



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114395584 B

(45) 授权公告日 2025.01.28

(21) 申请号 202111508425.X

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22) 申请日 2014.04.29

72001

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 罗文锋 彭昶

申请公布号 CN 114395584 A

(51) Int.CI.

C12N 15/85 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.04.26

C12N 15/62 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/30 (2006.01)

1308017.1 2013.05.03 GB

C07K 16/06 (2006.01)

1320339.3 2013.11.18 GB

(56) 对比文件

(62) 分案原申请数据

WO 03093295 A2, 2003.11.13

201480024993.4 2014.04.29

WO 2012173344 A2, 2012.12.20

(73) 专利权人 富士胶片戴奥辛思生物技术英国
有限公司

审查员 张婷

地址 英国比灵赫姆

(72) 发明人 F · L · 桑德斯 A · L · 多兹
A · M · G · 贝亚德 B · V · 卡拉

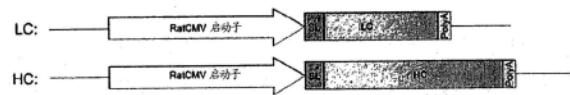
权利要求书1页 说明书7页

序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

表达盒的结构

表达方法



(57) 摘要

本申请涉及表达方法。具体而言，本申请提供了生产靶多肽的方法。该方法包括表达在宿主细胞中，优选在哺乳动物细胞中表达靶多肽的表达载体，以及回收该靶多肽，所述表达载体包括表达盒，该表达盒含有编码与纤连蛋白分泌前导序列可操作地连接的重组多肽的多核苷酸。

1

1. 生产靶重组多肽的方法,其包括:

(a) 在CHO宿主细胞中表达用于表达靶重组多肽的表达载体,所述表达载体包括表达盒,该表达盒含有编码与中国仓鼠纤连蛋白分泌前导序列可操作地连接的所述靶重组多肽的多核苷酸,其中所述纤连蛋白分泌前导序列为MLRGPGPGLLLAVLCLGTAVRCTEA;和

(b) 回收所述靶重组多肽。

2. 生产靶多肽的方法,其包括:

(a) 用在宿主细胞中表达靶多肽的表达载体转染CHO宿主细胞,该表达载体含有表达盒,该表达盒含有编码与中国仓鼠纤连蛋白分泌前导序列可操作地连接的所述靶多肽的多核苷酸,其中所述纤连蛋白分泌前导序列为MLRGPGPGLLLAVLCLGTAVRCTEA;

(b) 在允许所述宿主细胞增殖和从所述宿主细胞中表达和分泌所述靶多肽的条件下培养所述宿主细胞;和

(c) 回收所述靶多肽。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述表达盒包括hEF1 α 启动子。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述表达盒包括polyA序列。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述polyA序列选自人 β 珠蛋白polyA、牛生长激素polyA、SV40早期或晚期polyA序列。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述靶重组多肽或靶多肽为单克隆抗体的轻链和重链,并且利用了两个表达盒,一个表达盒含有编码所述单克隆抗体的轻链的多核苷酸,第二个表达盒含有编码所述单克隆抗体重链的多核苷酸。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述两个表达盒包括相同的启动子、分泌前导序列和polyA序列。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述启动子是hEF1 α 启动子,和所述polyA序列是牛 β 珠蛋白polyA序列。

表达方法

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2014年4月29日,申请号为201480024993.4 (PCT/GB2014/000165),发明名称为“表达方法”。

技术领域

[0002] 本发明涉及表达重组多肽,特别是分泌重组多肽的方法。

背景技术

[0003] 如果目的多肽可以从它在其中表达的细胞中输出,这在重组多肽的生产中是明显有益的。因此,将表达系统有利地设计成使得这样的输出或分泌可行。从宿主细胞中分泌重组多肽通常涉及信号肽的使用,所述信号肽存在于注定用于从细胞质中输出的大多数真核生物和原核生物蛋白质中。用于这样的表达系统中的分泌前导区通常对于表达宿主而言是天然的,例如,大肠杆菌的PhoA、MalB和OmpA信号肽已经广泛用于将多肽分泌到该生物体的胞外周质中。

[0004] US7,071,172描述了用于基因治疗的基于AAV的递送载体中的纤连蛋白分泌前导区的用途。

发明内容

[0005] 根据本发明的第一方面,提供了生产靶多肽的方法,所述方法包括:

[0006] a) 表达在宿主细胞中表达靶多肽的表达载体,该表达载体包括表达盒,所述表达盒包括编码与纤连蛋白分泌前导序列或其功能等同物可操作地连接的重组多肽的多核苷酸;和

[0007] b) 回收靶多肽。

[0008] 可以用于本发明的纤连蛋白前导区包括哺乳动物和爬行动物纤连蛋白分泌前导区。爬行动物纤连蛋白分泌前导区的实例包括非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)纤连蛋白分泌前导区。哺乳动物纤连蛋白分泌前导区的实例包括人,大鼠,鼠,牛,猪,犬,猫和中国仓鼠纤连蛋白分泌前导区,和其功能等同物,例如具有序列MLRGPGPGLLLAVQCLGTAVPSTGA (SEQ ID No. 1) 的人纤连蛋白分泌前导区。在某些实施方案中,优选具有氨基酸序列MLRGPGPGLLLAVLCLGTAVRCTEA (SEQ ID No. 2) 的中国仓鼠纤连蛋白分泌前导区和其功能等同物。

[0009] 分泌前导区的功能等同物是与氨基酸序列共享70%或更大同一性,优选75%或更大同一性,更优选80%或更大同一性,和最优选90%或更大同一性,如95%或更多,并且保留了分泌重组多肽的能力的氨基酸序列。在一些实施方案中,功能等同的分泌前导区通过任何加入,缺失或替代而相差单个氨基酸。

[0010] 在许多实施方案中,可操作地连接的多核苷酸序列是相邻接的,并且在分泌前导区的情况下,是邻接的并且在同一个读码框内。

[0011] 优选地,编码纤连蛋白分泌前导区的多核苷酸和编码靶多肽的多核苷酸之间的连

接为分泌前导区连接于重组多肽的N末端。在某些实施方案中，重组多肽包含N末端标签，分泌前导序列和编码重组多肽的多核苷酸之间的连接，其中分泌前导区附着于标签，优选附着于标签的N末端。

[0012] 编码纤连蛋白分泌前导序列的多核苷酸优选地连接于编码靶多肽的多核苷酸的5'末端，并且优选具有序列ATGCTGAGAGGCCCTGGACCTGGACTGCTGCTGGCTGTGCAGTGTCTGGG AACCGCCGTGCCCTCTACCGGCGCC (SEQ ID No. 3) 或ATGCTCAGGGTCCGGGACCCGGGCTGCTGCTGGCC GTCCCTGTGCCTGGGACAGCGGTGCGCTGTACCGAAGGCC (SEQ ID No. 4)。

[0013] 本发明的载体包括与分泌前导区和重组多肽的表达盒可操作地连接的启动子。

[0014] 根据表达盒要在其中表达的宿主细胞来选择可以用于本发明的载体的启动子。

[0015] 可以用于原核生物宿主细胞中的启动子包括噬菌体聚合酶启动子，如单个T7启动子区，包括由Studier和Moffat，在J.Mol.Biol.189:113-130 (1986) 中公开的那些，其通过引用并入本文之中，尤其是T7基因10启动子区和宿主聚合酶启动子，特别是大肠杆菌聚合酶启动子，如T7A1、T7A2、T7A3、 λ pL、 λ pR、lac、lacUV5、trp、tac、trc、phoA和rrnB。

[0016] 当利用T7 RNA-聚合酶依赖性启动子区时，会认识到的是需要T7 RNA聚合酶源，其通过本领域已知的方法来提供，并且通常通过向宿主菌株插入表达所需的噬菌体聚合酶的 λ DE3原噬菌体，以产生产噬的宿主菌株而提供。T7 RNA聚合酶也可以通过用携带T7RNA聚合酶的基因的特化的 λ 转导噬菌体感染而递送到细胞。

[0017] 可以用于酵母宿主细胞的启动子包括gal启动子和AOX启动子，如AOX1和AOX2、GAP (甘油醛3-磷酸脱氢酶)、FLP (甲醛脱氢酶) 和GAL1和GAL10。

