特异性抗体是以CEA为第二抗原的TCB。在一个实施例中,双特异性抗CD3/CEA抗体是R06958688或RG7802或赛必妥单抗(cibisatamab)。此类抗体报告于W0 2017/055389中,该专利以引用方式整体并入本文。

[0357] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中,三价双特异性抗体的第一轻链和第二轻链都不是共同轻链或通用轻链。

[0358] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中,第二重链可变结构域和第一轻链可变结构域形成第一结合位点,并且第一重链可变结构域和第二轻链可变结构域形成第二结合位点。

[0359] 在所有方面和实施例的一个优选实施例中,第一结合位点特异性结合人CD3。

[0360] 在所有方面和实施例的一个优选实施例中,第二结合位点特异性结合人CD3。

[0361] 在所有方面和实施例的一个优选实施例中,准确地包含或引入两种脱氧核糖核酸。

[0362] 根据本发明的脱氧核糖核酸中的各个表达盒是序贯排列的。一个表达盒的末端和在其后的表达盒的起点之间的距离仅为几个核苷酸,这是克隆过程所需的,即克隆过程的

结果。

[0363] 在所有前述方面和实施例的一个实施例中,两个紧随其后的表达盒最多相隔100bps(即分别从多聚A信号序列或终止子序列的末端开始,直到紧随其后的启动子元件的起点为至多100个碱基对(bps))。在一个实施例中,两个紧随其后的表达盒间隔至多50bps。在一个优选的实施例中,两个紧随其后的表达盒间隔至多25bps。

## 附图说明

[0364] 图1:双质粒RMCE策略的方案,其涉及使用三个RRS位点同时实施两次独立的RMCE。

## 具体实施方式

[0365] 本发明至少部分基于以下发现:为了表达三价抗体(例如TCB)(包含不同多肽的复合分子,即异源多聚体),使用限定和特异性的表达盒组织形式导致三价抗体(例如TCB)在哺乳动物细胞(诸如CHO细胞)中的有效表达和产生。

[0366] 本发明至少部分基于以下发现:双重组酶介导的盒交换(RMCE)可以用于产生重组哺乳动物细胞,诸如重组CHO细胞,其中已将限定和特异性的表达盒序列整合到基因组中,这进而导致三价抗体(例如TCB)的有效表达和产生。该整合通过靶向整合在哺乳动物细胞基因组中的特定位点处实现。因此,有可能控制异源多聚体三价抗体(例如TCB)的不同多肽相对于彼此的表达比。由此,进而以高表达产量实现了正确折叠和组装的三价抗体(例如TCB)的有效表达、正确组装和成功分泌。

[0367] I. 定义

[0368] 可用于实施本发明的方法和技术在例如以下文献中有所描述:Ausubel, F.M. (编辑), *Current Protocols in Molecular Biology*, 第I卷至第III卷(1997); Glover, N.D. 和 Hames, B.D. 编辑, *DNA Cloning: A Practical Approach*, 第I卷和第II卷(1985), Oxford University Press; Freshney, R.I. (编辑), *Animal Cell Culture-a practical approach*, IRL Press Limited(1986); Watson, J.D. 等人, *Recombinant DNA*, 第二版, CHSL Press(1992); Winnacker, E.L., *From Genes to Clones*; N.Y., VCH Publishers(1987); Celis, J. 编辑, *Cell Biology*, 第二版, Academic Press(1998); Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 第二版, Alan R. Liss, Inc., N.Y. (1987)。

[0369] 使用重组DNA技术能够生成核酸的衍生物。此类衍生物可以例如在单个或几个核苷酸位置处通过取代、改变、交换、缺失或插入来加以修饰。修饰或衍生化可以例如借助定点诱变来进行。此类修饰可以由本领域技术人员容易地进行(参见例如, Sambrook, J. 等人, *Molecular Cloning: A laboratory manual*(1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA; Hames, B.D. 和 Higgins, S.G., *Nucleic acid hybridization-a practical approach*(1985) IRL Press, Oxford, England)。

[0370] 必须注意的是,如本文和所附权利要求书中所用,单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数指代,除非上下文另外明确规定。因此,例如,提及“一个细胞”包括多个此类细胞和本领域技术人员已知的其等同物,诸如此类。同样,术语“一个/一种”、“一个或多个/一种或多种”和“至少一个/至少一种”在本文中可以互换使用。还应当注意的是,术语“包

含”、“包括”和“具有”可以互换使用。

[0371] 术语“约”表示其后所跟随的数值的 $\pm 20\%$ 范围。在一个实施例中，术语“约”表示其后所跟随的数值的 $\pm 10\%$ 范围。在一个实施例中，术语“约”表示其后所跟随的数值的 $\pm 5\%$ 范围。

[0372] 术语“包括”还涵盖术语“由……组成”。

[0373] 本文使用的术语“CD20-TCB”表示靶向CD20的TCB (CD20-TCB; RG6026; TCB形式的抗CD3/CD20抗体)，其具有长半衰期和高效力，这是通过与CD20的高亲和力二价结合以及先前表征的2:1TCB分子形式的B和T细胞结合域的头对尾取向来实现的(参见例如Bacac, M.等人 Clin. Cancer Res. 22 (2016) 3286-3297; Bacac, M.等人 Oncoimmunology 5 (2016) e1203498)。

[0374] 术语“包含外源核苷酸序列的哺乳动物细胞”涵盖以下细胞：已向其中引入一种或多种外源核酸(包括此类细胞的子代)并且其旨在形成进一步遗传修饰的起点。因此，术语“包含外源核苷酸序列的哺乳动物细胞”涵盖包含整合在哺乳动物细胞基因组的基因座内的单个位点处的外源核苷酸序列的细胞，其中所述外源核苷酸序列至少包含侧接至少一个第一选择性标记的第一重组识别序列和第二重组识别序列(这些重组酶识别序列是不同的)。在一个实施例中，包含外源核苷酸序列的哺乳动物细胞是包含整合在宿主细胞基因组的基因座内的单个位点处的外源核苷酸序列的细胞，其中所述外源核苷酸序列包含侧接至少一个第一选择性标记的第一重组识别序列和第二重组识别序列，以及位于第一重组识别序列与第二重组识别序列之间的第三重组识别序列，并且所有重组识别序列都不同。

[0375] 如本文所用，术语“重组细胞”表示最终遗传修饰后的细胞，诸如例如表达目标多肽并且可以用于以任何规模生产所述目标多肽的细胞。例如，已进行过重组酶介导的盒交换(RMCE)，由此感兴趣多肽的编码序列已被引入宿主细胞的基因组中的“包含外源核苷酸序列的哺乳动物细胞”为“重组细胞”。尽管该细胞仍能够进行进一步的RMCE反应，但并不希望这样做。

[0376] “包含外源核苷酸序列的哺乳动物细胞”和“重组细胞”都是“转化细胞”。该术语包括原代转化细胞以及由其衍生的子代，而不考虑传代次数。子代可能例如不与亲本细胞的核酸内容物完全一致，而是可能含有突变。涵盖了具有与在最初转化的细胞中筛选或选择的功能或生物活性相同的功能或生物活性的突变体子代。

[0377] “分离的”组合物是已经与其天然环境的组分分离的组合物。在一些实施例中，将组合物纯化至大于95%或99%的纯度，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳、CE-SDS)或色谱(例如，尺寸排阻色谱或离子交换或反相HPLC)确定的。关于用于评估例如抗体纯度的方法的综述，参见Flatman, S.等人, J. Chrom. B 848 (2007) 79-87。

[0378] “经分离的”核酸是指已自其自然环境的组分中分离的核酸分子。分离的核酸包括这样的核酸分子，其包含在通常含有所述核酸分子的细胞中，但所述核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0379] “分离的”多肽或抗体是指已经与其天然环境的组分分离的多肽分子或抗体分子。

[0380] 术语“整合位点”表示细胞基因组内的已向其中插入外源核苷酸序列的核酸序列。在某些实施例中，整合位点在细胞基因组中的两个相邻核苷酸之间。在某些实施例中，整合位点包括一段核苷酸序列。在某些实施例中，整合位点位于哺乳动物细胞的基因组的特定

基因座内。在某些实施例中，整合位点在哺乳动物细胞的内源基因内。

[0381] 如本文所用，术语“载体”或“质粒”（可以互换使用）是指能够载运与其相连的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体，以及并入其已被引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0382] 术语“与……结合”表示结合位点与其靶标的结合，诸如，包含抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域的抗体结合位点与相应抗原的结合。这种结合可以使用例如 **BIAcore®** 测定 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 来确定。即，术语“(与抗原)结合”表示抗体在体外测定中与其抗原结合。在一个实施例中，结合在结合测定中确定，其中抗体与表面结合，并且抗原与抗体的结合通过表面等离子体共振 (SPR) 来测量。结合意味着例如结合亲和力 ( $K_D$ ) 为  $10^{-8}$ M 或更低，在一些实施例中为  $10^{-13}$ M 至  $10^{-8}$ M，在一些实施例中为  $10^{-13}$ M 至  $10^{-9}$ M。术语“结合”还包括术语“特异性结合”。

[0383] 例如，在 **BIAcore®** 测定的一个可能实施例中，抗原与表面结合，并且通过表面等离子体共振 (SPR) 来测量抗体（即其结合位点）的结合。结合的亲和力由术语  $k_a$ （缔合常数：缔合以形成复合物的速率常数）、 $k_d$ （解离常数：复合物解离的速率常数）和  $K_D$  ( $k_d/k_a$ ) 限定。替代性地，SPR 传感图的结合信号可以直接与参考物的响应信号在共振信号高度和解离行为方面进行比较。

[0384] 术语“结合位点”表示对靶标表现出结合特异性的任何蛋白质实体。这可以是例如受体、受体配体、抗运载蛋白、亲和体、抗体等。因此，如本文所用的术语“结合位点”表示可以与第二多肽特异性结合或可以被第二多肽特异性结合的多肽。

[0385] 如本文所用，术语“选择性标记”表示这样的基因：其允许在相应的选择性试剂的存在下特异性选择或排除携带该基因的细胞。例如，但不作为限制，选择性标记可以允许在相应选择性试剂（选择性培养条件）的存在下正选择用该选择性标记基因转化的宿主细胞；未转化的宿主细胞将不能在该选择性培养条件下生长或存活。选择性标记可以是正的、负的或双功能的。正选择性标记可以允许选择携带该标记的细胞，而负选择性标记可以允许选择性地消除携带该标记的细胞。选择性标记可以赋予对药物的抗性，或者补偿宿主细胞中的代谢或分解代谢缺陷。在原核细胞中，可以使用赋予对氨基糖苷磷酸转移酶 (APH)（例如，潮霉素磷酸转移酶 (HYG)、新霉素和 G418 APH）、二氢叶酸还原酶 (DHFR)、胸苷激酶 (TK)、谷氨酰胺合成酶 (GS)、天冬酰胺合成酶、色氨酸合成酶 (吡啶)、组氨酸脱氢酶 (组氨酸 D) 的基因，以及编码对嘌呤霉素、杀稻瘟菌素、博来霉素、腐草霉素、氯霉素、Zeocin 和霉酚酸的抗性的基因。另外的标记基因描述于 WO 92/08796 和 WO 94/28143 中。

[0386] 除有助于在存在相应选择性试剂的情况下进行选择之外，选择性标记还可以替代性地为通常不存在于细胞中的分子，例如绿色荧光蛋白质 (GFP)、增强的 GFP (eGFP)、合成的 GFP、黄色荧光蛋白质 (YFP)、增强的 YFP (eYFP)、青色荧光蛋白质 (CFP)、mPlum、mCherry、tdTomato、mStrawberry、J-red、DsRed 单体、mOrange、mKO、mCitrine、Venus、YPet、Emerald、CyPet、mCFPm、Cerulean 和 T-Sapphire。可以例如分别通过检测到编码的多肽所发出的荧光或不存在这种荧光，来将表达这种分子的细胞与不含该基因的细胞区分开来。

[0387] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指两种或更多种组分的并置,其中这些组分的关系允许它们以预期的方式发挥作用。例如,如果启动子和/或增强子用于调节编码序列的转录,则该启动子和/或增强子可操作地连接至编码序列。在某些实施例中,“可操作地连接”的DNA序列在单个染色体上相连并且相邻。在某些实施例中,例如,当必须接合两个蛋白质编码区(诸如分泌前导区和多肽)时,这些序列是相连、相邻的,并且在同一阅读框中。在某些实施例中,可操作地连接的启动子位于编码序列上游并且可以与该编码序列相邻。在某些实施例中,例如,关于调节编码序列表达的增强子序列,这两种组分能够可操作地连接,但并不相邻。如果增强子增加了编码序列的转录,则该增强子可操作地连接至编码序列。可操作地连接的增强子可以位于编码序列的上游、内部或下游,并且可以位于与编码序列的启动子距离相当远的位置。可操作的连接可以通过本领域中已知的重组方法(例如使用PCR方法和/或通过方便的限制性位点处连接)来完成。如果不存在方便的限制性位点,则可以根据常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。如果内部核糖体进入位点(IRES)允许在内部位置处以独立于5'端的方式启动ORF的翻译,则IRES可操作地连接至开放阅读框(ORF)。

[0388] 如本文所用,术语“侧接”是指第一核苷酸序列位于第二核苷酸序列的5'端或3'端或这两端处。侧接核苷酸序列可以与第二核苷酸序列相邻或相距限定的距离。侧接核苷酸序列的长度无具体限制。例如,侧接序列可以具有几个碱基对或几千个碱基对。

[0389] 脱氧核糖核酸包含编码链和非编码链。术语“5'”和“3'”当在本文中使用时,是指编码链上的位置。

[0390] 如本文所用,术语“外源”是指核苷酸序列并非来源于特异性细胞,而是通过DNA递送方法(例如,通过转染方法、电穿孔方法或转化方法)引入所述细胞中。因此,外源核苷酸序列是人工序列,其中人工性可以源自例如不同来源的子序列的组合(例如,具有SV40启动子的重组酶识别序列与绿色荧光蛋白质的编码序列的组合是人工核酸)或源自序列(例如仅编码膜结合受体的细胞外结构域或cDNA的序列)的部分的缺失,或者核碱基突变。术语“内源”是指来源于细胞的核苷酸序列。“外源”核苷酸序列可以具有碱基组成相同的“内源”对应物,但其中“外源”序列例如经由重组DNA技术被引入细胞中。

[0391] 抗体

[0392] 关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息给出于:Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中。

[0393] 术语“重链”在本文中以其原始含义使用,即表示形成抗体的四个多肽链中的两个较大的多肽链(参见例如,Edelman,G.M.和Gally J.A.,J.Exp.Med.116(1962)207-227)。上下文中的术语“更大”可以指分子量、长度和氨基酸数中的任何一个。术语“重链”独立于其中存在的单个抗体结构域的序列和数量。它仅根据相应多肽的分子量进行分配。

[0394] 术语“轻链”在本文中以其原始含义使用,即表示形成抗体的四个多肽链中较小的多肽链(参见例如Edelman,G.M.和Gally J.A.,J.Exp.Med.116(1962)207-227)。上下文中的术语“较小”可以指分子量、长度和氨基酸数中的任何一个。术语“轻链”独立于其中存在的单个抗体结构域的序列和数量。它仅根据相应多肽的分子量进行分配。

[0395] 如本文所用,重链和轻链的所有恒定区和结构域的氨基酸位置是根据Kabat等人,

Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service, National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中描述的Kabat编号系统编号的,并且在本文中被称为“根据Kabat编号”。具体地,将Kabat编号系统(参见Kabat,et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th ed.,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)的第647-660页)用于 $\kappa$ 和 $\lambda$ 同种型的轻链恒定结构域CL,并且将Kabat的EU索引编号系统(参见Kabat,et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th ed.,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)的第661-723页)用于恒定重链结构域(CH1、铰链、CH2和CH3,这在本文中通过在此情况下称为“根据Kabat的EU索引编号”而进一步分类)。

