(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116457468 A
(43)申请公布日 2023.07.18

(21)申请号 202180074963.4
(22)申请日 2021.09.21
(30)优先权数据
20306068.6 2020.09.21 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.05.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/075864 2021.09.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/058603 EN 2022.03.24
(71)申请人 赛诺菲
地址 法国巴黎
(72)发明人 B·L·杜马斯 M·N·卢尼斯
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
C12N 15/90(2006.01)

权利要求书3页 说明书29页
序列表26页 附图2页

(54)发明名称

用于治疗性蛋白质生产的高产重组中国仓鼠卵巢细胞系的产生

(57)摘要

本发明涉及一种包含部分或完全失活的内源性二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)和谷氨酰胺合成酶(GS)基因的细胞系及其用于产生重组蛋白的用途。

CN 116457468 A

1.一种细胞系,所述细胞系包含:

-部分或完全失活的内源性二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)基因,以及

-部分或完全失活的内源性谷氨酰胺合成酶(GS)基因。

2.根据权利要求1所述的细胞系,所述细胞系是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

3.根据权利要求1或2所述的细胞系,其中所述细胞系通过以下方式产生:

(a1)使包含内源性DHODH基因和内源性GS基因的细胞中的所述内源性DHODH基因失活,

(b1)在适合于产生其中所述内源性DHODH基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含尿苷的培养基中培养所述细胞,

(c1)回收所述细胞,在所述细胞中所述内源性DHODH基因部分或完全失活,

(d1)使所述细胞中的内源性GS基因失活,以及

(e1)在适合于产生其中所述内源性GS基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含谷氨酰胺的培养基中培养所述细胞。

4.根据权利要求1或2所述的细胞系,其中所述细胞系通过以下方式产生:

(a2)提供包含内源性GS基因和部分或完全失活的内源性DHODH基因的细胞,

(b2)使所述细胞中的内源性GS基因失活,以及

(c2)在适合于产生其中所述内源性GS基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含谷氨酰胺的培养基中培养所述细胞。

5.根据权利要求1或2所述的细胞系,其中所述细胞系通过以下方式产生:

(a3)提供包含内源性DHODH基因和部分或完全失活的内源性GS基因的细胞,

(b3)使所述细胞中的内源性DHODH基因失活,以及

(c3)在适合于产生其中所述内源性DHODH基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含尿苷的培养基中培养所述细胞。

6.根据权利要求3至5中任一项所述的细胞系,其中通过基因编辑方法使所述内源性DHODH基因和/或所述内源性GS基因失活。

7.根据权利要求6所述的细胞系,其中通过CRISPR-Cas9方法使所述内源性DHODH基因和/或所述内源性GS基因失活。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的细胞系,其中:

-所述内源性DHODH基因的一个或多个或所有等位基因部分或完全失活,和/或

-所述内源性GS基因的一个或多个或所有等位基因部分或完全失活。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的细胞系,其中所述细胞系进一步包含:

-含有编码外源性哺乳动物DHODH的核苷酸序列(i)和至少一个用于表达重组蛋白(I)的表达盒的表达载体,其中所述外源性DHODH包含与序列SEQ ID NO:2或序列SEQ ID NO:4至少60%相同的序列,以及

-含有编码外源性哺乳动物GS的核苷酸序列(ii)和至少一个用于表达重组蛋白(II)的表达盒的表达载体,其中所述外源性GS包含与序列SEQ ID NO:6或序列SEQ ID NO:8至少94.5%相同的序列。

10.一种表达系统,所述表达系统包含:

(A)根据权利要求1至9中任一项所述的细胞系,

(B)含有编码哺乳动物DHODH的核苷酸序列(i)和至少一个用于表达重组蛋白(I)的表

达盒的表达载体,其中所述DHODH包含与序列SEQ ID NO:2或序列SEQ ID NO:4至少60%相同的序列,以及

(C)含有编码哺乳动物GS的核苷酸序列(ii)和至少一个用于表达重组蛋白(II)的表达盒的表达载体,其中所述GS包含与序列SEQ ID NO:6或序列SEQ ID NO:8至少94.5%相同的序列。

11.根据权利要求9所述的细胞系或根据权利要求10所述的表达系统,其中所述核苷酸序列(i)包含SEQ ID NO:1的序列或SEQ ID NO:3的序列。

12.根据权利要求9或11所述的细胞系或根据权利要求10或11所述的表达系统,其中所述核苷酸序列(ii)包含SEQ ID NO:5的序列或SEQ ID NO:7的序列。