[0018] 可以用于哺乳动物宿主细胞的启动子对于宿主细胞而言是内源性的或外源性的。合适的启动子包括病毒启动子如CMV, SV40启动子和RSR-LTR。也可以使用来自管家基因的启动子如hEF1 α 和鼠磷酸甘油酸激酶(mPGK)的启动子。在一些实施方案中，优选的启动子是人CMV和大鼠CMV。如果一个以上的多肽要表达(例如MAbHC和LC多肽)，启动子可以相同或不同。启动子可以与增强子序列组合使用，所述增强子例如巨细胞病毒，特别是人巨细胞病毒的主要即时早期增强子。

[0019] 可以将表达载体整合进宿主细胞基因组或包含于染色体外元件如质粒。

[0020] 表达载体通常也含有对于该载体要在其中表达的宿主细胞合适的选择性标志物。用于原核宿主细胞的选择性标志物包括抗生素抗性标志物，如四环素或卡那霉素抗性标志物。用于酵母宿主中的选择性标志物包括抗生素抗性标志物，如Zeocin、嘌呤霉素、新霉素和潮霉素抗性。用于哺乳动物细胞，特别是中国仓鼠卵巢细胞的选择性标志物包括谷氨酰胺合成酶和二氢叶酸还原酶标志物系统。

[0021] 所使用的载体包括本领域常规的适于在合适的宿主细胞中表达的特征。原核表达载体通常包括复制原点，限制性酶位点，转录终止子和质粒稳定性基因座，如cer稳定性序列。酵母表达载体通常包括启动子，转录终止子，选择标志物，和如果复制，包括复制原点。哺乳动物表达载体通常包括聚腺苷酸化序列，如人 β 珠蛋白聚A序列，牛生长激素聚A序列，和SV40早期或晚期聚A序列。

[0022] 本发明的表达载体可以用于在宿主细胞内表达重组多肽，特别是蛋白质。可以利用原核生物，特别是真核生物的宿主细胞。原核生物细胞的实例包括细菌细胞，例如革兰氏阴性细菌细胞，包括大肠杆菌(E.coli)，鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)，粘质

沙雷菌 (*Serratia marsescens*) , 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) , 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) , 和革兰氏阳性细菌细胞, 包括枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 。优选的原核宿主细胞是细菌, 特别是肠细菌, 优选地大肠杆菌, 特别是它的B或K12菌株。

[0023] 可以利用的真核宿主细胞的实例包括酵母, 哺乳动物和昆虫细胞。酵母宿主细胞特别包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) , 巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 和多形汉森酵母 (*Hansenula polymorpha*) .

[0024] 优选的宿主细胞是哺乳动物细胞, 如婴仓鼠肾细胞, 人胚胎肾细胞系, 例如HEK293细胞, 人视网膜来源细胞系, 例如PER C6细胞, 和鼠淋巴样细胞系, 例如NS0和SP2细胞。并且最优先的是中国仓鼠卵巢细胞, 并具体为CHOK1, DG44, DUXKB11和CHOpro3-细胞。

[0025] 本发明的表达载体通常以质粒形式使用。质粒可以是自主复制型质粒或整合型质粒。

[0026] 在本发明的某些高度优选的实施方案中, 对应于所使用的宿主细胞选择纤连蛋白分泌前导区。例如, 在来源于人类的细胞中使用人纤连蛋白, 在大鼠细胞中使用大鼠纤连蛋白, 特别是在中国仓鼠卵巢细胞中使用中国仓鼠纤连蛋白。

[0027] 通过本发明的方法可以表达的多肽包括治疗性蛋白质和肽, 其包括细胞因子、生长因子、抗体、抗体片段、免疫球蛋白样多肽、酶、疫苗、肽激素、趋化因子、受体、受体片段、激酶、磷酸酶、异构酶、水解酶、转录因子和融合多肽。

[0028] 可以表达的抗体包括单克隆抗体, 多克隆抗体和具有生物活性的抗体片段, 其包括前面所述的任一项的多价和/或多特异性形式。

[0029] 天然存在的抗体通常包括四个多肽链, 通过二硫键内部连接的两条相同的重链 (H) 和两条相同的轻链 (L) 。每条重链包括可变区 (V_H) 和恒定区 (C_H) , 所述 C_H 区以其天然形式包含三个区域, C_H1 , C_H2 和 C_H3 。每条轻链包括可变区 (V_L) 和包括一个结构域的恒定区, C_L 。