[0396] 本文的术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且涵盖各种抗体结构,其包括但不限于全长抗体、单克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体-抗体片段融合物以及它们的组合。

[0397] 术语“天然抗体”表示具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由经二硫键合的两条相同轻链和两条相同重链组成。从N末端到C末端,每条重链具有重链可变区(VH),接着是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3),借此,铰链区定位在第一重链恒定结构域与第二重链恒定结构域之间。类似地,从N末端到C末端,每条轻链都有轻链可变区(VL),后跟轻链恒定结构域(CL)。抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以归属于两种类型中的一种,这两种类型称为卡帕( $\kappa$ )和兰姆达( $\lambda$ )。

[0398] 术语“全长抗体”表示具有与天然抗体基本上相似的结构抗体。全长抗体包含两条或更多条全长抗体轻链,每条轻链在N到C末端方向包含可变区和恒定结构域;以及两条重链,每条在N到C末端方向包含可变区、第一恒定结构域、铰链区、第二恒定结构域和第三恒定结构域。与天然抗体相反,全长抗体可包含另外的免疫球蛋白结构域,例如,一种或多种额外的scFv,或重链或轻链Fab片段,或与全长抗体不同链的一个或多个末端缀合的scFab,但每个末端仅缀合单个片段。这些缀合物也为术语全长抗体所涵盖。

[0399] 术语“抗体结合位点”表示一对重链可变结构域和轻链可变结构域。为了确保与抗原的正确结合,这些可变结构域是同源可变结构域,即属于一起。抗体结合位点包含至少三个HVR(例如在VHH的情况下)或三到六个HVR(例如在天然存在的,即具有VH/VL对的常规抗体的情况下)。通常,负责抗原结合的抗体的氨基酸残基形成结合位点。这些残基通常包含在一对抗体重链可变结构域和相应的抗体轻链可变结构域中。例如,抗体的抗原结合位点包含来自互补决定区或HVR的氨基酸残基。“框架”或“FR”区是除本文定义的高变区残基以外的那些可变结构域区域。因此,抗体的轻链和重链可变结构域从N末端到C末端包含区域FR1、HVR1、FR2、HVR2、FR3、HVR3和FR4。特别地,重链可变结构域的HVR3区是对抗原结合贡献最大的区域,并且定义了抗体的结合特异性。“功能性结合位点”能够与其靶标特异性结合。术语“特异性结合”表示在结合测定的一个实施例中结合位点在体外测定中与其靶标的结合。这种结合测定可以是任何测定,只要可以检测到结合事件。例如,其中抗体与表面结合的测定,抗原与抗体的结合通过表面等离子体共振(SPR)来测量。可替代地,可以使用桥接ELISA。

[0400] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指以下项中的每一种:包含氨基酸残基延伸体的抗体可变结构域的在序列中高变(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上限定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。通常,抗体包含六个HVR;三个在重链可变结构域VH中(H1、H2、H3),并且三个在轻链可变结构域VL中(L1、L2、L3)。

[0401] HVR包括

[0402] (a) 存在于氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处的高变环(Chothia,C和Lesk,A.M.,J.Mol.Biol.196(1987)901-917);

[0403] (b) 存在于氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)处的CDR(Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991),NIH Publication 91-3242);

[0404] (c) 存在于氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)和93-101(H3)处的抗原接触点(MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996));以及

[0405] (d) (a)、(b)和/或(c)的组合,包括氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)和94-102(H3)。

[0406] 除非另外指明,否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如,FR残基)在本文中根据Kabat等人,出处同上编号。

[0407] 抗体的“类别”是指抗体的重链所具有的恒定结构域或恒定区优选Fc区的类型。存在五大类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且它们中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。

[0408] 术语“重链恒定区”表示包含恒定结构域的免疫球蛋白重链区域,即对于天然免疫球蛋白,为CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,或对于全长免疫球蛋白,为第一恒定结构域、铰链区、第二恒定结构域和第三恒定结构域。在一个实施例中,人IgG重链恒定区从Ala118延伸至重链的羧基末端(根据Kabat EU索引编号)。然而,恒定区的C末端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在(根据Kabat EU索引编号)。术语“恒定区”表示包含两个重链恒定区的二聚体,它们可以通过铰链区半胱氨酸残基彼此共价连接,形成链间二硫键。

[0409] 术语“重链Fc区”表示免疫球蛋白重链的C末端区,其包含至少一部分铰链区(中和下铰链区),第二恒定结构域,例如CH2结构域,和第三恒定结构域,例如CH3结构域。在一个实施例中,人IgG重链Fc区从Asp221或从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端(根据Kabat EU索引编号)。因此,Fc区比恒定区小但在C末端部分与其相同。然而,重链Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在(根据Kabat EU索引编号)。术语“Fc-区”表示包含两个重链Fc区的二聚体,它们可以通过铰链区半胱氨酸残基彼此共价连接,形成链间二硫键。

[0410] 抗体的恒定区,更准确地说是Fc区(以及同样的恒定区)直接参与补体激活、C1q结合、C3激活和Fc受体结合。虽然抗体对补体系统的影响取决于某些条件,但与C1q的结合由Fc区中限定的结合位点引起。此类结合位点在现有技术中是已知的,并且,例如,由Lukas,T.J.等人,J.Immunol.127(1981)2555-2560;Brunhouse,R.和Cebra,J.J.,Mol.Immunol.16(1979)907-917;Burton,D.R.等人,Nature 288(1980)338-344;Thommesen,J.E.等人,

Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E. 等人, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M. 等人, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A. 等人, Immunology 86 (1995) 319-324; 和 EP 0 307 434 所述。此类结合位点为例如 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 P329 (根据 Kabat EU 索引编号)。亚类 IgG1、IgG2 和 IgG3 的抗体通常表现出补体活化、C1q 结合和 C3 活化作用, 而 IgG4 则不激活补体系统、不结合 C1q 并且不激活 C3。“抗体的 Fc 区”是技术人员所熟知的术语, 并且基于木瓜蛋白酶对抗体的切割来定义。

[0411] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体, 即, 除了可能的变异抗体 (例如, 含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的生产过程中产生, 此类变体通常以少量形式呈递) 之外, 包含该群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位。与通常包括针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制剂相反, 单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此, 修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的, 并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如, 单克隆抗体可以通过多种技术制备, 包括但不限于杂交瘤方法、重组 DNA 方法、噬菌体展示方法, 以及利用包含全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法。

[0412] 如在本申请中所用的术语“价”表示抗体中存在指定数目的结合位点。因此, 术语“二价”“四价”和“六价”分别表示抗体中存在两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点。

[0413] “单特异性抗体”表示具有单个结合特异性具体是结合一种抗原的的抗体。单特异性抗体可制备为全长抗体或抗体片段 (例如,  $F(ab')_2$ ) 或它们的组合 (例如, 全长抗体加上额外的 scFv 或 Fab 片段)。单特异性抗体不需要是单价的, 即单特异性抗体可以包含多于一个与一种抗原特异性结合的结合位点。例如, 天然抗体是单特异性但二价的。

[0414] “多特异性抗体”表示具有关于同一抗原上至少两个不同表位或两个不同抗原的结合特异性。多特异性抗体可制备为全长抗体或抗体片段 (例如,  $F(ab')_2$  双特异性抗体) 或它们的组合 (例如, 全长抗体加上额外的 scFv 或 Fab 片段)。多特异性抗体至少是二价的, 即包含两个抗原结合位点。此外, 多特异性抗体至少是双特异性的。因此, 二价双特异性抗体是多特异性抗体的最简单形式。具有两个、三个或更多个 (例如, 四个) 功能性抗原结合位点的工程化抗体也已有报告 (参见例如, US 2002/0004587 A1)。

[0415] 在某些实施例中, 抗体是多特异性抗体, 例如至少双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两种抗原或表位具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施例中, 结合特异性中的一个针对第一抗原, 而另一个针对不同的第二抗原。在某些实施例中, 多特异性抗体可以与同一抗原的两个不同的表位结合。多特异性抗体也可用于将细胞毒性剂定位于表达该抗原的细胞。

[0416] 用于制备多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达 (参见 Milstein, C. 和 Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, WO 93/08829, 以及 Traunecker, A. 等人, EMBO J. 10 (1991) 3655-3659) 和“杵臼结构”工程化 (参见例如 US 5,731,168)。多特异性抗体也可以通过如下方法来制备: 工程化静电操纵效应以制备抗体 Fc-异二聚体分子 (WO 2009/089004); 交联两个或更多个抗体或片段 (参见例如 US 4,676,980, 以及 Brennan, M. 等人, Science 229 (1985) 81-83); 使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体 (参见例如 Kostelny, S.A. 等人, J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553); 使用特异

性技术制备双特异性抗体片段(参见例如Holliger,P.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 (1993) 6444-6448);使用单链Fv(scFv)二聚体(Gruber,M.等人,J.Immunol.152(1994) 5368-5374);以及如Tutt,A.等人,J.Immunol.147(1991) 60-69中所述制备三特异性抗体。

[0417] 抗体或片段也可以是多特异性抗体,如WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792或WO 2010/145793中所述。

[0418] 其抗体或片段也可以是如WO 2012/163520中公开的多特异性抗体。

[0419] 双特异性抗体通常是与同一抗原上的两个不同的、不重叠的表位或不同抗原上的两个表位特异性结合的抗体分子。

[0420] 上下文中的术语“非重叠”表示包含在双特异性Fab的第一互补位中的氨基酸残基不包含在第二互补位中,并且包含在双特异性Fab的第二互补位中的氨基酸不包含在第一互补位中。

[0421] “杵臼结构”二聚模块及其在抗体工程化中的用途在Carter P.、Ridgway J.B.B.、Presta L.G.:Immunotechnology,1996年2月第2卷第1期,第73-73(1)页中有所描述。

[0422] 抗体重链中的CH3结构域可通过“杵臼结构(knob-into-holes)”技术改变,这一技术在例如WO 96/027011、Ridgway,J.B.等人,Protein Eng.9(1996) 617-621和Merchant, A.M.等人,Nat.Biotechnol.16(1998) 677-681中以若干实例详细描述。在这一方法中,改变两个CH3结构域的相互作用表面以增加这两个CH3结构域的异二聚化,从而增加包含它们的多肽的异二聚化。(两个重链的)两个CH3结构域中的一个可为“杵(knob)”而另一个为“臼(hole)”。二硫桥的引入进一步稳定化异二聚体(Merchant,A.M.等人,Nature Biotech.16(1998) 677-681;Atwell,S.等人,J.Mol.Biol.270(1997) 26-35)并增加产率。

[0423] (抗体重链的)CH3结构域中的突变T366W表示为“杵突变”或“突变杵”,而(抗体重链的)CH3结构域中的突变T366S、L368A、Y407V表示为“臼突变”或“突变臼”(根据Kabat EU索引编号)。通过将S354C突变引入具有“杵突变”(表示为“杵-cys-突变”或“突变杵-cys”)的重链的CH3结构域中或通过Y349C突变引入具有“臼突变”(表示为“臼-cys-突变”或“突变臼-cys”)的重链的CH3结构域(根据Kabat EU索引编号)中,也可使用位于CH3结构域之间的额外的链间二硫桥(Merchant,A.M.等人,Nature Biotech.16(1998) 677-681)。

[0424] 如本文所用,术语“结构域交叉”表示在抗体重链VH-CH1片段及其相应的同源抗体轻链对中,即在抗体Fab中(片段抗原结合),结构域序列偏离天然抗体序列是因为至少一个重链结构域由其相应的轻链结构域取代,反之亦然。结构域交叉有三种常见类型:(i)CH1和CL结构域的交叉,其由轻链中的结构域交叉导致VL-CH1结构域序列和由重链片段中的结构域交叉导致VH-CL结构域序列(或具有VH-CL-铰链-CH2-CH3结构域序列的全长抗体重链);(ii)VH和VL结构域的结构域交叉,其由轻链中的结构域交叉导致VH-CL结构域序列和由重链片段中的结构域交叉导致VL-CH1结构域序列;以及(iii)完整轻链(VL-CL)和完整VH-CH1重链片段的结构域交叉(“Fab交叉”),其由结构域交叉导致具有VH-CH1结构域序列的轻链和由结构域交叉导致具有VL-CL结构域序列的重链片段(所有上述结构域序列均以N末端至C末端方向表示)。

[0425] 如本文所用,关于相应重链结构域和轻链结构域的术语“彼此替换”是指前述结构域交叉。因此,当CH1结构域和CL结构域“彼此替换”时,是指项目(i)下提及的结构域交叉以

及所得重链和轻链结构域序列。因此,当VH和VL“彼此替换”时,是指在第(ii)项中提到的结构域交叉;以及当CH1和CL结构域“彼此替换”并且VH和VL结构域“彼此替换”时,是指在第(iii)项中提到的结构域交叉。例如,在WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254和Schaefer, W.等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA 108(2011)11187-11192中报告了包括结构域交叉的双特异性抗体。此类抗体通常称为CrossMab。

[0426] 在一个实施例中,多特异性抗体还包含至少一个Fab片段,其包括如上文第(i)项所述的CH1和CL结构域的结构域交叉,或如第(ii)项所述的VH和VL结构域的结构域交叉,或如上文第(iii)项所述的VH-CH1和VL-VL结构域的结构域交叉。在具有结构域交叉的多特异性抗体的情况下,特异性结合相同抗原的Fab被构建为具有相同结构域序列。因此,在多特异性抗体中包含多个具有结构域交叉的Fab的情况下,所述Fab与相同抗原特异性结合。

[0427] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的抗体。在某些实施例中,人源化抗体将基本上包含所有中的至少一个可变结构域,通常是两个可变结构域,其中所有或基本上所有HVR(例如CDR)对应于非人抗体的HVR,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。“人源化形式”的抗体,例如,非人抗体,是指已经进行过人源化的抗体。

[0428] 如本文所用,术语“重组抗体”表示所有通过重组手段例如重组细胞制备、表达、创造或分离的抗体(嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体)。这包括从重组细胞(如NS0、HEK、BHK或CHO细胞)中分离的抗体。

[0429] 如本文所用,术语“抗体片段”是指除了完整抗体以外的分子,其包括完整抗体的一部分且结合完整抗体结合的抗原,即其为功能性片段。抗体片段的示例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、双特异性抗体、双体抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如scFv或scFab)。

[0430] II. 组合物和方法

[0431] 一般来讲,对于感兴趣多肽(诸如治疗性多肽)的重组大规模生产,需要稳定地表达和分泌所述多肽的细胞。这种细胞被称为“重组细胞”或“重组生产细胞”,用于产生这种细胞的过程被称为“细胞系开发”。在细胞系开发过程的第一步中,合适的宿主细胞(诸如CHO细胞)用适于表达所述感兴趣多肽的核酸序列转染。在第二步中,基于已经用编码感兴趣多肽的核酸共转染的选择性标记的共表达,选择稳定表达感兴趣多肽的细胞。

[0432] 编码多肽的核酸(即编码序列)称为结构基因。这种结构基因是简单的信息,并且其表达需要额外的调控元件。因此,结构基因通常整合在表达盒中。表达盒在哺乳动物细胞中起作用所需的最少调控元件是在所述哺乳动物细胞中起作用的启动子,其位于结构基因的上游,即5',以及在所述哺乳动物细胞中起作用的多聚腺苷酸化信号序列,其位于结构基因的下游,即3'。启动子、结构基因和多聚腺苷酸化信号序列以可操作连接的形式排列。