13.根据权利要求9、11和12中任一项所述的细胞系或根据权利要求10、11和12中任一项所述的表达系统,其中所述重组蛋白(I)和(II)是单克隆抗体的不同臂。

14.根据权利要求9和11-13中任一项所述的细胞系或根据权利要求10-13中任一项所述的表达系统,其中所述载体包含适合于克隆抗体轻链的第一表达盒和适合于克隆抗体重链的第二表达盒。

15.一种试剂盒,所述试剂盒包含:

-根据权利要求9和11-14中任一项所述的细胞系或根据权利要求10-14中任一项所述的表达系统,以及

-不含尿苷和谷氨酰胺、特别是也不含DHODH抑制剂和GS抑制剂的培养基。

16.一种产生重组蛋白的体外方法,所述体外方法包括以下步骤:

A)a1)提供根据权利要求9和11-14中任一项所述的细胞系;

或

a2)提供根据权利要求1至8中任一项所述的细胞系,以及

a2')将根据权利要求10至14中任一项所定义的表达载体引入步骤a2)中提供的细胞系中;

或

a3)提供包含内源性DHODH基因和内源性GS基因的细胞系,

a3')使步骤a3)中提供的细胞系中的所述内源性DHODH基因和所述内源性GS基因部分或完全失活,以及

a3")将根据权利要求10至14中任一项所定义的表达载体引入步骤a3')中获得的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中;

或

a4)提供包含内源性GS基因和部分或完全失活的内源性DHODH基因的细胞,

a4')使步骤a4)中提供的细胞系中的所述内源性GS基因部分或完全失活,以及

a4")将根据权利要求10至14中任一项所定义的表达载体引入步骤a4')中获得的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中;

或

a5)提供包含内源性DHODH基因和部分或完全失活的内源性GS基因的细胞,

a5')使步骤a5)中提供的细胞系中的所述内源性DHODH基因部分或完全失活,以及

a5")将根据权利要求10至14中任一项所定义的表达载体引入步骤a5')中获得的包含

部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中；

B)在适合于产生所述重组蛋白的条件下培养所述细胞系;以及

C)分离和/或纯化所述重组蛋白。

17.根据权利要求16所述的方法,其中步骤B)在不含尿苷和谷氨酰胺、特别是也不含DHODH抑制剂和GS抑制剂的培养基中进行。

18.根据权利要求16或17所述的方法,所述方法进一步包括将所述重组蛋白配制成药物组合物的步骤D)。

19.根据权利要求9和11-14中任一项所述的细胞系、根据权利要求10至14中任一项所述的表达系统或根据权利要求15所述的试剂盒用于产生重组蛋白的用途。

20.根据权利要求19所述的用途,其中所述细胞系、所述表达系统或所述试剂盒与不含尿苷和谷氨酰胺、特别是在不存在DHODH抑制剂和GS抑制剂的情况下的培养基组合使用。

用于治疗性蛋白质生产的高产重组中国仓鼠卵巢细胞系的产生

技术领域

[0001] 本发明涉及用于蛋白质生产的细胞系和选择标记物。

背景技术

[0002] 以工业规模生产重组蛋白需要分离可产生大量重组蛋白的克隆。将异源基因引入动物宿主细胞中并针对所添加的基因的表达进行筛选是漫长且复杂的过程。所述过程涉及转染和选择具有稳定长期表达的克隆,以及筛选具有相应重组蛋白的高表达率的克隆。

[0003] 当产生从表达载体表达重组蛋白的克隆时,通常用在同一载体上编码目的蛋白和选择标记物两者的DNA载体转染宿主细胞。因此,这种表达载体包含可选择标记物,所述可选择标记物允许选择其中存在所述表达载体的克隆。这种可选择标记物也可以导致转染的DNA的共同扩增,从而允许分离高生产者克隆。

[0004] 大多数可选择标记物是赋予对抗生素或其他有毒物质的抗性的蛋白质,或者是细胞存活所必需的蛋白质。若干种此类可选择标记物是本领域已知的,包括例如G418、潮霉素、嘌呤霉素、博来霉素(zeomycin)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、谷氨酰胺合成酶(GS)和次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)。

[0005] GS在真核细胞中工业重组蛋白生产的领域被广泛用作可选择标记物。GS基因允许合成细胞生长所必需的谷氨酰胺,并被MSX(L-甲硫氨酸亚砜亚胺)抑制。在存在MSX的情况下,只有表达较高量的GS的细胞才能存活。经过适当筛选后,可以选择产生外源性蛋白的细胞。