[0030] V_H 和 V_L 区可以进一步细分为被称为互补决定区 (CDR) 的高变性的区域, 其散置于被称为框架区域 (FR) 的更加保守的区域。每个 V_H 和 V_L 包含三个CDRs和四个FRs, 其从氨基末端至羧基末端以下面的顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0031] 可以表达的抗体片段包括完整抗体的一部分, 所述部分具有所需的生物学活性。抗体片段通常包括至少一个抗原结合位点。抗体片段的实例包括: (i) 具有 V_L 、 C_L 、 V_H 和 C_H1 结构域的Fab片段, ; (ii) Fab衍生物, 例如在 C_H1 结构域的C末端有一个或多个半胱氨酸残基的Fab' 片段, 其可以在两个Fab衍生物之间通过二硫键形成二价片段; (iii) 具有 V_H 和 C_H1 结构域的Fd片段; (iv) Fd衍生物, 如在 C_H1 结构域的C末端有一个或多个半胱氨酸残基的Fd衍生物; (v) 具有抗体的一个单臂的 V_L 和 V_H 结构域的Fv片段; (vi) 单链的抗体分子, 如其中 V_L 和 V_H 结构域是共价连接的单链Fv (scFv) 抗体; (vii) 与有或没有恒定区结构域的另一个可变区结构域 (V_H 或 V_L 结构域多肽) 连接的没有恒定区结构域的 V_H 或 V_L 结构域多肽 (例如 V_H-V_H 、 V_H-V_L 或 V_L-V_L); (viii) 结构域抗体片段, 例如由 V_H 结构域或 V_L 结构域以及 V_H 或 V_L 结构域的抗原结合片段, 例如分离的CDR区域组成的片段; (ix) 所谓的“二体”, 其包括两个抗原结合位点, 例如在同一多肽链中与轻链可变结构域 (V_L) 连接的重链可变结构域 (V_H); 和 (x) 所谓的线性抗体, 其包括一对串联的Fd片段, 所述的Fd片段与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区。

[0032] 可以制备的优选的抗体片段是哺乳动物单一可变结构域抗体, 其为含有折叠的多

肽结构域的抗体片段,所述的折叠的多肽结构域含有免疫球蛋白可变结构域特有的序列,并且其特异性地结合抗原(即,解离常数为500nM或更少,如400nM或更少,优选地250nM或更少,最优选地100nM或更少),并且其作为单一可变结构域结合抗原,即没有任何互补的可变结构域。单一可变结构域抗体包括完整的抗体可变结构域,和经修饰的可变结构域(例如,其中一个或多个环已经被不是抗体可变结构域特有的序列所替代,或者已经被截断的或含有N-或C末端延伸的抗体可变结构域),以及可变结构域的折叠片段。可以制备的优选单一可变结构域选自V_H和V_L,其包括V_{kappa}和V_{lambda}。最优选地,单一可变结构域是人或骆驼(camelid)的结构域,其包括人源化骆驼的结构域。

[0033] 当靶多肽含有待分泌的两个或更多个链时,特别是当靶多肽是包括两条或多条链的抗体或抗体片段时,至少一条或优选地各条链都连接到纤连蛋白分泌前导区,并且相应地设计编码这种多肽的多核苷酸。所使用的纤连蛋白分泌前导区可以是相同的或不同的。编码两条或多条链的多核苷酸可以包括在相同的表达盒中,但优选地包括在不同的表达盒中。当利用不同的表达盒时,表达盒可以位于不同的载体上,但优选位于相同的载体上。利用的启动子可以相同或不同。

[0034] 表达系统是针对所使用的细胞通过本领域周知的方法而表达。优选的表达方法包括在生长培养基中培养宿主细胞,然后回收表达的多肽。术语“生长培养基”指用于生长宿主细胞的营养培养基。在许多实施方案中,利用了营养溶液。对于给定的宿主细胞的合适的生长培养基和回收多肽的方法是本领域周知的。

[0035] 在许多实施方案中,多肽回收包括过滤,离心,渗滤,离子交换层析,亲和层析,如蛋白质A亲和层析、疏水相互作用层析(HIC)、凝胶过滤和HPLC中的一种或多种。