[0433] 在感兴趣多肽是由不同(单体)多肽构成的异源多聚体多肽的情况下,需要的不仅是单个表达盒,而是在所含结构基因上不同的多个表达盒,即,对于该异源多聚体多肽的不同(单体)多肽中的每一者需要至少一个表达盒。例如,全长抗体是包含轻链的两个拷贝以及重链的两个拷贝的异源多聚体多肽。因此,全长抗体由两种不同的多肽构成。因此,全长抗体的表达需要两个表达盒,一个用于轻链,另一个用于重链。例如,如果全长抗体是双特异性抗体,即抗体包含与两种不同抗原特异性结合的两个不同结合位点,则轻链和重链也

彼此不同。因此,这种双特异性全长抗体由四种不同的多肽构成,并且需要四个表达盒。

[0434] 感兴趣多肽的表达盒进而整合到所谓的“表达载体”中。“表达载体”是提供用于在细菌细胞中扩增所述载体以及在哺乳动物细胞中表达所包含的结构基因的所有必需元件的核酸。通常,表达载体包含原核质粒增殖单元,例如用于大肠杆菌的原核质粒增殖单元,其包含复制起点和原核选择标志物,以及真核选择标志物,以及表达感兴趣的结构基因所需的表达盒。“表达载体”是用于将表达盒引入哺乳动物细胞的转运工具。

[0435] 如前面的段落中所概述,待表达的多肽越复杂,所需的表达盒的数量也越高。固有地随着表达盒的数量增加,整合到宿主细胞基因组中的核酸的大小也增加。表达载体大小也随之增加。但是,载体大小的实际上限在约15kbp的范围内,超过该范围,处理和加工效率显著下降。该问题可以通过使用两个或更多个表达载体来解决。因此,表达盒可以在不同的表达载体之间拆分,每个表达载体仅包含其中一些表达盒。

[0436] 常规细胞系开发(CLD)依赖于携带感兴趣多肽(SOI)表达盒的载体的随机整合(RI)。一般来讲,如果载体通过随机方法转染,则几种载体或其片段整合到细胞的基因组中。因此,基于RI的转染过程是不可预测的。

[0437] 所以,通过解决在不同表达载体之间拆分表达盒时的大小问题,出现了新的问题,就是整合的表达盒的随机数量及其空间分布。

[0438] 一般来讲,用于表达结构基因的表达盒被整合到细胞的基因组中的越多,相应表达的多肽的量就变得越高。除了整合的表达盒的数量之外,整合的位点和基因座也对表达产量产生影响。例如,如果表达盒整合在细胞基因组中具有低转录活性的位点处,则仅表达少量的编码多肽。但是,如果相同的表达盒整合在细胞基因组中具有高转录活性的位点处,则表达大量的编码多肽。

[0439] 只要异源多聚体多肽的不同多肽的表达盒全部以相同的频率整合在具有相当转录活性的基因座处,这种表达差异就不会引起问题。在这种情况下,多聚体多肽的所有多肽均以相同的量表达,并且多聚体多肽将被正确地组装。

[0440] 但是这种情况不太可能出现,并且对于由多于两种多肽构成的分子也不能保证。例如,在WO 2018/162517中已经公开,依赖于i)表达盒序列和ii)不同表达载体之间表达盒的分布,使用RI观察到表达产量和产物质量的高度变化。不受该理论的束缚,该观察是由于以下事实:来自不同表达载体的不同表达盒以不同频率在细胞中的不同基因座处整合,导致异源多聚体多肽的不同多肽的差异表达,即以不适当的不同比率表达。因此,一些单体多肽以较高的量存在,而另一些则以较低的量存在。异源多聚体多肽单体之间的这种不均衡导致不完全组装、错误组装以及分泌速率减慢。所有前述情况都将导致正确折叠的异源多聚体多肽的表达产量较低,以及产物相关副产物的比例较高。

[0441] 与常规的RI CLD不同,靶向整合(TI)CLD在细胞基因组中的预定“热点”处引入包含不同表达盒的转基因。而且,该引入采用了表达盒的限定比率。因此,不受该理论的束缚,异源多聚体多肽的所有不同多肽都以相同(或至少相当且仅略有不同)的速率和适当的比率表达。由此,正确组装的异源多聚体多肽的量应当增加并且产物相关副产物的比例应当减少。

[0442] 另外,考虑到限定的拷贝数和限定的整合位点,通过TI获得的重组细胞与通过RI获得的细胞相比应当具有更好的稳定性。此外,由于选择性标记仅用于选择具有适当TI的

细胞,而不用于选择具有高水平转基因表达的细胞,所以可以应用诱变性较低的标记,以使产生序列变体(SV)的可能性最小化,这些序列变体的产生部分是由于甲氨蝶呤(MTX)或甲硫氨酸亚砷亚胺(MSX)等选择性试剂的致突变性。

[0443] 但现在已发现,TI中所使用的转基因中的表达盒的序列(即表达盒组织形式)对三价抗体(例如TCB)表达具有深远的影响。

[0444] 本发明使用具有限定的数量和序列的各个表达盒的特异性表达盒组织形式。这导致在哺乳动物细胞中表达的三价抗体(例如TCB)的高表达产量和良好的产物质量。

[0445] 为了确定转基因与根据本发明的表达盒序列的整合,使用了TI方法。本发明提供了使用双质粒重组酶介导的盒交换(RMCE)反应产生表达三价抗体(例如TCB)的重组哺乳动物细胞的新方法。改进尤其在于在限定的序列中的相同基因座处的限定整合,以及由此引起的三价抗体(例如TCB)的高表达和产物相关副产物的形成减少。

[0446] 本发明所公开的主题不仅提供了用于生产重组哺乳动物细胞以便稳定地大规模生产三价抗体(例如TCB)的方法,而且还提供了具有三价抗体(例如TCB)高生产量且具有有利的副产物谱的重组哺乳动物细胞。

[0447] 本文所使用的双质粒RMCE策略允许在同一TI基因座中插入多个表达盒。

[0448] II.a根据本发明的转基因和方法

[0449] 本文报道了表达三价抗体(例如TCB)的重组哺乳动物细胞。三价抗体(例如TCB)是不由所述哺乳动物细胞天然表达的异源多聚体多肽。更具体地,三价抗体(例如TCB)是由四条多肽组成的异二聚体蛋白质:第一和第二轻链以及第一和第二重链。为了实现三价抗体(例如TCB)的表达,已将在特异性和限定的序列中包含多个不同表达盒的重组核酸整合到哺乳动物细胞的基因组中。

[0450] 本文还报道了用于产生表达三价抗体(例如TCB)的重组哺乳动物细胞的方法,以及使用所述重组哺乳动物细胞生产三价抗体(例如TCB)的方法。

[0451] 本发明至少部分基于以下发现:异多聚体三价抗体(例如TCB)表达所需的不同表达盒的序列(即表达盒组织形式)在整合到哺乳动物细胞的基因组中时影响三价抗体(例如TCB)的表达产量。

[0452] 本发明至少部分基于以下发现:双重重组酶介导的盒交换(RMCE)可以用于产生重组哺乳动物细胞,诸如重组CHO细胞,其中已将限定和特异性的表达盒序列整合到基因组中,这进而导致三价抗体(例如TCB)的有效表达和产生。该整合通过靶向整合在哺乳动物细胞基因组中的特定位点处实现。因此,有可能控制异源多聚体多肽的不同多肽相对于彼此的表达比。由此,进而以高表达产量实现了正确折叠和组装的三价抗体(例如TCB)的有效表达、正确组装和成功分泌。

[0453] 由于三价抗体(例如TCB)是异源4聚体,其表达至少需要四个不同的表达盒:第一个用于表达第一轻链,第二个用于表达第二轻链,第三个用于表达第一重链,第四个用于表达第二重链。此外,可以包括一个或多个用于阳性选择标志物的其他表达盒。

[0454] 在一个实例中,为了检查表达盒组织对TI宿主生产力的影响,RMCE库是通过转染两个质粒(前载体和后载体)产生的,包括TCB形式的三价抗体的单个链的不同数量和组织。在通过流式细胞术选择、回收并且验证RMCE后,在为期14天的分批进料生产试验中评估库的生产力。对于特定的载体组织,观察到与参考库相比滴度增加。

[0455] 评估了抗体链表达盒组织对五种不同TCB表达的影响。TCB 1到5都具有不同的靶向特异性。TCB 3用4个不同的抗CD3结合位点进行了测试。

[0456] 对于TCB-1,已获得以下结果;参考组织以灰色阴影表示,k=具有杵突变的重链;h=具有臼突变的重链;l=轻链;xl=具有结构域交换的轻链:

组织 编号	5' 到 3' 方向的前载 体表达盒				5' 到 3' 方向的后载 体表达盒				滴度 [g/L]	% MP (CE-SDS)	eff.滴度 [g/L]
	1	2	3	4	1	2	3	4			
17	<xl	<xl	<k	-	h	l	l	-	3.75	81	3.04
16	k	k	xl	xl	h	l	-	-	1.5	37.5	0.56
15	k	xl	xl	-	h	l	-	-	3	75	2.25
14	k	h	xl	l	k	l	-	-	2.75	81.5	2.24
13	l	xl	k	h	h	l	l	-	2.09	56.3	0.98
12	k	h	xl	l	h	l	l	-	2.6	80	2.08
11	k	xl	xl	-	h	l	l	-	3.35	63	2.11
2	k	h	xl	l	-	-	-	-	1.98	89.6	1.58

[0457]

10	k	xl	-	-	h	l	l	-	1.9	74	1.41
9	k	xl	-	-	h	l	-	-	1	12	0.12
2	k	h	xl	l	-	-	-	-	1.98	89.6	1.58
8	k	h	-	-	xl	l	-	-	1	72	0.72
7	k	h	xl	l	k	l	-	-	2.75	81.5	2.24
6	k	h	xl	l	l	-	-	-	2.04	89.7	1.63
5	k	h	xl	l	xl	-	-	-	1.75	89.6	1.39
4	k	h	xl	l	k	-	-	-	1.72	89.4	1.38
3	k	h	xl	l	h	-	-	-	1.96	89.7	1.56
2	k	h	xl	l	-	-	-	-	1.98	89.6	1.58
3	l	xl	k	h	h	l	l	-	2.09	56.3	0.98
2	k	h	xl	l	-	-	-	-	1.98	89.6	1.58
1	l	xl	k	h	-	-	-	-	1.67	92.5	1.34

[0458] MP=主要产品,eff.Titer=有效滴度=滴度乘以%主要产品

[0459] 本发明概述如下。

[0460] 根据本发明的一个独立方面是用于生产三价抗体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0461] a) 培养包含编码所述三价抗体的脱氧核糖核酸的哺乳动物细胞,以及

[0462] b) 从细胞或培养基中回收所述三价抗体,

[0463] 其中编码所述三价抗体的所述脱氧核糖核酸稳定地整合到所述哺乳动物细胞的

基因组中并且在5'至3'方向上包含

- [0464] (1)
- [0465] -编码第一重链的第一表达盒,
- [0466] -编码第一轻链的第二表达盒,
- [0467] -编码第一轻链的第三表达盒,
- [0468] -编码第二重链的第四表达盒,和
- [0469] -编码第二轻链的第五表达盒,
- [0470] 或(2)
- [0471] -编码第一重链的第一表达盒,
- [0472] -编码第一轻链的第二表达盒,
- [0473] -编码第一轻链的第三表达盒,
- [0474] -编码第二重链的第四表达盒,
- [0475] -编码第二轻链的第五表达盒,
- [0476] -编码第二轻链的第六表达盒,
- [0477] 或(3)
- [0478] -编码第一重链的第一表达盒,
- [0479] -编码第二重链的第二表达盒,
- [0480] -编码第一轻链的第三表达盒,
- [0481] -编码第二轻链的第四表达盒,
- [0482] -编码第二轻链的第五表达盒,
- [0483] 或(4)
- [0484] -编码第一重链的第一表达盒,
- [0485] -编码第二重链的第二表达盒,
- [0486] -编码第一轻链的第三表达盒,
- [0487] -编码第二轻链的第四表达盒,
- [0488] -编码第一重链的第五表达盒,
- [0489] -编码第二轻链的第六表达盒,
- [0490] 或(5)
- [0491] -编码第一重链的第一表达盒,
- [0492] -编码第二重链的第二表达盒,
- [0493] -编码第一轻链的第三表达盒,
- [0494] -编码第二轻链的第四表达盒,
- [0495] -编码第二重链的第五表达盒,
- [0496] -编码第二轻链的第六表达盒,
- [0497] -编码第二轻链的第七表达盒,
- [0498] 或(6)
- [0499] -编码第一轻链的第一表达盒,
- [0500] -编码第一轻链的第二表达盒,
- [0501] -编码第一重链的第三表达盒,

- [0502] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0503] -编码第二轻链的第五表达盒，
- [0504] -编码第二轻链的第六表达盒。
- [0505] 可以通过本领域技术人员已知的任何方法将编码三价抗体的脱氧核糖核酸稳定整合到哺乳动物细胞的基因组中，只要保持特定的表达盒序列即可。
- [0506] 本发明的一个独立方面是编码三价抗体的脱氧核糖核酸，其在5'至3'方向上包含
- [0507] (1)
- [0508] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0509] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0510] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0511] -编码第二重链的第四表达盒，和
- [0512] -编码第二轻链的第五表达盒，
- [0513] 或(2)
- [0514] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0515] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0516] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0517] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0518] -编码第二轻链的第五表达盒，
- [0519] -编码第二轻链的第六表达盒，
- [0520] 或(3)
- [0521] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0522] -编码第二重链的第二表达盒，
- [0523] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0524] -编码第二轻链的第四表达盒，
- [0525] -编码第二轻链的第五表达盒，
- [0526] 或(4)
- [0527] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0528] -编码第二重链的第二表达盒，
- [0529] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0530] -编码第二轻链的第四表达盒，
- [0531] -编码第一重链的第五表达盒，
- [0532] -编码第二轻链的第六表达盒，
- [0533] 或(5)
- [0534] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0535] -编码第二重链的第二表达盒，
- [0536] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0537] -编码第二轻链的第四表达盒，
- [0538] -编码第二重链的第五表达盒，
- [0539] -编码第二轻链的第六表达盒，

- [0540] -编码第二轻链的第七表达盒，  
[0541] 或(6)  
[0542] -编码第一轻链的第一表达盒，  
[0543] -编码第一轻链的第二表达盒，  
[0544] -编码第一重链的第三表达盒，  
[0545] -编码第二重链的第四表达盒，  
[0546] -编码第二轻链的第五表达盒，  
[0547] -编码第二轻链的第六表达盒。  
[0548] 本发明的一个独立方面是脱氧核糖核酸用于在哺乳动物细胞中表达三价抗体的用途，该脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含  
[0549] (1)  
[0550] -编码第一重链的第一表达盒，  
[0551] -编码第一轻链的第二表达盒，  
[0552] -编码第一轻链的第三表达盒，  
[0553] -编码第二重链的第四表达盒，和  
[0554] -编码第二轻链的第五表达盒，  
[0555] 或(2)  
[0556] -编码第一重链的第一表达盒，  
[0557] -编码第一轻链的第二表达盒，  
[0558] -编码第一轻链的第三表达盒，  
[0559] -编码第二重链的第四表达盒，  
[0560] -编码第二轻链的第五表达盒，  
[0561] -编码第二轻链的第六表达盒，  
[0562] 或(3)  
[0563] -编码第一重链的第一表达盒，  
[0564] -编码第二重链的第二表达盒，  
[0565] -编码第一轻链的第三表达盒，  
[0566] -编码第二轻链的第四表达盒，  
[0567] -编码第二轻链的第五表达盒，  
[0568] 或(4)  
[0569] -编码第一重链的第一表达盒，  
[0570] -编码第二重链的第二表达盒，  
[0571] -编码第一轻链的第三表达盒，  
[0572] -编码第二轻链的第四表达盒，  
[0573] -编码第一重链的第五表达盒，  
[0574] -编码第二轻链的第六表达盒，  
[0575] 或(5)  
[0576] -编码第一重链的第一表达盒，  
[0577] -编码第二重链的第二表达盒，