[0006] 在先前的申请WO 2016/062837中,诸位发明人开发了一种基于使用二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)作为可选择标记物的表达系统。DHODH是嘧啶合成所需的酶。因此,抑制DHODH的化合物抑制DNA合成,从而抑制细胞增殖。这种选择标记物因此构成编码DHODH的表达载体,其与DHODH抑制剂(如来氟米特和特立氟胺)组合使用。

[0007] 然而,与上述选择标记物一起使用的大多数抑制剂是有毒的。在DHODH选择标记物的情况下,特立氟胺是例如有效的免疫抑制剂,并且出于安全性原因,它的处理尤其是大规模处理可能具有挑战性。在GS选择标记物的情况下,MSX在高剂量时引起惊厥,因此也可能引起处理问题。在DHFR选择标记物的情况下,已知甲氨蝶呤展现出造血毒性和消化毒性,因此也引起处理问题。

[0008] 此外,为了产生复杂的蛋白质,如双特异性或三特异性单克隆抗体,单个克隆从若干种单独的表达载体产生若干种单独的重组蛋白是有必要的。在这种情况下,必须用若干种DNA载体(各自在同一载体上编码目的蛋白和特异性选择标记物两者)转染宿主细胞。每种表达载体因此包含不同的可选择标记物,所述可选择标记物允许选择其中存在所述表达载体的克隆。

[0009] 因此,需要这样的表达系统,使得能够通过若干种不同的选择标记物产生若干种不同的蛋白质,并且其中可以在不添加难以处理的化合物的情况下进行产生目的蛋白的克

隆的选择。

[0010] 本发明满足了这种需要。

发明内容

[0011] 本发明由诸位发明人对细胞系的设计产生,其中由于所述细胞系中DHODH基因和GS基因的部分或完全失活,因此可以在不含尿苷和谷氨酰胺的培养基中选择产生目的蛋白的细胞。通常使其中所述DHODH基因和GS基因部分或完全失活的这种细胞系在补充有尿苷和谷氨酰胺的培养基中生长,但是当用包含编码哺乳动物DHODH、特别是编码突变的哺乳动物DHODH的核苷酸序列和用于表达第一目的蛋白的表达盒的表达载体转染并且用包含编码哺乳动物GS的核苷酸序列和用于表达第二目的蛋白的表达盒的表达载体转染时,通常将所述培养基改为不含尿苷和谷氨酰胺的培养基,从而选择产生所述第一目的蛋白和所述第二目的蛋白的细胞。

[0012] 由于通过避免使用抑制剂作为选择压力,所以这种表达系统是特别有利的,它增加了所述生产细胞的活力。诸位发明人进一步证明了毒性的这种降低与高生产率相关。此外,这种表达系统能够产生复杂的重组蛋白,如双特异性或三特异性单克隆抗体。

[0013] 因此,本发明涉及一种细胞系,所述细胞系包含:

[0014] -部分或完全失活的内源性二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)基因,以及

[0015] -部分或完全失活的内源性谷氨酰胺合成酶(GS)基因。

[0016] 在特定实施方案中,所述细胞系是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

[0017] 在另一个特定实施方案中,所述细胞系通过以下方式产生:

[0018] (a1)使包含内源性DHODH基因和内源性GS基因的细胞中的所述内源性DHODH基因失活,特别是通过基因编辑方法,如通过CRISPR-Cas方法,如通过CRISPR-Cas9方法,

[0019] (b1)在适合于产生其中所述内源性DHODH基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含尿苷的培养基中培养所述细胞,

[0020] (c1)回收所述细胞,在所述细胞中所述内源性DHODH基因部分或完全失活,

[0021] (d1)使所述细胞中的所述内源性GS基因失活,特别是通过基因编辑方法,如通过CRISPR-Cas方法,如通过CRISPR-Cas9方法,以及

[0022] (e1)在适合于产生其中所述内源性GS基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含谷氨酰胺的培养基中培养所述细胞。

[0023] 在可替代的特定实施方案中,所述细胞系通过以下方式产生:

[0024] (a2)提供包含内源性GS基因和部分或完全失活的内源性DHODH基因的细胞,

[0025] (b2)使所述细胞中的内源性GS基因失活,特别是通过基因编辑方法,如通过CRISPR-Cas方法,如通过CRISPR-Cas9方法,以及

[0026] (c2)在适合于产生其中所述内源性GS基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含谷氨酰胺的培养基中培养所述细胞。

