



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202415767 A

(43)公開日：中華民國 113 (2024) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：112130927 (22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 20 日
(51)Int. Cl. : C12N5/10 (2006.01) C12N15/62 (2006.01)
C07K14/705 (2006.01)
(30)優先權：2016/04/20 美國 62/325,400
(71)申請人：美商再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國
(72)發明人：鮑比 羅伯特 BABB, ROBERT (US)；布維克弗 達爾亞 BURAKOV, DARYA
(US)；陳 剛 CHEN, GANG (US)；凡德 詹姆斯 FANDL, JAMES P. (US)；趙
瑜 ZHAO, YU (CN)
(74)代理人：何愛文；王仁君
申請實體審查：有 申請專利範圍項數：31 項 圖式數：7 共 94 頁

(54)名稱
基於使用增強表現基因座之製備抗體的組成物及方法
(57)摘要

本發明關於重組蛋白在真核細胞中的位點特異性整合和表現。尤其，本發明包括藉由運用多個增強表現基因座來增進真核細胞，尤其是中國倉鼠(Cricetulus griseus)細胞系中的抗原結合蛋白，包括單特異性和雙特異性抗體之表現的組成物和方法。

This invention relates to site-specific integration and expression of recombinant proteins in eukaryotic cells. In particular, the invention includes compositions and methods for improved expression of antigen-binding proteins including monospecific and bispecific antibodies in eukaryotic cells, particularly Chinese hamster (Cricetulus griseus) cell lines, by employing multiple expression-enhancing locus.

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

基於使用增強表現基因座之製備抗體的組成物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR MAKING ANTIBODIES BASED
ON USE OF EXPRESSION- ENHANCING LOCI

【中文】

本發明關於重組蛋白在真核細胞中的位點特異性整合和表現。尤其，本發明包括藉由運用多個增強表現基因座來增進真核細胞，尤其是中國倉鼠(*Cricetulus griseus*)細胞系中的抗原結合蛋白，包括單特異性和雙特異性抗體之表現的組成物和方法。

【英文】

This invention relates to site-specific integration and expression of recombinant proteins in eukaryotic cells. In particular, the invention includes compositions and methods for improved expression of antigen-binding proteins including monospecific and bispecific antibodies in eukaryotic cells, particularly Chinese hamster (*Cricetulus griseus*) cell lines, by employing multiple expression-enhancing locus.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

基於使用增強表現基因座之製備抗體的組成物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR MAKING ANTIBODIES BASED
ON USE OF EXPRESSION- ENHANCING LOCI

相關申請案之交互參照

【0001】 本申請案主張2016年4月20日提申之美國臨時申請案編號62/325,400的優先權，其整體內容係以參照方式併入本案。

【技術領域】

【0002】 本揭示內容關於重組蛋白在真核細胞中的位點特異性整合和表現。尤其，本揭示內容關於藉由運用增強表現基因座來增進真核細胞，尤其是中國倉鼠(*Cricetulus griseus*)細胞系中的抗原結合蛋白(包括單特異性和雙特異性抗體)表現的組成物和方法。

【先前技術】

【0003】 細胞表現系統旨在提供用於製造給定蛋白的可靠和有效的來源，無論是用於研究或治療用途。哺乳動物細胞中的重組蛋白表現是製造治療性蛋白的較佳方法，此係由於，舉例來說，哺乳動物表現系統適當地在轉譯後修飾重組蛋白的能力。

【0004】 儘管可取得各種表現系統，但仍然存在著用於表現重組蛋白的整合基因的有效基因轉移和穩定性的挑戰。對於目標轉殖基因的長期表現，一個考量是細胞基因的最小破壞性，以避免該細胞系表型的改變。

【0005】 適應多個表現基因的工程化穩定細胞系，例如多重特異性抗體中的多個抗體鏈，是特別具有挑戰性的。可能會發生整合基因表現位準

的廣泛變化。由於局部遺傳環境(即位置效應)，整合額外基因可能導致表現和不穩定性的更大變異。用於產生多重特異性抗原結合蛋白的表現系統通常需要意圖作為特異性多聚體形式配對的兩個或更多個不同免疫球蛋白鏈的表現，並可通常傾向於同二聚體的產生，而非所需的異二聚體或多聚體組合。據此，本領域需要改良的哺乳動物表現系統。

【發明內容】

【0006】 在一態樣中，本揭示內容提供了一種細胞，該細胞含有位點特異性地整合在兩個增強表現基因座中的多個外源性核酸，其中多個外源性核酸共同編碼一抗原結合蛋白。該抗原結合蛋白可為雙特異性抗原結合蛋白、或習用的單特異性抗原結合蛋白。

【0007】 在一些具體例中，提供了一種細胞，該細胞含有整合在一第一增強表現基因座中的一第一外源性核酸，以及整合在一第二增強表現基因座中的一第二外源性核酸；其中第一和第二外源性核酸共同編碼一抗原結合蛋白。

【0008】 在一些具體例中，第一外源性核酸含有編碼一第一重鏈片段(HCF)的核苷酸序列，第二外源性核酸含有編碼一第一輕鏈片段(LCF)的核苷酸序列。

【0009】 在一些具體例中，第二外源性核酸更包括編碼一第二HCF(亦為HCF*)的核苷酸序列。在雙特異性抗原結合蛋白中的第一和第二HCFs可相同、或不同。各個HCF-或LCF-編碼核苷酸序列可編碼來自恆定區的胺基酸。在一些具體例中，編碼第一HCF的核苷酸序列係編碼一第一CH3域，編碼第二HCF的核苷酸序列(HCF*)係編碼一第二CH3域。在一些具體例中，第一和第二CH3域可為至少一個胺基酸位置不同，例如造成不同蛋白A結合特性的位置不同。在其他具體例中，編碼第一和第二CH域的核苷酸序

列彼此不同，在於該核苷酸序列之一者的密碼子已被修飾。

【0010】 在一些具體例中，第一外源性核酸(含有第一HCF-編碼核苷酸序列)更包含編碼一第二LCF的核苷酸序列。第二LCF可相同於或不同於第二外源性核酸中的第一LCF。

【0011】 在本案提供之細胞的許多具體例中，編碼HCF或LCF的核苷酸序列之各者係獨立地可操作地聯結至一啟動子，使得各個HCF或LCF編碼序列的轉錄係分開地調控。

【0012】 在一些具體例中，一第一RRS和一第二RRS相對於第一外源性核酸係分別位於5'和3'，一第三RRS和一第四RRS相對於第二外源性核酸係分別位於5'和3'，其中第一和第二RRS是不同的，第三和第四RRS是不同的。一般來說，側接在外源性核酸的一對RRS中的RRS是不同的，以避免該外源性核酸的非預期重組和除去。在一些具體例中，第一、第二、第三和第四RRS彼此皆不同。

【0013】 在第一基因座中的第一外源性核酸包括第一HCF-編碼核苷酸序列且第二基因座中的第二外源性核酸包括第一LCF-編碼序列和第二HCF-編碼序列兩者的具體例中，一第一額外RRS可存在於編碼第一LCF的核苷酸序列和編碼第二HCF的核苷酸序列之間。該額外RRS可不同於第一、第二、第三和第四RRS之各者。在一些具體例中，第一額外RRS被包括在該可篩選標記基因可操作地聯結的一啟動子、和可篩選標記基因之間，或額外RRS可被包括在可篩選標記基因內、或可篩選標記基因的内含子之內，該可篩選標記基因係存在於第一LCF-編碼序列和一HCF-編碼序列之間、或一第一HCF-編碼序列和一第二HCF-編碼序列之間。

【0014】 在第一基因座中的第一外源性核酸包括第一HCF-編碼核苷酸序列和第二HCF-編碼核苷酸序列且第二基因座中的第二外源性核酸包括第一LCF-編碼序列和第二HCF-編碼序列兩者的具體例中，一第一RRS和一

第二RRS相對於第一外源性核酸可分別存在於5'和3'，一第三RRS和一第四RRS相對於第二外源性核酸可分別存在於5'和3'，其中第一和第二RRS是不同的，第三和第四RRS是不同的。在一些具體例中，第一和第二HCF是相同的，第一和第二LCFs是相同的，在該例中，該RRS可被工程化，俾使第一和第三RRS是相同的，第二和第四RRS是相同的。在一些具體例中，第一和第二HCF是不同的，第一和第二LCF是相同的，在該例中，該RRS可被工程化，俾使第一、第二、第三和第四RRS彼此皆不同。無論該兩 HCF是否相同或不同，額外RRS可存在於第一LCF-編碼序列和第二HCF-編碼序列之間，及/或存在於第二LCF編碼序列和第一HCF-編碼序列之間。該額外(middle) RRS係不同於第一、第二、第三和第四RRS之各者。該額外RRS可被包括在可篩選標記基因之內、或在可篩選標記基因的内含子之內，該可篩選標記基因係放置在兩個HCF/LCF編碼序列之間。

【0015】 在另一態樣中，提供了含有整合在兩個增強表現基因座之內的成對RRS的細胞，其可用於透過RMCE整合編碼抗原結合蛋白的核酸。

【0016】 在某些具體例中，提供了含有整合在兩個增強表現基因座之內的成對RRS的細胞，其可用於在重組酶的存在下透過RMCE同時整合編碼抗原結合蛋白的核酸。

【0017】 在一些具體例中，提供了一種細胞，該細胞含有：整合在第一增強表現基因座之內，從5'至3'：一第一RRS、一第一外源性核酸、和一第二RRS；整合在第一第二增強表現基因座之內，從5'至3'：一第三RRS、一第二外源性核酸、和一第四RRS；其中第一和第二RRS是不同的，第三和第四RRS是不同的。

【0018】 在一些具體例中，第一外源性核酸包括一第一可篩選標記基因，第二外源性核酸包括一第二可篩選標記基因，其中第一和第二可篩選標記基因是不同的。

【0019】 在一些具體例中，第一和第二外源性核酸之一或兩者可包括額外RRS，即介於第一基因座的第一和第二RRS之間的額外RRS、及/或介於第三和第四RRS之間的額外RRS。該額外的中間RRS係不同於位在5'和3'的RRS。當額外RRS被包括在5' RRS與3' RRS之間(譬如介於第一和第二RRS之間)時，一個可篩選標記基因可被包括在該5' RRS和額外(中間) RRS之間，而另一個不同的可篩選標記基因可被包括在該額外RRS和3' RRS之間。

【0020】 在另一具體例中，該細胞提供一第一外源性核酸，其包括一第三RRS，即介於第一基因座中的第一和第二RRS之間的額外RRS，其中第一和第二RRS在該表現盒的5'和3'端側接有兩個選擇標記。在其他具體例中，第二外源性核酸亦可包括相同的第三RRS，即介於第二基因座中的第一和第二RRS之間的額外RRS，其中第一和第二RRS在該表現盒的5'和3'端側接有兩個選擇標記。包括在第一、第三和第二RRS之間的四個可篩選標記基因彼此不同。

【0021】 在另一具體例中，該細胞提供一第一外源性核酸，其包括一第三RRS，即介於第一基因座中的第一和第二RRS之間的額外RRS，其中第一和第二RRS在該表現盒的5'和3'端側接有兩個選擇標記。在其他具體例中，第二外源性核酸可包括一第六RRS，即介於第二基因座中的一第四和第五RRS之間的額外RRS，其中第四和第五RRS在該表現盒的5'和3'端側接有兩個選擇標記。包括在RRS之間的四個可篩選標記基因彼此不同。

【0022】 在眾多具體例中，本案提供之細胞為CHO細胞系的細胞。

【0023】 在各式具體例中，所利用的兩個增強表現基因座選自於由下列所構成的群組：含有與SEQ ID NO: 1至少90%一致的核苷酸序列的基因座、含有與SEQ ID NO: 2至少90%一致的核苷酸序列的基因座、以及含有與SEQ ID NO: 3至少90%一致的核苷酸序列的基因座。

【0024】 在另外的態樣中，載體組係提供用於在細胞中整合和表現雙

特異性抗原結合蛋白。

【0025】 在一些具體例中，該載體組包括一第一載體，其從5'至3'含有一第一RRS、含有編碼一第一HCF的核苷酸序列的一第一核酸、和一第二RRS；一第二載體，其從5'至3'含有一第三RRS、含有編碼一第二HCF的核苷酸序列的一第二核酸、一第四RRS；以及編碼一第一LCF的核苷酸序列，其係於第一載體上的第一核酸之內、或於不同於第一和第二載體的一第三載體內；其中第一、第二、第三、和第四RRS是不同的；其中該雙特異性抗原結合蛋白含有第一HCF、第二HCF和第一LCF，其中第一和第二HCF是不同的。

【0026】 在一些具體例中，編碼第一LCF的核苷酸序列係於第一載體上的第一核酸內。在一些具體例中，第一核酸更包括一第一可篩選標記基因。

【0027】 在一些具體例中，編碼第一LCF的核苷酸序列在第三載體內提供並側接有5' RRS和3' RRS，其中(i)該3' RRS係相同於第一RRS，該5' RRS係不同於第一和第二RRS，或者(ii)該5' RRS係相同於第二RRS，該3' RRS係不同於第一和第二RRS。在一些具體例中，該載體可設計成俾使第一和第三載體共享的共用RRS係以拆分可篩選標記基因格式(或拆分-內含子格式)提供，譬如放置於在第一和第三載體之一者上的一可篩選標記基因的5'部分的3'端，並放置於在另一個載體的可篩選標記基因上的其餘3'部分的5'端。

【0028】 在一些具體例中，該載體組更包括編碼一第二LCF的核苷酸序列，其被提供在第二載體的第二核酸之內、或在有別於第一、第二和第三載體於的一第四載體內。

【0029】 在一些具體例中，第一和第二LCF是相同的。

【0030】 在一些具體例中，編碼第一LCF的核苷酸序列被包括在第一載體上的第一核酸之內，編碼第二VL的該核苷酸序列在第四載體上提供。

在一些具體例中，在第四載體上的編碼第二LCF的該核苷酸序列係側接有5' RRS和3' RRS，其中(i)該3' RRS係相同於第三RRS，該5' RRS係不同於第三和第四RRS，或(ii)該5' RRS係相同於第四RRS，該3' RRS係不同於第三和第四RRS。在某些具體例中，該載體被設計成俾使第二和第四載體所共享的共用RRS在一拆分標記(譬如經由內含子)格式中提供，譬如放置於在第二和第四載體之一者上的可篩選標記基因的5'部分的3'端，並放置於在另一個載體上的可篩選標記基因的其餘3'部分的5'端。

【0031】 在一些具體例中，編碼第一LCF的核苷酸序列係於第一載體上的第一核酸內，編碼第二VL的該核苷酸序列係於第二載體上的第二核酸內。

【0032】 在一些具體例中，編碼第一LCF的核苷酸序列係在第三載體上，編碼第二VL的該核苷酸序列係在第四載體上。在一些具體例中，在第三載體上的編碼第一LCF的核苷酸序列係側接有5' RRS和3' RRS，其中(i)在第三載體上的3' RRS係相同於第一RRS，在第三載體上的5' RRS係不同於第一和第二RRS，或(ii)在第三載體上的5' RRS係相同於第二RRS，在第三載體上的3' RRS係不同於第一和第二RRS；其中在第四載體上的編碼第二LCF的該核苷酸序列係側接有5' RRS和3' RRS，其中(i)在第四載體上的3' RRS係相同於第三RRS，在第四載體上的5' RRS係不同於第三和第四RRS，或(ii)在第四載體上的5' RRS係相同於第四RRS，在第四載體上的3' RRS係不同於第三和第四RRS。

【0033】 在本案提供之載體組的許多具體例中，編碼第一HCF的核苷酸序列可編碼一第一CH3域，編碼第二HCF的核苷酸序列可編碼一第二CH3域。在一些具體例中，第一和第二CH3域係至少一個胺基酸不同。在一些具體例中，編碼第一和第二CH3域的核苷酸序列的差異在於該核苷酸序列之一者的密碼子已被修飾。

【0034】 在本案提供之載體組的許多具體例中，編碼HCF或LCF的核苷酸序列之各者係獨立地聯結一啟動子。

【0035】 在一些具體例中，一載體組可再包括核苷酸序列，該序列編碼識別該RRS之一或多者的一或多個重組酶，其可被包括在LCF-或HCF-編碼載體之一者中、或由分別的載體提供。

【0036】 在又其他具體例中，提供一載體組，其包括一第一載體，該載體含有一第一核酸、側接有5'同源臂和3'同源臂，該載體係用於整合至細胞的一第一表現增強基因座內；以及一第二載體，該載體含有一第二核酸、側接有5'同源臂和3'同源臂該載體係用於整合至細胞的一第二表現增強基因座內；其中第一和第二核酸共同編碼一抗原結合蛋白。

【0037】 在另外的態樣中，本揭示內容提供了系統，該系統包括一細胞(譬如CHO細胞)和一或多個載體之組合並可利用於製備具有兩個增強表現基因座外源性核酸整合在內的細胞，該外源性核酸共同編碼一抗原結合蛋白，其為單特異性蛋白或雙特異性蛋白。該系統可以套組的形式提供，舉例來說。

【0038】 在某些具體例中，提供了一種系統，該系統包含一細胞和一載體組，其中該細胞含有整合至其基因組之兩個分別的增強表現基因座的一組RRS，該組RRS係彼此不同且分隔在一或多個外源性核酸，例如選擇標記之間，用於與一載體組中的感興趣基因重組交換；其中在該載體組中的RRS包含如同該細胞中的RRS之相同配置。

【0039】 在一些具體例中，提供了一種系統，該系統包含一細胞和一載體組，其中該細胞含有整合在一第一增強表現基因座之內，從5'至3'：一第一RRS、一第一外源性核酸、和一第二RRS，以及整合在一第二增強表現基因座之內，從5'至3'：一第三RRS、一第二外源性核酸、和一第四RRS；其中第一和第二RRS是不同的，第三和第四RRS是不同的；其中第一和第二

增強表現基因座是不同的；其中該載體組包括(i)一第一載體，從5'至3'含有：一第一載體5' RRS、一第一核酸、和一第一載體3' RRS，其中第一載體5'和3' RRS是不同的；(ii)一第二載體，從5'至3'含有：一第二載體5' RRS、一第二核酸、和一第二載體3' RRS，其中第二載體5'和3' RRS是不同的；以及(iii)編碼一第一HCF的核苷酸序列和編碼一第一LCF的核苷酸序列，其中該兩重鏈-編碼核苷酸序列之一者係於第一核酸中且另一個核苷酸序列係於第二核酸中；其中第一HCF和第一LCF為抗原結合蛋白之區；以及其中在將該載體引進該細胞之後，該載體內的第一和第二核酸即經由該RRS所介導之重組分別整合至第一增強表現基因座和第二增強表現基因座內。

【0040】 在一些具體例中，該抗原結合蛋白為單特異性抗原結合蛋白。

【0041】 在一些具體例中，第一和第三RRS是相同的，第二和第四RRS是相同的。在某些具體例中，一第一額外RRS係介於第一基因座中的第一和第二RRS之間。在一些具體例中，第一載體5' RRS係相同於第一和第三RRS；第一載體3' RRS、第二載體5' RRS、第一額外RRS是相同的；第二載體3' RRS係相同於第二和第四RRS。在一些具體例中，該LCF-編碼核苷酸序列係於第一載體內，HCF-編碼核苷酸序列係於第二載體內。在一些具體例中，第一載體3' RRS係放置在可篩選標記基因的5'部分的3'端，第二載體5' RRS放置在該可篩選標記基因的其餘可篩選標記基因3'部分的5'端。在其他具體例中，第一載體5' RRS係相同於第一RRS，第一載體3' RRS係相同於第二RRS；以及其中第二載體5' RRS係相同於第三RRS，第二載體3' RRS係相同於第四RRS。

【0042】 在各式具體例中，該抗原結合蛋白為雙特異性抗原結合蛋白。

【0043】 在一些具體例中，該系統中的載體組更包括編碼一第二HCF

的核苷酸序列，該第二HCF係不同於第一HCF。

【0044】 在一些具體例中，編碼第一LCF的核苷酸序列和編碼第二HCF的核苷酸序列皆包括在第一載體上的第一核酸內，編碼第一HCF的核苷酸序列係於第二載體內。在一些具體例中，第一載體5' RRS係相同於第一RRS，第一載體3' RRS係相同於第二RRS，第二載體5' RRS係相同於第三RRS，第二載體3' RRS係相同於第四RRS。

【0045】 在一些具體例中，編碼第二HCF的核苷酸序列係於一第三分離載體上，側接有一第三載體5' RRS和一第三載體3' RRS。在一些具體例中，編碼第一LC的核苷酸序列係於第一載體內，編碼第一HCF的核苷酸序列係於第二載體內，第一載體5' RRS係相同於第一RRS，第一載體3' RRS係相同於第二載體5' RRS及相同於一第一額外RRS，第二載體3' RRS係相同於第二RRS，第三載體5' RRS係相同於第三RRS，第三載體3' RRS係相同於第四RRS，其中第一額外RRS係包括在第一基因座中、介於第一和第二RRS之間。在一些具體例中，該載體係設計成以拆分標記格式提供共用RRS，譬如第一載體3' RRS係放置在包括在第一載體內的一可篩選標記基因的5'部分的3'端，且第二載體5' RRS係放置在包括在第二載體內的其餘可篩選標記基因的5'端。

【0046】 在一些具體例中，該系統中的載體組更包括編碼一第二LCF的核苷酸序列，該第二LCF可相同或不同於第一LCF。

【0047】 在一些具體例中，編碼第二LCF的核苷酸序列係於第二載體的第二核酸中，其中第一載體5' RRS係相同於第一RRS，第一載體3' RRS係相同於第二RRS，第二載體5' RRS係相同於第三RRS，第二載體3' RRS係相同於第四RRS。

【0048】 在一些具體例中，編碼第二LCF的核苷酸序列係於一第三分別的載體內、側接有一第三載體5' RRS和一第三載體3' RRS。在一些具體例

中，第一載體5'和3' RRS係分別和第一基因座中的第一和第二RRS一致；第三載體5' RRS係相同於第三RRS，第三載體3' RRS係相同於第二載體5' RRS及相同於在第二基因座中、介於第三和第四RRS之間的額外RRS，第二載體3' RRS係相同於第四RRS。在一些具體例中，該共用RRS係設計成一拆分標記格式，譬如第三載體3' RRS係放置在包括在第三載體內的一可篩選標記基因的5'部分的3'端，且第二載體5' RRS係放置在包括在第二載體內的可篩選標記基因的其餘3'部分的5'端。

【0049】 在本案提供的系統的許多具體例中，編碼HCF或LCF的該核苷酸序列可編碼來自恆定區的胺基酸。在一些具體例中，編碼第一HCF的核苷酸序列可編碼一第一CH3域，編碼第二HCF的核苷酸序列可編碼一第二CH3域。在一些具體例中，第一和第二CH3域係至少一個胺基酸不同。在一些具體例中，編碼第一和第二CH3域的該核苷酸序列的差別在於該核苷酸序列之一者的密碼子已被修飾。

【0050】 在本案提供的系統的許多具體例中，編碼HCF或LCF的核苷酸序列之各者係獨立地聯結至一啟動子。

【0051】 在一些具體例中，一系統的載體組可再包括核苷酸序列，該序列編碼識別該RRS之一或多者的一或多個重組酶，其可被包括在HCF-或LCF-編碼載體之一者中、或由分別的載體提供。

【0052】 在各式具體例中，本案所提供之系統中的細胞為CHO細胞。

【0053】 在各式具體例中，該兩增強表現基因座選自於由下列所構成的群組：包含SEQ ID NO: 1之核苷酸序列的基因座、包含SEQ ID NO: 2之核苷酸序列的基因座、和包含SEQ ID NO: 3之核苷酸序列的基因座。

【0054】 在另一態樣中，本揭示內容亦提供製備雙特異性抗原結合蛋白的方法。在一具體例中，該方法利用本案揭示的系統並藉由轉染將該系統的載體引進該系統的細胞。該外源性核酸已經由RMCE合宜地整合至該細

胞的兩個增強表現基因座中的經轉染細胞可被篩揀並鑑定。含HCF的多肽和含LCF的多肽可從該整合的核酸表現，感興趣的抗原結合蛋白可從該經鑑定的轉染細胞獲得，並使用習知方法純化。

【0055】 在另一具體例中，該方法簡單地利用上述細胞，該細胞含有共同編碼一抗原結合蛋白之整合於兩個增強表現基因座的外源性核酸，並從該細胞表現該抗原結合蛋白。

【圖式簡單說明】

【0056】 圖1. 對於單特異性抗體，用於整合在一個增強表現基因座相較於多個增強表現基因座之內的例示性抗體選殖策略。將兩個載體轉染到宿主細胞中，第一載體攜帶編碼抗體鏈1 (AbC1)，例如輕鏈的核酸，第二載體攜帶編碼抗體鏈2 (AbC2)，例如重鏈的核酸，以及與整合在宿主細胞的靶向基因座之內的標記不同的選擇標記。從5'到3'：載體構築體的RRS1、中間RRS3和RRS2位點係匹配宿主細胞的基因座之內、側接在選擇標記的RRS位點。轉染宿主細胞的額外載體係編碼重組酶。當第二載體的選擇標記是抗生素抗藥性基因時，由於兩個載體被工程化以合併允許表現標記，所以在抗生素中生長的正向重組選殖體被選擇。或者，螢光標記使得能藉由螢光激活細胞分選(FACS)分析來進行正向選殖選擇。相同的載體可利用於在單個基因座，例如EESYR®基因座(基因座1)的位點特異性整合。

【0057】 圖2. 使用整合在一個增強表現基因座對比於兩個基因座之內的兩個載體選殖策略，抗體A和抗體B被選殖到如圖1所繪示的基因座中。細胞被單離並投至生物反應器中的12天補料分批培養，隨後收穫，並使用蛋白A感測器進行Octet效價試驗。亦觀察到細胞是同基因型(isogenic)和穩定的。觀察到利用兩個位點整合方法的整體效價增加0.5至0.9倍。

【0058】 圖3. 對於三個抗體鏈所編碼的雙特異性抗體，用於整合在

一個增強表現基因座之內相較於整合在兩個分別的增強表現基因座之內之例示性抗體選殖策略。三個載體係利用於此雙特異性策略，一第一載體攜帶抗體鏈1 (AbC1)，舉例來說，共同輕鏈的核酸，側接有RRS1和RRS3，以供整合至EESYR® (SEQ ID NO:1；基因座1)；一第二載體攜帶抗體鏈2 (AbC2)，舉例來說，重鏈，具有側接有RRS4和RRS6的上游選擇標記，以供整合至SEQ ID NO:2基因座；以及另外的一第三載體攜帶編碼一第二拷貝AbC1的核酸，其聯結至有別於第二載體的不同選擇標記並聯結至抗體鏈3 (AbC3)，舉例來說，該載體盒中的第二(不同)重鏈，其5'側接有RRS4且3'側接有RRS5 (5'和3' RRS匹配至宿主細胞中位於包含SEQ ID NO:2的基因座的RRS位點)。所示的兩載體系統可利用於單個基因座，例如EESYR®基因座(包含SEQ ID NO:1；基因座1)之位點特異性整合。分析來自各別生產細胞系的效價，參見圖5。