- [0578] -编码第一轻链的第三表达盒，  
[0579] -编码第二轻链的第四表达盒，  
[0580] -编码第二重链的第五表达盒，  
[0581] -编码第二轻链的第六表达盒，  
[0582] -编码第二轻链的第七表达盒，  
[0583] 或(6)  
[0584] -编码第一轻链的第一表达盒，  
[0585] -编码第一轻链的第二表达盒，  
[0586] -编码第一重链的第三表达盒，  
[0587] -编码第二重链的第四表达盒，  
[0588] -编码第二轻链的第五表达盒，  
[0589] -编码第二轻链的第六表达盒。  
[0590] 本发明的一个独立方面是重组哺乳动物细胞，其包含整合在该细胞的基因组中的编码三价抗体的脱氧核糖核酸，  
[0591] 其中所述编码三价抗体的脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含  
[0592] (1)  
[0593] -编码第一重链的第一表达盒，  
[0594] -编码第一轻链的第二表达盒，  
[0595] -编码第一轻链的第三表达盒，  
[0596] -编码第二重链的第四表达盒，和  
[0597] -编码第二轻链的第五表达盒，  
[0598] 或(2)  
[0599] -编码第一重链的第一表达盒，  
[0600] -编码第一轻链的第二表达盒，  
[0601] -编码第一轻链的第三表达盒，  
[0602] -编码第二重链的第四表达盒，  
[0603] -编码第二轻链的第五表达盒，  
[0604] -编码第二轻链的第六表达盒，  
[0605] 或(3)  
[0606] -编码第一重链的第一表达盒，  
[0607] -编码第二重链的第二表达盒，  
[0608] -编码第一轻链的第三表达盒，  
[0609] -编码第二轻链的第四表达盒，  
[0610] -编码第二轻链的第五表达盒，  
[0611] 或(4)  
[0612] -编码第一重链的第一表达盒，  
[0613] -编码第二重链的第二表达盒，  
[0614] -编码第一轻链的第三表达盒，  
[0615] -编码第二轻链的第四表达盒，

- [0616] -编码第一重链的第五表达盒，
- [0617] -编码第二轻链的第六表达盒，
- [0618] 或(5)
- [0619] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0620] -编码第二重链的第二表达盒，
- [0621] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0622] -编码第二轻链的第四表达盒，
- [0623] -编码第二重链的第五表达盒，
- [0624] -编码第二轻链的第六表达盒，
- [0625] -编码第二轻链的第七表达盒，
- [0626] 或(6)
- [0627] -编码第一轻链的第一表达盒，
- [0628] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0629] -编码第一重链的第三表达盒，
- [0630] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0631] -编码第二轻链的第五表达盒，
- [0632] -编码第二轻链的第六表达盒。
- [0633] 本发明的一个独立方面是包含两种脱氧核糖核酸的组合物，这两种脱氧核糖核酸进而包含三种不同的重组识别序列和五至七表达盒，其中
- [0634] -所述第一脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含
- [0635] (1)
- [0636] -第一重组识别序列，
- [0637] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0638] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0639] -编码第一轻链的第三表达盒，和
- [0640] -第三重组识别序列的第一拷贝，
- [0641] 或(2)
- [0642] -第一重组识别序列，
- [0643] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0644] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0645] -编码第一轻链的第三表达盒，和
- [0646] -第三重组识别序列的第一拷贝，
- [0647] 或(3)
- [0648] -第一重组识别序列，
- [0649] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0650] -编码第二重链的第二表达盒，
- [0651] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0652] -编码第二轻链的第四表达盒，和
- [0653] -第三重组识别序列的第一拷贝，

- [0654] 或 (4)
- [0655] - 第一重组识别序列,
- [0656] - 编码第一重链的第一表达盒,
- [0657] - 编码第二重链的第二表达盒,
- [0658] - 编码第一轻链的第三表达盒,
- [0659] - 编码第二轻链的第四表达盒, 和
- [0660] - 第三重组识别序列的第一拷贝,
- [0661] 或 (5)
- [0662] - 第一重组识别序列,
- [0663] - 编码第一重链的第一表达盒,
- [0664] - 编码第二重链的第二表达盒,
- [0665] - 编码第一轻链的第三表达盒,
- [0666] - 编码第二轻链的第四表达盒, 和
- [0667] - 第三重组识别序列的第一拷贝,
- [0668] 或 (6)
- [0669] - 第一重组识别序列,
- [0670] - 编码第一轻链的第一表达盒,
- [0671] - 编码第一轻链的第二表达盒,
- [0672] - 编码第一重链的第三表达盒, 和
- [0673] - 第三重组识别序列的第一拷贝,
- [0674] 并且
- [0675] - 所述第二脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含 (1)
- [0676] - 第三重组识别序列的第二拷贝,
- [0677] - 编码第二重链的第四表达盒,
- [0678] - 编码第二轻链的第五表达盒, 和
- [0679] - 第二重组识别序列,
- [0680] 或 (2)
- [0681] - 第三重组识别序列的第二拷贝,
- [0682] - 编码第二重链的第四表达盒,
- [0683] - 编码第二轻链的第五表达盒,
- [0684] - 编码第二轻链的第六表达盒, 和
- [0685] - 第二重组识别序列,
- [0686] 或 (3)
- [0687] - 第三重组识别序列的第二拷贝,
- [0688] - 编码第二轻链的第五表达盒, 和
- [0689] - 第二重组识别序列,
- [0690] 或 (4)
- [0691] - 第三重组识别序列的第二拷贝,
- [0692] - 编码第一重链的第五表达盒,

- [0693] -编码第二轻链的第六表达盒,和
- [0694] -第二重组识别序列,
- [0695] 或(5)
- [0696] -第三重组识别序列的第二拷贝,
- [0697] -编码第二重链的第五表达盒,
- [0698] -编码第二轻链的第六表达盒,
- [0699] -编码第二轻链的第七表达盒,和
- [0700] -第二重组识别序列,
- [0701] 或(6)
- [0702] -第三重组识别序列的第二拷贝,
- [0703] -编码第二重链的第四表达盒,
- [0704] -编码第二轻链的第五表达盒,
- [0705] -编码第二轻链的第六表达盒,和
- [0706] -第二重组识别序列。

[0707] 在一个实施例中,第一和第二脱氧核糖核酸均包含根据(1)的组织;或者第一和第二脱氧核糖核酸均包含根据(2)所述的组织;或者第一和第二脱氧核糖核酸均包含根据(3)所述的组织;或者第一和第二脱氧核糖核酸均包含根据(4)所述的组织;或者第一和第二脱氧核糖核酸均包含根据(5)所述的组织;或者第一和第二脱氧核糖核酸均包含根据(6)所述的组织。

[0708] 本发明的一个独立方面是用于生产包含编码三价抗体的脱氧核糖核酸并且分泌三价抗体的重组哺乳动物细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

[0709] a) 提供包含整合在哺乳动物细胞的基因组的基因座内的单个位点处的外源核苷酸序列的所述哺乳动物细胞,其中所述外源核苷酸序列包含侧接至少一个第一选择标志物的第一重组识别序列和第二重组识别序列,以及位于所述第一重组识别序列与所述第二重组识别序列之间的第三重组识别序列,并且所有的所述重组识别序列都不同;

[0710] b) 向a)中所提供的细胞中引入两种脱氧核糖核酸的组合物,所述两种脱氧核糖核酸包含三种不同的重组识别序列和五至七个表达盒,其中

[0711] -所述第一脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含

[0712] (1)

[0713] -第一重组识别序列,

[0714] -编码第一重链的第一表达盒,

[0715] -编码第一轻链的第二表达盒,

[0716] -编码第一轻链的第三表达盒,和

[0717] -第三重组识别序列的第一拷贝,

[0718] 或(2)

[0719] -第一重组识别序列,

[0720] -编码第一重链的第一表达盒,

[0721] -编码第一轻链的第二表达盒,

[0722] -编码第一轻链的第三表达盒,和

- [0723] -第三重组识别序列的第一拷贝，
- [0724] 或(3)
- [0725] -第一重组识别序列，
- [0726] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0727] -编码第二重链的第二表达盒，
- [0728] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0729] -编码第二轻链的第四表达盒，和
- [0730] -第三重组识别序列的第一拷贝，
- [0731] 或(4)
- [0732] -第一重组识别序列，
- [0733] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0734] -编码第二重链的第二表达盒，
- [0735] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0736] -编码第二轻链的第四表达盒，和
- [0737] -第三重组识别序列的第一拷贝，
- [0738] 或(5)
- [0739] -第一重组识别序列，
- [0740] -编码第一重链的第一表达盒，
- [0741] -编码第二重链的第二表达盒，
- [0742] -编码第一轻链的第三表达盒，
- [0743] -编码第二轻链的第四表达盒，和
- [0744] -第三重组识别序列的第一拷贝，
- [0745] 或(6)
- [0746] -第一重组识别序列，
- [0747] -编码第一轻链的第一表达盒，
- [0748] -编码第一轻链的第二表达盒，
- [0749] -编码第一重链的第三表达盒，和
- [0750] -第三重组识别序列的第一拷贝，并且
- [0751] -所述第二脱氧核糖核酸在5'至3'方向上包含(1)
- [0752] -第三重组识别序列的第二拷贝，
- [0753] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0754] -编码第二轻链的第五表达盒，和
- [0755] -第二重组识别序列，
- [0756] 或(2)
- [0757] -第三重组识别序列的第二拷贝，
- [0758] -编码第二重链的第四表达盒，
- [0759] -编码第二轻链的第五表达盒，
- [0760] -编码第二轻链的第六表达盒，和
- [0761] -第二重组识别序列，

- [0762] 或(3)
- [0763] -第三重组识别序列的第二拷贝,
- [0764] -编码第二轻链的第五表达盒,和
- [0765] -第二重组识别序列,
- [0766] 或(4)
- [0767] -第三重组识别序列的第二拷贝,
- [0768] -编码第一重链的第五表达盒,
- [0769] -编码第二轻链的第六表达盒,和
- [0770] -第二重组识别序列,
- [0771] 或(5)
- [0772] -第三重组识别序列的第二拷贝,
- [0773] -编码第二重链的第五表达盒,
- [0774] -编码第二轻链的第六表达盒,
- [0775] -编码第二轻链的第七表达盒,和
- [0776] -第二重组识别序列,
- [0777] 或(6)
- [0778] -第三重组识别序列的第二拷贝,
- [0779] -编码第二重链的第四表达盒,
- [0780] -编码第二轻链的第五表达盒,
- [0781] -编码第二轻链的第六表达盒,和
- [0782] -第二重组识别序列,
- [0783] 其中所述第一脱氧核糖核酸和所述第二脱氧核糖核酸的所述第一重组
- [0784] 识别序列至所述第三重组识别序列与整合的外源核苷酸序列上的所述第一重组识别序列至所述第三重组识别序列匹配,
- [0785] 其中编码一个第二选择标志物的表达盒的5'末端部分和3'末端部分在
- [0786] 合在一起时形成所述一个第二选择标志物的功能性表达盒;
- [0787] c)
- [0788] i) 与b)的所述第一脱氧核糖核酸和所述第二脱氧核糖核酸同时引入;
- [0789] 或
- [0790] ii) 在其后依次引入
- [0791] 一种或多种重组酶,
- [0792] 其中所述一种或多种重组酶识别所述第一脱氧核糖核酸和所述第二脱氧核糖核酸的所述重组识别序列;(并且任选地其中所述一种或多种重组酶进行两次重组酶介导的盒交换;)
- [0793] 以及
- [0794] d) 选择表达所述第二选择标志物并且分泌所述三价抗体的细胞,
- [0795] 从而产生包含编码所述三价抗体的脱氧核糖核酸并且分泌所述三价抗体的重组哺乳动物细胞。
- [0796] 在一个实施例中,第一和第二脱氧核糖核酸均包含根据(1)的组织;或者第一和第

二脱氧核糖核酸均包含根据(2)所述的组织;或者第一和第二脱氧核糖核酸均包含根据(3)所述的组织;或者第一和第二脱氧核糖核酸均包含根据(4)所述的组织;或者第一和第二脱氧核糖核酸均包含根据(5)所述的组织;或者第一和第二脱氧核糖核酸均包含根据(6)所述的组织。

[0797] 在本发明所有独立方面以及所有相关实施例的一个实施例中,通过靶向整合将编码三价双特异性抗体的脱氧核糖核酸稳定整合到哺乳动物细胞基因组中的单个基因座中。

[0798] 在本发明所有独立方面以及所有相关实施例的一个实施例中,编码三价双特异性抗体的脱氧核糖核酸通过单或双重重组酶介导的盒交换反应稳定整合到哺乳动物细胞基因组中的单个基因座中。

[0799] 在本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,第一重链在CH3结构域中包含突变T366W(根据Kabat编号)并且第二重链在CH3结构域中包含突变T366S、L368A和Y407V(根据Kabat编号),反之亦然。

[0800] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,重链中的一个进一步包含突变S354C并且相应的另一条重链包含突变Y349C(根据Kabat编号)。

[0801] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,第一重链是包含附加经结构域交换Fab片段的延伸重链。

[0802] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,第一轻链是经结构域交换轻链VH-VL或CH1-CL。

[0803] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中

[0804] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第一轻链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,

[0805] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,

[0806] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第二重链可变结构域和CL结构域,并且

[0807] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域,

[0808] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点,并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。

[0809] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中

[0810] -所述第一重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、第二重链可变结构域、CL结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,

[0811] -所述第二重链从N末端到C末端包含第一重链可变结构域、CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域,

[0812] -所述第一轻链从N末端到C末端包含第一轻链可变结构域和CH1结构域,和

[0813] -所述第二轻链从N末端到C末端包含第二轻链可变结构域和CL结构域,

[0814] 其中所述第一重链可变结构域和所述第二轻链可变结构域形成第一结合位点,并且所述第二重链可变结构域和所述第一轻链可变结构域形成第二结合位点。

[0815] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,脱氧核糖核酸在单个位点或基因座稳定整合到哺乳动物细胞的基因组中。

[0816] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,编码三

价抗体的脱氧核糖核酸包含另外的编码选择标志物的表达盒。

[0817] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,所述编码所述选择标志物的表达盒部分地位于所述第三重组识别序列的5'并部分地位于所述第三重组识别序列的3',其中所述表达盒的位于5'的部分包含启动子和起始密码子,并且所述表达盒的位于3'的部分包含没有起始密码子的编码序列和多聚A信号,其中所述起始密码子可操作地连接至所述编码序列。

[0818] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,所述编码选择标志物的表达盒的位于5'的部分包含可操作地连接至起始密码子的启动子序列,由此启动子序列在上游侧接第三表达盒,并且起始密码子在下游侧接第三重组识别序列;并且所述编码选择标志物的表达盒的位于3'的部分包含编码选择标志物的核酸,该核酸缺乏起始密码子,并且在上游侧接第三重组识别序列,在下游侧接第四表达盒,其中所述起始密码子可操作地连接至编码序列。