[0027] 在仍可替代的特定实施方案中,所述细胞系通过以下方式产生:

[0028] (a3)提供包含内源性DHODH基因和部分或完全失活的内源性GS基因的细胞,

[0029] (b3)使所述细胞中的所述内源性DHODH基因失活,特别是通过基因编辑方法,如通过CRISPR-Cas方法,如通过CRISPR-Cas9方法,以及

[0030] (c3)在适合于产生其中所述内源性DHODH基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含尿苷的培养基中培养所述细胞。

[0031] 在特定实施方案中,所述内源性DHODH基因的一个或多个或所有等位基因部分或完全失活,和/或所述内源GS基因的所有等位基因部分或完全失活。

[0032] 在进一步的实施方案中,所述细胞系进一步包含:

[0033] -含有编码外源性哺乳动物DHODH的核苷酸序列(i)和至少一个用于表达重组蛋白(I)的表达盒的表达载体,其中所述外源性DHODH包含与序列SEQ ID NO:2或序列SEQ ID NO:4至少60%相同的序列,以及

[0034] -含有编码外源性哺乳动物GS的核苷酸序列(ii)和至少一个用于表达重组蛋白(II)的表达盒的表达载体,其中所述外源性GS包含与序列SEQ ID NO:6或序列SEQ ID NO:8至少94.5%相同的序列。

[0035] 在其特定实施方案中,所述核苷酸序列(i)包含SEQ ID NO:1的序列或SEQ ID NO:3的序列。

[0036] 在其另一个特定实施方案中,所述核苷酸序列(ii)包含SEQ ID NO:5的序列或SEQ ID NO:7的序列。

[0037] 在其另一个特定实施方案中,所述重组蛋白(I)和(II)是单克隆抗体的不同臂。

[0038] 在其仍另一个特定实施方案中,所述载体分别包含适合于克隆抗体轻链的第一表达盒和适合于克隆抗体重链的第二表达盒。

[0039] 本发明的另一个目的是一种表达系统,所述表达系统包含:

[0040] (A)如上定义的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的内源性GS基因的细胞系,

[0041] (B)含有编码哺乳动物DHODH的核苷酸序列(i)和至少一个用于表达重组蛋白(I)的表达盒的表达载体,其中所述DHODH包含与序列SEQ ID NO:2或序列SEQ ID NO:4至少60%相同的序列,以及

[0042] (C)含有编码哺乳动物GS的核苷酸序列(ii)和至少一个用于表达重组蛋白(II)的表达盒的表达载体,其中所述GS包含与序列SEQ ID NO:6或序列SEQ ID NO:8至少94.5%相同的序列。

[0043] 在特定实施方案中,所述核苷酸序列(i)包含SEQ ID NO:1的序列或SEQ ID NO:3的序列。

[0044] 在另一个特定实施方案中,所述核苷酸序列(ii)包含SEQ ID NO:5的序列或SEQ ID NO:7的序列。

[0045] 在另一个特定实施方案中,所述重组蛋白(I)和(II)是单克隆抗体的不同臂。

[0046] 在仍特定实施方案中,所述载体分别包含适合于克隆抗体轻链的第一表达盒和适合于克隆抗体重链的第二表达盒。

[0047] 本发明进一步涉及一种试剂盒,所述试剂盒包含:

[0048] -如上定义的细胞系或如上定义的表达系统,以及

[0049] -不含尿苷和谷氨酰胺、特别是也不含DHODH抑制剂和GS抑制剂的培养基。

[0050] 本发明的另一个目的涉及一种产生重组蛋白的体外方法,所述体外方法包括以下步骤:

[0051] A)a1)提供如上定义的细胞系,所述细胞系进一步包含:

[0052] -含有编码外源性哺乳动物DHODH的核苷酸序列(i)和至少一个用于表达重组蛋白(I)的表达盒的表达载体,其中所述外源性DHODH包含与序列SEQ ID NO:2或序列SEQ ID NO:4至少60%相同的序列,以及

[0053] -含有编码外源性哺乳动物GS的核苷酸序列(ii)和至少一个用于表达重组蛋白(II)的表达盒的表达载体,其中所述外源性GS包含与序列SEQ ID NO:6或序列SEQ ID NO:8至少94.5%相同的序列,

[0054] 或

[0055] a2)提供如上定义的细胞系,以及

[0056] a2')将如上定义的表达载体引入步骤a2)中提供的细胞系中;