[0036] 根据本发明的优选的方面,提供了生产靶多肽的方法,该方法包括:

[0037] (a)用在宿主细胞中表达靶多肽的表达载体转染或转化宿主细胞,所述表达载体包括表达盒,该表达盒包括编码与纤连蛋白分泌前导序列或其功能等同物可操作地连接的靶多肽的多核苷酸;

[0038] (b)在允许宿主细胞的增殖和让靶多肽从宿主细胞表达和分泌的条件下培养宿主细胞,

[0039] (c)和回收靶多肽。

[0040] 根据本发明的其它方面,提供了中国仓鼠卵巢细胞,优选CHOK1、DG44、DUXKB11或CH0pro3-细胞,其用含有表达盒的表达载体转染,该表达盒含有编码与纤连蛋白分泌前导序列或其功能等同物可操作地连接的靶多肽的多核苷酸。

[0041] 在本发明的其它方面中编码的靶多肽优选包括单克隆抗体。可以利用含有编码单克隆抗体的重链和轻链二者并且优选二者各自与纤连蛋白分泌前导区可操作地连接的多核苷酸的表达盒。在一些实施方案中,利用分开的含有重链和轻链的表达盒,其可以位于分开的载体上,但经常位于同一载体上。利用的纤连蛋白分泌前导区可以是相同的或不同的,但优选地是相同的。

[0042] 在许多优选的实施方案中,表达盒包括管家基因启动子,特别是与编码靶多肽的多核苷酸可操作地连接的hEF1 α 启动子,并且当利用两个或更多个表达盒时,每个表达盒包括管家基因启动子,优选相同启动子,最优选hEF1 α 启动子。

[0043] 这个或各个靶多肽的表达盒优选地包括牛生长激素聚A序列。

[0044] 表达载体优选地包括选择标志物,最优先二氢叶酸还原酶标志物系统。在某些情况下,二氢叶酸还原酶标志物系统包括进一步含有鼠磷酸甘油酸激酶启动子的表达盒。

[0045] 包括含有在哺乳动物细胞中有效的启动子的表达盒和编码与纤连蛋白分泌前导序列可操作地连接的靶多肽的多核苷酸的DNA构建体构成本发明的另一方面。

[0046] DNA构建体优选地包括用于单克隆抗体的重链和轻链的分开的表达盒。最优先地,每个表达盒包括相同的启动子,特别是管家基因启动子,最特别的是hEF1 α 启动子。特别优先的是,每个表达盒进一步包括牛生长激素聚A序列。DNA构建体常常有利地包括选择标志物,最优先二氢叶酸还原酶标志物系统。在某些情况下,二氢叶酸还原酶的标志物系统包括进一步含有鼠磷酸甘油酸激酶启动子的表达盒。

附图说明

[0047] 图1显示了本发明的表达盒的结构。

具体实施方式

[0048] 通过下面的实施例来非限制地说明本发明。

[0049] 实施例1

[0050] 对于待评估的每个分泌前导区(SL),构建了两个单基因载体,其含有抗MUC-1 MAb的h γ 1FL重链(HC)或抗MUC-1 MAb的 λ 轻链(LC)。每个表达盒由与编码分泌前导区的多核苷酸序列功能性地连接的大鼠CMV启动子组成,所述分泌前导区连接到编码HC或LC成熟多肽的多核苷酸序列和人 β 珠蛋白聚A序列的阅读框中。表达盒的结构在图1中说明。

[0051] 利用的分泌前导区如下:

[0052] 分泌前导区A:人胶原蛋白,序列为MLSFVDTRTLLLLAVTLCLATCQS (SEQ ID No.5)

[0053] 分泌前导区B:人纤连蛋白,序列为MLRGPGPGLLLAVQCLGTAVPSTGA (SEQ ID No.1)

[0054] 分泌前导区C:中国仓鼠纤连蛋白,序列为MLRGPGPGLLLAVLCLGTAVRCTEA (SEQ ID No.2)

[0055] 分泌前导区D:中国仓鼠白蛋白,序列为MKWVTFLLLLFSVSDSAFS (SEQ ID No.6)