[0819] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中

[0820] 每个编码选择标志物的表达盒在5'至3'方向上包含启动子、编码抗体链的核酸和多聚腺苷酸化信号序列,以及任选地终止子序列。

[0821] 并且

[0822] 每个编码选择标志物的表达盒在5'至3'方向上包含启动子、编码选择标志物的核酸和多聚腺苷酸化信号序列,以及任选地终止子序列。

[0823] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,对于除选择标志物的表达盒之外,所述启动子为具有内含子A的人CMV启动子,所述多聚腺苷酸化信号序列为bGH多聚腺苷酸化信号序列,并且所述终止子为的hGT终止子,对于选择标志物的表达盒,其中所述启动子为SV40启动子,并且所述多聚腺苷酸化信号序列为SV40多聚腺苷酸化信号序列并且不存在终止子。

[0824] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,哺乳动物细胞是CHO细胞。

[0825] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,如果沿5'到3'方向的组织形式具有作为第一表达盒的编码第一重链的表达盒,则所有盒是单向布置。

[0826] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,如果沿5'到3'方向的组织是编码第一轻链的第一表达盒,编码第一轻链的第二表达盒、编码第一重链的第三表达盒、编码第二重链的第四表达盒、编码第二轻链的第五表达盒、编码第二轻链的第六表达盒,则第一至第三表达盒单向布置,并且第四至第六表达盒单向布置,由此第一至第三表达盒布置在第四至第六表达盒的相反方向上。

[0827] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,所述编码选择标志物的表达盒部分地位于第三重组识别序列的5'并部分地位于第三重组识别序列的3',其中所述表达盒的位于5'的部分包含启动子和起始密码子,并且所述表达盒的位于3'的部分包含没有起始密码子的编码序列和多聚A信号。

[0828] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,所述编码选择标志物的表达盒的位于5'的部分包含可操作地连接至起始密码子的启动子序列,由

此启动子序列在上游侧接第二表达盒(即定位在第二表达盒的下游),并且起始密码子在下流侧接第三重组识别序列(即定位在第三重组识别序列的上游);并且所述编码选择标志物的表达盒的位于3'的部分包含编码选择标志物的核酸,该核酸缺乏可操作地连接至多聚腺苷酸化序列的起始密码子,并且在上游侧接第三重组识别序列,在下游侧接第三表达盒。

[0829] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,起始密码子是翻译起始密码子。在一个实施例中,所述起始密码子为ATG。

[0830] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,第一脱氧核糖核酸被整合到第一载体中并且第二脱氧核糖核酸被整合到第二载体中。

[0831] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,所述表达盒中的每一者在5'至3'方向上包含启动子、编码序列和多聚腺苷酸化信号序列,任选地随后是终止子序列,它们都可操作地连接彼此。

[0832] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,哺乳动物细胞是CHO细胞。在一个实施例中,所述CHO细胞为CHO-K1细胞。

[0833] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,重组酶识别序列是L3、2L和LoxFas。在一个实施例中,L3具有序列SEQ ID NO:01,2L具有序列SEQ ID NO:02,并且LoxFas具有序列SEQ ID NO:03。在一个实施例中,所述第一重组酶识别序列为L3,所述第二重组酶识别序列为2L,并且所述第三重组酶识别序列为LoxFas。

[0834] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,所述启动子为具有内含子A的人CMV启动子,所述多聚腺苷酸化信号序列为bGH多聚A位点,并且所述终止子序列为hGT终止子。

[0835] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,对于除所述选择标志物的表达盒之外,启动子为具有内含子A的人CMV启动子,所述多聚腺苷酸化信号序列为bGH多聚A位点,并且所述终止子序列为hGT终止子,对于选择标志物的表达盒,其中所述启动子为SV40启动子,并且所述多聚腺苷酸化信号序列为SV40多聚A位点并且不存在终止子序列。

[0836] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,人CMV启动子具有SEQ ID NO:04的序列。在一个实施例中,人CMV启动子具有序列SEQ ID NO:06。

[0837] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,bGH多聚腺苷酸化信号序列是SEQ ID NO:08。

[0838] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,hGT终止子具有SEQ ID NO:09的序列。

[0839] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,SV40启动子具有SEQ ID NO:10的序列。

[0840] 在根据本发明的每个独立方面以及所有相关实施例的一个相关实施例中,SV40多聚腺苷酸化信号序列是SEQ ID NO:07。

[0841] 在根据本发明的所有方面和实施例的一个实施例中,三价抗体是治疗性抗体。

[0842] 在根据本发明的所有方面和实施例的一个实施例中,三价双特异性(治疗性)抗体(TCB)包含

[0843] -第一Fab片段和第二Fab片段,其中第一Fab片段和第二Fab片段的每个结合位点

与第二抗原特异性结合，

[0844] -第三Fab片段，其中第三Fab片段的结合位点与第一抗原特异性结合，并且其中第三Fab片段包含结构域交叉，使得可变轻链结构域(VL)和可变重链结构域(VH)被彼此替换，以及

[0845] -包含第一Fc区多肽和第二Fc区多肽的Fc区，

[0846] 其中第一Fab片段和第二Fab片段各自包含重链片段和全长轻链，

[0847] 其中第一Fab片段的重链片段的C末端与第一Fc区多肽的N末端融合，

[0848] 其中第二Fab片段的重链片段的C末端与第三Fab片段的可变轻链结构域的N末端融合，且第三Fab片段的重链恒定结构域1的C末端与第二Fc区多肽的N末端融合。

[0849] 在根据本发明的所有方面和实施例的一个实施例中，三价抗体是抗CD3/CD20双特异性抗体。在一个实施例中，抗CD3/CD20双特异性抗体是以CD20为第二抗原的TCB。在一个实施例中，双特异性抗CD3/CD20抗体是RG6026。此类抗体报告于WO 2016/020309中，该专利以引用方式整体并入本文。

[0850] 在根据本发明的所有方面和实施例的一个实施例中，三价抗体是抗CD3/CEA双特异性抗体。在一个实施例中，抗CD3/CEA双特异性抗体是以CEA为第二抗原的TCB。在一个实施例中，双特异性抗CD3/CEA抗体是R06958688或RG7802或赛必妥单抗(cibisatamab)。此类抗体报告于WO 2017/055389中，该专利以引用方式整体并入本文。

[0851] II.b重组酶介导的盒交换(RMCE)

[0852] 靶向整合允许将外源核苷酸序列整合到哺乳动物细胞基因组的预定位点中。在某些实施例中，靶向整合由识别一个或多个重组识别序列(RRS)的重组酶介导。在某些实施例中，靶向整合由同源重组介导。

[0853] “重组识别序列”(RRS)是由重组酶识别的核苷酸序列，对于重组酶介导的重组事件是必需的并且足以引发此类重组事件。RRS可以用于限定核苷酸序列中将发生重组事件的位置。

[0854] 在某些实施例中，RRS选自由以下项组成的组：LoxP序列、LoxP L3序列、LoxP 2L序列、LoxFas序列、Lox511序列、Lox2272序列、Lox2372序列、Lox5171序列、Loxm2序列、Lox71序列、Lox66序列、FRT序列、Bxb1 attP序列、Bxb1 attB序列、 $\phi$  C31 attP序列和 $\phi$  C31 attB序列。如果必须存在多个RRS，则对这些序列中的每一者的选择取决于在选择不同RRS的限度内的另一个序列。

[0855] 在某些实施例中，RRS可以由Cre重组酶识别。在某些实施例中，RRS可以由FLP重组酶识别。在某些实施例中，RRS可以由Bxb1整合酶识别。在某些实施例中，RRS可以由 $\phi$  C31整合酶识别。

[0856] 在某些实施例中，当RRS为LoxP位点时，所述细胞需要Cre重组酶来执行重组。在某些实施例中，当RRS为FRT位点时，所述细胞需要FLP重组酶来执行重组。在某些实施例中，当RRS为Bxb1 attP或Bxb1 attB位点时，所述细胞需要Bxb1整合酶来执行重组。在某些实施例中，当RRS为 $\phi$  C31 attP或 $\phi$  C31attB位点时，所述细胞需要 $\phi$  C31整合酶来执行重组。重组酶可以使用包含所述酶的编码序列的表达载体来引入细胞中。

[0857] Cre-LoxP位点特异性重组系统已广泛用于许多生物实验系统中。Cre为38kDa位点特异性DNA重组酶，其识别34bp LoxP序列。Cre来源于噬菌体P1并且属于酪氨酸家族位点特

异性重组酶。Cre重组酶可以介导LoxP序列之间的分子内重组和分子间重组。LoxP序列由8bp非回文核心区及其侧接的两个13bp反向重复序列构成。Cre重组酶与13bp重复序列结合,从而介导8bp核心区内的重组。Cre-LoxP介导的重组以高效率发生,并且无需任何其他宿主因子。如果两个LoxP序列以相同的取向被置于同一核苷酸序列中,则Cre介导的重组将切除位于两个LoxP序列之间的DNA序列,成为共价闭环。如果两个LoxP序列以相反的位置被置于同一核苷酸序列中,则Cre介导的重组将反转位于这两个序列之间的DNA序列的取向。如果两个LoxP序列在两个不同的DNA分子上,并且如果一个DNA分子为环状分子,则Cre介导的重组将导致环状DNA序列的整合。

[0858] 在某些实施例中,LoxP序列为野生型LoxP序列。在某些实施例中,LoxP序列为突变体LoxP序列。已开发突变体LoxP序列,用于提高Cre介导的整合或替换的效率。在某些实施例中,突变体LoxP序列选自由以下项组成的组:LoxP L3序列、LoxP 2L序列、LoxFas序列、Lox511序列、Lox2272序列、Lox2372序列、Lox5171序列、Loxm2序列、Lox71序列和Lox66序列。例如,Lox71序列在左侧的13bp重复序列中有5bp发生突变。Lox66序列在右侧的13bp重复序列中有5bp发生突变。野生型LoxP序列和突变体LoxP序列均可以介导Cre依赖性重组。

[0859] 术语“匹配RRS”表示在两个RRS之间发生了重组。在某些实施例中,两个匹配RRS是相同的。在某些实施例中,两个RRS均为野生型LoxP序列。在某些实施例中,两个RRS均为突变体LoxP序列。在某些实施例中,两个RRS均为野生型FRT序列。在某些实施例中,两个RRS均为突变体FRT序列。在某些实施例中,两个匹配RRS为不同的序列,但是可以由同一重组酶识别。在某些实施例中,第一匹配RRS为Bxb1 attP序列,并且第二匹配RRS为Bxb1 attB序列。在某些实施例中,第一匹配RRS为 $\phi$ C31 attB序列,并且第二匹配RRS为 $\phi$ C31 attB序列。

[0860] II.c适用于TI的示例性哺乳动物细胞

[0861] 如上所述的包含外源核酸(“着陆位点”)的任何已知的或将来的适用于TI的哺乳动物细胞均可以用于本发明中。

[0862] 本发明以根据前述部分的包含外源核酸(着陆位点)的CHO细胞为例。这仅仅是为了对本发明进行举例说明,而不应以任何方式解释为限制。本发明的真正范围在权利要求书中设定。

[0863] 在一个优选的实施例中,包含整合在哺乳动物细胞的基因组基因座内单个位点处的外源核苷酸序列的哺乳动物细胞为CHO细胞。

[0864] 适用于本发明的包含整合在其基因组的基因座内的单个位点处的外源核苷酸序列的示例性哺乳动物细胞为具有着陆位点(=整合在哺乳动物细胞的基因组基因座内的单个位点处的外源核苷酸序列)的CHO细胞,其包含三个用于Cre重组酶介导的DNA重组的异种特异性loxP位点。这些异种特异性loxP位点为L3、LoxFas和2L(参见例如,Lanza等人,Biotechnol.J.7(2012)898-908;Wong等人,Nucleic Acids Res.33(2005)e147),由此L3和2L分别在5'端和3'端侧接着陆位点,并且LoxFas位于L3位点与2L位点之间。着陆位点还包含双顺反子单元,其经由IRES将选择性标记的表达与荧光GFP蛋白的表达联系起来,从而允许通过正选择稳定着陆位点,以及选择在转染和Cre重组后不存在该位点(负选择)。绿色荧光蛋白质(GFP)用于监测RMCE反应。示例性的GFP具有SEQ ID NO:11的序列。

[0865] 如前一段中所概述的着陆位点的这种配置允许同时整合两个载体,即具有L3和LoxFas位点的所谓前载体,以及包含LoxFas和2L位点的后载体。与着陆位点中存在的选择

性标记基因不同的选择性标记基因的功能元件分布在两个载体之间：启动子和起始密码子位于前载体上，而编码区和多聚A信号位于后载体上。只有来自两个载体的所述核酸的正确的Cre介导整合才诱导针对相应选择性试剂的抗性。

[0866] 一般来讲，适用于TI的哺乳动物细胞为包含整合在哺乳动物细胞基因组的基因座内的单个位点处的外源核苷酸序列的哺乳动物细胞，其中所述外源核苷酸序列包含侧接至少一个第一选择性标记的第一重组识别序列和第二重组识别序列，以及位于第一重组识别序列与第二重组识别序列之间的第三重组识别序列，并且所有重组识别序列都不同。所述外源核苷酸序列称为“着陆位点”。

[0867] 本发明所公开的主题使用了适用于外源核苷酸序列的TI的哺乳动物细胞。在某些实施例中，适用于TI的哺乳动物细胞包含整合在哺乳动物细胞基因组中的整合位点处的外源核苷酸序列。这种适用于TI的哺乳动物细胞也可以表示为TI宿主细胞。

[0868] 在某些实施例中，所述适用于TI的哺乳动物细胞为包含着陆位点的仓鼠细胞、人细胞、大鼠细胞或小鼠细胞。在某些实施例中，所述适用于TI的哺乳动物细胞为包含着陆位点的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、CHO K1细胞、CHO K1SV细胞、CHO DG44细胞、CHO DUKXB-11细胞、CHO K1S细胞或CHO K1M细胞。

[0869] 在某些实施例中，适用于TI的哺乳动物细胞包含整合的外源核苷酸序列，其中所述外源核苷酸序列包含一个或多个重组识别序列(RRS)。在某些实施例中，所述外源核苷酸序列包含至少两个RRS。RRS可以由重组酶(例如，Cre重组酶、FLP重组酶、Bxb1整合酶或 $\phi$ C31整合酶)识别。RRS可以选自由以下项组成的组：LoxP序列、LoxP L3序列、LoxP 2L序列、LoxFas序列、Lox511序列、Lox2272序列、Lox2372序列、Lox5171序列、Loxm2序列、Lox71序列、Lox66序列、FRT序列、Bxb1 attP序列、Bxb1 attB序列、 $\phi$ C31 attP序列和 $\phi$ C31 attB序列。

[0870] 在某些实施例中，所述外源核苷酸序列包含第一RRS、第二RRS和第三RRS，以及位于第一RRS与第二RRS之间的至少一个选择性标记，并且第三RRS不同于第一RRS和/或第二RRS。在某些实施例中，所述外源核苷酸序列还包含第二选择性标记，并且第一选择性标记和第二选择性标记是不同的。在某些实施例中，所述外源核苷酸序列还包含第三选择性标记和内部核糖体进入位点(IRES)，其中IRES可操作地连接至第三选择性标记。第三选择性标记可以不同于第一选择性标记或第二选择性标记。