[0057] 或

[0058] a3)提供包含内源性DHODH基因和内源性GS基因的细胞系,

[0059] a3')使步骤a3)中提供的细胞系中的所述内源性DHODH基因和所述内源性GS基因部分或完全失活,以及

[0060] a3")将如上定义的表达载体引入步骤a3')中获得的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中;

[0061] 或

[0062] a4)提供包含内源性GS基因和部分或完全失活的内源性DHODH基因的细胞系,

[0063] a4')使步骤a4)中提供的细胞系中的所述内源性GS基因部分或完全失活,以及

[0064] a4")将如上定义的表达载体引入步骤a4')中获得的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中;

[0065] 或

[0066] a5)提供包含内源性DHODH基因和部分或完全失活的内源性GS基因的细胞,

[0067] a5')使步骤a5)中提供的细胞系中的所述内源性DHODH基因部分或完全失活,以及

[0068] a5")将如上定义的表达载体引入步骤a5')中获得的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中;

[0069] B)在适合于产生所述重组蛋白的条件下培养所述细胞系;以及

[0070] C)分离和/或纯化所述重组蛋白。

[0071] 在特定实施方案中,所述步骤B)在不含尿苷和谷氨酰胺、特别是也不含DHODH抑制剂和GS抑制剂的培养基中进行。

[0072] 在另一个特定实施方案中,所述方法进一步包括将所述重组蛋白配制成药物组合物的步骤D)。

[0073] 本发明进一步涉及如上定义的细胞系、如上定义的表达系统或如上定义的试剂盒用于产生重组蛋白的用途。

[0074] 在特定实施方案中,所述细胞系、所述表达系统或所述试剂盒与不含尿苷和谷氨酰胺、特别是在不存在DHODH抑制剂和GS抑制剂的情况下的培养基组合使用。

附图说明

[0075] 图1显示了2018年12月21日在Genebank NCBI上可获得的以Gene ID:100756632引

用的人DHODH基因的基因组结构。

[0076] 图2显示了使用人DHODH和人GS选择标记物和DHODH/GS KO(敲除)或野生型CHO细胞得到的第10天和第14天三特异性抗体产量。

具体实施方式

[0077] 二氢乳清酸脱氢酶

[0078] 如本文所用,术语“二氢乳清酸脱氢酶”或“DHODH”是指能够催化二氢乳清酸盐(4,5-二氢乳清酸或2,6-二氧代-1,3-二嗪农-4-甲酸)转化为乳清酸盐(乳清酸或1,2,3,6-四氢-2,6-二氧代-4-嘧啶甲酸)的多肽,如以下反应所示:

[0079] (S)-二氢乳清酸盐 $+O_2 \leftrightarrow$ 乳清酸盐 $+H_2O_2$

[0080] 这种多肽被分类为酶学委员会(EC)编号1.3.3.1。能够催化上述反应的多肽展现出“DHODH活性”。

[0081] 上述反应是合成DNA和RNA所需的单磷酸尿苷(rUMP)的从头合成的第四步。因此,DHODH的抑制或失活具有抑制DNA和RNA合成的作用,从而抑制细胞增殖。

[0082] 谷氨酰胺合成酶

[0083] 如本文所用,术语“谷氨酰胺合成酶”或“GS”是指能够催化谷氨酸盐和氨的缩合形成谷氨酰胺的多肽,如以下生物化学反应所示:

[0084] ATP + L-谷氨酸盐 $+NH_3 \leftrightarrow$ ADP + 磷酸盐 + L-谷氨酰胺

[0085] 这种多肽被分类为酶学委员会(EC)编号6.3.1.2。能够催化上述反应的多肽展现出“GS活性”。

[0086] 细胞系

[0087] 本发明涉及一种细胞系,所述细胞系包含部分或完全失活的内源性二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)基因和部分或完全失活的内源性谷氨酰胺合成酶(GS)基因。

[0088] 所述细胞系是真核细胞系,例如哺乳动物细胞系,如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系、猴细胞系或人细胞系。

[0089] 在特定实施方案中,所述细胞系是CHO细胞系。

[0090] CHO细胞系通常用于工业蛋白质生产,并且许多CHO细胞系是本领域技术人员已知的。例如,此类CHO细胞系包括公众可从美国典型培养物保藏中心获得的品系,如CHO-K1细胞系(ATCC编号:CCL-61)、CHO-S细胞系(例如由Invitrogen和Gibco销售)、CHO DP-12细胞系(ATCC编号CRL-12444和12445)和CHO 1-15细胞系(ATCC编号CRL-9606)。另一种适合于工业蛋白质生产的细胞系是CHO 9E4细胞系。所述9E4细胞系是通过单细胞克隆过程从CHO-K1细胞系的克隆建立的。实施例1中更深入地呈现了9E4细胞系的建立。所述CHO-K1细胞系由Puck于1957年获得,并且以编号CCL-61保藏在ATCC。