[0056] 对CHODG44宿主细胞计数,在6孔平板的孔中,以 1.2×10^6 个细胞/孔将细胞接种到补充有10%血清,2mM谷氨酰胺和0.45%葡萄糖的MEM- α 培养基中,在36.5°C,7.5%CO₂下过夜温育。

[0057] 对于每个转染,将4 μ g的HC和LC单基因载体(2 μ g)混合在一起,稀释于250微升的无血清的MEM- α 培养基(Life Technologies)中。也包括了一个模拟转染(只有PBS)。对于每个转染,在250微升无血清MEM- α 培养基中稀释12.5微升Lipofectamine 2000(Life Technologies)并混合。在室温(15-25°C)下温育该混合物5分钟。合并稀释的DNA和Lipofectamine 2000TM试剂,混合,并在室温下温育20分钟。加入另外的500微升MEM- α 培养基到每个转染混合物中,从孔中除去生长培养基,然后将该复合物加入到含有细胞的6孔平板的孔中。在5小时后,去除培养基,加入新的生长培养基。在36.5°C,7.5%CO₂温育细胞5天。获得上清液,通过离心澄清化。用Octet(Forte Bio)蛋白质A测定法确定抗体效价。

[0058] 在下面的表1中给出了结果。

[0059] 表1

[0060]	所使用的分泌前导区	平均抗体效价 (mg/1)
	A	2.91
	B	7.79
	C	8.85
	D	1.89

[0061] 产生的抗体通过蛋白质A捕获从上清液中回收,通过阳离子交换层析,接着阴离子交换层析在低pH洗脱并纯化。将来自阴离子交换层析的洗脱液进行病毒纳米过滤,接着缓冲液交换和浓缩。

[0062] 实施例2

[0063] 载体构建

[0064] 构建双基因载体,其含有驱动抗-MUC-1 MAb的h γ 1FL重链和抗MUC-1 MAb的人 λ 轻链两者表达的hEF1 α 启动子。

[0065] 构建其它双基因启动子,其中将hEF1 α 启动子替换为hCMV-MIE启动子或大鼠CMV启动子。

[0066] 在双基因载体中的各表达盒由与编码实施例1的CHO纤连蛋白信号肽的多核苷酸序列功能性连接的启动子组成,该编码实施例1的CHO纤连蛋白信号肽的多核苷酸序列连接在编码HC或LC成熟多肽的多核苷酸序列的阅读框中。通过牛生长激素聚A序列的存在保证正确的mRNA加工。

[0067] 为了允许选择稳定的细胞系,该载体还含有处于鼠磷酸甘油酸(mPGK)启动子控制下的鼠二氢叶酸还原酶(dhfr)基因和处于胸腺嘧啶激酶(TK)启动子控制下的潮霉素抗性基因的拷贝。

[0068] CHO DG44细胞的常规亚培养

[0069] 将CHO DG44细胞在悬浮液振摇烧瓶中常规培养于补充有8mM L-谷氨酰胺和1×HT补充液(Life Technologies)的EX-CELLACF CHO培养基(Sigma)中。以 2×10^5 个细胞/毫升的浓度接种细胞,每3天将细胞分板。烧瓶在37°C, 7.5% CO₂下于一个轨道振荡培养箱中,以140rpm培养。

[0070] 稳定的细胞系传代转染

[0071] 如上文详述,用于转染的细胞在细胞悬浮培养基中生长。将来自生长培养基的细胞离心,并重悬至 2×10^7 细胞/毫升的浓度。将0.1mL体积的细胞悬浮液和4微克的线性化质粒DNA加入电穿孔杯中。然后将小杯放于Amaxa核转染仪(Lonza)中,进行核转染。在转染后,将细胞加入到T75烧瓶中的补充有8mM谷氨酰胺和1x HT补充剂的20mL预热的EX-CELL ACF CHO培养基(Sigma)中。转染细胞在37°C, 7.5% CO₂下温育。在从培养基中除去次黄嘌呤和胸腺嘧啶(HT)(转染后48小时),并且加入400微克/毫升潮霉素B(Invitrogen)和25nM MTX细胞(转染后144小时)后,将细胞以5000个细胞/孔(2.5×10^4 /mL)铺入96孔的平板。在37°C,在空气中7.5% CO₂的气氛中温育平板。在直至转染后约3星期时针对集落生长监测平板。收获来自多至100个含有细胞生长的孔中的上清液,使用Octet(Forte Bio)蛋白质A测定法针对抗体分析。将最高的24个表达集落扩展入24孔平板,培养10天。然后,使用Octet(Forte Bio)蛋白质A测定法针对抗体测定上清液。结果在下面的表2中给出。