【0059】 圖4. 對於三個或四個抗體鏈所編碼的雙特異性抗體，用於整合在一個增強表現基因座之內相較於整合在兩個分別的增強表現基因座之內之例示性抗體選殖策略。四個載體係利用於此雙特異性策略，一第一載體攜帶編碼抗體鏈1 (AbC1)，舉例來說，側接有RRS1和RRS3的第一輕鏈的核酸，以供整合至EESYR® (SEQ ID NO:1；基因座1)；一第二載體攜帶抗體鏈2 (AbC2)，舉例來說，具有5'側接有RRS3且3'側接有RRS2之上游選擇標記的重鏈，以供亦整合至EESYR®基因座(包含(SEQ ID NO:1；基因座1)；以及一第三載體攜帶編碼有別於第二載體的不同選擇標記並聯結至抗體鏈3 (AbC3)的核酸，該抗體鏈3為，舉例來說，該載體盒中的第二(不同的)重鏈，其5'側接有RRS6且3'側接有RRS5 (5'和3' RRS匹配至宿主細胞中位於包含SEQ ID NO: 2的基因座；基因座2的RRS位點)；以及另外的一第四載體攜帶編碼第二輕鏈，舉例來說，抗體鏈1 (AbC1)的核酸(然而，可相同或不同於第一輕鏈)。所示的四載體系統可利用於兩個基因座的位點特異性整

合，例如EESYR®基因座(包含SEQ ID NO:1；基因座1)和包含SEQ ID NO: 2或3的基因座。該四載體系統係與整合於一個基因座(EESYR®基因座；基因座1)的兩個載體系統比較。

【0060】 圖5.使用整合在一個增強表現基因座對比於兩個基因座之內的兩個載體選殖策略，雙特異性抗體C和雙特異性抗體D被選殖，細胞被單離並投至生物反應器中的12天補料分批培養，隨後收穫並使用固定化抗-Fc、和第二抗-Fc* (經修飾的Fc偵測抗體，參閱美國2014-0134719 A1，2014年5月15日公開)進行Octet效價試驗。亦觀察到細胞是同基因型和穩定的。相較於雙特異性抗體(異二聚體)在一個整合位點中的表現，利用兩個位點整合方法，觀察到總雙特異性效價(異二聚體形成)增加1.75至2倍。

【0061】 圖6A和6B.將雙特異性抗體E (Ab E)、雙特異性抗體F (Ab F)、雙特異性抗體G (Ab G)、和雙特異性抗體H (Ab H)選殖至RSX或RSX^{2BP}中。表現各個雙特異性抗體的細胞包含在一個增強表現基因座(RSX)或兩個增強表現基因座(RSX^{2BP})中的(共同)輕鏈核苷酸、重鏈核苷酸(野生型Fc)和經修飾的重鏈核苷酸(Fc*)。細胞被單離並投至生物反應器中的13天補料分批培養、隨後收穫和HPLC沖提方法，以測定整體抗體和雙特異性抗體效價(圖6A)。每個總抗體效價的雙特異性抗體物種效價(從同二聚體物種純化出來)的比例被測定為總Ab的百分比(圖6B)。

【0062】 圖7.單特異性抗體J和K (分別為Ab J和Ab K)被選殖到RSX或RSX²中。細胞被單離並投至生物反應器中的13天補料分批培養、隨後收穫和HPLC方法，以測定整體IgG效價。

【實施方式】

定義

【0063】 本案使用的術語「抗體」包括由四個多肽鏈—藉由二硫鍵相

互連接的兩個重(H)鏈和兩個輕(L)鏈一所構成的免疫分子。各個重鏈可包含重鏈可變區(本案縮寫為HCVR或VH)和重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域，CH1、CH2和CH3和一鉸鏈(鉸鏈)。各個輕鏈包含輕鏈可變區(本案縮寫為LCVR或VL)和輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域，CL。該VH和VL區可再細分成高度可變性區，稱作互補性決定區(CDR)，穿插有較保守的區域，稱作框架區(FR)。各個VH和VL係由三個CDR和四個FR組成，從胺基端到羧基端依照下列順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 (重鏈CDR可縮寫為HCDR1、HCDR2和HCDR3；輕鏈CDR可縮寫為LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

【0064】 用語「抗原結合蛋白」包括具有至少一個CDR並且能夠選擇性地識別抗原，即能夠結合帶有至少在微莫耳的範圍內之 K_D 的抗原的蛋白。治療性抗原結合蛋白(譬如治療性抗體)經常需要介於毫微莫耳或微微莫耳的範圍內之 K_D 。通常，抗原結合蛋白包括兩個或更多個CDR，譬如2、3、4、5、或6個CDR。抗原結合蛋白的例子包括抗體、抗體的抗原結合片段，例如含有抗體的重鏈和輕鏈之可變區的多肽(譬如Fab片段、 $F(ab')_2$ 片段)、以及含有抗體的重鏈和輕鏈之可變區並含有來自重及/或輕鏈的恆定區(例如一或多個恆定域，即CL、CH1、鉸鏈、CH2、和CH3域的一或多者)的額外胺基酸的蛋白。

【0065】 用語「雙特異性抗原結合蛋白」包括能夠在兩個不同分子(譬如抗原)上或在相同分子上(譬如在相同抗原上)選擇性地結合一或具有不同特異性一至兩個或更多個表位的抗原結合蛋白。此類蛋白的抗原結合部分或片段抗原結合(Fab)部分對特定抗原具有特異性，並且通常由免疫球蛋白的重鏈可變區和輕鏈可變區組成。在某些情況下，重鏈可變區和輕鏈可變區可能不是同源對，換句話說，具有不同的結合特異性。

【0066】 雙特異性抗原結合蛋白的例子是「雙特異性抗體」，其包括

能夠選擇性地結合兩個或更多個表位的抗體。雙特異性抗體一般包含兩個不同的重鏈，而且各個重鏈特異性地結合—在兩個不同的分子(譬如抗原)上或在相同的分子上(譬如在相同的抗原上)—的不同表位。假使雙特異性抗原結合蛋白能夠選擇性地結合兩個不同的表位(一第一表位和一第二表位)，則第一重鏈可變區對第一表位的親和力一般將比第一重鏈可變區對第二表位的親和力低至少一個至兩個或三個或四個數量級，反之亦然。雙特異性抗原結合蛋白，例如雙特異性抗體可包括識別相同抗原之不同表位的重鏈可變區。典型的雙特異性抗體具有兩個重鏈，各具有三個重鏈CDR，接著是(N-端至C-端)：CH1域、鉸鏈、CH2域、和CH3域，以及免疫球蛋白輕鏈，其不賦予抗原結合特異性但其可與各個重鏈接合、或其可與各個重鏈接合且其可結合由重鏈抗原結合區所結合的表位之一個或多者、或其可與各個重鏈接合並能使該重鏈之一或兩者結合至一或兩個表位。在一具體例中，Fc域包括至少CH2和CH3。Fc域可包括鉸鏈、CH2域和CH3域。

【0067】 一種具體化的雙特異性格式包括一第一重鏈(HC)、具有經修飾CH3 (HC*)的一第二重鏈、和共同輕鏈(LC) (相同輕鏈的兩個拷貝)。另一個具體例包括第一重鏈 (HC)、共同LC和HC-ScFv融合多肽(其中第二HC係融合至ScFv的N-端)。另一個具體例包括第一HC、同源LC、HC-ScFv融合多肽(其中第二HC係融合至ScFv的N-端)。另一個具體例包括第一重鏈(HC)、LC和Fc域。另一個具體例包括第一HC、LC、ScFv-Fc融合多肽(其中Fc係融合至ScFv的C-端)。另一個具體例包括第一HC、共同LC、和Fc-ScFv融合多肽(其中Fc係融合至ScFv的N-端)。另一個具體例包括第一HC、LC和ScFv-HC(其中第二HC係融合至ScFv的C-端)。

【0068】 在某些具體例中，一個重鏈(HC)可為天然的或「野生型」序列且第二重鏈可在Fc域中被修飾。在其他具體例中，一個重鏈(HC)可為天然的或「野生型」序列且第二重鏈的密碼子可被修飾。

【0069】 術語「細胞」包括適用於表現重組核酸序列、並具有允許外源性核酸的穩定整合和增強表現的基因座的任何細胞。細胞包括哺乳動物細胞，例如非人類動物細胞、人類細胞或細胞融合物，例如，舉例來說，雜交瘤或四源雜交瘤(quadromas)。在一些具體例中，該細胞為人類、猴、猿、倉鼠、大鼠、或小鼠細胞。在一些具體例中，該細胞為選自下列細胞的哺乳動物細胞：CHO (譬如CHO K1、DXB-11 CHO、素食-CHO)、COS (譬如COS-7)、視網膜細胞、Vero、CV1、腎(譬如HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60 (譬如BHK21)、Jurkat、Daudi、A431 (表皮)、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、塞爾托利氏細胞(Sertoli cell)、BRL 3A細胞、HT1080細胞、骨髓瘤細胞、腫瘤細胞、和衍生自前述細胞的細胞系。在一些具體例中，該細胞包含一或多個病毒基因，譬如表現病毒基因的視網膜細胞(譬如PER.C6TM細胞)。

【0070】 術語「密碼子被修飾(codon modified)」意指一蛋白-編碼核苷酸序列已在一或多個核苷酸(即一或多個密碼子)被修飾，而不改變該密碼子所編碼的胺基酸，產生該核苷酸序列的密碼子修飾版本。核苷酸序列的密碼子修飾可提供以核酸為基礎的試驗(譬如尤其是以雜交為基礎的試驗、PCR)區分核苷酸序列與其密碼子修飾版本的便利基礎。在一些情況下，藉由運用本領域熟知的密碼子優化技術，核苷酸序列的密碼子被修飾，以提供所編碼蛋白在宿主細胞中的改良或最佳化表現(Gustafsson, C., et al., 2004, *Trends in Biotechnology*, 22:346–353; Chung, B.K.-S., et al., 2013, *Journal of Biotechnology*, 167:326–333; Gustafsson, C., et al., 2012, *Protein Expr Purif*, 83(1): 37–46)。使用此類技術的序列設計軟體工具在本領域中亦是眾所周知的，包括但不限於密碼子優化器(Codon optimizer) (Fuglsang A. 2003, *Protein Expr Purif*, 31:247–249)、基因設計器(Gene Designer) (Villalobos A, et al.,

2006, *BMC Bioinforma*, 7:285)、和OPTIMIZER (Puigbò P, et al. 2007, *Nucleic Acids Research*, 35:W126-W131)等。

【0071】 用語「互補決定區」或術語「CDR」包括由生物體的免疫球蛋白基因的核酸序列編碼的胺基酸序列，其正常地(即在野生型動物中)出現在免疫球蛋白分子(譬如抗體或T細胞受體)的輕或重鏈的可變區中的兩個框架區之間。CDR可由，舉例來說，種系序列或重排或未重排序列，以及，舉例來說，由幼小或成熟B細胞或T細胞編碼。在某些情況下(譬如就CDR3而言)，CDRs可由不連續(譬如在未重排的核酸序列中)但在B細胞核酸序列中連續的兩個或更多個序列(譬如種系序列)編碼，譬如作為剪接或連接序列的結果(譬如V-D-J重組以形成重鏈CDR3)。

【0072】 術語「增強表現基因座」是指一細胞的基因組中的一基因座，該基因座含有一序列或多個序列，當適宜的基因或構築體是外源地添加(即整合)至該序列或多個序列中或接近該序列或多個序列、或「可操作地聯結」至該序列或多個序列時，該基因座展現相較於該基因組中的其他區或序列之較高位準的表現。

【0073】 當用於描述增強表現時，術語「增強」包括藉由外源序列隨機整合至基因組中或藉由整合於不同的基因座所通常觀察到的增強至少約1.5-倍至至少約3-倍的表現增強，舉例來說，相較於相同的表現構築體的單個拷貝的隨機整合池。運用本發明的序列觀察到的倍數表現增強係相較於在沒有本發明序列的實質上相同條件所測得的相同基因的表現位準，舉例來說，相較於整合至相同物種基因組中的另一基因座之內。增強的重組效率包括基因座重組的能力的增強(舉例來說，運用重組酶識別位點(「RRS」))。增強指的是隨機重組的重組效率，舉例來說，不運用重組酶識別位點或類似物，其通常為0.1%。較佳的增強重組效率約為隨機的10倍，或約1%。除非另有指明，所主張的本發明並不限於特定的重組效率。增強

表現基因座通常由宿主細胞支持感興趣蛋白的高生產率。是以，增強表現包括各個細胞的感興趣蛋白的高產量(蛋白克數計的升高效價)，而非簡單地藉由培養物中的細胞的高拷貝數得到高效價。比生產率Qp (pg/細胞/日，即 pcd)被視為可持續生產力的量度。展現大於5 pcd、或大於10 pcd、或大於15 pcd、或大於20 pcd、或大於25 pcd、或甚至大於30 pcd之Qp的重組宿主細胞是合乎需要的。感興趣基因插入增強表現基因座、或「熱點」的宿主細胞展現高的比生產率。

【0074】 當用語「外源性地添加的基因」、「外源性地添加的核酸」、或簡稱為「外源性核酸」係參照感興趣的基因座運用時，則該用語是指在自然界中發現感興趣的基因座時，不存在於該感興趣的基因座中的任何DNA序列或基因。舉例來說，CHO基因座中的「外源性核酸」(譬如包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2之序列的基因座)可為在自然界的特定CHO基因座中的未發現的倉鼠基因(即來自倉鼠基因組中另一個基因座的倉鼠基因)、來自任何其他物種的基因(譬如人類基因)、嵌合基因(譬如人類/小鼠)、或在自然界中並未發現存在於感興趣的CHO基因座中的任何其他基因。

【0075】 用語「重鏈」或「免疫球蛋白重鏈」包括來自任何生物體的免疫球蛋白重鏈恆定區序列，除非另有說明，否則包括重鏈可變域。重鏈可變域包括三個重鏈CDR和四個FR區，除非另有說明。典型的重鏈具有，接在可變域(從N-端到C-端)之後：CH1域、鉸鏈、CH2域、和CH3域。術語「重鏈的片段」包括重鏈的至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多個胺基酸的肽，並且可包括一或多個CDR、合併有一或多個FR的一或多個CDR、CH1、鉸鏈、CH2、或CH3之一或多者、可變區、恆定區、恆定區的片段(譬如CH1、CH2 CH3)、或其等之組合。HCF的例子包括VH，以及Fc區的全部或部分。用語「編碼HCF的核苷酸序列」包括編碼由HCF構成之多肽的核苷酸序列和編碼含有HCF之多肽的核苷酸序列，譬如可含

有除了指定的HCF以外的額外胺基酸的多肽。舉例來說，編碼HCF的核苷酸序列包括編碼由VH構成、由聯結到CH3的VH構成、由完整重鏈構成之多肽的核苷酸序列。

【0076】 在核酸序列上下文的「同源序列」是指實質上同源於一參照核酸序列的序列。在一些具體例中，兩個序列被視為實質上同源，假使其相應核苷酸的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多在殘基的相關展距是一致的。在一些具體例中，該相關展距是完整的(即全長)序列。

【0077】 用語「輕鏈」包括來自任何生物體的免疫球蛋白輕鏈恆定區序列，除非另有說明，否則包括人類的 κ 和 λ 輕鏈。輕鏈可變(VL)域通常包括三個輕鏈CDR和四個框架(FR)區，除非另有說明。一般來說，全長的輕鏈包括，從胺基端到羧基端，包括FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的VL域、和輕鏈恆定域。可連同本發明使用的輕鏈包括該等譬如不選擇性地結合由雙特異性抗體選擇性地結合的第一或第二表位者。適宜的輕鏈還包括該等可結合或有助於結合一抗體之抗原結合區所結合的一個或兩個表位者。術語「輕鏈的片段」或「輕鏈片段」(或「LCF」)包括輕鏈的至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多個胺基酸的肽，並且可包括一或多個CDRs、合併有一或多個FRs的一或多個CDR、可變區、恆定區、恆定區的片段、或其等之組合。LCF的例子包括VL和輕鏈恆定區(「CL」)的全部或部分。用語「編碼LCF的核苷酸序列」包括編碼由LCF構成之多肽的核苷酸序列和編碼含有LCF之多肽的核苷酸序列，譬如可含有除了指定的LCF以外的額外胺基酸的多肽。舉例來說，編碼LCF的核苷酸序列包括編碼尤其由VL構成、或由完整輕鏈構成之多肽的核苷酸序列。

【0078】 用語「可操作地聯結」是指核酸或蛋白以所聯接的分子如同預期般發揮作用的方式聯結。當DNA區在功能上彼此相關時，彼等為可操

作地聯結。舉例來說，一啟動子係可操作地聯結至一編碼序列，假使該啟動子能夠參與該序列的轉錄；一核醣體結合位點係可操作地聯結至一編碼序列，假使其係定位成允許轉譯。一般來說，可操作地聯結可包括但不需要鄰接性(contiguity)。在諸如分泌性領導之序列的情況下，閱讀框中的鄰接性和適當的置放是典型的特徵。感興趣基因座的表現增強序列係可操作地聯結至感興趣基因(GOI)，其在功能上與GOI相關，舉例來說，其存在使得GOI的表現增強。

【0079】 在描述感興趣的基因座，例如SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2或其片段時，「一致性百分比(Percent identity)」意指包括沿著連續同源區顯示所述一致性的同源序列，但在計算一致性百分比時，比對序列中沒有同系物的間隙、刪除、或插入的存在並不列入考慮。

【0080】 如本案所用，在譬如SEQ ID NO: 1、或其片段與物種同系物之間測定的「一致性百分比」將不包括的序列比對為物種同系物間不具有同源序列供線性比對(即，視情況而定，該SEQ ID NO: 1或其片段在該點具有插入，或者物種同系物具有間隙或刪除)。於是，「一致性百分比」不包括對於間隙、刪除、和插入的不利結果。

【0081】 「識別位點」或「識別序列」是核酸酶或其他酶所識別的特異性DNA序列，以結合並引導DNA主鏈的位點特異性切割。核酸內切酶切割DNA分子內的DNA。識別位點在本領域亦稱作識別標靶位點。

【0082】 「重組酶識別位點」(或「RRS」)是重組酶所識別的特異性DNA序列，例如Cre重組酶(Cre)或翻轉酶(flp)。當位點特異性重組酶的目標識別序列之一或多者被策略性地置於生物體的基因組中時，位點特異性重組酶可進行DNA重排，包括刪除、反轉和易位。在一個例子中，Cre特異性地介導其DNA目標識別位點 $loxP$ 的重組事件，該位點係由被8-bp間隔物隔開的兩個13-bp反向重複組成。可運用不止一個重組酶識別位點，舉例來說，

以促進DNA的重組介導交換。亦可運用重組酶識別位點的變化型或突變型，舉例來說lox位點(Araki, N. et al, 2002, *Nucleic Acids Research*, 30:19, e103)。

【0083】 「重組酶介導的盒式交換」或「RMCE」是關於以供體盒精確地置換基因組目標盒的方法。為了實行此方法，通常提供的分子組成物包括1)基因組目標盒，其5'和3'側接有特定重組酶的特異性識別標靶位點，2)供體盒，其側接有配合的識別標靶位點，以及3)位點特異性重組酶。重組酶蛋白是本領域熟知的(Turan, S. and Bode J., 2011, *FASEB J.*, 25, pp. 4088–4107)，並且能夠在特異性識別標靶位點(DNA序列)中精確切割DNA，而不增加或損失核苷酸。常見的重組酶/位點組合包括但不限於Cre/lox和Flp/rt。市售的套組亦提供含有R4-attP位點的載體和編碼phiC31整合酶的載體，以用於RMCE。(亦參閱，譬如美國公開申請案編號US20130004946)。

【0084】 「位點特異性整合」或「靶向插入」是指用於引導基因或核酸序列插入或整合至基因組中的特定位置的基因靶向方法，即將DNA引導到在連續的聚核苷酸鏈中的兩個核苷酸之間的特定位點。位點特異性整合或靶向插入亦可針對包括多個表現單元或盒的核定特酸，例如多個基因，各自具有其本身的調控元件(例如啟動子、增強子及/或轉錄終止序列)。「插入」和「整合」可互換使用。應當理解的是，取決於利用的基因編輯技術，基因或核酸序列(舉例來說，包含表現盒的核酸序列)的插入可導致(或可被工程化用於)置換或刪除一或多個核酸。

【0085】 「穩定整合」意指整合於宿主細胞基因組中的外源性核酸在細胞培養物中維持整合持續一段時間，舉例來說，至少7天、至少10天、至少15天、至少20天、至少25天、至少30天、至少35天、至少40天、至少45天、至少50天、至少55天、至少60天、或更長。應當理解的是，大規模製造和純化雙特異性抗原結合蛋白是一項具有挑戰性的任務。穩定性和選殖

性對任何生物分子的再現性至關重要，尤其是治療上使用的生物分子。藉由本揭示內容的方法所製備的表現雙特異性抗體的穩定選殖體提供了生成治療性生物分子的一致且可再現的方式。

一般說明

【0086】 本揭示內容提供了增進宿主細胞，尤其是中國倉鼠 (*Cricetulus griseus*) 細胞系中的多個多肽表現的組成物和方法，其係藉由在宿主細胞中運用多個(譬如兩個)增強表現基因座。更明確地說，本揭示內容提供了設計成以位點特異性方式使共同編碼一抗原結合蛋白的多個外源性核酸整合於宿主細胞，例如CHO細胞中的多個增強表現基因座內的組成物和方法。尤其，本揭示內容提供了含有整合於多個增強表現基因座之內的多個外源性核酸的細胞，其中該多個外源性核酸共同編碼一抗原結合蛋白。本揭示內容更提供設計成使多個外源性核酸位點特異性地整合至多個增強表現基因座的核酸載體。本揭示內容另提供了系統，該系統包括在多個增強表現基因座之各者含有多個重組酶識別位點(RRS)的宿主細胞，以及含有匹配的RRS和多個外源性核酸的載體組，以供來自該載體的多個外源性核酸位點特異性地整合至多個增強表現基因座內。再者，本揭示內容提供了使用本案所揭示的細胞、載體和系統製備抗原結合蛋白的方法。

具有位點特異性地整合於多個增強表現基因座內的多個外源性核酸的細胞

【0087】 在一態樣中，本揭示內容提供一種細胞，其含有位點特異性地整合於兩個增強表現基因座之內的多個外源性核酸，其中該多個外源性核酸共同編碼一抗原結合蛋白。該抗原結合蛋白可為雙特異性抗原結合蛋白、或習用的(即單特異性)抗原結合蛋白。本案提供的細胞能夠產生帶有高效價及/或高比生產率(pg/細胞/日)的所欲抗原結合蛋白。在一些具體例中，一細胞產生至少1 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L、2.5 g/L、3.0 g/L、3.5 g/L、4.0 g/L、4.5 g/L、5.0 g/L、10 g/L、或更大效價的抗原結合蛋白。在一些具體例中，

產生抗原結合蛋白的細胞具有至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15微微克/細胞/日、或更高的比生產率，其係以每日各個細胞產生的總抗原結合蛋白(以pg計)為基準來測定。在一些具體例中，提供了能夠以雙特異性抗原結合蛋白效價比上總抗原結合蛋白效價為至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、或更高的比例產生雙特異性抗原結合蛋白的細胞。在一些具體例中，提供了能夠產生雙特異性抗原結合蛋白的細胞，其中雙特異性抗原結合蛋白效價的比例為該細胞所產生的總抗原結合蛋白效價的至少50%。

【0088】 在其他具體例中，提供了能夠產生抗原結合蛋白的細胞，其中由兩個基因座的表現所產生的總抗原結合蛋白效價相較於由一個基因座的表現所產生的總抗原結合蛋白效價係為至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、或更高。在某些具體例中，提供了能夠產生一抗原結合蛋白的細胞，其中由兩個基因座的表現所產生的總抗原結合蛋白效價相較於由一個基因座的表現所產生的總抗原結合蛋白效價係為至少0.5倍、0.75倍、1倍、1.5倍、1.75倍、2倍、或更高。

【0089】 在一些具體例中，該細胞含有一第一外源性核酸，其整合在一第一增強表現基因座之內的特異性位點；和一第二外源性核酸，其整合在一第二增強表現基因座之內的特異性位點；其中第一和第二外源性核酸共同編碼一抗原結合蛋白。第一和第二外源性核酸一起包括編碼抗原結合蛋白的HCF(s)或LCF(s) (譬如可變區)的多個核苷酸序列。例如，就單特異性抗體而言，對於單特異性抗原結合蛋白，可有編碼HCF (譬如VH)的一個核苷酸序列和編碼LCF (譬如VL)的一個核苷酸序列、或各者的多個拷貝(譬如兩個拷貝)。就雙特異性抗體而言，可有各編碼HCF (通常兩個HCFs彼此不同)的兩個核苷酸序列、編碼LCF的核苷酸序列的一或兩個拷貝、或編碼兩個不同LCFs的兩個核苷酸序列。取決於抗原結合蛋白為單特異性或雙特異

性，編碼HCF(s)或LCF(s) (譬如可變區)的核苷酸序列可以不同變化或組合整合在兩個增強表現基因座。舉例來說，就單特異性抗原結合蛋白而言，在一例中，編碼HCF的核苷酸序列和編碼LCF的核苷酸序列可分開地整合在兩個基因座，各基因座一個；而在另一例中，編碼HCF和LCF的一核酸係整合在一個基因座，編碼相同HCF和相同LCFs的分別核酸係整合在另一基因座。就雙特異性抗原結合蛋白而言，在一例中，編碼一第一HCF和一LCF的核苷酸序列可整合於一第一基因座，編碼一第二HCF的核苷酸序列係整合於一第二基因座，其中該兩個HCFs是不同的，該LCF為雙特異性抗原結合蛋白的共同LCF；而在另一例中，編碼一第一HCF與一LCF的核苷酸序列係整合於一第一基因座，編碼一第二HCF與相同LCF的核苷酸序列係整合於一第二基因座。

【0090】 在一些具體例中，編碼HCF或LCF的核苷酸序列可編碼來自恆定區的胺基酸。舉例來說，編碼HCF或LCF的核苷酸序列可編碼CL、CH1、CH2、CH3的一或多者、或CH1、CH2或CH3的組合、或可編碼整個恆定區。在一些具體例中，編碼HCF的核苷酸序列係編碼CH3域。在特定具體例中，編碼一HHCF的核苷酸序列係編碼一重鏈。在一些具體例中，編碼LCF的核苷酸序列係編碼一輕鏈。