[0091] 人细胞(如HEK293(ATCC编号CRL-1573)、HKB11(ATCC编号CRL-12568)、PER-C6(Crucell)、HT1080(ATCC编号CRL-121)、Jurkat、Daudi、Raji和CAP(ATCC编号CRL-1098)细胞)也可以用于蛋白质生产,以获得重组人蛋白的天然糖基化模式。

[0092] 在一个实施方案中,所述细胞系能够在无血清培养基(例如化学成分确定的培养基)和/或悬浮液中生长。本领域技术人员可以通过使亲本细胞系在无血清培养基和/或悬浮液中适应(例如通过单细胞克隆、通过逐渐适应和/或通过“饥饿和保存”过程)来获得这

种细胞系。

[0093] 本发明的细胞系是这样一种细胞系,所述细胞系包含部分或完全失活的内源性二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)基因和部分或完全失活的内源性谷氨酰胺合成酶(GS)基因。

[0094] “内源性DHODH基因”在本文中意指在特定环境条件下在特定发育阶段正常存在于所述特定细胞中的DHODH基因。

[0095] “内源性DHODH基因”与下文定义的“外源性DHODH”的区别在于所述外源性DHODH由下文定义的表达载体提供,如果所述表达载体已被引入本发明的细胞系中,则所述表达载体可存在于所述本发明的细胞系中。

[0096] 正如技术人员所理解的,所述内源性DHODH基因将取决于所述细胞系。例如,在CHO细胞系中,所述内源性DHODH基因是中国仓鼠DHODH基因;在人细胞系中,所述内源性DHODH基因是人DHODH基因。

[0097] 通常,野生型中国仓鼠DHODH是指包含SEQ ID NO:2或由其组成的序列以及展现出DHODH活性的所述序列的变体。此类变体可以例如对应于仓鼠物种中天然存在的变体(如等位基因变体或剪接变体)。

[0098] 通常,野生型人DHODH是指包含SEQ ID NO:4或由其组成的序列以及展现出DHODH活性的所述序列的变体。此类变体可以例如对应于人物种中天然存在的变体(如等位基因变体或剪接变体)。

[0099] “内源性GS基因”在本文中意指在特定环境条件下在特定发育阶段正常存在于所述特定细胞中的GS基因。

[0100] “内源性GS基因”与下文定义的“外源性GS”的区别在于所述外源性GS由下文定义的表达载体提供,如果所述表达载体已被引入本发明的细胞系中,则所述表达载体可存在于本发明的细胞系中。

[0101] 正如技术人员所理解的,所述内源性GS基因将取决于所述细胞系。例如,在CHO细胞系中,所述内源性GS基因是中国仓鼠GS基因;在人细胞系中,所述内源性GS基因是人GS基因。

[0102] 通常,野生型中国仓鼠GS是指包含SEQ ID NO:9或由其组成的序列以及展现出GS活性的所述序列的变体。此类变体可以例如对应于仓鼠物种中天然存在的变体(如等位基因变体或剪接变体)。

[0103] 通常,野生型人GS是指包含SEQ ID NO:6或由其组成的序列以及展现出GS活性的所述序列的变体。此类变体可以例如对应于人物种中天然存在的变体(如等位基因变体或剪接变体)。

[0104] 如本文所用,“基因”包括编码基因产物的DNA区域以及调控基因产物产生的所有DNA区域,无论此类调控序列是否与编码序列相邻和/或与转录序列相邻。因此,基因包括启动子序列、终止子、翻译调节序列(如核糖体结合位点和内部核糖体进入位点)、增强子、沉默子、绝缘子、边界元件、复制起点、基质附着位点和基因座控制区域。

[0105] 基因“失活”是指与相应的野生型细胞相比基因表达的任何降低。基因失活可以是完全的(完全失活或敲除)或部分的(例如,其中基因展现出低于正常表达水平的亚等位基因,或显示出其影响的活性的部分降低的突变基因产物)。