[0072] 表2

[0073]

	hEF1α		hCMV-MIE		大鼠 CMV	
	96wp	24wp	96wp	24wp	96wp	24wp
最大实验水平 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	7.3	18.0	6.1	3.2	6.1	nd
平均实验水平 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	3.3	4.2	0.7	1.3	0.6	nd

[0074] 实施例3

[0075] 从CHO上清液中纯化抗体

[0076] 利用蛋白质A树脂纯化来自利用实施例2中所述的hEF1α启动子双基因载体产生的重组CHO DG44细胞系的上清液。将350mL澄清化的收获物装载到含有MabSelect SuRe树脂(GE Healthcare)的预装的柱上。首先用20mM的磷酸钠,1MNaCl(pH 7.0),然后用20mM的磷酸钠(pH 7.0)洗涤树脂。然后用100mM的乙酸洗脱抗体。使用Octet(Forte Bio)蛋白质A测定法定量回收的产物,并示于表3中。

[0077] 表3

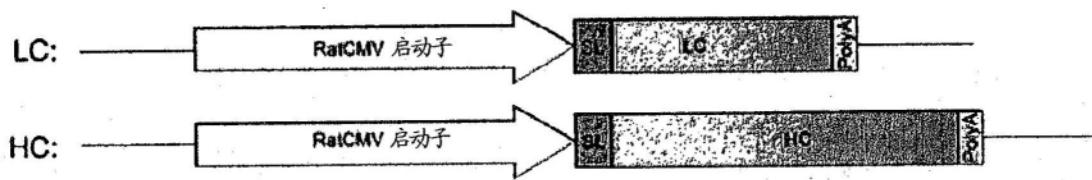
[0078]

	体积 (mL)	浓度 (mg/mL)
澄清化的收获物	350	1.3
洗脱的抗体	50.55	7.7

- [0001] <110> 富士胶片戴奥辛思生物技术英有限公司
[0002] <120> 表达方法
[0003] <130> BIL 81024/WO
[0004] <160> 6
[0005] <170> BiSSAP 1.3
[0006] <210> 1
[0007] <211> 26
[0008] <212> PRT
[0009] <213> 人类
[0010] <400> 1
[0011] Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Leu Leu Leu Ala Val Gln Cys
[0012] 1 5 10 15
[0013] Leu Gly Thr Ala Val Pro Ser Thr Gly Ala
[0014] 20 25
[0015] <210> 2
[0016] <211> 25
[0017] <212> PRT
[0018] <213> 灰仓鼠
[0019] <400> 2
[0020] Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Leu Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu
[0021] 1 5 10 15
[0022] Gly Thr Ala Val Arg Cys Thr Glu Ala
[0023] 20 25
[0024] <210> 3
[0025] <211> 78
[0026] <212> DNA
[0027] <213> 人类
[0028] <400> 3
[0029] atgctgagag gccctggacc tggactgctg ctgctggctg tgcagtgtct ggaaaccgcc 60
[0030] gtgccttcta ccggcgcc 78
[0031] <210> 4
[0032] <211> 75
[0033] <212> DNA
[0034] <213> 灰仓鼠
[0035] <400> 4
[0036] atgctcaggg gtccgggacc cgggctgctg ctggccgtcc tgtgcctgg gacagcggtg 60
[0037] cgctgtaccg aagcc 75
[0038] <210> 5

- [0039] <211> 24
[0040] <212> PRT
[0041] <213> 人类
[0042] <400> 5
[0043] Met Leu Ser Phe Val Asp Thr Arg Thr Leu Leu Leu Leu Ala Val Thr
[0044] 1 5 10 15
[0045] Leu Cys Leu Ala Thr Cys Gln Ser
[0046] 20
[0047] <210> 6
[0048] <211> 18
[0049] <212> PRT
[0050] <213> 灰仓鼠
[0051] <400> 6
[0052] Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Val Ser Asp Ser Ala
[0053] 1 5 10 15
[0054] Phe Ser

表达盒的结构



1

图1