【0091】 在關於兩個HCFs的具體例中，編碼一第一HCF的該核苷酸序列可編碼來自一第一恆定區的胺基酸，編碼一第二HCF的該核苷酸序列可編碼來自一第二恆定區的胺基酸，其中來自該兩恆定區的胺基酸可在至少一位置相同或不同(例如產生不同的蛋白A結合特性的位置、或下文就各式雙特異性抗原結合蛋白說明的其他位置)。無關乎胺基酸的差異，編碼來自兩恆定區的胺基酸的兩個核苷酸序列可藉由修飾核苷酸序列的一或多個密碼子來區分，這提供了在以核酸為基礎的試驗中區分該兩個核苷酸序列的便利基礎。

【0092】 在一些具體例中，各個HCF-或LCF-編碼核苷酸序列為獨立地並可操作地聯結至含有啟動子的轉錄調控序列。「獨立地」意指各個編碼序列係可操作地聯結至分別的轉錄調控序列，例如一啟動子，所以該編碼序列的轉錄係處於分別的調控和控制之下。在一些具體例中，引導該兩個含HCF之多肽轉錄的啟動子是相同的。在一些具體例中，引導該兩個含HCF之多肽轉錄的啟動子，還有引導含VL之多肽轉錄的啟動子皆是相同的，譬如CMV啟動子。在一些具體例中，各個HCF-或LCF-編碼核苷酸序列為獨立地並可操作地聯結至可誘導型或可抑制型啟動子。可誘導型與可抑制型啟動子容許生產僅在生產期(補料分批培養)而不在生長期(種子培養)期間發生；或精確地以差異化方式控制在不同基因座中的抗體組分(HCF與LCF)的表現。各個基因產物的生產(表現)的精細控制可藉由不同的啟動子來實現。

【0093】 在一個此類例子中，細胞首先被工程化，以表現四環黴素抑制蛋白(TetR)，並且使各個HCF-和LCF-編碼核苷酸序列置於活性受TetR調控的啟動子的轉錄控制之下。兩個串聯的TetR操縱子(TetO)置於緊鄰CMV啟動子的下游。在一些具體例中，各個HCF-及/或LCF-編碼核苷酸序列係獨立地且可操作地聯結至至少一個TetR操縱子(TetO)或Arc操縱子(ArcO)上游的一啟動子。在其他具體例中，各個HCF-及/或LCF-編碼核苷酸序列係獨立地且可操作地聯結至CMV/TetO或CMV/ArcO雜合啟動子。另外的適宜啟動子在下文中說明。

【0094】 在一些具體例中，整合在兩個基因座的多個外源性核酸係側接有RRS。舉例來說，一第一RRS和一第二RRS係分別位於相對於整合在一第一基因座的一第一外源性核酸的5'和3'，以及一第三RRS和一第四RRS係分別位於相對於整合在一第二基因座的一第二外源性核酸的5'和3'，其中第一和第二RRS是不同的，第三和第四RRS是不同的。在一些具體例中，第一、

第二、第三和第四RRS皆彼此不同。在其他具體例中，第一和第三RRS是相同的，第二和第四RRS是相同的，其中第一外源性核酸編碼HCF與一LCF，第二外源性核酸編碼相同的HCF與LCF。

【0095】 在一些具體例中，當整合在一基因座的一外源性核酸包括兩個HCF或LCF-編碼核苷酸序列時，額外RRS可被包括在該兩個核苷酸序列之間。此類額外RRS應不同於側接在外源性核酸的兩個RRS。在一些具體例中，該額外RRS係插入包括在該整合的外源性核酸內並位於該兩個HCF或LCF-編碼核苷酸序列之間的可篩選標記基因的內含子。在轉錄與轉錄後處理之後，該內含子將被切除，生成編碼該可篩選標記的mRNA。在整合在一第一基因座的外源性核酸和整合在一第二基因座的外源性核酸皆包括兩個HCF或LCF-編碼序列(譬如LCF-HCF1和LCF-HCF2)的具體例中，額外RRS可被包括在各個基因座的該兩個HCF或LCF-編碼序列之間的第一和第二外源性核酸的僅一者、或兩者內。第一基因座的額外RRS可相同或不同於第二基因座的額外RRS。各個額外RRS應不同於側接在整合於基因座之外源性核酸的兩個RRS。各個額外RRS可任擇地插入可篩選標記基因的內含子，並且在該兩基因座中具有內含子的可篩選標記基因可不同。

【0096】 當多個HCF或LCF-編碼序列被包括在整合於基因座的外源性核酸之內時，該多個編碼序列在該基因座之內的相對位置可變化。舉例來說，在整合的外源性核酸包括LCF-編碼核苷酸序列和HCF-編碼核苷酸序列的具體例中，該LCF-編碼核苷酸序列可位於相對於該HCF-編碼核苷酸序列的上游或下游。在特定具體例中，該LCF-編碼核苷酸序列係位於相對於該HCF-編碼核苷酸序列的上游。在兩基因座包括一LCF-編碼核苷酸序列和一HCF-編碼核苷酸序列時，在特定具體例中，在兩基因座中，該LCF-編碼核苷酸序列皆位於該HCF-編碼核苷酸序列的上游。

【0097】 在另外的具體例中，提供了含有整合於一第一增強表現基因

座之內的一第一對RRS和整合於一第二增強表現基因座之內的一第二對RRS的細胞，其中在各對之內的兩個RRS是不同的。此類細胞可用於接收共同編碼一抗原結合蛋白的欲被整合之多個外源性核酸。

【0098】 在一些具體例中，一第一外源性核酸係存在於第一基因座的兩個RRS之間，一第二外源性核酸係存在於第二基因座的兩個RRS之間。第一和第二外源性核酸可各自編碼一或多個可篩選標記基因。可篩選標記基因可彼此不同。

【0099】 在一些具體例中，額外RRS係存在於基因座中成對的兩個RRS (即5' RRS和3' RRS)之間，其中該額外RRS係不同於該基因座的5' RRS和3' RRS兩者。在一些具體例中，額外RRS係存在於該兩基因座之一者的5' RRS和3' RRS之間；在其他具體例中，額外RRS係存在於該兩基因座之各者的5' RRS和3' RRS之間。當額外RRS係存在於5' RRS和3' RRS之間時，一可篩選標記基因可被包括在該5' RRS和該額外RRS之間，而且另一可篩選標記基因可被包括在該額外RRS和該3' RRS之間，該兩個可篩選標記是不同的。

【0100】 在所述的許多具體例中，該細胞為CHO細胞，其中兩個增強表現基因座之一者係選自於由下列所構成的群組：與SEQ ID NO: 1至少90%一致的核苷酸序列、與SEQ ID NO: 2至少90%一致的核苷酸序列、以及與SEQ ID NO: 3至少90%一致的核苷酸序列。

雙特異性抗原結合蛋白

【0101】 適用於選殖與生產本揭示內容所述之細胞、載體、和系統的雙特異性抗原結合蛋白，例如雙特異性抗體並不限於雙特異性抗原結合蛋白的任何特定格式。

【0102】 在各式具體例中，雙特異性抗原結合蛋白包括各自含有抗原結合部分(譬如HC)和CH3域的兩個多肽，其中該兩個多肽的抗原結合部分具有不同抗原特異性，其中該兩個CH3域相對於彼此是異二聚體，在於該等

CH3域之一者已在至少一個胺基酸位置被修飾，以生成該兩個多肽之間的區分性蛋白A結合特性。參閱，譬如美國專利8,586,713所述的雙特異性抗體。以此方式，可運用區分性蛋白A單離方案來容易地從異二聚體中單離異二聚體之雙特異性抗原結合蛋白。

【0103】 在一些具體例中，雙特異性抗原結合蛋白包括具有不同抗原特異性的兩個重鏈，而且在CH3域至少一個胺基酸位置不同，以生成該兩個重鏈之間的區分性蛋白A結合特性。

【0104】 在一些具體例中，該兩個多肽含有人類IgG的CH3域，其中該兩個多肽之一者含有選自IgG1、IgG2和IgG4之人類IgG的CH3域，該兩個多肽的另一者含有選自IgG1、IgG2和IgG4之人類IgG的經修飾CH3域，其中該修飾減少或消除了經修飾CH3區域與蛋白A的結合。在特定具體例中，該兩個多肽之一者含有人類IgG1的CH3域，該兩個多肽的另一者含有人類IgG1的經修飾CH3域，其中該修飾選自於由IMGT外顯子編號系統中的(i) 95R和(ii) 95R和96F所構成的群組。在其他特定具體例中，經修飾CH3域包含選自於由IMGT外顯子編號系統中的16E、18M、44S、52N、57M、和82I所構成的群組的一至五個額外修飾。

【0105】 在其他各種具體例中，該兩個多肽含有小鼠IgG的CH3域，其中該兩個多肽之一者含有未修飾小鼠IgG的CH3域，該兩個多肽的另一者含有小鼠IgG的經修飾CH3域，其中該修飾減少或消除了經修飾CH3區域與蛋白A的結合。在各式具體例中，小鼠IgG的CH3區域係經修飾，以在特定位置包含特定胺基酸(EU編號)，其選自由下列構成之群組：252T、254T、和256T；252T、254T、256T、和258K；247P、252T、254T、256T、和258K；435R和436F；252T、254T、256T、435R、和436F；252T、254T、256T、258K、435R、和436F；247P、252T、254T、256T、258K、435R、和436F；以及，435R。在特定具體例中，進行特定的一組修飾，其選自由下列構成

之群組：M252T、S254T、S256T；M252T、S254T、S256T、I258K；I247P、M252T、S254T、S256T、I258K；H435R、H436F；M252T、S254T、S256T、H435R、H436F；M252T、S254T、S256T、I258K、H435R、H436F；I247P、M252T、S254T、S256T、I258K、H435R、H436F；以及，H435R。

【0106】 在各式具體例中，雙特異性抗原結合蛋白是小鼠和大鼠單株抗體或抗原結合蛋白的雜交體，譬如小鼠IgG2a和大鼠IgG2b的雜交體。根據該等具體例，雙特異性抗體係由該兩個抗體的異二聚體構成，其包含各者經由Fc部分連結的一對重/輕鏈。所欲的異二聚體可輕易地從兩個親代抗體同二聚體和雙特異性異二聚體的混合物純化，因為雙特異性抗體和蛋白A的結合特性係不同於親代抗體和蛋白A的結合特性：大鼠IgG2b不會結合至蛋白A，而小鼠IgG2a會。因此，小鼠-大鼠係結合至異二聚體蛋白A，但在比小鼠IgG2a同二聚體更高pH沖提出來，此使得雙特異性異二聚體的選擇性純化成為可能。

【0107】 在其他各式具體例中，雙特異性抗原結合蛋白具有本領域中稱為「杵-臼(knobs-into-holes)」的格式(參閱，譬如美國專利號7,183,076)。在該等具體例中，兩個抗體的Fc部分被工程化，以產生一個突出的「杵」，另一者為互補的「臼」。當在相同的細胞中生產時，藉由使工程化的「杵」與工程化的「臼」相連，據說重鏈偏好形成異二聚體，而非同二聚體。

【0108】 在另一具體例中，第一重鏈和第二重鏈包含在CH3域中的一或多個胺基酸修飾，以實現兩個重鏈之間的交互作用。CH3-CH3界面胺基酸殘基可用帶電荷的胺基酸置換，以提供形成不利靜電的同二聚體。(參閱，譬如PCT公開號WO2009089004；和歐洲公開號EP1870459)。

【0109】 在其他具體例中，第一重鏈包含同型IgA的CH3域，第二重鏈包含IgG的CH3域(或反之亦然)，以促進異二聚體的優先形成。(參閱譬如PCT公開號WO2007110205)。

【0110】 在其他具體例中，可藉由工程方法將各種格式併入免疫球蛋白鏈，以助長異二聚體的形成，例如Fab-臂交換(PCT公開號PCT公開號WO2008119353；PCT公開號WO2011131746)、捲曲螺旋域交互作用(PCT公開號WO2011034605)或白胺酸拉鏈肽(Kostelny, et al. *J. Immunol.*1992, 148(5):1547-1553)。

【0111】 可用於生成雙特異性抗原結合蛋白的免疫球蛋白重鏈片段(例如可變區)可使用本領域已知的任何方法生成。舉例來說，第一重鏈包含由已用第一抗原免疫的第一動物的成熟B細胞的基因組所衍生的核酸編碼的可變區，第一重鏈特異性識別第一抗原；以及第二重鏈包含由已用第二抗原免疫的第二動物的成熟B細胞的基因組所衍生的核酸編碼的可變區，第二重鏈特異性識別第二抗原。免疫球蛋白重鏈可變區序列也可藉由本領域已知的任何其他方法獲得，譬如藉由噬菌體展示獲得。在其他例子中，編碼重鏈可變區的核酸包括該等在本領域已經描述或以其他方式可取得的抗體的核酸。在一些具體例中，該兩個重鏈編碼序列中的一者的密碼子已被修飾，以提供在以核酸為基礎的試驗中區分該兩個編碼序列的便利基礎。

【0112】 包含識別兩個不同表位(或兩個不同抗原)的兩個重鏈的雙特異性抗體更易於單離，其中彼等可與相同的輕鏈(即具有一樣的可變和恆定域的輕鏈)配對。本領域已知多種方法用於生成可與兩個不同特異性的重鏈配對的輕鏈，同時不干擾或實質上不干擾重鏈可變域與其標靶抗原的選擇性及/或親和力，如描述於譬如美國專利8,586,713及其中揭示的技術。

【0113】 該雙特異性抗原結合蛋白可具有各式各樣的雙重抗原特異性和相關的有用應用。

【0114】 在一些例子中，可製備包含針對腫瘤抗原和T細胞抗原之結合特異性的雙特異性抗原結合蛋白，其靶向細胞上的抗原，譬如CD20，亦靶向T細胞上的抗原細胞，譬如T細胞受體，例如CD3。以此方式，雙特異

性抗原結合蛋白靶向患者的感興趣細胞(譬如，淋巴瘤患者的B細胞，經由CD20結合)還有患者的T細胞。在各式具體例中，雙特異性抗原結合蛋白被設計成在結合CD3時激活T細胞，於是使T細胞活化偶合至特定的選定腫瘤細胞。

【0115】 就雙特異性抗原結合蛋白而言，其中一個部分結合至T細胞受體，例如結合至CD3，且另一部分結合至標靶抗原，標靶抗原可為腫瘤相關抗原。特定腫瘤相關抗原的非限制例子包括，譬如AFP、ALK、BAGE蛋白、BIRC5 (存活素)、BIRC7、 β -連環素、bcr-abl、BRCA1、BCMA、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、半胱天冬酶-8、CALR、CCR5、CD19、CD20(MS4A1)、CD22、CD30、CD40、CDK4、CEA、CLEC-12、CTLA4、細胞週期蛋白-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2 / Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(譬如GAGE-1、-2)、GD2、GD3、GloboH、磷脂醯肌醇蛋白聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA / B-raf、HLA / ras、HLA / MAGE-A3、hTERT、LMP2、MAGE蛋白(譬如MAGE-1、-2、-3、-4、-6、和-12)、MART-1、間皮素、ML-IAP、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16 (CA-125)、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA(FOLH1)、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、TAG-72、TGF- β 、TMPRSS2、湯普生-新式抗原(Tn)、TRP-1、TRP-2、酪胺酸酶、和尿普拉汀-3。在一些具體例中，雙特異性抗原結合蛋白包含結合CD3的一個部分。例示性抗-CD3抗體部分係描述於美國專利申請案公開號US2014/0088295A1和US20150266966A1，以及在2017年3月30日公開的國際專利公開號WO 2017/053856中，所有該等都藉由引用併入本案)。在其他具體例中，雙特異性抗原結合蛋白包含結合至CD3的一個部分和結合至BCMA、CD19、

CD20、CD28、CLEC-12、Her2、HLA蛋白、MAGE蛋白、Muc16、PSMA或Steap- 2的一個部分。在又其他具體例中，雙特異性抗原結合蛋白選自由下列構成之群組：抗-CD3 x抗-CD20雙特異性抗體(如美國專利申請案公開號US2014/0088295A1和US20150266966A1中所述，以參照方式併入本案)，抗-CD3 x抗黏蛋白16雙特異性抗體(譬如抗-CD3 x抗-Muc16雙特異性抗體)和抗-CD3 x抗前列腺特異性膜抗原雙特異性抗體(譬如抗-CD3 x抗-PSMA雙特異性抗體)。

【0116】 就雙特異性抗原結合蛋白而言，其中一個部分結合至T細胞受體，例如結合至CD3，且另一部分結合至標靶抗原，標靶抗原可為感染性疾病相關抗原。感染性疾病相關抗原的非限制例子包括，譬如在病毒顆粒的表面上表現或偏好在已感染病毒的細胞上表現的抗原，其中該病毒選自由下列構成之群組：HIV、肝炎(A、B或C)、疱疹病毒(譬如HSV-1、HSV-2、CMV、HAV-6、VZV、EB病毒)、腺病毒、流感病毒、黃熱病毒、腸道細胞病變性人類孤兒病毒、鼻病毒、克沙奇病毒、冠狀病毒、呼吸道融合病毒、腮腺炎病毒、輪狀病毒、麻疹病毒、德國麻疹病毒、細小病毒、牛痘病毒、HTLV、登革熱病毒、乳頭瘤病毒、軟體動物病毒、脊髓灰質炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒、和芳香病毒性腦炎病毒。或者，標靶抗原可為在細菌表面上表現或偏好在已感染細菌的細胞上表現的抗原，其中該細菌選自由下列構成之群組：衣原體、立克次體、分枝桿菌、葡萄球菌、鏈球菌、肺炎球菌、腦膜炎球菌、淋球菌、克雷伯氏菌、變形桿菌、沙雷氏菌、假單胞菌、退伍軍人症桿菌、白喉病菌、沙門氏菌、桿菌、霍亂桿菌、破傷風桿菌、肉毒桿菌、炭疽桿菌、鼠疫桿菌、鉤端螺旋體、和萊姆病菌。在某些具體例中，標靶抗原是在真菌表面上表現或偏好在已感染真菌的細胞上表現的抗原，其中該真菌選自由下列構成之群組：念珠菌(白色念珠菌、克魯斯氏念珠菌、光滑念珠菌、熱帶念珠菌等等)、新生隱球菌(*Cryptococcus*

neoformans)、曲黴(煙曲黴、黑曲黴等等)、毛黴目(毛黴屬、犁頭黴屬、根黴屬等等)、絲狀芽孢桿菌(*Sporothrix schenkii*)、皮膚癬菌(*Blastomyces dermatitidis*)、巴西隱孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、球孢子蟲(*Coccidioides immitis*)、和組織胞漿菌(*Histoplasma capsulatum*)。在某些具體例中，標靶抗原是在寄生蟲的表面上表現或偏好在已感染寄生蟲的細胞上表現的抗原，其中該寄生蟲選自由下列構成之群組：痢疾阿米巴原蟲(*Entamoeba histolytica*)、大腸纖毛蟲(*Balantidium coli*)、福氏耐格里變形蟲(*Naegleria fowleri*)、棘阿米巴屬(*Acanthamoeba* sp.)、梨形鞭毛蟲(*Giardia lamblia*)、隱孢子蟲屬(*Cryptosporidium* sp.)、肺囊蟲(*Pneumocystis carinii*)、間日瘧原蟲(*Plasmodium vivax*)、巴貝西蟲(*Babesia microti*)、布氏錐蟲(*Trypanosoma brucei*)、克氏錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)、杜氏利什曼原蟲(*Leishmania donovani*)、弓形蟲(*Toxoplasma gondii*)、巴西日圓線蟲(*Nippostrongylus brasiliensis*)、肥頭帶條蟲(*Taenia crassiceps*)、和馬來絲蟲(*Brugia malayi*)。特異性病原體相關抗原的非限制例子包括，譬如HIV gp120、HIV CD4、B型肝炎肝醣蛋白L、B型肝炎肝醣蛋白M、B型肝炎肝醣蛋白S、C型肝炎E1、C型肝炎E2、肝細胞特異性蛋白、單純皰疹病毒gB、巨細胞病毒gB、和HTLV包膜蛋白。

【0117】 亦可製造包含兩個結合部分的雙特異性結合蛋白，該等結合部分各自指向相同細胞表面上的結合夥伴(即各自指向不同標靶)。該設計係尤其適用於靶向在相同細胞表面上表現兩種標靶的特定細胞或細胞類型。雖然標靶可能單獨出現在其他細胞上，但是該等結合蛋白的結合部分係經挑選，俾使各個結合部分以相對低的親和力結合至其標靶(譬如，低的微莫耳或高的毫微莫耳—譬如超過一百毫微莫耳KD，譬如500、600、700、800毫微莫耳)。以此方式，在兩個標靶在相同細胞上鄰近的情況下，長期的標靶結合是有利的。

【0118】 可製備包含結合至相同標靶的兩個結合部分的雙特異性結合蛋白，該等結合部分係各自於相同標靶的不同表位。此設計尤其適用於使結合蛋白成功阻斷標靶的機率最大化。多個細胞外迴圈，譬如跨膜通道或細胞表面受體可被相同的雙特異性結合分子靶向。

【0119】 可製備包含兩個結合部分的雙特異性結合蛋白，該等結合部分係聚集並激活免疫信號的負調控物，以產生免疫抑制。當標靶在相同的細胞上時，可實現順向抑制；當標靶在不同的細胞上時，可實現反向抑制。順向抑制可用具有抗-IgGRIIb結合部分和抗-FcγR1結合部分的雙特異性結合蛋白來實現，俾使IgGRIIb僅在FcγR1的存在下聚集，以向下調控對FcγR1的免疫反應。反向抑制，譬如可藉由具有抗-BTLA結合部分和特異性結合感興趣的組織特異性抗原的結合部分的雙特異性結合蛋白來實現，俾使抑制性BTLA分子的聚集僅發生在所選擇的標靶組織，這可能解決自體免疫疾病。

【0120】 可製備激活多組分受體的雙特異性結合蛋白。在此設計中，指向受體兩個組分的兩個結合部分係結合、交聯該受體，並激活受體的信號傳導。此可譬如使用具有結合IFNAR1的結合部分和結合IFNAR2的結合部分的雙特異性結合蛋白，其中結合係交聯該受體。此類雙特異性結合蛋白可提供干擾素治療的替代方案。

【0121】 可製備跨越半滲透屏障，譬如血腦屏障運送結合部分的雙特異性結合蛋白。在此設計中，一個結合部分係結合能夠運送特定選擇性屏障的標靶；另一個結合部分靶向具有治療活性的分子，其中具有治療活性的標靶分子無法正常穿過屏障。此種雙特異性結合蛋白可用於將治療劑引入該治療劑不能到達的組織。一些例子包括靶向pIGR受體以將治療劑運送到腸或肺中，或靶向轉鐵蛋白受體以跨越血腦屏障運送治療劑。

【0122】 可製備將結合部分運送到特定細胞或細胞類型的雙特異性

結合蛋白。在此設計中，一個結合部分係靶向容易內化到細胞中的細胞表面蛋白(例如受體)。另一個結合部分靶向細胞內蛋白，其中細胞內蛋白的結合產生治療效果。

【0123】 結合吞噬免疫細胞的表面受體和感染性病原體(譬如酵母或細菌)的表面分子的雙特異性結合蛋白將感染性病原體帶往吞噬免疫細胞附近，而促進病原體被吞噬。此類設計的一個例子是靶向CD64或CD89分子以及病原體的雙特異性抗體。

【0124】 雙特異性結合蛋白具有作為一個結合部分的抗體可變區和作為第二結合部分的非Ig部分。抗體可變區實現了靶向，非Ig部分是聯接至Fc的效應子或毒素。以此方式，配體(例如效應子或毒素)被遞送至由抗體可變區結合的標靶。

【0125】 雙特異性結合蛋白具有各自結合至Ig區的兩個部分(譬如，含有CH2和CH3區的Ig序列)，俾使任何兩個蛋白部分可相對於Fc鄰近彼此。此設計的例子包括陷阱，譬如同-或異二聚體陷阱分子。

增強表現基因座

【0126】 適用於本發明的表現增強基因座包括，舉例來說，包含與SEQ ID NO: 1具有實質同源性的核苷酸序列的基因座，如美國專利8,389,239所述(本案亦稱為「EESYR[®]基因座」或「基因座1」)、包含與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3具有實質同源性的核苷酸序列的基因座，如美國申請案編號14/919,300 (本案亦稱為「YARS基因座」或「基因座2」)，以及本領域中記載的其他增強表現基因座和序列(譬如US 20150167020A1、和美國專利6,800,457)。

【0127】 在一些具體例中，用於本發明的兩個增強表現基因座選自於由下列所構成的群組：包含與SEQ ID NO: 1具有實質同源性的核苷酸序列的基因座、包含與SEQ ID NO: 2具有實質同源性的核苷酸序列的基因座、

以及包含與SEQ ID NO: 3具有實質同源性的核苷酸序列的基因座。該等基因座含有不僅提供可操作地聯結至序列(即在該序列之內或緊鄰該序列)所整合的基因的增強表現的序列，相較於基因組中的其他序列，亦展現更大的重組效率和改良的整合穩定性。

【0128】 已經從CHO細胞鑑定了SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 3。發現到其他哺乳動物物種(例如，舉例來說，人類或小鼠)與鑑定的增強表現區域僅具有有限的同源性；然而，同源序列可在衍生自中國倉鼠或其他同源物種的其他組織類型的細胞系中發現，並且可藉由本領域熟知的技術單離。舉例來說，吾人可藉由雜種雜交或基於PCR的技術鑑定其他同源序列。此外，可藉由本領域熟知的位點指向或隨機突變技術在SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列中進行改變。隨後可測試所得序列變體的增強表現活性。具有增強表現活性、與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3呈至少約90%一致的核酸一致性的DNA可藉由慣用的實驗單離，並且預期展現增強表現活性。

【0129】 插入一或多個外源性核酸的整合位點、位點或核苷酸位置可在表現增強序列(例如SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 1 NO: 2，SEQ ID NO: 3)的任一者之內或毗鄰的任何位置。在感興趣的基因座之內或毗鄰的特定染色體位置是否支持整合外源基因的穩定整合和有效轉錄可根據本領域熟知的標準程序來決定，譬如如美國專利8,389,239和美國申請案編號14,919,300中所述。

【0130】 本案所考慮的整合位點係位在表現增強序列之內、或緊鄰該序列，譬如小於約1kb、500鹼基對(bp)、250bp、100bp、50bp、25bp、10bbp、或小於約5bp，其係於相對於染色體DNA上的表現增強序列位置的上游(5')或下游(3')。在又一些其他具體例中，所運用的整合位點係位在相對於染色體DNA上的表現增強序列位置的上游(5')或下游(3')的約1000、2500、5000