[0106] 在特定实施方案中,所述内源性DHODH基因的一个或多个或所有等位基因部分或

完全失活。

[0107] 在特定实施方案中,所述内源性DHODH基因完全失活。

[0108] 在更特定的实施方案中,所述内源性DHODH基因的一个或多个或所有等位基因完全失活。

[0109] 在另一个特定实施方案中,所述内源性GS基因的一个或多个或所有等位基因部分或完全失活。

[0110] 在特定实施方案中,所述内源性GS基因完全失活。

[0111] 在更特定的实施方案中,所述内源性GS基因的一个或多个或所有等位基因完全失活。

[0112] 在仍特定的实施方案中,所述内源性DHODH基因的一个或多个或所有等位基因以及所述内源GS基因的所有等位基因完全失活。

[0113] 在特定实施方案中,使用CRISPR-Cas9方法使所述内源性DHODH基因和/或所述内源性GS基因失活,如描述于Aga等人(2015)BMC Proceedings 9(增刊9):P2。

[0114] 如技术人员所熟知,CRISPR-Cas9系统是原核适应性免疫应答系统,其使用非编码RNA来引导Cas9核酸酶诱导位点特异性DNA切割。通过细胞DNA修复机制经由非同源末端连接DNA修复途径(NHEJ)或同源定向修复(HDR)途径来修复这种DNA损伤。为了产生基因破坏,由对DNA靶标具有特异性的crRNA序列和与Cas9蛋白相互作用的tracrRNA序列组成的单一指导RNA(gRNA)与具有DNA核酸内切酶活性的重组形式的Cas9蛋白结合。所得复合物将导致靶标特异性双链DNA切割。切割位点将通过非同源末端连接(NHEJ)DNA修复途径修复,这是一个容易出错的过程,其可以导致插入/缺失(插入缺失)从而可以破坏基因功能。

[0115] 在特定实施方案中,DHODH基因的至少一个外显子被靶向失活,特别是通过基因编辑方法(如CRISPR-Cas9方法)靶向失活。在更特定的实施方案中,DHODH基因中编码DHODH蛋白的N末端部分的一部分被靶向失活,特别是通过基因编辑方法(如CRISPR-Cas9方法)靶向失活。在仍另一个实施方案中,DHODH基因的第二外显子被靶向失活,特别是通过基因编辑方法(如CRISPR-Cas9方法)靶向失活。

[0116] 在一个实施方案中,序列GGATGCAGCCATCATCCTTG(SEQ ID NO:10)的20个核苷酸的序列或与在不损害CHO存活的情况下敲除DHODH基因相容的任何序列用作用于产生gRNA的相应DNA片段,所述gRNA靶向DHODH基因的第二外显子。此gRNA通常使用序列GGATGCAGCCATCATCCTTGGTTTT(SEQ ID NO:11)和CAAGGATGATGG CTGCATCCCGGTG(SEQ ID NO:12)的寡核苷酸获得,所述寡核苷酸通常克隆在质粒的独特限制性位点,如pCM3561质粒(由Invitrogen商业化)的BaeI位点,使得克隆的DNA序列处于U6启动子的控制之下,并且在将所述质粒引入细胞中后被转录成含有与tr acrRNA融合的crRNA的单个转录单元,所述crRNA部分对于DHODH基因的第二外显子具有特异性并且所述tracrRNA部分被Cas9酶识别。

[0117] 在另一个特定实施方案中,GS基因的至少一个外显子被靶向失活,特别是通过基因编辑方法(如CRISPR-Cas9方法)靶向失活。在更特定的实施方案中,GS基因的外显子6被靶向失活,特别是通过基因编辑方法(如CRISPR-Cas9方法)靶向失活。在仍另一个实施方案中,GS基因的外显子6附近被靶向失活,特别是通过基因编辑方法(如CRISPR-Cas9方法)靶向失活。

[0118] 在一个实施方案中,序列GAGTATGTGAAGACTTTG(SEQ ID NO:29)的18个核苷酸的序

列或与在不损害CHO存活的情况下敲除GS基因相容的任何序列用作用于产生gRNA的相应DNA片段，所述gRNA靶向GS基因的外显子6。在另一个实施方案中，序列CCATCTTTATTCTCATGGGG(SEQ ID NO:30)的核苷酸序列或与在不损害CHO存活的情况下敲除GS基因相容的任何序列用作用于产生gRNA的相应DNA片段，所述gRNA靶向GS基因的外显子6。