[0871] 所述选择性标记可以选自由以下项组成的组：氨基糖苷磷酸转移酶(APH)(例如，潮霉素磷酸转移酶(HYG)、新霉素和G418 APH)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、胸苷激酶(TK)、谷氨酰胺合成酶(GS)、天冬酰胺合成酶、色氨酸合成酶(吡啶)、组氨醇脱氢酶(组氨醇D)，以及编码对嘌呤霉素、杀稻瘟菌素、博来霉素、腐草霉素、氯霉素、Zeocin和霉酚酸的抗性的基因。所述选择性标记也可以是选自由以下项组成的组的荧光蛋白质：绿色荧光蛋白质(GFP)、增强的GFP(eGFP)、合成的GFP、黄色荧光蛋白质(YFP)、增强的YFP(eYFP)、青色荧光蛋白质(CFP)、mPlum、mCherry、tdTomato、mStrawberry、J-red、DsRed单体、mOrange、mKO、mCitrine、Venus、YPet、Emerald6、CyPet、mCFPm、Cerulean和T-Sapphire。

[0872] 在某些实施例中，所述外源核苷酸序列包含第一RRS、第二RRS和第三RRS，以及位于第一RRS与第三RRS之间的至少一个选择性标记。

[0873] 外源核苷酸序列并非来源于特异性细胞，而是可以通过DNA递送方法(诸如，通

过转染方法、电穿孔方法或转化方法)引入所述细胞中的核苷酸序列。在某些实施例中,适用于TI的哺乳动物细胞包含整合在哺乳动物细胞基因组中的一个或多个整合位点处的至少一种外源核苷酸序列。在某些实施例中,所述外源核苷酸序列整合在哺乳动物细胞基因组的特异性基因座内的一个或多个整合位点处。

[0874] 在某些实施例中,整合的外源核苷酸序列包含一个或多个重组识别序列(RRS),其中所述RRS可以由重组酶识别。在某些实施例中,整合的外源核苷酸序列包含至少两个RRS。在某些实施例中,整合的外源核苷酸序列包含三个RRS,其中第三RRS位于第一RRS与第二RRS之间。在某些实施例中,第一RRS与第二RRS相同,并且第三RRS不同于第一RRS或第二RRS。在某些优选的实施例中,所有三个RRS都不同。在某些实施例中,所述RRS彼此独立地选自由以下项组成的组:LoxP序列、LoxP L3序列、LoxP 2L序列、LoxFas序列、Lox511序列、Lox2272序列、Lox2372序列、Lox5171序列、Loxm2序列、Lox71序列、Lox66序列、FRT序列、Bxb1 attP序列、Bxb1 attB序列、 $\phi$ C31 attP序列和 $\phi$ C31 attB序列。

[0875] 在某些实施例中,整合的外源核苷酸序列包含至少一个选择性标记。在某些实施例中,整合的外源核苷酸序列包含第一RRS、第二RRS和第三RRS,以及至少一个选择性标记。在某些实施例中,选择性标记位于第一RRS与第二RRS之间。在某些实施例中,两个RRS侧接至少一个选择性标记,即,第一RRS位于该选择性标记的5' (上游)并且第二RRS位于该选择性标记的3' (下游)。在某些实施例中,第一RRS与该选择性标记的5'端相邻,并且第二RRS与该选择性标记的3'端相邻。

[0876] 在某些实施例中,选择性标记位于第一RRS与第二RRS之间,并且这两个侧接RRS是不同的。在某些优选的实施例中,第一侧接RRS为LoxP L3序列,并且第二侧接RRS为LoxP 2L序列。在某些实施例中,LoxP L3序列位于该选择性标记的5',并且LoxP 2L序列位于该选择性标记的3'。在某些实施例中,第一侧接RRS为野生型FRT序列,并且第二侧接RRS为突变体FRT序列。在某些实施例中,第一侧接RRS为Bxb1 attP序列,并且第二侧接RRS为Bxb1 attB序列。在某些实施例中,第一侧接RRS为 $\phi$ C31 attP序列,并且第二侧接RRS为 $\phi$ C31 attB序列。在某些实施例中,这两个RRS以相同的取向定位。在某些实施例中,这两个RRS均处于正向取向或反向取向。在某些实施例中,这两个RRS以相反的取向定位。

[0877] 在某些实施例中,整合的外源核苷酸序列包含侧接两个RRS的第一选择性标记和第二选择性标记,其中第一选择性标记不同于第二选择性标记。在某些实施例中,这两个选择性标记均彼此独立地选自由以下项组成的组:谷氨酰胺合成酶选择性标记、胸苷激酶选择性标记、HYG选择性标记和嘌呤霉素抗性选择性标记。在某些实施例中,整合的外源核苷酸序列包含胸苷激酶选择性标记和HYG选择性标记。在某些实施例中,第一选择性标记选自由以下项组成的组:氨基糖苷磷酸转移酶(APH)(例如,潮霉素磷酸转移酶(HYG)、新霉素和G418 APH)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、胸苷激酶(TK)、谷氨酰胺合成酶(GS)、天冬酰胺合成酶、色氨酸合成酶(吲哚)、组氨醇脱氢酶(组氨醇D),以及编码对嘌呤霉素、杀稻瘟菌素、博来霉素、腐草霉素、氯霉素、Zeocin和霉酚酸的抗性的基因,并且第二选择性标记选自由以下项组成的组:GFP、eGFP、合成的GFP、YFP、eYFP、CFP、mPlum、mCherry、tdTomato、mStrawberry、J-red、DsRed单体、mOrange、mKO、mCitrine、Venus、YPet、Emerald、CyPet、mCFPm、Cerulean和T-Sapphire荧光蛋白质。在某些实施例中,第一选择性标记为谷氨酰胺合成酶选择性标记,并且第二选择性标记为GFP荧光蛋白质。在某些实施例中,侧接两个选

择性标记的两个RRS是不同的。

[0878] 在某些实施例中,选择性标记可操作地连接至启动子序列。在某些实施例中,选择性标记可操作地连接至SV40启动子。在某些实施例中,选择性标记可操作地连接至人巨细胞病毒(CMV)启动子。

[0879] 在某些实施例中,整合的外源核苷酸序列包含三个RRS。在某些实施例中,第三RRS位于第一RRS与第二RRS之间。在某些实施例中,第一RRS与第二RRS相同,并且第三RRS不同于第一RRS或第二RRS。在某些优选的实施例中,所有三个RRS都不同。

[0880] II.d适用于实施本发明的示例性载体

[0881] 除了上文所概述的“单载体RMCE”之外,还可以进行新的“双载体RMCE”以同时靶向整合两种核酸。

[0882] 在根据本发明的使用根据本发明的载体组合的方法中采用了“双载体RMCE”策略。例如,但不作为限制,整合的外源核苷酸序列可以包含三个RRS,例如以下排列:其中第三RRS(“RRS3”)存在于第一RRS(“RRS1”)与第二RRS(“RRS2”)之间,而第一载体包含与该整合的外源核苷酸序列上的第一RRS和第三RRS相匹配的两个RRS,并且第二载体包含与该整合的外源核苷酸序列上的第三RRS和第二RRS相匹配的两个RRS。双载体RMCE策略的一个示例在图1中展示。此类双载体RMCE策略允许通过在每对RRS之间的相应序列中掺入适当数量的SOI来引入多个SOI,从而在适用于TI的哺乳动物细胞的基因组中的TI之后获得根据本发明的表达盒组织形式。

[0883] 双质粒RMCE策略涉及使用三个RRS位点来同时实施两个独立的RMCE(图1)。因此,在适用于使用双质粒RMCE策略进行TI的哺乳动物细胞中的着陆位点包括第三RRS位点(RRS3),其与第一RRS位点(RRS1)或第二RRS位点(RRS2)没有交叉活性。这两个待靶向的表达质粒需要相同的侧接RRS位点才能有效靶向,其中一个表达质粒(前)侧接RRS1和RRS3,另一个表达质粒(后)侧接RRS3和RRS2。在该双质粒RMCE中还需要两个选择性标记。一个选择性标记表达盒被分成两部分。前质粒将包含启动子,随后是起始密码子和RRS3序列。后质粒将具有与选择性标记编码区的减去了起始密码子(ATG)的N末端融合的RRS3序列。可能需要在RRS3位点与选择性标记序列之间插入额外的核苷酸,以确保融合蛋白质发生框架内翻译(即可操作的连接)。仅当两个质粒均正确插入时,选择性标记的完整表达盒才将被组装,并因此使细胞对相应的选择性试剂具有抗性。图1为示出双质粒RMCE策略的示意图。

[0884] 单载体RMCE和双载体RMCE都允许通过精确交换存在于供体DNA上的DNA序列与哺乳动物细胞基因组中整合位点所在的DNA序列,来将一种或多种供体DNA分子单向整合到哺乳动物细胞基因组的预定位点中。这些DNA序列的特征在于两个异种特异性RRS,其侧接:i)至少一个选择性标记或如在某些双载体RMCE中的“分裂选择性标记”;和/或ii)至少一个外源SOI。

[0885] RMCE涉及靶标基因组基因座内的两个异种特异性RRS与供体DNA分子之间的双重重组交叉事件,这些事件由重组酶催化。RMCE被设计成将来自组合的前载体和后载体的DNA序列的拷贝引入哺乳动物细胞基因组的预定基因座中。与仅涉及一次交叉事件的重组不同,RMCE可以实现为使得原核载体序列不被引入哺乳动物细胞的基因组中,从而减少和/或防止不必要的触发宿主免疫或防御机制。RMCE过程可以用多个DNA序列重复。

[0886] 在某些实施例中,靶向整合通过两次RMCE实现,其中两种不同的DNA序列均整合到

适用于TI的哺乳动物细胞的基因组的预定位点中,其中每种DNA序列均包含至少一个编码异源多聚体多肽的一部分的表达盒和/或至少一个侧接两个异种特异性RRS的选择性标记或其部分。在某些实施例中,靶向整合通过多次RMCE实现,其中来自多个载体的DNA序列全部整合到适用于TI的哺乳动物细胞的基因组的预定位点中,其中每种DNA序列均包含至少一个编码异源多聚体多肽的一部分的表达盒和/或至少一个侧接两个异种特异性RRS的选择性标记或其部分。在某些实施例中,该选择性标记可以在第一载体上部分编码并且在第二载体上部分编码,使得只有通过双RMCE正确整合两者才能够表达该选择性标记。这种系统的一个示例呈现于图1中。

[0887] 在某些实施例中,经由重组酶介导的重组进行的靶向整合导致多聚体多肽的选择性标记和/或不同的表达盒整合到不含来自原核载体的序列的宿主细胞基因组的一个或多个预定整合位点中。

[0888] 除了所描绘和要求保护的各种实施例之外,所公开的主题还涉及具有本文所公开和要求保护的特征的其他组合的其他实施例。这样,本文所呈现的特定特征可以在所公开的主题的范围内以其他方式彼此组合,使得所公开的主题包括本文所公开的特征的任何合适的组合。出于图示和描述的目的,已经呈现了所公开主题的具体实施例的前文描述。其并不旨在穷举或将所公开的主题限制为所公开的那些实施例。

[0889] 对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离所公开主题的精神或范围的情况下,可以对所公开主题的组成和方法进行各种修改和变化。因此,其意图为,所公开的主题包括在所附权利要求及其等同内容的范围内的修改和变化。

[0890] 本文引用了各种出版物、专利和专利申请,其内容通过引用整体合并于本文。

[0891] 提供以下实例和附图以帮助理解本发明,本发明的真正范围在所附权利要求书中阐明。

#### [0892] 序列描述

[0893] SEQ ID NO:01:L3重组酶识别序列的示例性序列

[0894] SEQ ID NO:02:2L重组酶识别序列的示例性序列

[0895] SEQ ID NO:03:LoxFas重组酶识别序列的示例性序列

[0896] SEQ ID NO:04-06:人CMV启动子的示例性变体

[0897] SEQ ID NO:07:示例性SV40多聚腺苷酸化信号序列

[0898] SEQ ID NO:08:示例性bGH多聚腺苷酸化信号序列

[0899] SEQ ID NO:09:示例性hGT终止子序列

[0900] SEQ ID NO:10:示例性SV40启动子序列

[0901] SEQ ID NO:11:示例性GFP核酸序列

#### [0902] 实例

##### [0903] 实例1

[0904] 一般技术

##### [0905] 1) 重组DNA技术

[0906] 使用标准方法来操纵DNA,如描述于Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y,(1989)。根据制造商的说明来使用分子生物学试剂。

[0907] 2) DNA序列测定

[0908] DNA测序在SequiServe GmbH (Vaterstetten, Germany) 进行

[0909] 3) DNA和蛋白质序列分析及序列数据管理

[0910] EMBOSS (欧洲分子生物学开放软件套件) 软件包和Invitrogen的Vector NTI 11.5版或Geneious Prime用于序列创建、映射、分析、注释和图示。

[0911] 4) 基因和寡核苷酸合成

[0912] 在Geneart GmbH (Regensburg, Germany) 通过化学合成制备所需的基因片段。将合成的基因片段克隆到大肠杆菌质粒中进行繁殖/扩增。通过DNA测序来验证亚克隆基因片段的DNA序列。替代地,通过对化学合成的寡核苷酸进行退火或通过PCR来组装短的合成DNA片段。各个寡核苷酸由metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Germany) 制备。

[0913] 5) 试剂

[0914] 如果没有另外说明,所有商业化学品、抗体和试剂盒均按照制造商的方案使用。

[0915] 6) TI宿主细胞系的培养

[0916] TI CHO宿主细胞在37°C在湿度为85%和5%CO<sub>2</sub>的加湿孵育箱中培养。它们在含有300µg/ml潮霉素B和4µg/ml第二选择标志物物的专有DMEM/F12培养基中培养。每3或4天以0.3x10<sup>6</sup>细胞/ml浓度总体积30ml对细胞进行传代。对于培养,使用了125ml无挡板锥形摇瓶。细胞以150rpm的速度振荡,振荡幅度为5cm。细胞计数用Cedex HiRes Cell Counter (Roche) 测定。将细胞保持在培养物中直到它们达到60天的时龄。

[0917] 7) 克隆

[0918] 常规

[0919] 使用R位点进行克隆取决于目标基因 (SOI) 旁边的DNA序列,其等于位于以下片段中的序列。类似地,通过相同序列的重叠和随后由DNA连接酶密封组装的DNA中的切口,片段的组装是可能的。因此,有必要克隆单个基因,特别是包含正确R位点的初步载体。在成功克隆这些初步载体后,通过直接在R位点旁边切割的酶,通过限制性消化将位于R位点侧翼的目标基因切掉。最后一步是一步组装所有DNA片段。更详细地说,5'-核酸外切酶去除重叠区域 (R-位点) 的5'-末端。之后,可以进行R位点的退火,DNA聚合酶延伸3'末端以填补序列中的空白。最后,DNA连接酶密封核苷酸之间的缺口。添加包含不同酶(如外切核酸酶、DNA聚合酶和连接酶)的组装预混液,随后在50°C孵育反应混合物,将这些单个片段组装成一个质粒。之后,用质粒转化感受态大肠杆菌细胞。

[0920] 对于某些载体,使用了通过限制酶的克隆策略。通过选择合适的限制性内切酶,可以切下目标基因,然后通过连接将其插入不同的载体中。因此,优选使用在多克隆位点 (MCS) 切割的酶,并以巧妙的方式选择,以便可以在正确的阵列中进行片段的连接。如果载体和片段之前用相同的限制酶切割,片段和载体的粘性末端会完美地契合在一起,随后可以通过DNA连接酶连接。连接后,用新生成的质粒转化感受态大肠杆菌细胞。

[0921] 通过限制性消化进行克隆

[0922] 为了用限制性内切酶消化质粒,在冰上将以下组分移液在一起:

[0923] 表:限制性消化反应混合物

组分	ng (设定点)	μl
纯化的 DNA	待测定	待测定
CutSmart 缓冲剂 (10x)		5
限制酶		1
PCR-级水		ad 50
总计		50

[0925] 如果在一次消化中使用更多酶,则使用1μl每种酶,并通过添加更多或更少的PCR级水来调整体积。选择所有酶的前提是它们有资格与来自new England Biolabs的CutSmart缓冲剂(100%活性)一起使用并且具有相同的孵育温度(均为37℃)。

[0926] 使用热混合器或热循环仪进行孵育,允许在恒定温度(37℃)孵育样品。在孵育期间,不搅动样品。孵育时间设定为60分钟。然后将样品直接与加载染料混合并加载到琼脂糖电泳凝胶上或在4℃/冰上储存以备进一步使用。

[0927] 制备1%琼脂糖凝胶用于凝胶电泳。因此,将1.5g多用途琼脂糖称重到125锥形摇瓶中,并填充150ml TAE缓冲剂。在微波炉中加热混合物直至琼脂糖完全溶解。将0.5μg/ml 溴化乙锭加入琼脂糖溶液中。此后将凝胶浇铸在模具中。琼脂糖凝固后,将模具放入电泳室,并用TAE缓冲剂装填电泳室。之后加载样品。在第一个口袋中(从左侧开始),加载适当的DNA分子量标记,然后是样品。凝胶在<130V下运行约60分钟。电泳后,将凝胶从腔室中取出并在紫外成像仪中进行分析。

[0928] 目标条带被切割并转移到1.5ml Eppendorf管中。对于凝胶的纯化,根据制造商的说明使用来自Qiagen的QIAquick凝胶回收试剂盒。将DNA片段储存在-20℃以备进一步使用。

[0929] 用于连接的片段以1:2、1:3或1:5的载体插入片段摩尔比移液到一起,这取决于插入片段和载体片段的长度以及它们彼此之间的相关性。如果应该插入到载体中的片段很短,则使用1:5的比例。如果插入片段较长,则与载体相关地使用较少量的插入片段。每次连接使用50ng载体量,并使用NEBioCalculator计算特定数量的插入片段。对于连接,使用来自NEB的T4 DNA连接试剂盒。下表描述了连接混合物的一个实例:

[0930] 表:连接反应混合物

组分	ng (设定点)	浓度[纳克/微升]	μl
T4 DNA 连接酶缓冲剂 (10x)			2
载体 DNA (4000 bp)	50	50	1
插入 DNA (2000 bp)	125	20	6.25
无核酸酶水			9.75
T4 连接酶			1
总计			20

[0932] 从混合DNA和水开始,加入缓冲剂,最后加入酶,将所有组分在冰上移液在一起。通过上下吹打轻轻混合反应液,短暂微量离心,然后在室温孵育10分钟。孵育后,将T4连接酶在65℃加热灭活10分钟。样品在冰上冷却。在最后一步中,10-β感受态大肠杆菌细胞用2μl

连接的质粒转化(见下文)。

[0933] 通过R位点组装进行克隆

[0934] 为了组装,在冰上将所有末端带有R位点的DNA片段移液在一起。当组装超过4个片段时,按照制造商的建议,使用等摩尔比(0.05ng)的所有片段。反应混合物的一半由NEBuilder HiFi DNA组装预混液体现。总反应体积为40 $\mu$ l,并通过填充PCR清洁水达到。在下表中描述了示例性移液方案。

[0935] 表:组装反应混合物

组分	bp	pmol (设定点)	ng (设定点)	浓度[纳 克/微升]	$\mu$ l
插入片段 1	2800	0.05	88.9	21	4.23
插入片段 2	2900	0.05	90.5	35	2.59
插入片段 3	4200	0.05	131.6	35.5	3.71
插入片段 4	3600	0.05	110.7	23	4.81
载体	4100	0.05	127.5	57.7	2.21
NEBuilder HiFi DNA 组装预混液					20
PCR-清洁水					2.45
总计					40

[0937] 反应混合物建立后,将试管在热循环仪中在恒定的50 $^{\circ}$ C孵育60分钟。成功组装后,用2 $\mu$ l组装的质粒DNA转化10- $\beta$ 感受态大肠杆菌(见下文)。

[0938] 转化10- $\beta$ 感受态大肠杆菌细胞

[0939] 为了转化,将10- $\beta$ 感受态大肠杆菌细胞在冰上解冻。之后,将2 $\mu$ l质粒DNA直接移入细胞悬液中。轻弹试管并置于冰上30分钟。此后,将细胞放入42 $^{\circ}$ C温暖的热块中并热激准确地30秒。紧接着,将细胞在冰上冷却2分钟。将950 $\mu$ l NEB 10- $\beta$ 生长培养基加入细胞悬液中。将细胞在37 $^{\circ}$ C振荡孵育一小时。然后,将50-100 $\mu$ l移液到预热(37 $^{\circ}$ C)LB-Amp琼脂平板上并用一次性抹刀涂抹。将板在37 $^{\circ}$ C孵育过夜。只有成功掺入携带氨苄青霉素抗性基因的质粒的细菌才能在该平板上生长。次日挑取单菌落并在LB-Amp培养基中培养用于随后的质粒制备。

[0940] 细菌培养

[0941] 大肠杆菌的培养在LB培养基(Luria Bertani的简称)中进行,该培养基中加入1ml/L 100mg/ml氨苄青霉素,导致氨苄青霉素浓度为0.1mg/ml。对于不同的质粒制备量,用单个细菌菌落接种以下量。

[0942] 表:大肠杆菌培养体积

数量质粒制备	体积LB-Amp培养基[mL]	孵育时间[h]
Mini-Prep 96-孔(EpMotion)	1,5	23
Mini-Prep 15ml-管	3,6	23
Maxi-Prep	200	16

[0944] 对于Mini-Prep,96孔2ml深孔板每孔填充1.5ml LB-Amp培养基。挑取菌落并将牙签塞入培养基中。挑取所有菌落后,用粘性空气多孔膜将板封闭。将细胞在200rpm振荡速度在孵育器中37 $^{\circ}$ C孵育23小时。

[0945] 对于Mini-Prep,在15ml管(带通风盖)中装入3.6ml LB-Amp培养基并同样接种细菌菌落。在孵化过程中,牙签没有被移除,而是留在管中。与96孔板一样,试管在37℃、200rpm孵育23小时。

[0946] 对于Maxi-Prep,将200ml LB-Amp培养基装入高压灭菌的1L Erlenmeyer玻璃烧瓶中,并接种1ml大约5小时龄的细菌日间培养物。锥形瓶用纸塞封闭并在37℃、200rpm孵育16小时。

#### [0947] 质粒制备

[0948] 对于Mini-Prep,将50μl细菌悬液转移到1ml深孔板中。之后,将细菌细胞在平板中以3000rpm、4℃离心5分钟。去除上清液,将带有细菌团块的平板置于EpMotion中。在大约90分钟后之后运行完成,可以从EpMotion中取出经洗脱质粒DNA以供进一步使用。

[0949] 对于Mini-Prep,从孵育箱中取出15ml管,并将3.6ml细菌培养物分成两个2ml Eppendorf管。在室温,在台式微量离心机中以6,800xg将管离心3分钟。之后,根据制造商的说明使用Qiagen QIAprep Spin Miniprep试剂盒进行Mini-Prep。用Nanodrop测量质粒DNA浓度。

[0950] Maxi-Prep是根据制造商的说明使用Macherey-Nagel **NucleoBond®** Xtra Maxi EF试剂盒进行的。用Nanodrop测量DNA浓度。

#### [0951] 乙醇沉淀

[0952] 将一定体积的DNA溶液与2.5倍体积的100%乙醇混合。将混合物在-20℃孵育10分钟。然后以14,000rpm,4℃将DNA离心30分钟。小心去除上清液,用70%乙醇洗涤沉淀。再次以14,000rpm,4℃将管离心5分钟。通过移液小心除去上清液并干燥沉淀。待乙醇蒸发后,加入适量的无内毒素水。给予DNA时间在4℃重新溶解在水中过夜。取一小部分并用Nanodrop装置测量DNA浓度。

#### [0953] 实例2

##### [0954] 质粒生成

##### [0955] 表达盒组成

[0956] 为了表达抗体链,使用了包含以下功能元件的转录单元:

[0957] -来自人类巨细胞病毒的即刻早期增强子和启动子,包括内含子A,

[0958] -人重链免疫球蛋白5'-非翻译区(5'UTR),

[0959] -鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[0960] -编码相应抗体链的核酸,

[0961] -牛生长激素聚腺苷酸化序列(BGH pA),和

[0962] -任选地,人胃泌素终止子(hGT)。

[0963] 除了包括所希望的待表达基因的表达式/盒外,基础/标准哺乳动物表达质粒还包含

[0964] -来自载体pUC18的复制起点,其允许在大肠杆菌中进行该质粒的复制,以及

[0965] -B-内酰胺酶基因,其赋予大肠杆菌中的氨苄青霉素抗性。

##### [0966] 前载体和后载体克隆

[0967] 为构建双质粒抗体构建体,将抗体HC和LC片段克隆到包含L3和LoxFAS序列的前载体骨架以及包含LoxFAS和2L序列与pac选择标志物的后载体中。Cre重组酶质粒pOG231

(Wong, E.T., et al., *Nucleic Acids Res* 2005, 33, (17), e147; O'Gorman S et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, (26), 14602-7) 用于所有RMCE过程。

[0968] 通过基因合成(Geneart, Life Technologies Inc.)产生编码各个抗体链的cDNA。在37°C下用HindIII-HF和EcoRI-HF(NEB)将基因合成载体和骨架载体消化1小时,并且通过琼脂糖凝胶电泳分离。从琼脂糖凝胶切下插入物和骨架的DNA片段,并且通过QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen)提取。经纯化的插入片段和骨架片段经由快速连接试剂盒(Roche),按照制造商的方案以3:1的插入片段/骨架比连接。然后经由在42°C下热激30秒将连接方法转化到感受态大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中,并且在37°C下温育1小时,之后将它们铺板在含有氨苄青霉素的琼脂平板上以供选择。在37°C下将平板温育过夜。

[0969] 第二天,挑取克隆并且在37°C下振荡温育过夜,以进行最小量制备或最大量制备,这两种制备分别是用EpMotion®5075(Eppendorf)或QIAprep Spin Mini-Prep试剂盒(Qiagen)/NucleoBond Xtra Maxi EF试剂盒(Macherey&Nagel)来进行的。对所有构建体进行测序,以确保不存在任何不需要的突变(SequiServe GmbH)。

[0970] 在第二个克隆步骤中,用KpnI-HF/SalI-HF和SalI-HF/MfeI-HF消化先前克隆的载体,条件与第一次克隆相同。用KpnI-HF和MfeI-HF消化TI骨架载体。如上所述进行分离和提取。按照制造方案,使用T4 DNA连接酶(NEB)以1:1:1的插入物/插入物/骨架比在4°C下过夜,来将经纯化的插入物和骨架连接,并且在65°C下灭活10min。如上所述进行以下克隆步骤。

[0971] 克隆的质粒用于TI转染和池生成。

[0972] 实例3

[0973] 培养、转染、选择和单细胞克隆

[0974] TI宿主细胞在标准加湿条件(95%rH、37°C和5%CO<sub>2</sub>)下以150rpm的恒定搅拌速率在基于DMEM/F12的专有培养基中在一次性125ml通风摇瓶中繁殖。每3-4天将细胞接种在化学成分确定的培养基中,该培养基含有有效浓度的选择标志物1和选择标志物2,浓度为3x10<sup>5</sup>细胞/ml。用Cedex HiRes细胞计数器(F.Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)测量培养物的密度和活力。

[0975] 为了稳定转染,将等摩尔量的前后载体混合。将1 $\mu$ g Cre表达质粒加入5 $\mu$ g混合物中。

[0976] 转染前两天将TI宿主细胞以4x10<sup>5</sup>细胞/ml的密度接种在新鲜培养基中。根据制造商的方案,使用Nucleofector Kit V(Lonza, Switzerland)通过Nucleofector装置进行转染。3x10<sup>7</sup>细胞用30 $\mu$ g质粒转染。转染后,将细胞接种在不含选择剂的30ml培养基中。

[0977] 接种后第5天,将细胞离心并转移到80ml化学成分确定的培养基中,其含有嘌呤霉素(选择剂1)和1-(2'-脱氧-2'-氟代-1- $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖基-5-碘)尿嘧啶(FIAU;选择剂2),有效浓度为6x10<sup>5</sup>细胞/ml,用于选择重组细胞。从这一天起,将细胞在37°C、150rpm、5%CO<sub>2</sub>和85%湿度下孵育,其间不传代。定期监测培养物的细胞密度和活力。当培养物的活力再次开始增加时,选择剂1和2的浓度减少到之前使用量的大约一半。更具体地,为了促进细胞的回收,如果活力>40%并且活细胞密度(VCD)>0.5x10<sup>6</sup>个细胞/ml,则降低选择压力。因此,将4x10<sup>5</sup>个细胞/ml离心并且重悬在40ml选择性培养基II(化学成分确定的培养基,1/2选择性标记1和2)中。将细胞在与之前相同的条件下温育,并且也不分裂。

[0978] 开始选择十天后,通过流式细胞术测量细胞内GFP的表达和细胞外三价抗体(TCB)与细胞表面结合,检查Cre介导的盒交换是否成功。针对人抗体轻链和重链的APC抗体(别藻蓝蛋白标记的F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗人IgG)用于FACS染色。使用BD FACS Canto II流式细胞仪(BD,Heidelberg,Germany)进行流式细胞术。测量了每个样品的一万个事件。活细胞在前向散射(FSC)对侧向散射(SSC)图中设门。活细胞门由未转染的TI宿主细胞定义,并通过使用FlowJo 7.6.5EN软件(TreeStar,Olten,Switzerland)应用于所有样品。在FITC通道中量化GFP的荧光(在488nm处激发,在530nm处检测)。在APC通道中测量三价抗体(TCB)(在645nm处激发,在660nm处检测)。亲本CHO细胞,即用于产生TI宿主细胞的那些细胞,用作关于GFP和三价抗体(TCB)表达的阴性对照。选择开始后十四天,活力超过90%,认为选择完成。

#### [0979] 实例4

#### [0980] FACS筛选

[0981] 进行FACS分析以检查转染效率和转染的RMCE效率。将转染方法的 $4 \times 10^5$ 个细胞离心(1200rpm,4min),并且用1mL PBS洗涤两次。在用PBS进行的洗涤步骤之后,将沉淀物再悬浮于400 $\mu$ L PBS中并且转移到FACS管(带细胞滤网帽的Falcon<sup>®</sup>圆底试管;Corning)中。使用FACS Canto II进行测量,并且通过软件FlowJo分析数据。

#### [0982] 实例5

#### [0983] 补料分批培养

[0984] 在摇瓶或Ambr15容器(Sartorius Stedim)中,使用专有的化学成分确定的培养基进行分批进料生产培养。第0天,以 $1 \times 10^6$ 细胞/mL的密度接种细胞;第3天改变温度。在第3、7和10天,向培养物中添加专有的供料基质。在第0、3、7、10和14天,使用Vi-CellTMXR仪器(Beckman Coulter)测量培养物中的活细胞计数(VCC)和细胞活力百分比。在第7、10和14天,使用Bioprofile 400分析仪(Nova Biomedical)测量葡萄糖和乳酸浓度。在分批补料开始后14天,通过离心(10min,1000rpm,以及10min,4000rpm)收获上清液,并且通过过滤(0.22 $\mu$ m)使其澄清。第14天的滴度使用具有UV检测的蛋白A亲和色谱确定。