或更多鹼基對。

【0131】 應當理解的是，在本領域中，大型基因組區域，例如主鏈/基質附著區係運用於染色體DNA的有效複製和轉錄。主鏈/基質附著區(S/MAR)，亦稱為主鏈附著區(SAR)、或基質相關或基質附著區(MAR)是細胞核基質附著的真核基因組DNA區。不受限於任何一種理論，S/MARs通常定位到非編碼區，將給定的轉錄區(譬如染色質域)與其鄰居分開，並為能夠轉錄的因子，例如DNA酶或聚合酶的識別位點的機制及/或結合提供平台。一些S/MARs的特徵在於長度約為14-20kb (Klar, et al. 2005, *Gene* 364:79-89)。因此，整合在表現增強基因座(譬如在SEQ ID NO: 1、或SEQ ID NO: 2、或SEQ ID NO: 3之內或鄰近)的基因被期望賦予增強的表現。在一些具體例中，包含整合在增強表現基因座之內的特定位點的編碼雙特異性抗原結合蛋白的外源性核酸序列的宿主細胞係展現出高的比生產率。在其他具體例中，編碼雙特異性抗原結合蛋白的宿主細胞具有至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、或30微微克/細胞/日(pcd)的比生產率。

【0132】 在一些具體例中，外源性核酸係整合在包含SEQ ID NO: 1之核苷酸序列的基因座之內的位點。在特定具體例中，該整合位點係位於SEQ ID NO: 1之核苷酸序列之內或緊鄰SEQ ID NO: 1之核苷酸序列。在特別的具體例中，該整合位點係位於SEQ ID NO: 1之內的位置，其係選自跨越以下編號的位置的核苷酸：10-13,515；20-12,020；1,020-11,020；2,020-10,020；3,020-9,020；4,020-8,020；5,020-7,020；6,020-6,920；6,120-6,820；6,220-6,720；6,320-6,620；6,420-6,520；6,460-6,500；6,470-6,490；和6,475-6,485。在其他具體例中，該整合位點係位於選自由下列構成之群組的序列中：SEQ ID NO: 1的核苷酸5,000-7,400, 5,000-6,500, 6,400-7,400；和SEQ ID NO: 1的核苷酸6,400-6,500。在特定具體例中，該整合位點係在SEQ ID NO: 1的核苷酸6471至6473的「act」三聯體之前、之後、

或之內。

【0133】 在一些具體例中，外源性核酸係整合在包含SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3的核苷酸序列的基因座之內的位點。在特定的具體例中，該整合位點係在SEQ ID NO: 2的核苷酸序列之內或緊鄰SEQ ID NO: 2的核苷酸序列。在特別的具體例中，該整合位點係在SEQ ID NO: 3的核苷酸序列之內或緊鄰SEQ ID NO: 3的核苷酸序列。在一些具體例中，該整合位點係在SEQ ID NO: 3的核苷酸1990-1991、1991-1992、1992-1993、1993-1994、1995-1996、1996-1997、1997-1998、1999-2000、2001-2002、2002-2003、2003-2004、2004-2005、2005-2006、2006-2007、2007-2008、2008-2009、2009-2010、2010-2011、2011-2012、2012-2013、2013-2014、2014-2015、2015-2016、2016-2017、2017-2018、2018-2019、2019-2020、2020-2021或2021-2022之內。在特定具體例中，該整合係在SEQ ID NO: 3的核苷酸2001-2022或SEQ ID NO: 3的核苷酸2001-2022之內。在一些具體例中，外源性核酸係插入在SEQ ID NO: 3的核苷酸2001-2002或核苷酸2021-2022或是SEQ ID NO: 3的核苷酸2001-2002或核苷酸2021-2022之內，而由於插入的結果，SEQ ID NO: 3的核苷酸2002-2021被刪除。

位點特異性整合至增強表現基因座

【0134】 將一或多個外源性核酸以位點特異性方式整合至增強表現基因座，即如本案所揭示般整合至增強表現基因座中的一個特定位點可以數種方式實現，包括了，譬如藉由同源重組、和重組酶介導的盒交換，如本領域所述(參閱譬如美國專利8,389,239及其中揭示的技術)。

【0135】 在一些具體例中，提供了在增強表現基因座之內包含至少兩個，即兩個或更多個不同重組酶識別序列(RRS)的細胞，該細胞係便於整合含有一或多個感興趣的外源性核酸或基因的核酸序列。此類細胞可藉由各種方式，包括同源重組，譬如下文和本領域所述，例如美國專利8,389,239

及其中揭示的技術將含有兩個或更多個RRS的外源性核酸序列引進所欲的基因座而獲得。

【0136】 在特定具體例中，提供了在增強表現基因座之內含有超過兩個不同重組酶識別序列(RRS)的細胞，該細胞係便於整合多個外源性核酸。在特別的具體例中，提供了在增強表現基因座內含有三個不同重組酶識別序列(RRS)的細胞，該細胞可介導兩個分別的外源性核酸的整合，舉例來說，其中基因組中的5'RRS和中間RRS係匹配欲被整合之第一外源性核酸所側接的5'RRS和3'RRS，而基因組中的中間RRS和3'RRS則匹配欲被整合之第二外源性核酸所側接的5' RRS和3' RRS。

【0137】 適宜的RRS可選自包含下列的群組：*LoxP*、*Lox511*、*Lox5171*、*Lox2272*、*Lox2372*、*Loxm2*、*Lox-FAS*、*Lox71*、*Lox66*及其突變體，其中位點特異性重組酶是Cre重組酶或其衍生物係用於實現重組酶介導的盒式交換(RMCE)。在其他例子中，適宜的RRS可選自包含下列的群組：*FRT*、*F3*、*F5*、*FRT*突變體-10、*FRT*突變體+ 10及其突變體，在此情形下，位點特異性重組酶Flp重組酶或其衍生物係用於實現RMCE。在再另一個例子中，RRS可選自包含下列的群組：*attB*、*attP*及其突變體，在此情況下，位點特異性重組酶phiC31整合酶或其衍生物係用於實現RMCE。

【0138】 在其他具體例中，天然細胞係藉由同源重組技術修飾，以將含有一或多個外源性核酸的核酸序列整合至增強表現基因座之內的特定位點。

【0139】 對於同源重組，同源聚核苷酸分子(即同源臂)排列並交換其序列的一段展距。可在此交換期間引進一轉殖基因，假使該轉殖基因係側接有同源基因組序列。在一個例子中，重組酶識別位點可經由同源重組引入宿主細胞基因組的整合位點。在其他例子中，含有一或多個感興趣外源性核酸的核酸序列，譬如各自編碼HCF或LCF(例如可變區)的一或多個核酸

係插入宿主基因組，其中該核酸序列係側接有和標靶基因座之序列同源的序列(「同源臂」)。

【0140】 真核細胞中的同源重組可藉由在整合位點引入染色體DNA的斷點來促進。此可藉由將某些核酸酶靶向到特定的整合位點來達成。識別在標靶基因座的DNA序列的DNA結合蛋白是本領域已知的。基因靶向載體也運用於促進同源重組。

【0141】 用以實現同源重組的基因靶向載體建構和核酸酶選擇在本發明所屬技術人員的技術範圍內。在一些例子中，具有模塊結構並且含有一個別鋅指域的鋅指核酸酶(ZFNs)係識別標靶序列中的特定3-核苷酸序列(譬如靶向整合位點)。一些具體例可利用帶有靶向多個標靶序列的個別鋅指域之組合的ZFNs。轉錄激活子樣(TAL)效應子核酸酶(TALENs)也可用於位點特異性基因組編輯。TAL效應子蛋白DNA結合域通常與限制核酸酶(例如FokI)的非特異性切割域合併利用。在一些具體例中，包含TAL效應子蛋白DNA結合域和限制核酸酶切割域的融合蛋白係運用來在本發明基因座之內的標靶序列識別和切割DNA (Boch J et al., 2009 *Science* 326:1509-1512)。RNA引導的核酸內切酶(RGENs)是從細菌適應性免疫機制開發的可編程基因組工程工具。在此系統中—規律成簇的間隔短迴文重複(CRISPR)/CRISPR相關(Cas)免疫回應—當與兩個RNA錯合且其中之一者引導標靶選擇時，蛋白Cas9形成序列特異性核酸內切酶。RGENs是由組分(Cas9和tracrRNA)和標靶特異性CRISPR RNA(crRNA)構成。DNA標靶切割的效率和切割位點的位置係基於前間隔序列鄰近模體(PAM)位置，標靶識別的額外要件而變化(Chen, H. et al, *J. Biol. Chem.* published online March 14, 2014, as Manuscript M113.539726)。專門用於特異性靶向基因座(例如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、或SEQ ID NO: 3)的序列可藉由將該等序列中的許多序列與CHO基因組對齊來鑑定，其可以16-17個鹼基對匹配揭露潛在的脫靶位點。

【0142】 在一些具體例中，攜帶感興趣的核酸(譬如，含有側接一或多個可篩選標記基因的一或多個RRS的核酸、或含有一或多個外源性核酸的核酸，各者編碼HCF或LCF (例如可變區)，側接有5'和3'同源臂)的靶向載體係藉由一或多個額外載體或mRNA引進細胞。在一個具體例中，該一或多個額外載體或mRNA含有核苷酸序列，該序列編碼位點特異性核酸酶，其包括但不限於鋅指核酸酶(ZFN)、ZFN二聚體、轉錄激活子樣效應子核酸酶(TALEN)、TAL效應子域融合蛋白、和RNA引導的DNA核酸內切酶。在某些具體例中，該一或多個載體或mRNA包括包含引導RNA、tracrRNA和編碼Cas酶的核苷酸序列的第一載體、和包含供體(外源)核苷酸序列的第二載體。此類供體序列含有核苷酸序列，該序列係編碼感興趣的基因、或識別序列、或包含意圖用於靶向插入的該等外源元件中的任何一者的基因盒。當使用mRNA時，該mRNA可藉由本領域技術人員已知的常見轉染方法轉染到細胞中，並且可編碼酶，例如轉位酶或核酸內切酶。雖然引進細胞的mRNA可能是短暫的且不整合至基因組中，但該mRNA可攜帶必需或有益於整合發生的外源性核酸。在一些情況下，mRNA係經挑選，以消除輔助性聚核苷酸的長期持久副作用的風險，其中僅需要短期表現來實現核酸的所欲整合。

用於位點特異性整合的載體

【0143】 本案提供了用於經由位點特異性整合將外源性核酸引進兩個增強表現基因座的核酸載體。適宜的載體包括被設計成含有側接有經由RMCE整合的RRS的外源性核酸序列的載體，以及被設計成含有側接有經由同源重組整合的同源臂的感興趣外源性核酸序列的載體。

【0144】 在各式具體例中，提供了經由RMCE實現位點特異性整合的載體。在一些具體例中，載體被設計成實現多個核酸同步整合至兩個標靶基因座中。對比於依序整合，同步整合允許效率和快速單離產生抗原結合蛋白、或感興趣的其他多聚蛋白，而適用於大規模生產(製造)。

【0145】 在一些具體例中，提供了用於在細胞中表現雙特異性抗原結合蛋白的載體組。

【0146】 在一些具體例中，載體組可包括兩個「HCF載體」，各自含有側接有5'RRS和3'RRS的核酸，其中該核酸包括編碼HCF的核苷酸序列，其中兩個HCF是不同的。該兩個HCF載體上的RRS彼此不同，並被設計為將HCF-編碼核苷酸序列整合至兩個增強表現基因座。該載體組還包括編碼LCF的核苷酸序列，其可包括在該HCF載體之一者中，或者包括在兩個HCF載體中(藉此提供相同LCF的兩個拷貝)，或者，在分別的「LCF載體」提供並側接有5'RRS和3'RRS。

【0147】 在一些具體例中，LCF-編碼核苷酸序列被包括在HCF載體之一者中並位於該HCF載體上的5'RRS和3'RRS之間。該LCF-編碼序列可位於該HCF-編碼序列的上游或下游。

【0148】 在一些具體例中，該LCF-編碼核苷酸序列被包括在兩個HCF載體並位於各個HCF載體上的5' RRS與3' RRS之間。類似地，該LCF-編碼序列可放置在各個載體的HCF-編碼序列的上游或下游。

【0149】 在一些具體例中，LCF-編碼核苷酸序列係於分別的載體—「LCF」載體—提供，並側接有5' RRS和3' RRS，該兩個RRS彼此不同。該載體組的RRS可設計成俾使LCF-編碼序列可在和亦含有該共用RRS的標靶基因座的RMCE期間，經由共用RRS而和該HCF-編碼序列之一者「聯合」。舉例來說，LCF載體的3' RRS可相同於HCF載體之一者的5' RRS，經由RMCE整合於標靶基因座之後產生一種LCF-HCF配置。在另一例子中，HCF載體的3' RRS可相同於LCF載體的5' RRS，經由RMCE整合於標靶基因座之後產生一種HCF-LCF配置。在一些具體例中，該共用RRS被設計為拆分可篩選標記格式—也就是說，其被包括在一個載體中所包括的可篩選標記基因的5'部分的3'端，亦被包括在另一載體中所包括的相同可篩選標記基因的其餘

3'部分的5'端，俾使在「聯合」並整合至標靶基因座內之後，該適當地整合的核酸包括完整的可篩選標記基因，以容許方便鑑定轉染體。在一些具體例中，該共用RRS被設計為拆分基因格式，即，被包括在此類拆分基因之內的基因或內含子的5'部分的3'端，作為在一個載體上的該基因的5'部分的一部分，並包括在此類拆分基因之內的基因或內含子的其餘部分的5'端，作為該拆分基因的其餘3'部分的一部分。在又其他具體例中，一第一載體的第三或中間RRS被設計為介於其所操作地聯接的啟動子與可篩選標記基因之間(但在另一載體上，其被隔開)；第一載體的第三或中間RRS被設計為啟動子的3'；第二載體的第三或中間RRS被設計為可篩選標記基因的5'。

【0150】 在一些具體例中，載體組可包括編碼LCF的額外核苷酸序列。也就是說，載體組可包括兩個HCF載體，和兩個LCF-編碼核苷酸序列。該兩個LCF-編碼序列可編碼相同或不同的LCF。在一些具體例中，該兩個LCF-編碼序列可各自包括在HCF載體中，產生兩個載體，各自含有HCF-編碼序列和LCF-編碼序列。該兩載體可被設計成具有適用於靶向該兩個載體序列進入兩個基因座的RRS。在其他具體例中，該兩個LCF-編碼序列之一者被包括在HCF載體中並位於該HCF載體上的5'RRS和3'RRS之間，而另一個LCF-編碼序列係於分別的載體上提供 - 即，一個載體具有LCF和HC兩者(呈LCF-HCF或HCF-LCF配置，或簡稱為「LCF/HCF載體」)，一個HCF載體，和一個LCF載體。在若干該等其他具體例中，載體RRS可被設計成允許HCF載體上的HCF-編碼序列和LCF載體上的LCF-編碼序列透過RMCE在標靶基因座聯合。舉例來說，LCF載體的3' RRS可相同於HCF載體的5' RRS，共用RRS可被設計為拆分可篩選標記或拆分內含子格式，以促進轉染體的選擇與鑑定。在又其他具體例中，當該兩個LCFs不同時，該兩個LCF-編碼核苷酸序列各可在分別的載體上提供 - 也就是說，該載體組包括兩個HCF載體，和兩個LCF載體。RRS可被設計成允許一個LCF-編碼序列和一個HCF-編碼

序列在一個標靶基因座適當「聯合」，而另一個LCF-編碼序列和另一個HCF-編碼序列在一個第二標靶基因座適當「聯合」。圖1、3和4為不同載體格式與RRS/基因座組合的例示，而非意味限制。各個給定載體系統提供了在重組酶的存在下同時整合各個核苷酸序列的方式，以供快速和方便地選擇正整合體(所欲選殖體)。

【0151】 編碼HCF或LCF的核苷酸序列可編碼來自恆定區的胺基酸或(多個)域，或編碼整個恆定區。在特定具體例中，編碼HCF或LCF的核苷酸序列可編碼一或多個恆定域，例如CL、CH1、鉸鏈、CH2、CH3、或其等之組合。在某些具體例中，編碼HCF域的核苷酸序列可編碼CH3域。舉例來說，編碼第一HCF的核苷酸序列可編碼第一CH3域，編碼第二HCF的核苷酸序列可編碼第二CH3域。第一和第二CH3域可相同，或至少一個胺基酸不同。CH3域或恆定區中的差異可採用本案所述的雙特異性抗原結合蛋白的任何形式，譬如造成不同蛋白A結合特性、或造成「杵臼(knob-and-hole)」格式的差異。無關乎任何胺基酸序列差異，該兩個HCF-編碼核苷酸序列亦可差別在於該兩個核苷酸序列之一者的密碼子已被修飾。

【0152】 在一些具體例中，各個HCF或LCF-編碼的核苷酸序列為獨立地並可操作地聯結至包括譬如啟動子的轉錄調控序列。在一些具體例中，引導該兩個含HCF之多肽轉錄的啟動子是相同的。在一些具體例中，引導該兩個含HCF之多肽轉錄的啟動子，還有引導含LCF之多肽轉錄的啟動子皆是相同的(譬如CMV啟動子，或本案所述的任何其他適宜的啟動子)。在一些具體例中，各個HCF-或LCF-編碼核苷酸序列為獨立地並可操作地聯結至可誘導型或可抑制型啟動子。可誘導型或可抑制型啟動子容許生產，舉例來說，僅在生產期(補料分批培養)而不在生長期(種子培養)期間發生。可誘導型或可抑制型啟動子亦容許一或多個感興趣基因的差異化表現。在一些具體例中，各個HCF-及/或LCF-編碼核苷酸序列為獨立地並可操作地聯

結至至少一個TetR操縱子(TetO)或Arc操縱子(ArcO)上游的啟動子。在又其他具體例中，各個HCF-及/或LCF-編碼核苷酸序列為獨立地並可操作地聯結至CMV/TetO或CMV/ArcO雜合啟動子。雜合啟動子(亦稱作調控融合蛋白)的例子可在2003年12月11日公開的國際專利公開號WO03101189A1中找到(以參照方式併入本案)。

【0153】 在一些具體例中，該載體組包括編碼重組酶的核苷酸序列，其識別一或多個RRS，其可包含在HCF或LCF-編碼載體之一者中，或者在分別的載體提供。

【0154】 在各種其他具體例中，載體係提供以經由同源重組實現位點特異性整合。

【0155】 在一些具體例中，提供了一種載體組，其包含兩個載體，各自含有側接有5'同源臂和3'同源臂的外源性核酸，以用於位點特異性整合至細胞中的兩個增強表現基因座，其中來自該兩個載體的外源性核酸共同編碼一抗原結合蛋白。於是，一個載體上的同源臂被設計為用於整合至兩個基因座之一者內，另一個載體上的同源臂被設計為用於整合至另一個基因座內。在該等具體例中，抗原結合蛋白可為單特異性或雙特異性。

【0156】 選擇與增強表現基因座中的序列同源的序列，並且將選擇的序列作為靶向載體中的同源臂係合宜地落於技術人員的專業技術以內。在一些具體例中，載體或構築體包含第一同源臂和第二同源臂，其中合併的第一和第二同源臂包含置換該基因座之內的内源性序列的標靶序列。在其他具體例中，第一和第二同源臂包含整合在或插入該基因座之內的内源性序列之內的標靶序列。在一些具體例中，該同源臂含有與存在於SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3的核苷酸序列同源的核苷酸序列。在特定具體例中，該載體含有5'同源臂，其具有對應於SEQ ID NO: 3的核苷酸1001-2001的核苷酸序列，和3'同源臂，其具有對應於SEQ ID NO: 3的核苷

酸2022-3022的核苷酸序列。同源臂，舉例來說一第一同源臂(亦稱作5'同源臂)與一第二同源臂(亦稱作3'同源臂)係同源於該基因座之內的靶向序列。從5'至3'的同源臂可擴展包含至少1 kb、或至少約2 kb、或至少約3 kb、或至少約4 kb、或至少5 kb、或至少約10 kb的基因座之內的一區域或靶向序列。在其他具體例中，為第一和第二同源臂選擇的靶向序列的核苷酸總數量係包含至少1 kb、或至少約2 kb、或至少約3 kb、或至少約4 kb、或至少5 kb、或至少約10 kb。在一些情況下，介於5'同源臂與3'同源臂(同源於靶向序列)之間的距離包含至少5 bp、10 bp、20 bp、30 bp、40 bp、50 bp、60 bp、70 bp、80 bp、90 bp、100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、或至少1 kb、或至少約2 kb、或至少約3 kb、或至少約4 kb、或至少5 kb、或至少約10 kb。在SEQ ID NO: 3的核苷酸1001-2001和2022-3022被選擇作為5'和3'同源臂的情況下，介於該兩同源臂之間的距離可為20個核苷酸(對應於SEQ ID NO: 3的核苷酸2002-2021)；此類同源臂可介導外源性核酸序列整合至包含SEQ ID NO: 3的基因座之內，譬如在SEQ ID NO: 3的核苷酸1990-2021或2002-2021之內，並同時刪除SEQ ID NO: 3的核苷酸2002-2021。

【0157】 本案揭示的用於以位點特異性整合至增強表現基因座來引進外源性核酸的載體可包括額外的基因和序列，其係用於引導感興趣的外源性核酸和所編碼多肽的表現，並且用於選擇和鑑定感興趣的外源性核酸已成功整合進入的細胞。此類額外的序列包括，舉例來說，轉錄和翻譯調控序列、可篩選標記基因等等，下文亦會說明。

調控序列

【0158】 本案所揭示之用於將外源性核酸以位點特異性方式引進增強表現基因座的載體、和作為位點特異性整合結果獲得的細胞可包括用於引導感興趣的外源性核酸和編碼多肽之表現的調控序列。調控序列包括轉

錄啟動子、增強子、編碼適宜mRNA核糖體結合位點的序列，以及控制轉錄和轉譯終止的序列。轉錄和轉譯的控制序列可藉由病毒來源提供。舉例來說，常用的啟動子和增強子係衍生自多瘤病毒、腺病毒2、猿猴病毒40 (SV40)、小鼠或人類巨細胞病毒(CMV)、CMV立即早期(CMV-IE)或CMV主要IE (CMV-MIE)啟動子，以及RSV、SV40晚期啟動子、SL3-3、MMTV、泛素(Ubi)、泛素C (UbC)、和HIV LTR啟動子。病毒基因組啟動子、控制及/或信號序列可用於驅動表現，前提是此類控制序列與所選擇的宿主細胞相容。也可使用非病毒的細胞啟動子(譬如， β -球蛋白和EF-1 α 啟動子)，取決於欲表現的感興趣蛋白的細胞類型。衍生自SV40病毒基因組的DNA序列，舉例來說，SV40起點、早期和晚期啟動子、增強子、剪接和聚腺苷酸化位點可用於提供用於表現外源DNA序列的其他遺傳元件。早期和晚期啟動子是特別有用的，因為兩者皆易於以亦包含SV40病毒複製起點的片段從SV40病毒中獲得(Fiers *et al.*, *Nature* 273:113, 1978)。亦可使用較小或較大的SV40片段。通常，從Hind III位點延伸到位於SV40複製起點的BglII位點的大約250bp序列係被包括在內。可使用可誘導型(藉由化合物、輔因子、調控蛋白誘導，舉例來說)及/或可抑制型(藉由化學化合物、輔因子、調控蛋白抑制，舉例來說)啟動子，並且尤其可用於允許產生抗原結合蛋白僅在生產期(補料分批培養)而不在生長期(種子培養)期間發生，或者精確地以差異化方式控制不同基因座中的抗體組分的表現。可誘導型啟動子的例子包括醇脫氫酶I基因啟動子、四環黴素回應啟動子系統、糖皮質激素受體啟動子、雌激素受體啟動子、蛻皮激素受體啟動子、以金屬硫蛋白為基礎的啟動子、和以T7-聚合酶為基礎的啟動子。可抑制型啟動子的例子包括雜合啟動子(也稱為調控融合蛋白)，其包含可操作地聯結至至少一個TetR操縱子(TetO)或Arc操縱子(ArcO)的CMV或其他啟動子，並且在2003年12月11日公開的國際專利公開號WO03101189A1中有描述(以參照方式併入本案)。先前已經說明了適

用於經由雙順反子載體表現多個轉錄體的序列(Kim S. K. and Wold B. J., *Cell* 42:129, 1985)，並可用於本發明。用於以多順反子表現蛋白的適宜策略的例子包括使用2A肽(Szymczak et al., *Expert Opin Biol Ther* 5: 627-638 (2005))和使用內部核醣體進入位點(「IRES」)，兩者都是本領域熟知的。其他類型的表現載體亦將是有用的，舉例來說，該等描述於美國專利號4,634,665 (Axel et al.)與美國專利號4,656,134 (Ringold et al.)者。

可篩選標記(Selectable Markers)

【0159】 本案所揭示之用於將外源性核酸以位點特異性方式引進增強表現基因座的載體，以及作為位點特異性整合結果獲得的細胞可包括一或多個可篩選標記基因。

【0160】 在一些具體例中，可篩選標記基因賦予抗藥性，例如，舉例來說，該等描述於Kaufman, R. J. (1988) *Meth. Enzymology* 185:537的表1者，並包括DHFR-MTX抗藥性、P-糖蛋白和多種抗藥性(MDR) - 各種親脂性細胞毒性劑(譬如阿德力黴素(adriamycin)、秋水仙鹼、長春新鹼)、和腺苷脫氨酶(ADA)-Xyl-A或腺苷和2'-脫氧柯福黴素(2'-deoxycoformycin)。其他主要的可篩選標記包括微生物所衍生的抗生素抗藥性基因，例如新黴素(neomycin)、卡那黴素(kanamycin)或潮黴素(hygromycin)抗藥性。幾種適宜的選擇系統係存在於哺乳動物宿主(Sambrook supra, pgs 16.9-16.15)。亦描述了運用兩種主要可篩選標記的共同轉染流程(Okayama and Berg, *Mol. Cell Biol* 5:1136, 1985)。

【0161】 在其他具體例中，可篩選標記基因係編碼提供或能夠生成用於識別已經或尚未成功插入及/或置換的基因盒的可偵測信號的多肽，視情況而定。適宜的例子包括螢光標記或蛋白、催化生成可偵測信號的化學反應的酶等等。螢光標記的例子是本領域公知的，包括但不限於珊瑚(*Discosoma coral*) (DsRed)、綠色螢光蛋白(GFP)、改良型綠色螢光蛋白

(eGFP)、氰基螢光蛋白(CFP)、改良型氰基螢光蛋白(eCFP)、黃色螢光蛋白(YFP)、改良型黃色螢光蛋白(eYFP)和遠紅外光型螢光蛋白(譬如mKate、mKate2、mPlum、mRaspberry或E2-深紅色)。亦參閱，譬如Nagai, T., et al. 2002 *Nature Biotechnology* 20:87-90; Heim, R. et al. 23 February 1995 *Nature* 373:663-664; and Strack, R.L. et al. 2009 *Biochemistry* 48:8279-81。

用於製備抗原結合蛋白的系統

【0162】 在另外的態樣中，本揭示內容提供了一種系統，該系統包括細胞(譬如CHO細胞)與一或多個載體載體的組合，並可用來製備具有共同編碼一抗原結合蛋白的外源性核酸整合至兩個增強表現基因座之內的細胞，該抗原結合蛋白為單特異性蛋白或雙特異性蛋白。該系統可以套組的形式提供，舉例來說。

【0163】 在一些具體例中，一系統被設計成允許有效的載體建構及透過RMCE將多個外源性核酸同時整合至兩個增強表現基因座之內的特異性位點。同時整合允許快速單離所欲的選殖體，使用兩個增強表現基因座對於創建適用於生產蛋白的穩定細胞系(譬如商業化的細胞系)亦是重要的。

【0164】 本案提供的系統包括細胞和載體組。該細胞含有一對RRS (5'RRS和3'RRS)，其係整合至兩個增強表現基因座的各者之內。在一些具體例中，外源性核酸係存在於各個基因座的5'RRS和3'RRS之間，並可包括譬如一或多個可篩選標記基因。該載體組包括至少兩個載體，各個載體含有側接有編碼HCF或LCF的核苷酸序列的一對RRS (5'RRS和3'RRS)，並且該兩個載體之一者上的核苷酸序列係編碼HCF (HCF載體)，該兩個載體之另一者上的核苷酸序列係編碼LCF (LCF載體)，其中該HCF和LCF是抗原結合蛋白的區。在各對RRS中的5'RRS和3'RRS是不同的，在該系統中的RRS被設計為俾使將載體引進細胞之後，載體中的HCF或LCF-編碼核苷酸序列即透過RRS所介導的RMCE整合至該兩增強表現基因座內，以表現抗原結合蛋白。

取決於抗原結合蛋白，載體數量、HCF或LCF-編碼序列的放置、以及RRS之間的關聯性可以不同方式設計。

【0165】 在一些具體例中，該系統被設計成用於整合至兩個增強表現基因座內並表現單特異性抗原結合蛋白。在一些具體例中，在該兩個載體(即HCF載體和LCF載體)之一者上的5' RRS和3' RRS係分別和該兩個基因座之一者的5' RRS和3' RRS一致，在另一個載體上的5' RRS和3' RRS係分別和另一個基因座的5' RRS和3' RRS一致，HCF和LCF核酸基本上分開地靶向該兩個基因座，一者對各者。在其他具體例中，在分別的載體上的HCF編碼序列和LCF編碼序列被設計成聯合地整合至該兩個基因座之各者。根據該等具體例，第一基因座中的5' RRS和3' RRS係分別相同於第二基因座中的5' RRS和3' RRS；各個基因座亦含有介於5'和3' RRS (「中間RRS」)之間的額外RRS。此外，第一兩個載體中的5' RRS係相同於第一和第二基因座中的5' RRS，該第一載體中的3' RRS係相同於第二載體中的5' RRS並相同於第一和第二基因座中的中間RRS，第二載體中的3' RRS係相同於兩個基因座的3' RRS。該載體可被設計成具有拆分啟動子和選擇標記格式(啟動子在一個載體上，而且啟動子可操作地聯結之選擇標記在另一個載體上)。該載體可被設計成具有拆分可篩選標記格式、或拆分內含子格式，如上所述，以促進以適當的整合選擇轉染體。再者，該系統可被設計成允許LCF-編碼序列和HCF-編碼序列在整合後的不同相對位置。在一些具體例中，該系統被設計成具有整合在HCF-編碼序列上游的LCF-編碼序列。在其他具體例中，該系統被設計成具有整合在HCF-編碼序列上游的LCF-編碼序列。

【0166】 在一些具體例中，該系統被設計成整合至兩個增強表現基因座中並表現雙特異性抗原結合蛋白。

【0167】 在一些具體例中，除了HCF載體(編碼一第一HCF)和LCF載體(編碼一第一LCF)以外，該系統亦包括編碼一第二HCF的核苷酸序列，該

第二HCF係不同於第一HCF。編碼第二HCF的核苷酸序列可被包括，舉例來說，在LCF載體中、或在分別的載體，即一第二HCF載體中。在一些具體例中，第二HCF-編碼序列被包括在該LCF載體中、介於該LCF載體上的5' RRS和3' RRS之間，在該情況中，該系統包括HCF載體和LCF/HCF載體。該系統—尤其是RRS—可被設計成將該HCF-編碼序列整合進入該兩基因座之一者、將編碼HCF和LCF兩者的序列整合進入另一基因座。在其他具體例中，編碼第二HCF的核苷酸序列係於分別的載體上、側接有5' RRS和3' RRS，在該情況中，該系統包括兩個HCF載體和一個LCF載體。在該等其他具體例中，在該系統中的RRS可被設計成俾使該LCF-編碼序列可透過RMCE經由亦存在於該兩基因座之一者、在該基因座中、介於5' RRS和3' RRS之間的共用RRS和該HCF-編碼序列之一者「聯合」，而且另一個HCF-編碼序列將整合至該兩基因座之另一者內。舉例來說，在該LCF載體中的3' RRS可相同於在該HCF載體之一者中的5' RRS及亦相同於在該兩基因座之一者上的中間RRS — 此設計將產生一種在整合至該基因座內之後具有中間RRS的LCF-HCF配置。在另一例中，HCF載體的3' RRS可相同於該LCF載體的5' RRS及相同於該兩基因座之一者上的中間RRS，產生一種在整合於該基因座之後具有中間RRS的HCF-LCF配置。在一些具體例中，該共用RRS被設計為拆分可篩選標記格式或拆分內含子格式，如上文所述。

【0168】 在一些具體例中，該系統亦包括編碼一第二LCF的核苷酸序列，除了HCF載體(編碼一第一HCF)和LCF載體(編碼一第一LCF)以外，以及編碼一第二HCF的核苷酸序列，該第二HCF係不同於第一HCF。即，該系統包括四個分別的編碼序列，兩個HCF且兩個編碼LCF。該兩個LCFs可相同或不同。該四個編碼序列可以不同設計放置在載體中。在一些具體例中，該四個序列係放置在兩個載體中：LCF/HCF、和LCF/HCF，且在任一載體中，LCF係在HCF的上游或下游。該系統(RRS)可被設計成俾使一個載體序

列整合至一個基因座內，且另一個載體序列整合至另一個基因座內。在一些具體例中，該四個序列係放置在三個載體中：LCF、HCF、和LCF/HCF (LCF在HCF的上游或下游)。該系統中的RRS可被設計成俾使該LCF/HCF載體的序列整合至一個基因座內，在LCF載體中的LCF編碼序列和在HCF載體中的HCF編碼序列係藉由利用LCF載體、HCF載體和此另一個基因座共享的共用RRS整合至另一個基因座內。類似地，該共用RRS可被設計成拆分標記或拆分內含子格式。在一些具體例中，該四個序列係放置在四個載體中：LCF、HCF、LCF、和HCF。該系統中的RRS可被設計成俾使在該LCF載體之一者中的LCF編碼序列和在該HCF載體之一者中的HCF編碼序列係藉由利用共用RRS聯合地整合至一個基因座內，而且在該LCF載體之另一者中的LCF編碼序列和在該HCF載體之另一者中的HCF編碼序列係藉由利用共用RRS聯合地整合至一個基因座內。

【0169】 在本案提供的系統的各式具體例中，編碼HCF或LCF的該核苷酸序列可編碼胺基酸，譬如來自恆定區的胺基酸或(多個)域，或編碼整個恆定區。在特定具體例中，編碼HCF或LCF的核苷酸序列可編碼一或多個恆定域，例如CL、CH1、CH2、CH3、或其等之組合。在某些具體例中，編碼HCF域的核苷酸序列可編碼CH3域。舉例來說，編碼第一HCF的核苷酸序列可編碼一第一CH3域，編碼第二HCF的核苷酸序列可編碼一第二CH3域。第一和第二CH3域可相同，或至少一個胺基酸不同。就本案所述雙特異性抗原結合蛋白而言，在CH3域中或在恆定區中的差異可採用任何格式，譬如造成不同蛋白A結合特性、或造成「杵-臼(knob-and-hole)」格式的差異。無關乎任何胺基酸序列差異，該兩個HCF-編碼核苷酸序列亦可差別在於該兩個核苷酸序列之一者的密碼子已被修飾。

【0170】 在本案提供的系統的各式具體例中，HCF或LCF-編碼核苷酸序列之各者係獨立地且可操作地聯結至轉錄調控序列，包括，譬如啟動

子。在一些具體例中，引導該兩個含HCF之多肽轉錄的啟動子是相同的。在一些具體例中，引導該兩個含HCF之多肽轉錄的啟動子，還有引導該兩個含LCF之多肽轉錄的啟動子皆是相同的(譬如CMV啟動子、可誘導型啟動子、可抑制型啟動子、或本案所述的任何其他適宜的啟動子)。

【0171】 在一些具體例中，本系統更包括核苷酸序列，該序列係編碼識別一或多個RRS的重組酶，其可被包括在可變區-編碼載體之一者中、或由分別的載體提供。

【0172】 本案揭示的系統被設計為允許有效建構載體並快速單離所欲的選殖體，使用兩個增強的表現基因座對於產生穩定的細胞系亦是重要的。在一些具體例中，系統被設計為利用負向選擇來鑑定具有預期的位點特異性整合的轉化體(譬如在RMCE之後除去宿主基因組中的一或多個螢光標記基因而導致螢光缺失)。一輪的負向選擇可能僅需兩週；然而，單離帶有預期重組的選殖體的效率可能是有限的(約1%)。假使負向選擇係合併基於(多個)整合核酸所提供的新穎選擇標記的正向選擇(例如新穎螢光標記、或對藥物或抗生素的抗藥性、拆分格式，舉例來說)，則單離帶有預期重組的選殖體的效率可顯著改善(至約40%至高達約80%)。該系統可包括額外的組分、試劑、或信息，舉例來說，藉由轉染將系統中的(多個)載體引進系統中的細胞的程序。非限制的轉染方法包括基於化學的轉染方法，包括使用脂質體；奈米顆粒；磷酸鈣(Graham et al. (1973) *Virology* 52 (2): 456–67, Bacchetti et al. (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (4): 1590–4以及Kriegler, M (1991) *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Company. pp. 96–97)；樹枝狀高分子(dendrimers)；或陽離子聚合物，例如DEAE-葡聚糖或聚乙烯亞胺。非化學方法包括電穿孔；聲波穿孔；和光學轉染。基於粒子的轉染包括使用基因槍、磁輔助轉染(Bertram, J. (2006) *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 277–28)。病毒方法也可用於

轉染。mRNA遞送包括使用TransMessenger™與TransIT®的方法(Bire et al. *BMC Biotechnology* 2013, 13:75)。將異源DNA引入細胞的一種常用的方法是磷酸鈣沉澱，舉例來說，如Wigler et al.所述(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567, 1980)。聚乙烯誘導的細菌原生質體與哺乳動物細胞的融合(Schaffner et al., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2163)是引進異源DNA的另一個有用的方法。電穿孔亦可用於將DNA直接引進宿主細胞的細胞質中，舉例來說，如下所述：Potter et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7161, 1988)或Shigekawa et al. (*BioTechniques* 6:742, 1988)。已描述了可用於將異源DNA引進哺乳動物細胞的其他試劑，例如Lipofectin™試劑和Lipofectamine™試劑(Gibco BRL, Gaithersburg, Md.)。該等兩種市售的試劑係用於形成脂質-核酸複合物(或脂質體)，當其應用於培養的細胞時，有助於使核酸被攝入細胞中。

製備抗原結合蛋白的方法

【0173】 本揭示內容亦提供製備雙特異性抗原結合蛋白的方法。藉由利用本案揭示的方法，所期望的抗原結合蛋白可以高效價及/或高比生產率(pg/細胞/日)產生。在一些具體例中，抗原結合蛋白係以至少1 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L、2.5 g/L、3.0 g/L、3.5 g/L、4.0 g/L、4.5 g/L、5.0 g/L、10 g/L、或更大的效價產生。在一些具體例中，抗原結合蛋白係以至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15皮克/細胞/日(pcd)、或更高的比生產率產生，其係以每日各個細胞產生的總抗原結合蛋白(以pg計)為基準測定。在一些具體例中，雙特異性抗原結合蛋白係以雙特異性抗原結合蛋白效價對上總抗原結合蛋白效價的比例為至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%或更高來產生。

【0174】 在一具體例中，該方法利用本案揭示的系統並藉由轉染將系統中的載體引進系統中的細胞。可選擇和鑑定外源性核酸已經由RMCE適當

地整合至細胞的兩個增強表現基因座中的轉染細胞。在一些具體例中，轉染細胞的鑑定係藉由針對轉染之前存在於宿主細胞中的一或多個選擇標記的負向選擇來實現。在其他具體例中，轉染細胞的鑑定係藉由針對轉染之前存在於宿主細胞中的一或多個選擇標記的負向選擇，合併基於載體中被設計成欲整合之核酸所提供的一或多個選擇標記的正向選擇來實現。含HCF的多肽與含LCF的多肽可從整合的核酸表現，感興趣的抗原結合蛋白可從鑑定的轉染細胞獲得，並使用習知的方法純化。

【0175】 在另一具體例中，該方法簡單地利用上述細胞，其含有整合在兩個增強的表現基因座的外源性核酸，該外源性核酸共同編碼一抗原結合蛋白，並從該細胞表現抗原結合蛋白。各個選殖的(多個)表現盒在各個特定的整合位點之內是連續的。

【0176】 本說明係藉由以下實施例進一步例示，其不應被解讀為以任何方式設限。所有引用的參考文獻(包括本申請案通篇中引用的參照文獻、已核准的專利、和公開的專利申請案)的內容在此明確地併入作為參考。

實施例

實施例1：在兩個特異性增強表現基因座表現單特異性抗體(Abs) (透過位點特異性整合)

【0177】 將Ab鏈(AbC1、AbC2)選殖到載體中，其中RSS位點係側接於Ab表現盒及用於可篩選標記的表現盒，如圖1所繪示。兩個Ab鏈可選殖到分別的載體中或合併至一個載體中，其中2個表現盒係以任一可能的順序串聯配置：AbC1、AbC2、和可篩選標記，舉例來說，AbC1係等同於習用的LC，AbC2係等同於習用的重鏈。

【0178】 簡言之，編碼VH和VL域的DNA可藉由PCR從單一抗原陽性B細胞直接單離。將重鏈和輕鏈PCR產物分別選殖到含有IgG重鏈恆定區和

κ 輕鏈恆定區的Sap I線性化抗體載體中。重鏈質體(AbC2)具有側接於重鏈表現盒的RRS3和RRS2位點。此外，在重鏈質體中，緊鄰RRS3下游有拆分選擇標記基因(譬如US7582298)。輕鏈質體具有側接於輕鏈表現盒的RRS1和RRS3位點。此外，輕鏈質體具有緊鄰RRS3的ATG之前的強力啟動子，俾使在整合至宿主細胞基因座內之後，來自輕鏈質體的RRS3-近端啟動子與起始ATG即被帶至毗鄰在合宜閱讀框架中的重鏈質體的选择標記基因，以允許所選擇基因的轉錄和轉譯。具有重鏈可變區序列的純化重組質體和具有來自相同B細胞的輕鏈可變區序列的質體隨後被合併且與表現重組酶的質體共同轉染到經修飾的CHO宿主細胞系，其於SEQ ID NO:1 (EESYR®；基因座1)和SEQ ID NO:2基因座具有適當的RSSs和選擇標記。該經修飾的CHO宿主細胞系在兩個轉錄活性基因座含有4個不同的選擇標記。因此，當選擇標記是不同的螢光標記時，CHO細胞生產可藉由流式細胞術單離代表所欲之細胞重組的正向-負向組合。當表現重鏈和輕鏈基因的重組質體與表現重組酶的質體共同轉染時，由該重組酶介導的位點特異性重組係造成抗體質體整合在含有RRS的各個染色體基因座並置換。據此，表現單特異性抗體的重組細胞被單離，並投至12天的補料分批生產、之後收穫並使用固定化蛋白A進行Octet效價試驗。觀察到該細胞是同基因型(isogenic)和穩定的。當利用兩個位點整合方法時，觀察到小振盪燒瓶中的單特異性抗體表現的整體效價增加，抗體B顯著增加，接近兩倍(圖2)。

實施例2：在兩個特異性增強表現基因座表現雙特異性抗體(BsAb) (透過位點特異性整合)

【0179】 就雙特異性抗體的表現而言，將三個抗體鏈和兩個可篩選標記選殖到類似於實施例1的質體中，俾使AbC1、AbC2、和可篩選標記1側接有與第一基因座相容的RRS位點、或整合位點 (EESYR®、SEQ ID NO:1；

基因座1)，而且AbC1、AbC3、可篩選標記2係與第二基因座、或整合位點 (SEQ ID NO: 2)相容。在吾人的觀察中，作為習用LC的AbC1並不需要兩個基因拷貝來充分表現。對於各個位點，製備了1或2個質體，其中3個表現盒係串聯配置或配置至2個質體內，其中2個表現盒被選殖到一個載體中，其餘的表現盒被選殖到第二載體中。參見圖3。

【0180】 當表現重鏈和輕鏈基因的重組質體與表現重組酶的質體共同轉染時，由該重組酶介導的位點特異性重組係造成抗體質體整合在含有RRS的各個染色體基因座並置換。據此，表現雙特異性抗體的重組細胞被單離，並投至12天的補料分批生產、之後收穫並使用固定的抗-Fc、和第二抗Fc*(經修飾的Fc偵測抗體，參閱US 2014-0134719 A1，公開於2014年5月15日)進行Octet效價試驗。觀察到該細胞是同基因型和穩定的。利用兩個位點整合方法，觀察到小振盪燒瓶中的整體效價從1.75顯著增加超過2倍(圖5)。

實施例3：在特異性整合後大規模生產雙特異性和單特異性抗體

【0181】 宿主細胞(CHO-K1)係如上文類似於實施例1所述創建(亦參見圖3的雙特異性抗體和圖1的單特異性抗體)。將能夠將基因盒RMCE於EESYR®基因座(基因座1)和SEQ ID NO: 2 (基因座2)中的宿主細胞與能夠將基因盒RMCE至僅一個整合位點(基因座1/EESYR®)的宿主細胞進行比對。攜帶抗體輕鏈和重鏈(AbC1、AbC2、AbC3)和必需的RRS和選擇標記核酸(參見圖3)的載體被重組到生產細胞系(RSX^{2BP})，以創建表現Ab E、Ab F、Ab G、和Ab H的宿主細胞。因此，各個雙特異性抗體宿主細胞表現一個共同輕鏈，以及結合不同抗原的兩個重鏈，其中一個重鏈在其CH3域被工程化，以差異性地結合蛋白A (如美國專利號8,586,713所述，以參照方式併入本案)。

【0182】 就單特異性抗體而言，將抗體輕鏈和重鏈(AbC1、AbC2)選

殖到載體中，其中RSS位點係側接於Ab表現盒(表現盒亦提供可篩選標記基因)，如圖1所繪示。進行重組，以創建表現Ab J和Ab K的宿主細胞(RSX²)。

【0183】 2L、15L、或50L生物反應器被接種衍生自CHO-K1的抗體生產細胞系RSX² 的種子培養物。使接種的細胞在36.5°C生長13天，並視需要餵養葡萄糖和其他補充營養素。使細胞生長在化學限定(無水解產物且無血清)基質培養基中。收穫總抗體並投至純化。

【0184】 總IgG抗體(效價)係在蛋白A/蛋白G層析之後測定。就雙特異性抗體而言，總IgG抗體以及包括雙特異性(雜二聚體Fc/Fc*)、帶有野生型重鏈的同二聚體(Fc/Fc)和帶有經修飾重鏈的同二聚體(Fc*/Fc*)的三個抗體物種之各者被測量，以測定所欲雙特異性抗體物種的比例。總效價係藉由使用美國專利號8,586,713所述之沖提技術，利用蛋白A/蛋白G管柱的HPLC方法測定。簡言之，該三個生物反應器物種係於樣本載入期間結合至管柱，在離子性改質劑的存在下，運用pH步驟梯度，蛋白A管柱最先沖出雙特異性物種(Fc/Fc*)。雙特異性物種係於第一沖提步驟期間收集，接著沖提出兩個同二聚體物種。

【0185】 表1顯示，藉由利用透過兩個整合位點表現抗體的宿主細胞，在先導大規模生產培養中的整體(總) IgG效價和雙特異性抗體效價(圖6A)係高度改善。

【0186】 表1：總IgG和雙特異性IgG效價測量

抗體	雙特異性效價(g/L)		總效價(g/L)	
	兩個位點 (基因座1/基因座2)	一個位點 (基因座1)	兩個位點 (基因座1/基因座2)	一個位點 (基因座1)
Ab E	2.25	0.87	4.47	2.7
Ab F	1.45	0.7	2.9	2.4
Ab G	1.6	0.5	2.7	1.3
Ab H	2	1	3.2	2.5

【0187】 雙特異性效價如上文所述般測定。如表2所示，雙特異性抗體的效價，如同具有兩個整合位點建構的宿主細胞的生產培養物中由細胞產生的總IgG效價的比例係顯著更高。參見圖6B。事實上，不可預期的是，一致地實現了50%或更大的雙特異性比例。

【0188】 表2：每次總IgG生產的雙特異性抗體比例

	雙特異性比例(%總IgG)	
	兩個位點 (基因座1/基因座2)	一個位點 (基因座1)
Ab E	50%	32%
Ab F	50%	29%
Ab G	59%	38%
Ab H	63%	40%

【0189】 單特異性抗體係使用兩個整合位點方法表現，以測定整體IgG效價的改善。表3例示，觀察到大型生物反應器規模的整體效價從0.6顯著增加到1.3倍。亦參見圖7。對於用於製造的生產生物反應器來說，尤其是培養體積為500升至高達10,000L的生物反應器，藉由使用該等改良的細胞系所觀察到的效價增加係等於每批次產物的產量大幅增加。

【0190】 表3：總IgG (單特異性)效價測量

	總效價(g/L)	
	兩個位點 (基因座1/基因座2)	一個位點 (基因座1)
Ab J	3.3	2.2
Ab K	3.2	2

【0191】 雖然已經藉由繪示和實施例的方式對前述發明進行了詳細

的說明，但是對於熟習此藝者來說，顯而易見的是，可對本發明的教示作出某些改變和修飾，而不脫離隨附申請專利範圍的精神或範疇。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列表

- <110> 美商再生元醫藥公司
Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- <120> 基於使用增強表現基因座之製備抗體的組成物及方法
COMPOSITIONS AND METHODS FOR MAKING ANTIBODIES BASED ON USE OF
EXPRESSION-ENHANCING LOCI
- <130> 33444PCT (10341W001)
- <150> 62/325,400
- <151> 2016-04-20
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 13515
- <212> DNA
- <213> 中國倉鼠