[0985] 产品质量由Caliper的LabChip(Caliper Life Sciences)确定。

#### [0986] 实例6

#### [0987] 载体设计的效果

[0988] 为了检查表达盒组织对TI宿主生产力的影响,RMCE库是通过转染两个质粒(前载体和后载体)产生的,包括TCB形式的三价抗体的单个链的不同数量和组织。在通过流式细胞术选择、回收并且验证RMCE后,在为期14天的分批进料生产试验中评估库的生产力。对于特定的载体组织,观察到与参考库相比滴度增加。

[0989] 评估了抗体链表达盒组织对五种不同TCB表达的影响。TCB 1到5都具有不同的靶向特异性。TCB 3用4个不同的抗CD3结合位点进行了测试。

[0990] 对于TCB-1,已获得以下结果;参考组织以灰色阴影表示:

TCB No.	5' 到 3' 方向的前载体表达盒				5' 到 3' 方向的后载体表达盒				滴度 [g/L]	% MP (CE-SDS)	eff.滴度 [g/L]	
	1	2	3	4	1	2	3	4				
1	<xl	<xl	<k	-	h	l	l	-	3.75	81	3.04	
[0991]	1	k	k	xl	xl	h	l	-	-	1.5	37.5	0.56
	1	k	xl	xl	-	h	l	-	-	3	75	2.25
	1	k	h	xl	l	k	l	-	-	2.75	81.5	2.24
	1	l	xl	k	h	h	l	l	-	2.09	56.3	0.98
	1	k	h	xl	l	h	l	l	-	2.6	80	2.08
	1	k	xl	xl	-	h	l	l	-	3.35	63	2.11
	1 参 考。	k	h	xl	l	-	-	-	-	1.98	89.6	1.58
	1	k	xl	-	-	h	l	l	-	1.9	74	1.41

TCB No.	5' 到 3' 方向的前载体表达盒				5' 到 3' 方向的后载体表达盒				滴度 [g/L]	% MP (CE-SDS)	eff.滴度 [g/L]
	1	2	3	4	1	2	3	4			
1 参考。	k	xl	-	-	h	l	-	-	1	12	0.12

1	k	h	xl	l	l	-	-	-	2.04	89.7	1.63
1 参考。	k	h	xl	l	-	-	-	-	1.98	89.6	1.58

1 参考。	k	xl	-	-	h	l	-	-	1	12	0.12
1 参考。	k	h	-	-	xl	l	-	-	1	72	0.72

[0992]

1	k	h	xl	l	k	l	-	-	2.75	81.5	2.24
1	k	h	xl	l	l	-	-	-	2.04	89.7	1.63
1	k	h	xl	l	xl	-	-	-	1.75	89.6	1.39
1	k	h	xl	l	k	-	-	-	1.72	89.4	1.38
1	k	h	xl	l	h	-	-	-	1.96	89.7	1.56
1 参考。	k	h	xl	l	-	-	-	-	1.98	89.6	1.58

1	l	xl	k	h	h	l	l	-	2.09	56.3	0.98
1 参考。	k	h	xl	l	-	-	-	-	1.98	89.6	1.58
1 参考。	l	xl	k	h	-	-	-	-	1.67	92.5	1.34

[0993] 对于TCB-3,已获得以下结果:

TCB No.	5' 到 3' 方向的前载体表达盒				5' 到 3' 方向的后载体表达盒				滴度 [g/L]	% MP (CE-SDS)	eff.滴度 [g/L]
	1	2	3	4	1	2	3	4			

3-1	k	l	l	-	xl	h	-	-	3.5	95	3.33
3-1	k	xl	l	-	xl	h	-	-	3	95	2.85
3-1	k	xl	l	-	h	l	l	-	3.7	68	2.52
3-1	k	xl	xl	-	h	l	l	-	3	65	1.95

[0994]

3-2	k	l	l	-	xl	h	-	-	2.95	95	2.8
3-2	k	xl	l	-	xl	h	-	-	2.6	93	2.42
3-2	k	xl	l	-	h	l	l	-	2.5	72	1.8
3-2	k	xl	xl	-	h	l	l	-	3.1	70	2.17

3-3	k	xl	l	-	xl	h	-	-	2.95	93	2.74
3-3	k	l	l	-	xl	h	-	-	2.6	93	2.42
3-3	k	xl	l	-	h	l	l	-	2.5	72	1.8
3-3	k	xl	xl	-	h	l	l	-	3.15	70	2.2

3-4	k	l	l	-	xl	h	-	-	3.35	95	3.18
3-4	k	xl	l	-	xl	h	-	-	2.75	95	2.61
3-4	k	xl	l	-	h	l	l	-	3.7	69	2.55
3-4	k	xl	xl	-	h	l	l	-	3.15	68	2.14

[0995] 对于TCB-2、-4和-5,已获得以下结果:

TCB No.	5' 到 3' 方向的前载体表达盒				5' 到 3' 方向的后载体表达盒				滴度 [g/L]	% MP (CE-SDS)	eff.滴度 [g/L]
	1	2	3	4	1	2	3	4			

[0996]

2	k	xl	l	-	h	l	xl	-	4.3	73	3.14
2	k	xl	xl	-	h	l	l	-	2.7	60	1.62
2	k	xl	k	-	l	l	h	-	0.9	74	0.67

4	k	xl	xl	-	h	l	l	-	2.16	76	1.64
4	k	xl	xl	-	h	l	-	-	1.02	19.5	0.81

TCB No.	5' 到 3' 方向的前载体表达盒				5' 到 3' 方向的后载体表达盒				滴度 [g/L]	% MP (CE-SDS)	eff.滴度 [g/L]
	1	2	3	4	1	2	3	4			
5	k	xl	xl	-	h	l	l	-	3,6	76	2.74
5	k	xl	xl	-	h	l	-	-	1.8	59	1.06

[0998] MP=主要产品, eff.Titer=有效滴度=滴度乘以%主要产品。

序列表

	<110> 豪夫迈·罗氏有限公司	
	<120> 通过以限定的组织形式靶向整合多个表达盒来产生三价抗体表达细胞的方法	
	<130> P35597-W0	
	<150> EP19181095.1	
	<151> 2019-06-19	
	<160> 11	
	<170> PatentIn 版本 3.5	
	<210> 1	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> L3	
	<400> 1	
	ataacttcgt ataaagtctc ctatacgaag ttat	34
	<210> 2	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 2L	
[0001]	<400> 2	
	ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat	34
	<210> 3	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> loxFas	
	<400> 3	
	acaacttcgt atataccttt ctatacgaag ttgt	34
	<210> 4	
	<211> 608	
	<212> DNA	
	<213> 人巨细胞病毒	
	<400> 4	
	gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	60
	gcccataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc	120
	ccaacgaccc ccgccattg 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
	tattagtcac cgctattage atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat	420

	agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt	480
	tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc	540
	aaatgggagg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctccg tttagtgaac	600
	gtcagatc	608
	<210> 5	
	<211> 696	
	<212> DNA	
	<213> 人巨细胞病毒	
	<400> 5	
	gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	60
	gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgccct ggctgaccgc	120
	ccaacgaccc ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	180
	ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac	240
	atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccg	300
	cctggcatta tgcccagtac atgacctat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	360
	tattagtcat cgctattagc atgggtgatg ggttttgca gtacatcaat gggcgtggat	420
	agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt	480
	tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc	540
	aaatgggagg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctccg tttagtgaac	600
	gtcagatccta gctctgggag aggagcccag cactagaagt cggcgggtgtt tccattcggt	660
	gatcagcact gaacacagag gaagcttgcc gccacc	696
	<210> 6	
[0002]	<211> 2125	
	<212> DNA	
	<213> 人巨细胞病毒	
	<400> 6	
	ctgcagtgaa taataaaatg tgtgtttgtc cgaatacgc gttttgagat ttctgtcgcc	60
	gactaaattc atgtcgcgcg atagtggtgt ttatcgccga tagagatggc gatattggaa	120
	aaatcgatat ttgaaaatat ggcataatga aaatgtcgcc gatgtgagtt tctgtgtaac	180
	tgatatcgcc atttttccaa aagtgatttt tgggcatacg cgatatctgg cgatagcgct	240
	tatatcgttt acgggggatg gcgatagacg actttggtga cttgggcgat tctgtgtgtc	300
	gcaaatatcg cagtttcgat ataggtgaca gacgatatga ggctatatcg ccgatagagg	360
	cgacatcaag ctggcacatg gccaatgcat atcgatctat acattgaatc aatattggcc	420
	attagccata ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca	480
	tacgttgat ccatatcata atatgtacat ttatattggt tcatgtccaa cattaccgcc	540
	atggtgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca attacgggt cattagttca	600
	tagcccatat atggagtcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc	660
	gccaacgac ccccgccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat	720
	agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt	780
	acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc	840
	cgctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta	900
	cgatttagtc atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg	960
	atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt	1020
	gttttggcac caaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac	1080

	gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa	1140
	ccgtcagatc gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga	1200
	ccgatccagc ctcccggcc gggaacgggtg cattggaacg cggattcccc gtgccaagag	1260
	tgacgtaagt accgcctata gagtctatag gcccaccccc ttggcttctt atgcatgcta	1320
	tactgttttt ggcttggggt ctatacacce ccgcttcctc atgttatagg tgatggtata	1380
	gcttagccta taggtgtggg ttattgacca ttattgacca ctcccctatt ggtgacgata	1440
	ctttccatta ctaatccata acatggctct ttgccacaac tctctttatt ggctataatgc	1500
	caatacactg tccttcagag actgacacgg actctgtatt tttacaggat ggggtctcat	1560
	ttattattta caaattcaca tatacaaac caccgtcccc agtgcccgca gtttttatta	1620
	aacataacgt gggatctcca cgcgaatctc gggtagctgt tccggacatg ggctcttctc	1680
	cggtagcggc ggagcttcta catccgagcc ctgtcccat gcctccagcg actcatggtc	1740
	gctcggcagc tccttgctcc taacagtgga ggccagactt aggcacagca cgatgcccac	1800
	caccaccagt gtgccgaca aggccgtggc ggtagggtat gtgtctgaaa atgagctcgg	1860
	ggagcgggct tgcaccgctg acgcatttgg aagacttaag gcagcggcag aagaagatgc	1920
	aggcagctga gttgttgtgt tctgataaga gtcagaggta actcccgttg cgggtctgtt	1980
	aacggtggag ggcagtgtag tctgagcagt actcgttgc gccgcgcgcg ccaccagaca	2040
	taatagctga cagactaaca gactgttcct ttccatgggt cttttctgca gtcaccgtcc	2100
	ttgacacggt ttaaacgccg ccacc	2125
	<210> 7	
	<211> 129	
	<212> DNA	
	<213> 猴病毒 40	
[0003]	<400> 7	
	aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca	60
	aataaagcat ttttttcacc attctagttag tggtttctcc aaactcatca atgtatctta	120
	tcatgtctg	129
	<210> 8	
	<211> 225	
	<212> DNA	
	<213> 牛	
	<400> 8	
	ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgccctc ccccgtcct tccttgacc	60
	tggaagggtc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc	120
	tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gggtagggca ggacagcaag ggggaggatt	180
	gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtagggctc tatgg	225
	<210> 9	
	<211> 73	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 9	
	caggataata tatggtaggg ttcatagcca gagtaacctt tttttttaat ttttatttta	60
	ttttattttt gag	73
	<210> 10	
	<211> 288	

	<212> DNA	
	<213> 猿病毒 40	
	<400> 10	
	agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca	60
	tgcattctcaa ttagtcagca accatagtc cccccctaac tccgccatc ccgccctaa	120
	ctccgccag ttcgccat tctccgcc atggctgact aattttttt atttatgcag	180
	aggccgagc cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag	240
	gcctagcctt ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatc cattttcg	288
	<210> 11	
	<211> 798	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 绿色荧光蛋白编码核酸	
[0004]	<400> 11	
	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
	ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
	ctcgtgacca ccctgacct cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggtacg tccaggagcg caccatcttc	300
	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgagg cgacaccctg	360
	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
	aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
	tacctgagca ccagtcgcg cctgagcaa gacccaacg agaagcgca tcacatggtc	660
	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaagtc	720
	ggactcagat ctcgagctca agcttcgaat tctgcagtcg acggtaccgc gggcccggga	780
	tccaccgat ctagatga	798

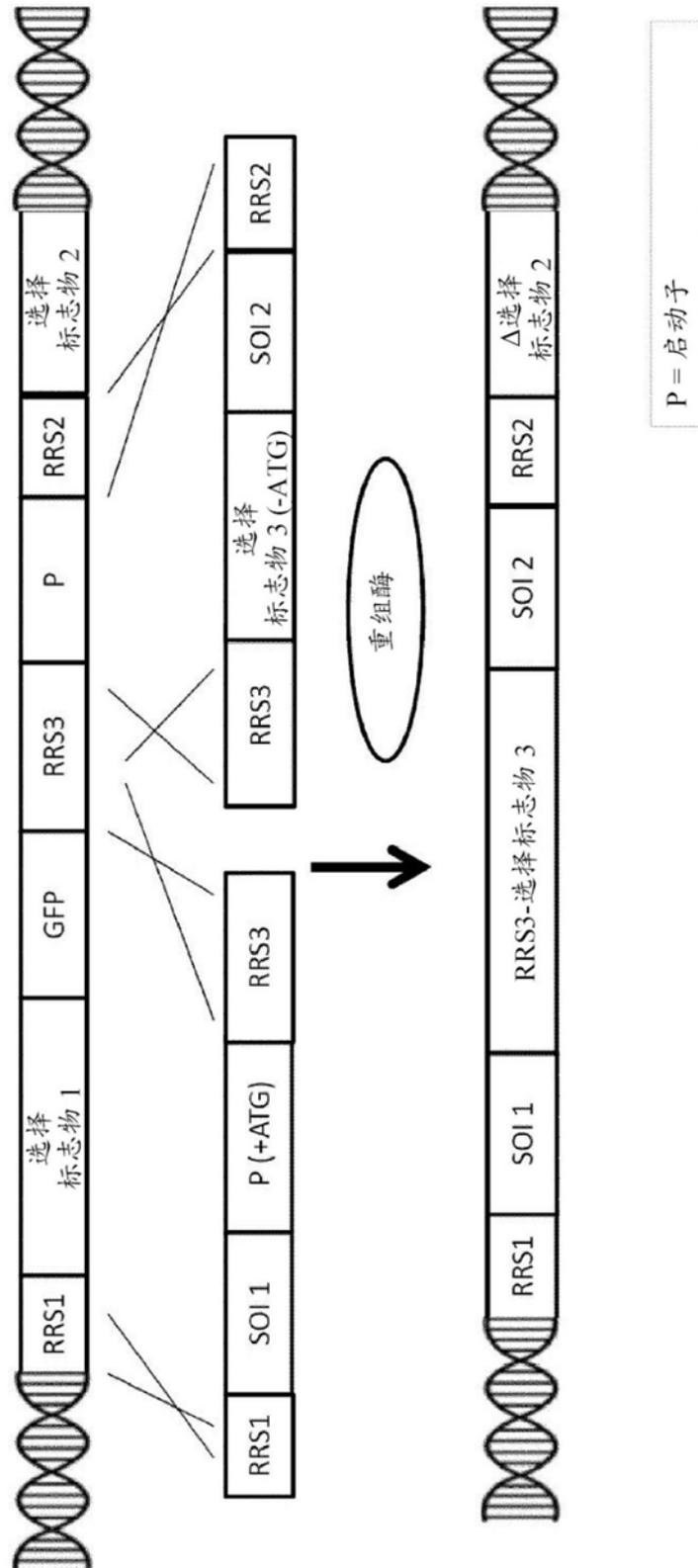


图1