<400> 1	
tctagaaaca aaaccaaaaa tattaagtca ggcttggctt caggtgctgg ggtggagtgc	60
tgacaaaaat acacaaattc ctggctttct aaggcttttt cggggattca ggtattgggt	120
gatggtagaa taaaaatctg aaacataggt gatgtatctg ccatactgca tgggtgtgta	180
tgtgtgtgta tgttgtgtctg tgttgtgtgcc cagacagaaa taccatgaag gaaaaaaca	240
cttcaaagac aggagagaag agtgacctgg gaaggactcc ccaatgagat gagaactgag	300
cacatgccag aggaggtgag gactgaacca ttcaacacaa gtggtgaata gtcctgcaga	360
cacagagagg gccagaagca ctcagaactc caggggggtca ggagtggttc tctggaggct	420
tctgcccttg gaggttcctg aggaggaggc ttccatattg aaaatgtagt tagtggccgt	480
ttccattagt acagtgacta gagagagctg agggaccact ggactgaggc ctagatgctc	540
agtcagatgg ccatgaaagc ctagacaagc acttccgggt ggaaaggaaa cagcaggtgt	600
gaggggtcag gggcaagtta gtgggagagg tcttccagat gaagtagcag gaacggagac	660
gcactggatg gccccacttg tcaaccagca aaagcttgga tcttgttcta agaggccagg	720
gacatgacaa gggtgatctc ggtttttaaa aggctttgtg ttacctaate acttctatta	780
gtcagatact ttgtaacaca atgagtact tggcctgtat tttagaaact tctgggatcc	840
tgaaaaaaca caatgacatt ctggctgcaa cacctggaga ctcccagcca ggccctggac	900
ccgggtccat tcatgcaaat actcagggac agattcttca ctaggtactg atgagctgtc	960
ttggatgcaa atgtggcctc ttcatTTTtac tacaagtcac catgagtcag gagtgctgt	1020
ttgcacagtg tgactaagtg atggagtgtt gactgcagcc attcccggcc ccagcttgtg	1080
agagagatcc ttttaaattg aaagtaagct caaagttacc acgaagccac acatgtataa	1140

actgtgtgaa taatctgtgc acatacaca accatgtgaa taatctgtgt acatgtataa	1200
actgtgtgaa taatctgtgt gcagcctttc cttacctact accttccagt gatcaggttt	1260
ggactgcctg tgtgctactg gacctgaat gtccccaccg cgtccccctg tcttttacga	1320
ttctgacatt ttttaataat tcagcggctt cccctctgct ctgtgcctag ctataccttg	1380
gtactctgca ttttggtttc tgtgacattt ctctgtgact ctgctacatt ctcagatgac	1440
atgtgacaca gaagggtgtc cctctggaga catgtgatgt ccctgtcatt agtggaatca	1500
gatgccccca aactgttgtc cagtgtttgg gaaagtgaac cgtgaaggag gatcaggaaa	1560
agaggggtgg aaatcaagat gtgtctgagt atctcatgtc cctgagtggg ccaggctgct	1620
gacttcactc cccaagtga gggaggccat ggtgagtaca cacacctcac acatactata	1680
tccaacacac acacacacac acacacacac acgcacgcac gcacgcacgc acgcacacat	1740
gcacacacac gaactacatt tcacaaacca catacgcata ttacacccca aacgtatcac	1800
ctatacatac cacacataca caccctcca cacatcacac acataccaca cccacacaca	1860
gcacacacat acataggcac acattcacac accacacata tacatttgtg tatgcataca	1920
tgcatacaca cacaggcaca cagacaccac acacatgcat tgtgtacgca cacatgcata	1980
cacacacata ggcacacatt gagcacacac atacatttgt gtacgcacac tacatagaca	2040
tatatgcatt tgtatatgca cacatgcatg cacacataca taggcacaca tagagcacac	2100
acatacattt gtgtatgcac acatgcacac accaatcaca tgggaagact caggttcttc	2160
actaaggttc acatgaactt agcagttcct ggttatctcg tgaaacttgg aagattgctg	2220
tggagaagag gaagcgttgg cttgagccct ggcagcaatt aaccccgccc agaagaagta	2280
ggttttaaaa tgagagggtc tcaatgtgga accgcaggg cgccagttca gagaagagac	2340
ctaccaagc caactgagag caaaggcaga gggatgaacc tgggatgtag tttgaacctc	2400
tgtaccagct gggcttcagt ctattttgtt atatctttat taaatattct tttagtttta	2460
tgtgcgtgaa taccttgctt gcataaatgt atgggcactg tatgtgttct tgggtccggt	2520
ggaggccagg agaggcatg gatcctccgg agctggcgtt tgagacagtt gtgaccaca	2580
gtgtggggtc tgggaactgg gtcttagtgt tccgcaagtg cagctggggc tcttaacctc	2640
tgagccatcc ctccagcttc aagaaactta tttcttagg acatggggga agggatccag	2700
ggcttttaggc ttgtttgttc agcaaatact cttttcgtgt attttgaatt ttattttatt	2760
ttactttttt gggatagaat cacattctgc agctcaggct gggcctgaac tcatcaaat	2820
cctcctgtct cagtctacca ggtgataaga ttactgatgt gagcctggct ttgacaagca	2880
cttttagagtc cccagccctt ctggacactt gtccaagta taatatatat atatatatat	2940
atatatatat atatatatat atatatgtg tgtgtgtgtt tgtgtgtgta tgagacactt	3000

gtcttaaggg tatcatatat atccttgatt tgcttttaatt ttatttttta attaaaaatg	3060
attagctaca tgtcacctgt atgcgtctgt atcatctata tacccttcct tccttctctc	3120
tccttctctc ttcttcttct caccccaag catctatittt caaatccttg tgccgaggag	3180
atgccaagag tctcgttggg ggagatggg agggggcgat acaggggaag agcaggagga	3240
aagggggaca gactgggtgtg ggtcttttga gagctcagga gaatagcagc gatcttcct	3300
gtccctgggtg tcacctctta cagccaacac cattttgttg cctggcagaa gagtgtgcaa	3360
gctggtcgca ggtctgccac acaaccccaa tctggcccca agaaaaggca cctgtgtgtg	3420
actctgggggt taaaggcgct gcctggctgt ctccagctgg acttgaaact cccgtttaat	3480
aaagagtctt gcaaaataat acccgagag tcacagtgc aggttccgt gctttcctga	3540
agcgccaggc acgggttccc taggaaatgg ggccttgctt gccagctcc cacggcttgc	3600
cctgcaaacg gcctgaatga tctggcactc tgcgttgcca ctgggatgaa atggaaaaaa	3660
gaaaaagaag aagtgtctct ggaagcgggc gcgtcacac aaaccgcaa cgatttgtta	3720
aacactctcc attgagaatc tggagtgcgg ttgccctcta ctggggagct gaagacagct	3780
agtggggcg gggggaggac cgtgctagca tcctccacg gtgctcgtg gctgtgtgc	3840
atgccgggaa ccgaaacgag gaaactaaagt caagtcttgc tttggtgga ctgacaatca	3900
acgaaatcac ttcgattgtt ttctctttt tactggaatt cttggatttg atagatgggg	3960
gaggatcaga gggggagggg aggggcgggg agacggaggg aggaggggag gaggggagga	4020
ggggaggagg ggaggagggg aagggaigga ggaaaatact aacttttcta attcaacatg	4080
acaaagattc ggagaaagt caccgctagt gaccgggagg aggaatgccc tattgggcat	4140
tatattccct gtcgtctaatt ggaatcaaac tcttggttcc agcaccaagg attctgagcc	4200
tatcttattc aagacagtaa ctacagccca cacggaagag gctatacaac tgaagaaata	4260
aaattttcac ttattttcat ttctgtgact gcatgttcc atgtagagag ccacctgtgt	4320
ctaggggctg atgtgctggg cagtagagtt ctgagcccgt taactggaac aaccagaac	4380
tcccaccaca gtagagctt gctgagagag ggaggccctt ggtgagattt ctttgtgtat	4440
ttatttagag acagggtctc atactgtagt ccaagctagc ctccagctca cagaaattct	4500
cctgttccgg ttccaaagt actggagtta tgagtgtgtg ttaattgaac gctaagaatt	4560
tgctgattga agaaaacctc aagtgggttt ggctaatecc cacgacccca gaggctgagg	4620
caggaggaat gagagaattc aaggtttgcc agagccacag ggtgagctca atgtggagac	4680
tgtgagggtg agctcaatgt ggagactgtg aggtgagct caatgtggag actgtgaggg	4740
tgagctcaat gtggagactg tgagggtgag ctcaatgtgg agactgtgag ggtgagctca	4800
atgtggagac ctgtatcaag ataataatag tagtagtaac aatgcaggcg aggggtgtgt	4860

tgagtggtag agcagttagt tgatttgaca tgcttgaggt ctcccgggtcc atctgtggcc	4920
ctgcaacagg aaggaggaggga ggaagggggg gaacgagaga gaggaaagag agacagaagc	4980
taagataggg aatgagagag gaaggaagaa acgggaagaa attcagactc cttcctgagt	5040
tccgccaacg cctagtgaca tcctgtgcac accctaaggt ggcctttgtg tggcactggc	5100
ttgggtggtc gggaaaggca ttttcagctt gttgcagaac tgccacagta gcatgctggg	5160
tccgtgaaag tttctgcccg ttaacaagaa gtctctacta ctgttgacct caccagtga	5220
aatttcitta attgtctcct ggtgttctgg gttttgcatt tttgtttcta aggatacatt	5280
cctgggtgat gtcatgaagt ccccaaagac acagtggggc tgtgttgat tgggaaagat	5340
gatttatctg ggggtgtcaa aggaaaagaa gggaaacagg cacttgggaa aatgtcctcc	5400
cgcccacccg aattttggct tggcaaccgt ggtggaggag caagaaacac gtggacgttt	5460
gaggaggcat ggggtcctag gaggacagga agcagaagga gagagctggg ctgacagcct	5520
gcaggcattg cacagtttca gaaggagatt acagcatgac tgagttttta gggatccaac	5580
agggacctgg gtagagattc tglgggtctt gaggcaactt gacctcagcc agatgggtatt	5640
tgaataacct gctcttagag ggaaaacaga catagcaaac agagccacgt ttagtgatga	5700
aactctcact ttgcctgagt catgtgcggc catgcccagg ggtcaggctg aactcaact	5760
caaaaacaag tgagaaattg aagacaatcc ggggtggcag ctactggaag ggccaccaca	5820
tccccagaaa gagtggagct gctaaaaagc catttgtgat aggcacagtt atcttgaatg	5880
catggagcag agattacgga aaaatcgaga atgttaatga ggcaacattc gagttgagtc	5940
atcagtggtg ggaaaccag acgtttccat cccctaaaag gaacatcttg ctctcagtca	6000
aaatggaaat aaaaattggg gcttgaattt ggcaaatgat tcagaactct gtgtaggtat	6060
tttcacacgc acagtggata attttcatgt tggagtttat ttgtgctaaa aggcagaaaa	6120
gggtaaaaag cacatcttaa gagttatgag gttctacgaa taaaaataat gttacttaca	6180
gctattcctt aattagtacc cccctccacc tgttgtaatt tcctgagata gtcagtggg	6240
aaaagatctc tccttctctt ctttctcccc ctcccctcct ctcccctcct cctccctcc	6300
ctcccctctc tcccctctc cccctttcct tctttctttg ctccctctcc tctgcctcct	6360
tctccccttc tcttctattt attctaagta gcttttaaca gcacaccaat tacctgtgta	6420
taacgggaaa acacaggctc aagcagctta gagaagattg atctgtgttc actagcgtgc	6480
aattcagagg tgggtgaaga taaaaggcaa acatttgagg ccatttcctt atttggcacg	6540
gcacttagga agtggaaacat gcctaatacta ctggtttgta ccacctttcc ctataatgga	6600
ctgtttggga agctcctggg caaccgattc tggcatctca ttggtcagag gcctgttaaa	6660
tggctactctt atttgcaaag aaggctgtaa cttgtagctt taaaagcctc tcctcaagaa	6720

agaagggaga aaggatatgg ctagacatat ctaatagact taaccactgt gaaaagcctt	6780
agtatgaatc agatagaacc tatttttaac tcagttttga aaaaaataat ctttatattt	6840
atttgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gaaccacatg	6900
tagcaggtgc tggaggaggc cagaagaggg caccagatct cctggaactg acaccacaca	6960
tggttatgag ctgcctgatg tgggtgctgg gaactgaact ctcgtgttct gcaagagcag	7020
caactgttct cttactgat gagccatctc tccagcccc ccataattt taattgttca	7080
ttttagtaaa tttattcat aatcaattat cacagtataa aacaatgatt ttatatatat	7140
catatacata tcaaggatga cagtgagggg gatatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg	7200
tgtgtgtgtg tgtgttattt gtgtgtgtgc tttttaagaa ggtgccatag tcactgcatt	7260
tctctgaagg atttcaaagg aatgagacat gtctgtctgc caggaacctt atcttccctt	7320
ttgggaatct gacccaaatg aggtattctg aggaactgaa tgaagagctc aagtagcagt	7380
gtcttaaacc caaatgtgct gtctagagaa agtcaacgtc atcagtgagc tgaggagaga	7440
tttactgagc ggaagacaag cgctctttga tttaaagtggc tcgaacagtc acggctgtgg	7500
agtggagcct gtgctcaggt ctgaggcagt ctttgcctagc cagctgtgat gagcagtga	7560
gaaaggggtg agatggaggc aggggtgggag cagggtatg gttcagacta ggtatcgtga	7620
gcacaccagc tggttgactt gtggtctgtg ggtcaggcgt tgtaaacgcc ctcagggtca	7680
ggcagtcaca ttgcttgaag ctgaatgggt gaggcaacac agagagtgca aagaaggcaa	7740
agtaccacct ctccccgac ccaggtcact tctgggttat agctgagact ccggacagca	7800
tgcaaccagc tggtttagagc ttcagggaaa acttgatgtc tgcatgttgc tatgaaatgt	7860
gattcggtag atctggagaa aatttataat gctggctcag tcaagcactg aacaaaggta	7920
ccttggcttt gggagctaca tgacattgac ttgtaggcag actttttttt ttctgccgcg	7980
caattccag ataaccaata tggaggctca atattaatta taaatgctcg gctgatatct	8040
caggcttggt actagctaac tcttccaact taaatgaacc catttctatt atctacattc	8100
tgccacgtga ctttacctg tacttctgt ttcctctcct tgtctgactc tgcccttctg	8160
cttcccagag tcttagtct ggttctcctg cctaacctta tctgcccag ctgctgacca	8220
agcatttata attaatatta agtctcccag tgagactctc atccaggag gacttgggtg	8280
ctccccctc ctcatgcca tccgtgtctt cctcttccct cgcttcccc tctcttccct	8340
gctcttccct ctccacctt cttttcatag tattgatggc aagggtgttc tagaatggag	8400
gagtgccat aggcattgcaa agaaaccagt taggatgtc tgtgaggggt tgtaatcata	8460
agcgatggac acaattcaag ccacagagtg aagacggaag gatgcactgt gctctagagc	8520
aacttctggg gcagaatcac aggggtgagtt tctgacttga gggcgaagag gccacgagga	8580

aggagtgag tttgtctgag ctagaagcta cggccacact cttggtagca gacctgcca	8640
caagcatgct ttgttaatca tgtgggatct gattttctc taaatctatg ttcaactctt	8700
aagaaaatgt gaattctcac attaaaattt agatatacgt cttttggtgg ggggggtgta	8760
aaaaatctc aagaatatgg atttctgggg gccggagaga tggctcagag gttaaagaa	8820
ctggttgctc ttctagacat tctgagttca attcccagca accacatggt ggctcacaac	8880
catctgtaat gcgacctggt gccatcttct gacatgcatg gatacatgca ggcagaaagc	8940
tgtatacata gtaaattgat aaatcttttt ttaaaaagag tatggattct gccgggtgtt	9000
ggtggcgcac gcctttaatc ccagcactct ggaggcagag gcaggtggat ctctgtgagt	9060
tcgagaccag cctggtctat aagagctagt tccaggacag cctccaaagc cacagagaaa	9120
ccctgtctcg aaaaaccaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaga gtatggattc	9180
taagaaagcc gtaacagctg gagctgtgta cggagttcag cgtggtacta gaagaacaga	9240
cattcatgat gaaacacccc aggattttta cttagtatct agtttcatt gttgttttga	9300
gaccggctct tatgtctcc aggctggcct caaactgctg atcttcccgc ctctacctct	9360
caagtcctgg gactacttgg ctcataaaac agttttgtc gggctccctg aagtatggt	9420
tgtacaaacc gtgggggtca atatactcac ttgggcagag agagaaggtc tgaatcccag	9480
acaatgactg catctcagga cagttgggaa gaggacaatg gcagaaggac ttagaaaaga	9540
tagactggag ggtggaaaag cagcaggaac agagaaacaa aacaggaagc ttgctatcca	9600
gggccactct ggagtcctgt ggcaagatgg aagcgggcta ggggaataca tttgtgctac	9660
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgat caatgcctat caatgttgaa	9720
ggggaaalat gtataccaca ttgattctgg gagcaattct cagtatctgg cctagagaaa	9780
ggaatggccc ctgcagaata gacagagtga atggigccct ttatcatttg ctaaagtga	9840
ggagaaataa acatccttcc atagagtttc aggtaaatga accccacagt tcactgtgc	9900
cgtggtggag gcctggccaa cagttaaaaa gattagacac ggacaaagtc tgaaggaaac	9960
acctcgaata ggaagaggag agccacctca ttctgtaact ttcctcaagg ggaagatgtt	10020
ccaagagtgg gaataaatgg tcaaaggggg gatttttaat taggaaaacg atttcctgta	10080
tcacttgtga aactggaggt tgatttgggg cataggacaa tagatttgat gctttgcaa	10140
aagctgtttc aaagcagaga aatggaatag agacaattat gtagcgagga gggagggtgg	10200
ggcgaagatg gagacagaga agtggaagct gactttaggg aagaggaaca tagaccacag	10260
gggcggggcg gggggcaggg gcggggggcg gggctcaaag gaggcagtgg gaacgttgct	10320
agtgttcgca gcgtaagcgt gaatgtgcaa gcgtctttgt ggtgtgtgac caggagtagc	10380
gtggctggct tgtgtgtgc ttgtaatccc agtctttgag gttccacac tgtccacag	10440

tgggtgtgat tttccctcgg agagcatgag ggctctgctt tccccacatc ctccccagcg	10500
ttcgttggta ttgttttcca agatgttagt gggtagaca aagcctctct gttgatttgc	10560
ctttaacagg tgacaaaaaa agctcaacca ggagacattt ttgccttctt ggaaggtaat	10620
gctcccatgt agagcaatgg gacccatctc taaggtagg ctactcttgc agtttgcacc	10680
cagctcttct gatgcaggaa ggaagttagt gggcaagcaa gactgtttgc ttcttgcgat	10740
ggacacattc tgcacacaaa ggctcaggag gggagaaggc tgtttgatgt ttagcactca	10800
ggaaggcccc tgatgcatct gtgattagct gtctccatct gtggagcaga cacggactaa	10860
ctaaaaacca gtgtttttta attgtcaagc cttaaggtag aggaaattga cttattgtgc	10920
tgggccatag gtagagcaag tgctctgcat tgggccaacc cccggctctg gtttctaggc	10980
accagaatgg cctagaacta actcacaatc ctccattcc aggtctcagg tgctagaatg	11040
aaccactata ccagcctgcc tgcctgccta cctgccttcc taaattttta atcatgggga	11100
gtaggggaga atacacttat cttagttagg gtttctattg ctgtgaagag acaccatgag	11160
catggcaact ctataaagg aaaacattta gttgggtggc agtttcagag gttttagtac	11220
attgtcatca tggctgggaa catgatggca tgcagacaga catggtgctg gagaaaggga	11280
tgagagtcc t acatcttgca ggcaacagga cctcagctga gacactggct ggtaccctga	11340
gcataggaaa cctcacagcc caccctcaca gtgacata ttcctcaaca aagccatacc	11400
tcctaatagt gccactccct atgagatgac agggccaatt acattcaaac tgctataaca	11460
ctttaaagta ttttattttt attattgtaa attatgtatg tagctgggtg gtggcagccg	11520
aggtgcacgc ctttaatccc agcacttggg aggcagaggc agatggatct ctgtgagttc	11580
aagaccagcc tggctctataa gagctagttag caaggaagga tatacaaaga acagtcttag	11640
gatagccttc aaagccacag agaagtgtg tcttgaaaac caaaaattgt gctgggacct	11700
gtctctgctt tggttgcttc ccactcccc agagctggac tcttggtcaa cactgaatca	11760
gctgcaaaat aaactcctgg attcctctct tgiaacagga gcccgaaagtc aggcgcccac	11820
ttgtcttctc gcaggattgc catagacttt ttctgtgtgc ccaccattcc agactgaagt	11880
agagatggca gtggcagaga ctgggaaggc tgcaacgaaa acaggaagtt attgcaccct	11940
gggaatagtc tggaaatgaa gcttcaaaac ttgcttcatg ttcagttgta cacagactca	12000
ctcccagggt gactcacacg tgtaaataatt cctgactatg tctgcactgc ttttatctga	12060
tgcttccctc caaaaatgcc aagtgtacaa ggtgagggaa tcacccttgg attcagagcc	12120
cagggtcgtc ctcccttaacc tggacttgtc tttctccggc agcctctgac acccctcccc	12180
ccattttctc tatcagaagg tctgagcaga gttggggcac gctcatgtcc tgatacactc	12240
cttgtcttcc tgaagatcta acttctgacc cagaaagatg gctaagggtg tgaagtgttt	12300

gacatgaaga cttgggtctta agaactggag caggggaaaa aagtcggatg tggcagcatg	12360
tacccgaaat cccagaactg gggaggtaga gacggatgag tgcccggggc tagctggctg	12420
ctcagccagc ctagctgaat tgccaaattc caactcctat tgaaaaacct ttaccaaaca	12480
aacaaacaaa caaataataa caacaacaac aacaacaaac taccccatat aagggtggcg	12540
gctcttggct cttgaggaat gactcaccca aacccaaagc tiggccacagc tgttctctgg	12600
cctaaatggg gtgggggtgg ggcagagaca gagacagaga gagacatgac ttcttgggct	12660
gggctgtgtg ctctaggcca ccaggaactt tcctgtcttg ctctctgtct ggcacagcca	12720
gagcaccagc acccagcagg tgcacacacc tccctccgtg cttcttgagc aaacacaggt	12780
gccttgggtc gtctattgaa ccggagtaag ttcttgcaga tgiatgcatg gaaacaacat	12840
tgtcctgggt ttatttctac tgttgtgata aaaaccgggg aactccagga agcagctgag	12900
gcagaggcaa atgcaaggaa tgcctgctcc tagcttgctc cccatggctt gccgggcctg	12960
ctttctgcaa gcccttctct cccattggc atgcctgaca tgaacagcgt ttgaaatgct	13020
ctcaaatgtc actttcaaag aaggcttctc tgatcttgct aactaaatca gaccatgttt	13080
caccgtgcat tatctttctg ctgtctgtct gtctgtctgt ctgtctatct gtctatcatc	13140
tatcaatcat ctatctatct atcttctatt tatctaccta tcattcaatc atctatcttc	13200
taactagtta tcatttattt atttgtttac ttactttttt tatttgagac agtatttctc	13260
tgagtgcag ccttggctgt cctggaaccc attctgtaac caggctgtcc tcaaactcac	13320
agagatccaa ctgcctctgc cttcttgggt ctgggggtta agacgtgcac caccaacgcc	13380
ccgctctatc atctatttat gtacttatta ttacgtcatt atctatcctc taactatcca	13440
tcattctgtc atccatcatc tatctatcta tctatctatc tatctatcta tctatcatcc	13500
atctataatc aattg	13515

<210> 2
<211> 14931
<212> DNA
<213> 中國倉鼠

<220>
<221> misc 特徵
<222> (2716)..(2239)
<223> 為a、c、g、t或核苷酸已逸失

<400> 2	
catgtacact tatgcaagta tgatatggcc caacacagta ttttacacca atttttatct	60
ataaaatata catgtacatc aaaatatatt attaataata acatcattat tctttctttc	120
caagtaataa acacatacac tgaaattttg gttcttgttg ataattttta tgaaacagga	180
aatgcaaatt tatcttagca tgtttacttc actttctttg catagataac cagtaatcac	240

attgatggat catgtagtga aatgtatit taggtatcta aggaattitg gcttcgtit	300
gtgcttggtg aactgaatt ctattcctaa caacagtgtg taaggattct gtctgattc	360
ttttaccagt atttgtccat ttgcattitc ttattattc atggctgctg ttctagaaag	420
tggaaggtag tgtgtcaagt cigttaaca tgttcctg atgacagtg tctaacacc	480
tctctgagta catgttggcc aatgtcgtt ctagacccat ctattcttgc ttgacttacc	540
ctggtacatg cctgccaaga aatttctct catcttctt gtctcttcac tgatttactt	600
gatgtgtgga ttacacattg atcatatgga aatagaagat acaatttct ttattcacag	660
tttggaaagc ttcaatctc atagatcac attattttt gctactgttc cctatgctat	720
ggtgaaattt ccatitgaat aattgttaa acaattaaca agaaagaac tatttttact	780
tgcaataact tccatttcag aacatttact acactgttac tatatccaaa aactagtitt	840
atatatcatg tgagaaatga ctaattcata atttggccat gacattttt tcagaaacag	900
aaaaagtgc caatacatc acaatgctat aaatattaag acttcagcaa attaaatatt	960
tattcatgat atcacataaa attcatitatt tatgttttatt ttaaagtgt ttttaaaaca	1020
gtggtatcac taaatattaa gttagatgtg ttatgtgct taatgaattt atattttaga	1080
atgttataag ttgtatatag tcaaatatgt aataaattt attttttagg tctttctcat	1140
taaggatatt taattttggg tcccttttcc agagtgactc tagctcatga tgagttgaca	1200
taaaaactaa acagtacaaa atgtacattg cattcagtat tgcacttgat ctttgcactg	1260
aagtttgagt cagttcatac atttagtact tgggaagtac attaagctaa ctttcattgc	1320
tctggcaaaa tgcctgataa gataagagtc tattgtggaa agccatggca gcaggaaagt	1380
aagactgctg atgatgttta atccatagtc aagacgcaga aggagatgaa tgcctggtatc	1440
caacattttt tgcgtttcat tttctctaga accctagtcc ataaagatgt atgacttgca	1500
ttcaaaatgc gtcccttca gttgttcaac ttttctgtaa atatccttcc aggcattgtc	1560
agaagattgt ttgcgaaata cttctcaatc cattcaagtt gatagtgcag attaatcact	1620
gcagaataaa agcctgtaac ttggctcacg tgccaaggaa tatgcacact cctgacacat	1680
caataagtaa atcaaagtgt agcttttggc tttaacattg ccagacttat gtaatgttct	1740
gcacgttctt cctccatcac tttttattct aatgggtgtt ccttgacatt gaatcacgt	1800
gtggaagctg cttagaatta acattgaaat ctactgatat atttatgatg cagcaattta	1860
gatttactat ttacttaga attttttata attgagagaa tataatattt tcacagtatt	1920
ctatctgctg taaatagagg attttaaaaa aaatctctat aactttttt tacaacacac	1980
agtaaaatta agttaaaatt taataaagtc actatgttga ttcaaagtg tgctacgcc	2040
acggtgtgca cgcaggtgta gcagaagatg ccactaaggt gggctaaggc cgatgggttg	2100

gggtctgcgc tccctggaga tgagccccag gcggttcctt ggcaatcagc tgcgatcatg	2160
atgcccgatg agccannnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	2220
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnc tgggtgactt tatggaaaga atttgataga tticatgatg	2280
tagaagaatt ttattaggct tattttacag gagactaaga ccttgggacc taaagatata	2340
tgggtcctga gaatcaggaa atgggtagag acgtggttga tggatatgaga cagattttag	2400
agaactctta gatcatgggc aatgaccgca atctgatgct tagaatagat catctataaa	2460
caattatgct gtcttttttc ttctgttgtt atgatctgat gatgtagccc ctttgccaag	2520
ttccctgata ccccttgcca agttccctga ttgtaacagt atataagcat tgccttgagag	2580
catattcaac tacattgagt gtgtctgtct gtcatttctt cgccgattcc tgatttctcc	2640
ttgagccitt tccctgttgc tccctcggtc ggtggtctcc acgagaggcg gtccgtggca	2700
aaagtgtata aatgttctaa aacatttgaa ctctaaaaca tgcaaaatga aaaattaaaa	2760
taaataaaca tgaaaattaa aatatattag ctgctaaaag ttaaacaata ctatataata	2820
ttttgttatt agaattcaaa atcacattag ttggatttaa ttggaacatt gcattctttc	2880
aataataatt tcaataaaaa aagtttcccc atgatagtag aaaataataa catatgtatc	2940
tatctattta tttaactaca catatatagc atttgtttca actaaaataa atgaatgagc	3000
aaagcaccta agtaattggt gtctattata ttatgaagc caatagtttc aaataaatta	3060
tcatgcataa ggaggtattg caaatgttaa accttttttg aaacagatat tcccagttac	3120
agaaattata atttctaata ttccctataa gtagaatgat gataattaat ataggccatt	3180
tgtaaataat gttcagatta aaatattctc tatttacta gagaagaatg atattaaatg	3240
tattataatt tatttcccat ttgtttgca ccactattct atatccctca gcagtttaaa	3300
ttgtttcac catatgtgtg tgtgtttgta tcttaaatat ggcactaaaa ttagaataat	3360
ttaataataa tctttaggag aaaagatatt gaattatttt atgttgatag gaaaatatct	3420
tttaattgtc caagaatact tttcttcta ttttaggact gatcagaccc aggactaata	3480
ttttatatgt actaattcta tglacaaaaa tatgttatta tctcatgaat tctgtctcaa	3540
tattgaggta ataaaaatag tccatcatga actttaaaat taaaataatg attaattaat	3600
ttttattcat attttgtttg tatgaatggt tatacatcac atgtgtgcct ggtgactgtg	3660
aatgtcagga gaaggatga aagccactgg aattggaata agagataata tttagatgt	3720
tatgtgggtg ctgagaattia gacgcaagcc atcttcaaga atagccagca tactatacca	3780
ctgagtaatc cattcatccc tcaataatta tctttgtaga cagtaaataat atttctaaac	3840
tataaatgac cagaaaaatt aatgtattat taatgaagac attcatctca tgtgacacac	3900
ttcacctgtc taaatcagta acactctctc cactaattaa gattttctaa gtgcatgaca	3960

cttactat	cttaaagctgt	ccaatggggg	ccagtc	ccccca	gtcagcaccc	agtgagataa	4020
tccatgaatg	catttatatc	ttaggaaaaa	ttcttatcta	tgtagtattt	agaacatttt		4080
catgtgaggg	gataaacaag	gaagcacaga	tgctttctga	tagaaacttt	ctctttaatt		4140
catctagaaa	aaaaaacct	ctcaggaaaa	tctctcttgc	tctccccc	atgctctatt		4200
cagcatcttc	tccctactta	attctagatc	tttttctcta	tgccctcttg	ctgctgccct		4260
gctggctctg	ctctaigcct	ccccatgtca	cttttctttg	ctatctcacc	gttaccttct		4320
ctgcctcact	ctctgccttc	ttctctgctt	ctcacatggc	caggctctgg	acaattatag		4380
ttatatgtta	catttctata	acacatgata	gttcacatag	tttctctcag	gctagggata		4440
tcacaatgac	tggccaatga	gcaagtggcc	ttgcatgtag	ctctaagttg	gtgatggttc		4500
ccagacagta	agtagccatt	tggttgaaat	ttgaggttgg	gtagtacatg	aagactgaat		4560
tttcttcaaa	ctctggcctt	gaaatagtaa	aacaacacct	atgaaaatga	cgacctgtat		4620
ttgtctttag	aggcaaccac	atattgtctg	cagggcctgc	tttgaatttg	ctctgaagtt		4680
agcttgtttg	tgtaaaagga	agaatcctat	atcagcctga	gaaatgtaaa	atatcctagc		4740
atttcaagtc	atcaaaatta	tatggagagt	ataaatcatc	cttctgacta	ttcatagtca		4800
tatttgtgtc	caccaagtat	aaaacacact	accaaagggc	tgtggaaaaa	atcgccataa		4860
ctgttcttat	tagggaggca	tagcagtggg	acctgaggaa	gttacagcaa	caaccagtca		4920
tccagtcaat	aaccccatgg	ctttgccact	tggaggtacc	caataatgtt	tggctttgcc		4980
gagtaggact	ccaacaaatt	cagaggggtca	atttttaaat	gctggttgtc	actgctgaac		5040
agtcccat	tgccctctgcat	aattccacaa	tggaaagctt	tttacctga	ttgccaatca		5100
ttaaacagcc	tactcagcat	aaacaggtat	gatattattc	tgcattttgt	tacattacta		5160
gatgaattcc	tatttcttcc	tacaatagt	gaactgaaaa	aagatacaca	atcatactac		5220
ccctctacta	atcttatgac	ttatatcatt	tcaattttca	gaccataatg	caaactattg		5280
acaaaaacat	gtgaagatga	aaaatagaaa	tgtagaataa	tattacatat	aaaaagaaaa		5340
ggcggactta	ttttgtttta	tttcttagca	tgcatagcaa	tacatgattt	gaggtttata		5400
taataaagg	acaataaaac	ttcaagaaac	ttaccctac	tgaattaaaa	tattaaagaa		5460
ggtcacacat	ttactcaaat	atattagact	actgggcaaa	tagacatgaa	aagtagagtt		5520
aatattgagg	taggccttct	gtgaaatgtc	taaggaaatt	atgtttcata	cagtgtgtaa		5580
ccaagtggga	atcatatcag	aaagcagtca	aaagcttata	ttacaagtaa	cagatgcttg		5640
gttatatgac	ctcccagagc	ttgactgtct	atacacaaaa	agtggtgta	ataaaactgt		5700
aatttgggct	atgttttttt	aaatggcttc	accaacatga	aaggaaggga	atgagcatgt		5760
catggatgct	tagagattat	gcttccagca	agaagaattg	agctttggct	cttattacag		5820

aaacatgaca aggtgtgagt tttatttatt agaaattata taatatatta agctggggac	5880
taaaaatfff attgaaacaa acaggcaagg gataggcatg tactagaagc aaaaatagga	5940
tgtcaatgct gtaatgttat tttttggacc aaaatagtat ttcctataga aatgacaatg	6000
atcttaggtt attattcttc ataaagatga caagttcaca agataatccta gttcattaaa	6060
atcgttttag tcatttaata gagtgcctgtg atagattaca caaaggaaag cacttacgat	6120
gagaaataat gatatccaca attattttct taattcttag aaacattcta ttgttatatc	6180
tcaatctcag aagccactta ttgctttatt attgaaacat atgaaattgt aagttatata	6240
ttgtctatgg tgacatttca aagaacatgt gacgtacagt gtagcacaga taaagaacat	6300
aactgcagct gaatcagtaa ctaaacttac atacattaaa tctgccatgt tggcaacagt	6360
gtgtgcacta ccaaaggatg tactaatgct caccgacactc ccctatgtca cccittgttc	6420
atcattacat cataggctca ttttgtttgc ttttgaaatc tagaccaagt cttttgtgtc	6480
tttccaagca cagagctcat taatttacct catagacttg ttaaacttct tctggttcat	6540
caattgaata gaaatactca ctactaatta tgtgagaccc tgccagtacc atagcacatg	6600
gataatffff acataaaaaca tgcatacaag taagattatt cagactgaac atgaatttta	6660
gagaaatcag gaaggagtat atgggagtgg ttggagtgg actagagaaa tgtaattaaa	6720
ctataatctc aatacaaaaga tctactaagc aaaaaacatg aaacattgtc attcaagtga	6780
aacatcagtc ttcaaatgg aaagatattt ttactaggaa aatgtctggt agatggttat	6840
tatctagaaa acacaaaaat tagaaaacgg taaactttaa taaaaagaat aatacaatga	6900
gactacatga aaagtctta actaatgaaa caaatatctt gaaacttttt tcttaaaagt	6960
ttaatatcaa taaccatcat ggaaattcaa attaaaacta ttacatatt acccctgaaa	7020
taataactaa tacccaataa aaataatata aacaaaaaat ggcaatgcat gccatcatgg	7080
atttgggaga gagaatgttc attgcagttc tgaatggata ctggtgccac caccgtgaaa	7140
atctctgtat aggtcccttc aaaagctgaa aatagacata tcacaagacc tgccacacat	7200
ttttcaagca aatacccaaa ggactctacc tgactgcaga gacactttct cataaaatat	7260
tattgttgat ctattcataa tatctggaaa atagaacacag ccaagatgcc catcaactga	7320
ttaatagatg ataaaattat tgtacatttc agtgtaatat tattcagttt ttaagaaaaa	7380
tgaaattatg taataagcat gtaaatggat atatcttgaa acaaccattc cccattatat	7440
tacctaaaca ttgaaagtcc aaaatcatat gatcttttta gtggatctac taatcttttg	7500
ctatatgtat tttattgaac taccatgga tgtgagataa ttggtaacaa cagcacatgg	7560
gagagcatgg gatcattcaa ggaagattag agagaatgca ttttttagga gataatggag	7620
gagcaataga aaggattaaa tgaggttact gatgaaagtg atggttagag aaggcaatat	7680

gaggagggat aactagcact tagggccttt tgaaaaagac atagagaaaa tactattgta	7740
gaaacttcct ataattgggtg tatagttata tacaccaaag agctcagatg gagttaccct	7800
ataatggaaa tattaactac tttttatcac tgtgataaaa catcctgaac agagcaacat	7860
agattgggaa gcatttactt tggcttacag ttctaacggg ataaaaattc atgatgaaag	7920
aatgaatatg tcagcaaaca gcagtagcaa tggcctgaga agcaggtgag agctcacatc	7980
ttgaagtgtg agaatgtagc agagagaaca aactgcaaat gaccagaaaa tgcttttgga	8040
tcagagccca taccctctg actgacttct ccagaaattc tgaacaaata aaactcccca	8100
aacagagcca taactgaagg tccagtgtct gagactacta ggggtatttc ttattcaaac	8160
cactacaatg gggtaggggg agcaatcctc caagtaggca ctacacacag acaataaaaa	8220
actctagtaa ctggaatgga ttgacttatt tgaattactt gccagtggag ctacatagag	8280
cacaattatt gtatttaaat taccctttat gatcttaca aacttgacag taagatcata	8340
ttgctaaaga aaccacatat ttgaatcagg gaacatggtg atatctagtt gttcttcaac	8400
tggaaacttc atgctttctg ccagcattc atgttgctgg aaagagcaat gtacactacc	8460
agtgtagaaa ttaaatcatc aatcttatca agatgtggat cctataagtt acaataaaaa	8520
ttagcctgat aagatatccc caccagaaga atattcacat aaatgctatg ggagcaacaa	8580
gctattttct aaattagctt taatcctatt ctacaagaga gaatccatat ctagaatagt	8640
tatagggatc aagaacccat ggcttgattg gtcataggcc caatgggaga tcctaattat	8700
attgttctac aaaatgaaaa taactcctaa tgacttggtg ctgcagtaat aagttagtat	8760
gttgctcaac tctcacaaga gaagttttgt cttacaataa atggcaatta aagcagcccc	8820
acaagattta tatcataccg atctcctcat ggcctatgca tctagaagct aggaaacaaa	8880
gaggacccta agagagacat acatgggtccc cctggagaag ggggaagggg caagacctcc	8940
aaagctaatt gggagcatgg gggaggggag agggagttag aagaaagaga aggggataaa	9000
aggagggaga ggaggacaag agagagaagg aagatctagt caagagaaga tagaggagag	9060
caagaaaaga gataccatag tagagggagc cttgtatgtt taaatagaaa actggcacta	9120
gggaattgtc caaagatcca caaggtccaa ctaataatct aagcaatagt cgagaggcta	9180
ccftaaaagc ctttctctga taatgagatt gatgactacc ttatatacca tcctagagcc	9240
ttcatccagt agctgatgga agcagaagca gacatctaca gctaaacact gagctagtgtg	9300
cagacagga ggagtgatga gcaaagtcaa gaccaggctg gagaacacac cagaaacagc	9360
agacctgaaa aaaatgttgc acatggaccc cagactgata gctgggagtc cagcatagga	9420
cttttctaga aacctgaat gaggatatca gtttgagggt ctggttaatc tatggggaca	9480
ctggtagtgg atcaatatit atccctagtt catgactgga atttgggtac ccattccaca	9540

tggaggaatt ctctgtcagc ctagacacat gggggaggtt ctaggtcctg ctccaaataa	9600
tgtgttagac tttgaagaac tcccttgaga agactcacc tccctgggga gcagaaagg	9660
gatgggatga ggggttggtga gggacaggag aggaggggag ggtgaggga cigggttga	9720
caagtaaatg atgcttgttt ctaattttaa tgaataaagg aaaagtaaa gaagaaaaga	9780
aaacaggcca aaagattata aaagacagag gtggtgggtg actataaaga aacactatta	9840
tctaaataaa aatatgtcag aagcacacat gaacttatag tgittatga agtatgtata	9900
ataactacat aatctcaagc caagaaaaa atatcatctt tcagtgatga aggtgatttt	9960
atttctccca gaattaaagc caaagacctt atgaaagtaa ttatcttcaa aaggttgaaa	10020
atacatactt tgcaatacac agatctgcct agaaatctca tgttcacaat acacatgatg	10080
ctcaattgaa ttccattcaa tgttacagtt tagataaaca gttttagat aaactcaca	10140
tgtatcattt ctttttattt ttgaccaa cagcttctca tctgttattc agaataattc	10200
ctcgatggca ggatatccat cccaattggg ggaaggggag aatttgaaga aaacctagac	10260
cacatacata ttgccattg ggaacaaaag tctaaaatga tgtgttcac atcttctcta	10320
ctagtcctct ccccgctcca aagaaccttg gtatatgtgc ctcatTTTtac agagagagga	10380
aagcaggaac tgagcatccc ttacttgcca tcctcaacc aaaatttgca tcattgctca	10440
gctctgccct tctcatatga cagttacaag tcaaggcttc caaagtcct ctgtcatgtt	10500
tgggtgcaat agtttataca gatgacttca tgtcttcata tctaatgtct tatatagatt	10560
aatattaaac aatgttattt ctctaaccac attttaaat aatttaaaa tccattaatt	10620
gtgtctataa aatgcagaca gagtgtgag acacaatata agcctgatga tctgaatttg	10680
aaactcacac ccaccacatg gagaatcaac ttccaaaat ttctctatta ctccacact	10740
tacaccattg tacaacaca ataataatga acaaaatgaa atgaaataaa aaattaagtc	10800
tctgtaggta atgctactgt gcagcaaaag taaaaatggc agcttaagct tgctttatgg	10860
ttacacttta ccatcttcca ttaattataa ggacttcaat catggcagaa ctatgtgtt	10920
attgtctcag tgtaacctaa ccagggttc cagatgttct taatgtggac acctaaacta	10980
tttgataatt gggttaagat ctttcctct ttcagaaga acctcaggac agagggaatc	11040
ttgtcttita attttgagtc ttagacttt ttccatttca aatatacatg aaacaagtga	11100
tgaagaaaat taatcaaaag gtgggaattg caatgatatt aggttcaata ttaagcttca	11160
atattatcat ggaatcgctt gttatacact gagtgtttgg caataaggga tttttagaag	11220
aaggagtitt tattctcaac aggttcttca agtttagctc aaataaatct aagcaatcca	11280
ctctagaatt aaatagtttc ctaagggcac agctatgaat agagctcaat ttacatataa	11340
aattttgttc accatttatg tcattccagt ttccattagt acaaggaaaa taaaaatat	11400

ttagatgtca atatcaagtg aatagttcat ctccittttt aatatatatac acctaaatca	11460
ccattttctc agaaaaatct ggccctgaagt tctgtctgga acttcaacat gaaaaaatg	11520
cacagcttgc tattataaat cctagttgat ttttaagatt catgtctggg gtctgactca	11580
gaggggccag aggctagaca aatatttttt gaatcttcat tgtgaagatt tttaatgatt	11640
atittaatat aaataacaaa gatgatggat aatgtaactt tgtacagttc atagacgctg	11700
aactactttg tgcctaaaaat gttagttccc tatcataaat gataggatgat aagtgatgt	11760
ttaatacttt ccctctgagc tatattcatg tactagagaa ttattttaaa catgaaaaga	11820
ctgtgtttat agtctcagct ccigagaact ggtccaacct taggcagggtg aatgccagga	11880
gcaacgtttt tcttctacag aggatgcttt gctgccaagc aacctgggtg tgtggaaatg	11940
ttccittttt aatcaagttt aaagggtctt catcatgctg ttgctccaca tattttcagg	12000
ttagagcttg gtccttggag tattatcttt taccagaaaa ttcatagtat tctttcaata	12060
actaacaact aaacttttcg ataaaaaaga attggaattt caattttaaa gcctgagtaa	12120
aattcttgtg aatcaggata ttttatttta agtcttatct tttaaaaagt tattttat	12180
tttaaaaaat tataatatac ttccataatt tccctccttc acttttcttt acaaactt	12240
ctatagatca ccattgtgtt ttttttttac atttatggcc tctttctgtt cattgttatt	12300
acatacaaat agtcttgcct atagaagaac accacaattt gttacctgat aacaaattat	12360
caacccttaa aacctacaaa ctattgatat tactgaaaag actatactta tagatgtaaa	12420
gatatatgtg tgtgcacata tatagataca catatatgta ggatttttaa ttttagattt	12480
tagacatcaa aattatttat atgactgaga aactagacac tataaatgag cattcagtat	12540
tcaacaccgt gatttttagat attgtcaca tgacagaaaa ttttcttata gaaaatttta	12600
agttttgtga ttgctctgtg cacttagtga agtctcacag aaaaagaatc atagtatttt	12660
tagtttataa taaaaagtac atataattaa aatggttggc acaaaacaac atttgagcat	12720
ttttcctatt tactatcaag tagtatcatt ttgaaataat aatttgacta gtttcaaaaa	12780
tgaaaacaaa atttaaacta aatgcctaatt ctagcctgat aacattttta tgaatgaaat	12840
tattcaatag tgttatcaat taggggccca aaacttttcc taaaataaaa cttttaattt	12900
ttttccattt ttatttaaat tagaaacaaa attgttttac atgtaaatca gagtttcctc	12960
accctccctt tctccctgtc cctcactaac accctacttg tcccatacca tttctgctcc	13020
ccagggaggg tgaggccttc catggggaaa cttcagagtc tgtctatcct ttcggatagg	13080
gcctaggccc tcacccattt gtctaggcta aggctcacia agtttactcc tatgctagtg	13140
ataagtactg atctactaca agagacacca tagatttcct aggcttcctc actgacaccc	13200
atgttcatgg ggtctggaac aatcatatgc tagtttccta ggtatcagtc tggggacat	13260

gagctcccc ttgttcaggt caactgtttc tgtgggtttc accacctgg tcttgactgc	13320
tttgcctc acctccctt ttcigttaact gggttccagt acaattccgt gtttagctgt	13380
gggtgtctac ttctactttc atcagcttct gggatggagc ctctaggata gcatacaatt	13440
agtcacatc tcattatcag ggaagggcat ttaaagtagc ctctccattg ttgcttggat	13500
tgftagtgg tgtcatcttt gtagatctct ggacatttcc ctagtgccag atatctcttt	13560
aaacctacaa gactacctct attatggat ctcttttctt gctctcgtct attcttccag	13620
acaaaatctt cctgctccct tataattttcc tctccctcc tcttctcccc ttctcattct	13680
cctagatcca tcttcccttc ccccatgctc ccaagagaga tgttgctcag gagatcttgt	13740
tccttaaccc ttttcttggg gatctgtctc tcttaggggt gtccttgttt cctagcttct	13800
ctggaagtgt ggattgtaag ctggtaatca ttgctccat gtctaaaatc catatatgag	13860
tgatgtttgt ctttttgtga ctgggttacc tcaactcaaaa tggtttcttc catatgtctg	13920
tggatttcaa tagcacaaac aacatacagt atcttggggc aacactaacc aaacaagtga	13980
aagaccagta tagcaagaac tttagagtta aagaaagaaa ttaaagaaga taccagaaaa	14040
tggaaagatc tcccatgctc tttagataggc agaataca tagtaaaaaat ggcaatcttg	14100
ccaaaatcca tctacagact caatgcaatc cccattaaat accagcacac ttcttcacag	14160
acctgaaaga ataatactta actttatatg gaaaaacaaa agaccaggga taggccaac	14220
aacctgtac aatgaaggca ctccagagg catccccatc cctgacttca agctctatta	14280
tagagtaata atcctgaaaa cagcttggta atggcacaaa aatagacagg tagaccaatg	14340
gaattgagtt gaaaaccctg atattaaccc acatatctat gaacacctga ctttgacaaa	14400
gaagctaagg ttatacaatg taagaaagaa agcatcttca acaaatcgtg ctggcataac	14460
tggatgctgg catgtagaag actgcagata gatccatgtc taatgccatg cacaaaactt	14520
aagtccaaat ggatcaaaaa cctcaacata aatccagcca cactgaacct catagaagag	14580
aaagtgggaa gtatccttga ataaattggg acaggagacc acatcttgaa cttaacacca	14640
gtagcacaga caatcagatc aataatcaat aaatgggacc tcctgaaact gagaagcttc	14700
tgttaaggcaa tggataagtc aacaggacaa aatggcagcc cacggaatgg gaaaagatat	14760
tcaccaatcc tatatctgac agagggtgc tctctatttg caaagaacac aataagctag	14820
tttttaaac accaattaat ccgattataa agttgggtag agaactaaat aaagaattgt	14880
taacagagca atctaacttg gcagaaagac acataagaaa gtgctcacca t	14931

<210> 3
 <211> 4001
 <212> DNA
 <213> 中國倉鼠

<400> 3
ccaagatgcc catcaactga ttaatagaig ataaaattat tgtacatttc agtgtaatat 60
tattcagttt ttaagaaaaa tgaattatg taataagcat gtaaattgat atatcttgaa 120
acaaccattc cccattatat tacctaaaca ttgaaagtcc aaaatcatat gatcttttta 180
gtggatctac taatcttttg ctatatgtat tttattgaac tacccatgga tgtgagataa 240
ttggtaacaa cagcacatgg gagagcatgg gatcattcaa ggaagattag agagaatgca 300
tttttttaga gataatggag gagcaataga aaggattaaa tgaggttact gatgaaagtg 360
atggttagag aaggcaatat gaggagggat aactagcact tagggccttt tgaanaagac 420
atagagaaaa tactattgta gaaacttcct ataattgggtg tatagttata tacaccaaag 480
agctcagaig gagttaccct ataatggaaa tattaactac tttttatcac tgtgataaaa 540
catcctgaac agagcaacat agattgggaa gcattttactt tggtttacag ttctaacggg 600
ataaaaaattc atgatgaaag aatgaatatg tcagcaaaca gcagtagcaa tggcctgaga 660
agcaggtgag agctcacatc ttgaagtgtg agaattgtgc agagagaaca aactgcaaat 720
gaccagaaaa tgcttttggg tcagagccca taccctctg actgacttct ccagaaattc 780
tgaacaaata aaactcccca aacagagcca taactgaagg tccagtgtct gagactacta 840
ggggattttc ttattcaaac cactacaatg ggggtggggg agcaatcctc caagtaggca 900
ctacacacag acaataaaaa actctagtaa ctggaatgga ttgacttatt tgaattactt 960
gccagtggag ctacatagag cacaattatt gtatttaaat taccctttat gatcttacia 1020
aacttgacag taagatcata ttgctaaaga aaccacatat ttgaatcagg gaacatggtg 1080
atatctagtt gttcttcaac tggaaacttc atgctttctg cccagcattc atgttgctgg 1140
aaagagcaat gtacactacc agtgtagaaa ttaaatcatc aatcttatca agatgtggat 1200
cctataagtt acaataaaaa ttagcctgat aagatatccc caccagaaga atattcacat 1260
aaatgctatg ggagcaacaa gctattttct aaattagctt taatcctatt ctacaagaga 1320
gaatccatat ctagaatagt tatagggatc aagaacccat ggcttgattg gtcataggcc 1380
caatgggaga tctaataatt attgttctac aaaatgaaaa taactcctaa tgacttggtg 1440
ctgcagtaat aagttagtat gttgtcacaac tctcacaaga gaagttttgt cttacaataa 1500
atggcaatta aagcagcccc acaagattta tatcataccg atctcctcat ggcctatgca 1560
tctagaagct aggaaacaaa gaggacccta agagagacat acatgggtccc cctggagaag 1620
gggaaggggg caagacctcc aaagctaat ggagcatgg gggaggggag agggagttag 1680
aagaaagaga aggggataaa aggagggaga ggaggacaag agagagaagg aagatctagt 1740
caagagaaga tagaggagag caagaaaaga gataccatag tagagggagc cttgtatgtt 1800

taaatagaaa actggcacta gggaattgtc caaagatcca caaggtccaa ctaataatct	1860
aagcaatagt cgagaggcta ccttaaaagc ctttctctga taatgagatt gatgactacc	1920
ttatatacca tcttagagcc ttcattccagt agctgatgga agcagaagca gacatctaca	1980
gctaaacact gagctagtgt cagacaggga ggagtgatga gcaaagtcaa gaccaggctg	2040
gagaaacaca cagaaacagc agacctgaaa aaaatgttgc acatggaccc cagactgata	2100
gctggggagt cagcatagga cttttctaga aacctgaat gaggatatca gtttggaggt	2160
ctgggttaatc tatggggaca ctggtagtgg atcaatattt atccctagtt catgactgga	2220
atttgggtac ccattccaca tggaggaatt ctctgtcagc ctagacacat gggggaggtt	2280
ctaggctcctg ctccaaataa tgtgttagac tttgaagaac tcccttgaga agactcacc	2340
tccctgggga gcagaaagg gatgggatga gggttggtga gggacaggag aggaggggag	2400
ggtgagggaa ctgggatiga caagtaaatg atgcttgttt ctaattttaa tgaataaagg	2460
aaaagtaaaa gaagaaaaga aaacaggcca aaagattata aaagacagag gtggtgggtg	2520
actataaaga aacactatta tctaaataaa aacatgtcag aagcacacat gaacttatag	2580
tgtttatgaa agtatgtata ataactacat aatctcaagc caagaaaaaa atatcatctt	2640
tcagtgatga aggtgatttt atttctccca gaattaaagc caaagacctt atgaaagtaa	2700
ttatcttcaa aagggtgaaa atacatactt tgcaatacac agatctgcct agaaatctca	2760
tgttcacaat acacatgatg ctcaattgaa ttccattcaa tgttacagtt tagataaaca	2820
gtttgtagat aaactcacia tgtatcattt ctttttattt ttgaccaa cagcttctca	2880
tctgttattc agaataattc ctgatggca ggatatccat cccaattggg ggaaggggag	2940
aatttgaaga aaacctagac cacatacata tttgccattg ggaaacaaag tctaaaatga	3000
tgttgttcac atcttctcta ctagtctct ccccgccca aagaaccttg gtatatgtgc	3060
ctcattttac agagagagga aagcaggaa tgagcatccc ttacttgcca tctcaaccc	3120
aaaatttgca tcattgtca gctctgccct tctcatatga cagttacaag tcaaggcttc	3180
caaagtcctt ctgtcatgtt tgggtgtcaat agtttataca gatgacttca tgtcttcata	3240
tctaatgtct tatatagatt aatattaaac aatgttattt ctctaaccac attttaaatt	3300
aatttaaaaa tccattaatt gtgtctataa aatgcagaca gagtgtgag acacaatata	3360
agcctgatga tctgaatttg aaactcacac ccaccacatg gagaatcaac ttccaaaaat	3420
tttctatta ctccacact tacaccatg tacaacaca ataataatga acaaaatgaa	3480
atgaaataaa aaattaagtc tctgtaggta atgtactgt gcagcaaaag taaaaatggc	3540
agcttaagct tgctttatgg ttacacttta ccacttcca ttaattataa ggacttcaat	3600
catggcagaa ctatgtgtt attgtctcag tgtaacctaa ccaggtgttc cagatgttct	3660

taatgtggac acctaaacta ttgatattt gggttaagat cttccctct ttcagaagaa	3720
acctcaggac agaggggaatc ttgtctttta attttgagtc tntagacttt ttccatttca	3780
aatatacatg aaacaagtga tgaagaaaat taatcaaaag gtgggaattg caatgatatt	3840
aggttcaata ttaagcttca atattatcat ggaatcgctt gttatacact gagtgtttgg	3900
caataaggga tttttagaag aaggagtttt tattctcaac aggttcctta agtttagctc	3960
aaataaatct aagcaatcca ctctagaatt aaatagtttc c	4001

申請專利範圍

1. 一種哺乳動物細胞，其包含

一第一外源性核酸，其整合在一第一增強表現基因座之內，其中第一外源性核酸包含編碼一第一重鏈片段(HCF)的核苷酸序列；以及

一第二外源性核酸，其整合在一第二增強表現基因座之內，其中第二外源性核酸包含編碼一第一輕鏈片段(LCF)的核苷酸序列和編碼一第二HCF的核苷酸序列；其中一第一可篩選標記基因係存在於編碼第一LCF的核苷酸序列和編碼第二HCF的核苷酸序列之間，且其中該可篩選標記基因包含含有第一重組識別位點(RRS)的內含子，

其中第一和第二外源性核酸共同編碼一抗原結合蛋白。

2. 如請求項1之細胞，其中第一外源性核酸更包含編碼一第二LCF的核苷酸序列。
3. 如請求項2之細胞，其中第二可篩選標記基因係存在於編碼第一HCF的核苷酸序列和編碼第二LCF的核苷酸序列之間，其中第二可篩選標記基因與第一可篩選標記基因不相同且包含含有第二RRS的內含子。
4. 如請求項1至3中任一項之細胞，其中第一和第二HCF各包含一重鏈可變域。
5. 如請求項1至3中任一項之細胞，其中第一和第二HCF的序列不相同。
6. 如請求項1至3中任一項之細胞，其中第一和第二HCF的序列相同。
7. 如請求項1至3中任一項之細胞，其中第一LCF包含一輕鏈可變域。
8. 如請求項2至3中任一項之細胞，其中第一和第二LCF的序列相同。
9. 如請求項2至3中任一項之細胞，其中第一和第二LCF的序列不相同。
10. 如請求項1至3中任一項之細胞，其中該抗原結合蛋白為一全長抗體。
11. 如請求項10之細胞，其中該抗體為雙特異性抗體。

12. 如請求項1至3中任一項之細胞，其中該可篩選標記基因賦予對抗生素之抗性。
13. 如請求項12之細胞，其中該抗生素為潮黴素(hygromycin)、新黴素(neomycin)或卡那黴素(kanamycin)。
14. 如請求項1至3中任一項之細胞，其中該細胞為CHO細胞。
15. 如請求項14之細胞，其中該兩個增強表現基因座之一者係包含與SEQ ID NO: 1至少90%一致的核苷酸序列，且另一者係包含與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO:3至少90%一致的核苷酸序列。
16. 一種用於在哺乳動物細胞中表現雙特異性抗原結合蛋白的載體組，其包含
 - 一第一載體，從5'至3'包含：一第一RRS、一第一核酸、一包含第一內含子的5'部分之第一可篩選標記基因之5'部分、及一第二RRS，其中該第二RRS係置於該第一內含子的5'部分的3'端，其亦為該第一可篩選標記基因的5'部分的3'端；
 - 一第二載體，從5'至3'包含：一第三RRS、包含編碼一第二HCF的核苷酸序列的一第二核酸、一第四RRS；及
 - 一第三載體，從5'至3'包含：一5' RRS、一包含第一內含子的其餘3'部分之第一可篩選標記基因之其餘3'部分、一第三核酸、及一3' RRS，其中該5' RRS係置於該第一內含子的其餘3'部分的5'端，其亦為該第一可篩選標記基因的3'部分的5'端，且其中該5' RRS與該第二RRS相同，且其中該3' RRS與第一和第二RRS不相同；其中第一、第二、第三和第四RRS不相同；
其中該第一和第三核酸之一者包含編碼一第一HCF之核苷酸序列，且另一者包含編碼一第一LCF之核苷酸序列；且
其中該雙特異性抗原結合蛋白包含第一HCF、第二HCF和第一

LCF，且其中第一和第二HCF不相同。

17. 如請求項16之載體組，其另外包含一第四載體，其中

該第二載體從5'至3'包含：第三RRS、包含編碼第二HCF的核苷酸序列之第二核酸、包含第二內含子的5'部分之第二可篩選標記基因之5'部分、及第四RRS，其中該第四RRS係置於該第二內含子的5'部分的3'端，其亦為該第二可篩選標記基因的5'部分的3'端；且

該第四載體從5'至3'包含：一5' RRS、包含第二內含子的其餘3'部分之第二可篩選標記基因之其餘3'部分、編碼第二LCF之核苷酸序列、及一3' RRS，其中該5' RRS係置於該第二內含子的其餘3'部分的5'端，其亦為該第二可篩選標記基因的3'部分的5'端，且其中該5' RRS與該第四RRS相同，且其中第四載體的該3' RRS與第三和第四RRS不相同。

18. 如請求項16之載體組，其另外包含一第四載體，其中

該第二載體從5'至3'包含：第三RRS、包含第二內含子的5'部分之第二可篩選標記基因之5'部分、包含編碼第二HCF的核苷酸序列之第二核酸、及第四RRS，其中該第三RRS係置於該第二內含子的5'部分的3'端，其亦為該第二可篩選標記基因的5'部分的3'端；且

該第四載體從5'至3'包含：一5' RRS、編碼第二LCF之核苷酸序列、包含第二內含子的其餘5'部分之第二可篩選標記基因之其餘5'部分、一3' RRS，其中該3' RRS係置於該第二內含子的5'部分的3'端，其亦為該第二可篩選標記基因的5'部分的3'端，且其中該3' RRS與該第三RRS相同。

19. 如請求項17或18之載體組，其中第一和第二LCF的序列相同。

20. 如請求項16至18中任一項之載體組，其中該雙特異性抗原結合蛋白為一全長雙特異抗體。

21. 如請求項16至18中任一項之載體組，其中該可篩選標記基因賦予對生素之抗性。

22. 如請求項21之載體組，其中該抗生素為潮黴素、新黴素或卡那黴素。

23. 一種用於在哺乳動物細胞中表現單特異性抗原結合蛋白的載體組，其包含

一第一載體，從5'至3'包含：一第一RRS、一第一核酸、一包含內含子的5'部分之可篩選標記基因之5'部分、及一第二RRS，其中該第二RRS係置於該第一內含子的5'部分的3'端，其亦為該可篩選標記基因的5'部分的3'端；及

一第二載體，從5'至3'包含：第二RRS、一包含該內含子的其餘3'部分之可篩選標記基因之3'部分、一第二核酸、及一第三RRS，其中該第二RRS係置於該內含子的其餘3'部分的5'端，其亦為該可篩選標記基因的3'部分的5'端；

其中第一、第二和第三RRS不相同；

其中該第一和第二核酸之一者包含編碼一HCF之核苷酸序列，且另一者包含編碼一LCF之核苷酸序列；且

其中該單特異性抗原結合蛋白包含該HCF和該LCF。

24. 如請求項23之載體組，其中該可篩選標記基因賦予對抗生素之抗性。

25. 如請求項24之載體組，其中該抗生素為潮黴素、新黴素或卡那黴素。

26. 一種用於表現單特異性抗原結合蛋白的哺乳動物細胞，其包含

一外源性核酸，其整合在一第一增強表現基因座之內且整合在一第二增強表現基因座之內，其中該外源性核酸包含：

一第一RRS、一第一核酸、一包含一第二RRS的內含子之可篩選標記基因、一第二核酸、及一第三RRS，

其中第一、第二和第三RRS不相同；

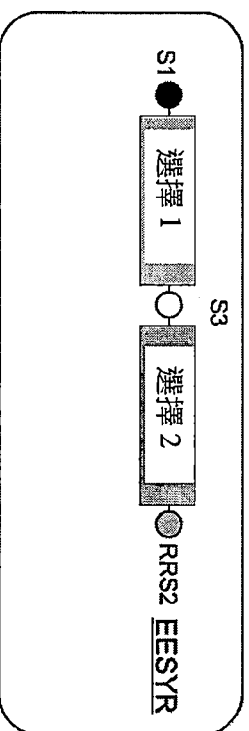
其中該第一和第二核酸之一者包含編碼一HCF之核苷酸序列，且另一者包含編碼一LCF之核苷酸序列；且

其中該單特異性抗原結合蛋白包含該HCF和該LCF。

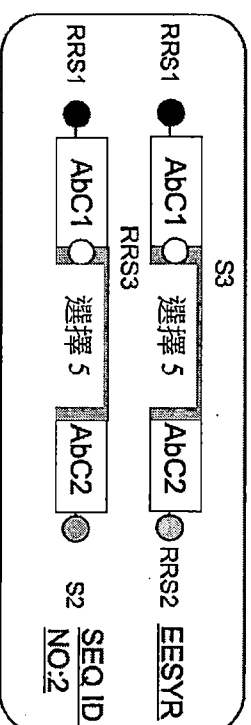
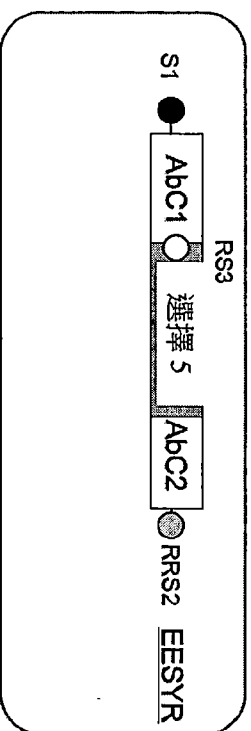
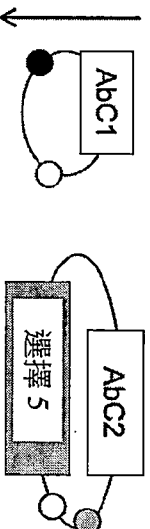
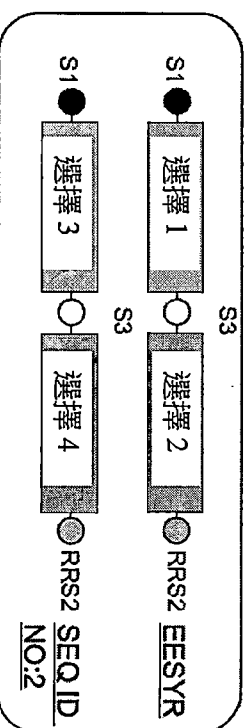
27. 如請求項26之細胞，其中該可篩選標記基因賦予對抗生素之抗性。
28. 如請求項27之細胞，其中該抗生素為潮黴素、新黴素或卡那黴素。
29. 如請求項26至28中任一項之細胞，其中該細胞為CHO細胞。
30. 如請求項29之細胞，其中該兩個增強表現基因座之一者係包含與SEQ ID NO: 1至少90%一致的核苷酸序列，且另一者係包含與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO:3至少90%一致的核苷酸序列。
31. 一種製備抗原結合蛋白的方法，其包含：
提供根據請求項1-15或26-30中任一者之哺乳動物細胞，以及
從該細胞製備該抗原結合蛋白。

圖式

單一特異性整合宿主細胞系



雙特異性整合宿主細胞系

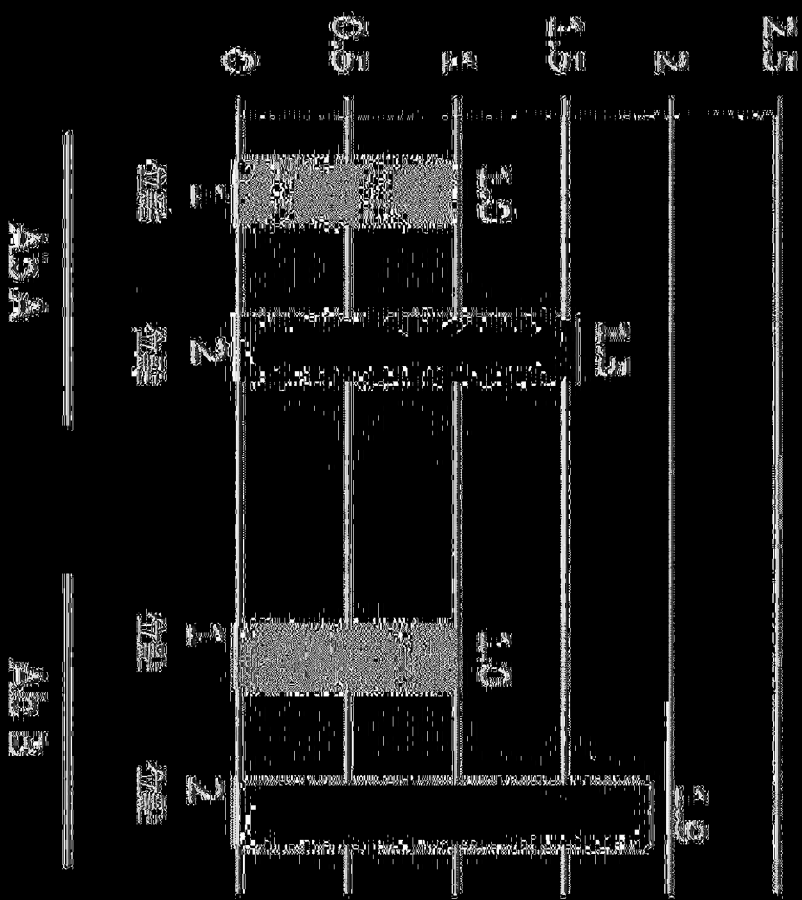


RSX 生產細胞系

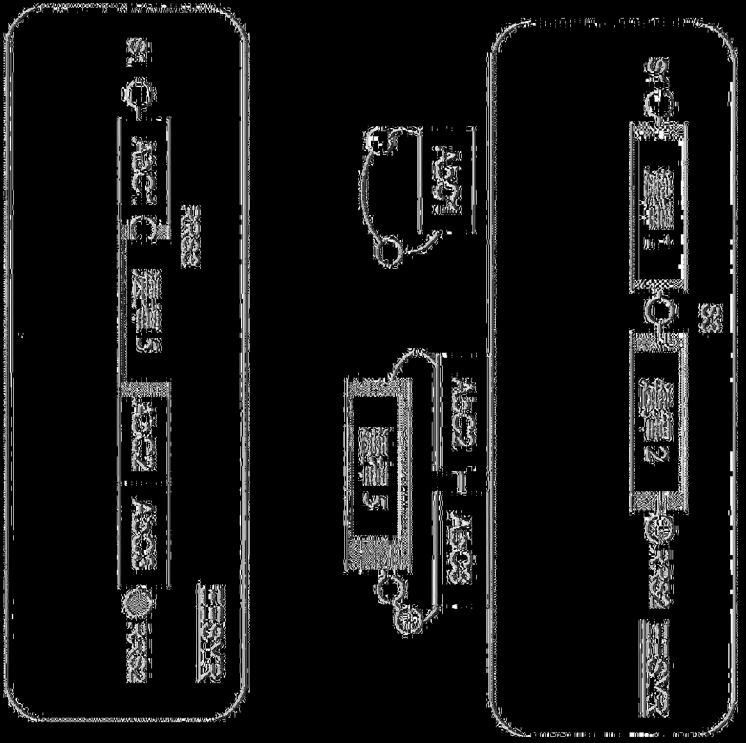
RSX² 生產細胞系

圖 1

数値(相対単位)



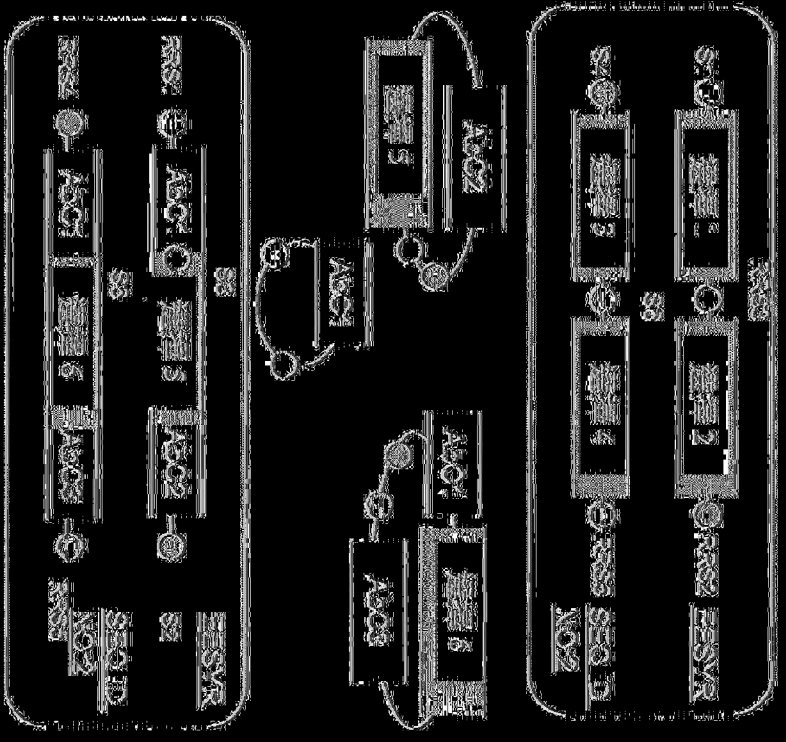
圖一 檢驗裝置之組合機台配置圖



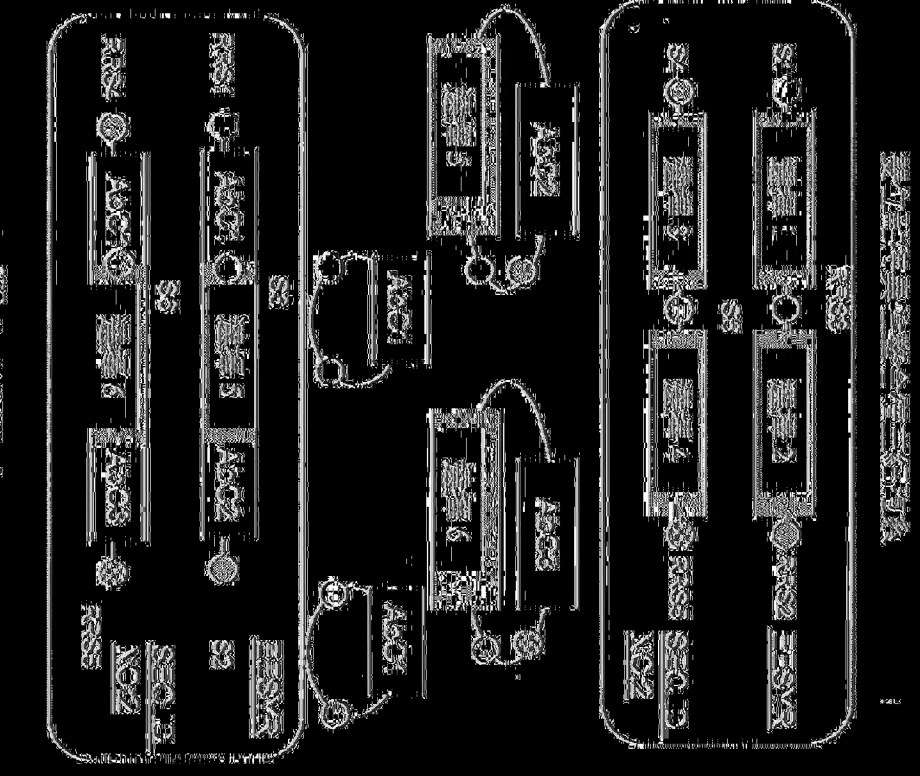
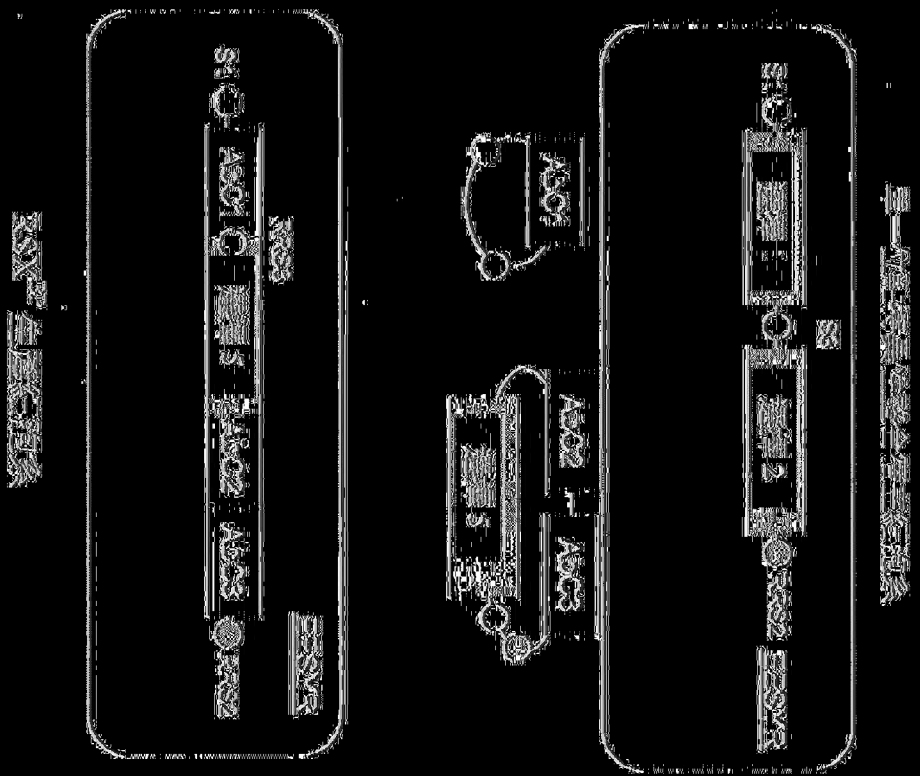
圖二 檢驗裝置之組合機台配置圖

圖三

圖四 檢驗裝置之組合機台配置圖



圖五 檢驗裝置之組合機台配置圖



1.4

5

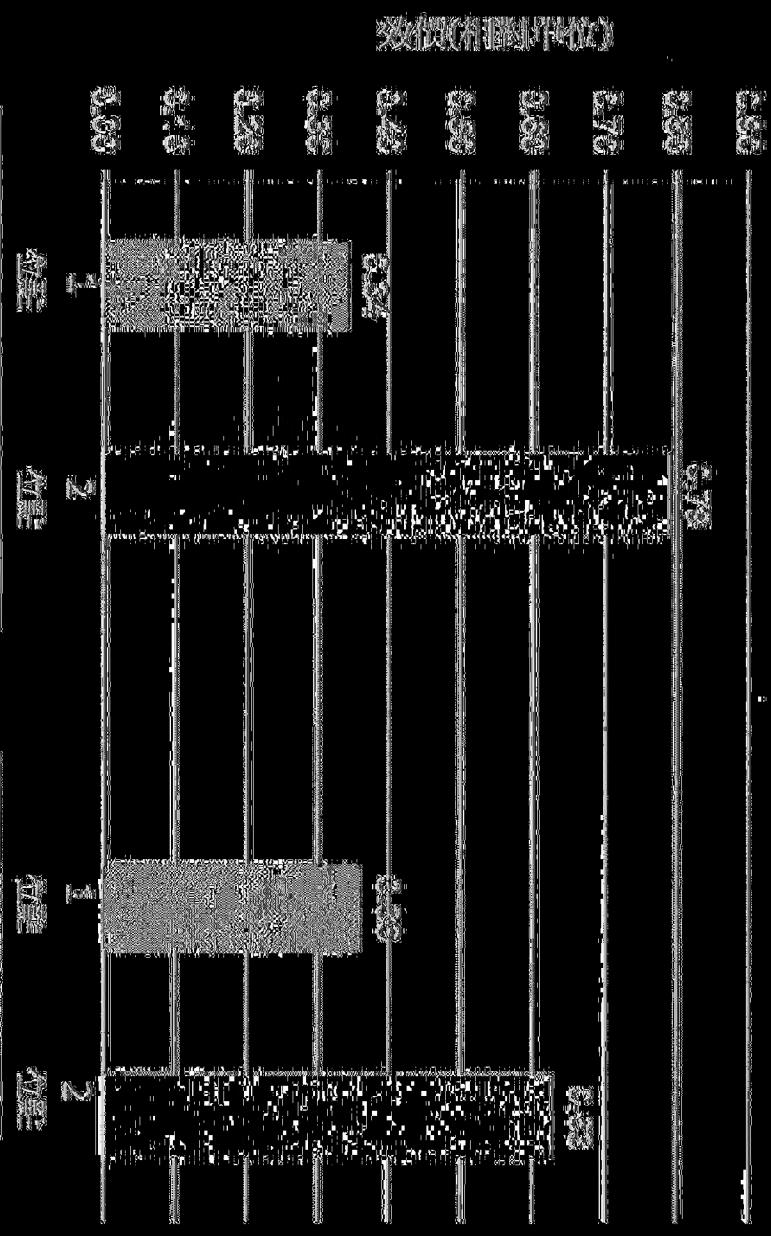


要素集-A3 表紙

15

A3 C

A3 D



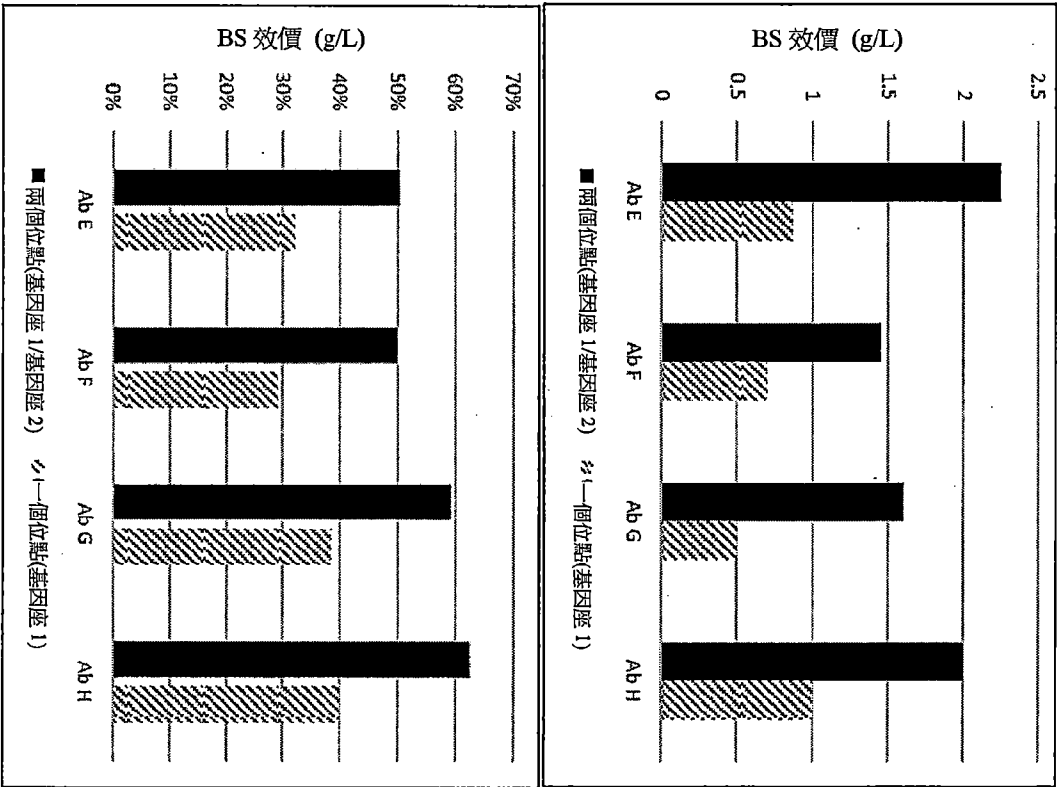


圖 6A

圖 6B