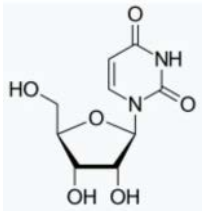
[0119] 为了鉴定对于DHODH基因和GS基因失活的细胞系，通常通过在孔板中有限稀释来分离单个细胞，并且在达到适当的汇合度(例如90％汇合度)后，将细胞分装到至少2种条件中，如一种在补充有尿苷和谷氨酰胺的培养基中并且另一种在不含尿苷和尿苷的培养基中。目的克隆通常是对缺乏尿苷和谷氨酰胺敏感的克隆。

[0120] 分离后，这些目的细胞可以在包含嘧啶碱基的培养基、特别是包含尿苷并且进一步包含谷氨酰胺的培养基中培养。

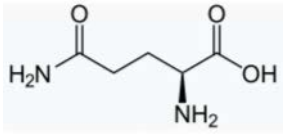
[0121] “嘧啶碱基”在本文中意指嘧啶本身和具有嘧啶核作为骨架的各种嘧啶衍生物。此类嘧啶碱基的例子包括尿嘧啶核酸相关物质，如尿嘧啶、尿苷、磷酸尿苷(特别是单磷酸尿苷(UMP)、二磷酸尿苷(UDP)和三磷酸尿苷(UTP))、脱氧尿苷、磷酸脱氧尿苷(特别是单磷酸脱氧尿苷(dUMP)、二磷酸脱氧尿苷(dUDP)和三磷酸脱氧尿苷(dUTP))；胞嘧啶核酸相关物质，如胞嘧啶、胞苷、磷酸胞苷(特别是单磷酸胞苷(CMP)、二磷酸胞苷(CDP)、三磷酸胞苷(CTP))、脱氧胞苷、2’-脱氧胞苷、磷酸脱氧胞苷(特别是单磷酸脱氧胞苷(dCMP)、二磷酸脱氧胞苷(dCDP)和三磷酸脱氧胞苷(dCTP))；胸腺嘧啶、胸苷、磷酸胸苷(特别是单磷酸胸苷(TMP)、二磷酸胸苷(TDP)和三磷酸胸苷(TTP))、脱氧胸苷、磷酸脱氧胸苷(特别是单磷酸脱氧胸苷(dTMP)、二磷酸脱氧胸苷(dTDP)和三磷酸脱氧胸苷(dTTP))。

[0122] 在特定实施方案中，所述嘧啶碱基是尿苷。

[0123] “尿苷”在本文中意指下式的核苷

[0124] 

[0125] “谷氨酰胺”在本文中是指下式的氨基酸

[0126] 

[0127] “不含尿苷的培养基”意指适合于特定细胞系生长的任何基础培养基，其中所述培养基包含小于1mM的尿苷，特别地所述培养基不包含任何尿苷。

[0128] “不含谷氨酰胺的培养基”意指适合于特定细胞系生长的任何基础培养基，其中所述培养基包含小于1mM的谷氨酰胺，特别地所述培养基不包含任何谷氨酰胺。

[0129] “不含尿苷和谷氨酰胺的培养基”在本文中意指适合于特定细胞系生长的任何基础培养基，其中所述培养基包含小于1mM的尿苷和小于1mM的谷氨酰胺，特别地所述培养基既不包含任何尿苷也不含任何谷氨酰胺。

[0130] “包含尿苷的培养基”意指适合于特定细胞系生长的任何基础培养基，其中所述培

养基进一步包含1mM至25mM尿苷,特别是5mM至10mM尿苷。

[0131] “包含谷氨酰胺的培养基”意指适合于特定细胞系生长的任何基础培养基,其中所述培养基进一步包含1mM至25mM谷氨酰胺,特别是4mM至6mM谷氨酰胺。

[0132] “包含尿苷和谷氨酰胺的培养基”意指适合于特定细胞系生长的任何基础培养基,其中所述培养基进一步包含1mM至25mM尿苷,特别是5mM至10mM尿苷以及1mM至25mM谷氨酰胺,特别是4mM至6mM谷氨酰胺。

[0133] “基础培养基”在本文中意指适合于暴露于细胞,例如暴露于CHO细胞的未补充培养基。本领域技术人员将理解,要使用的基础培养基将取决于所使用的细胞类型。基础培养基的例子包括CDCHO培养基、OPTiCHO™培养基、Fecto CHO™培养基、FortiCHO™培养基、ExpiCHO™培养基、Ex-Cell™培养基、ActiPRO™培养基、MAM PF77™培养基和PowerCHO™培养基。

[0134] 因此,在特定实施方案中,本发明的细胞系通过以下方式产生:

[0135] (a1)使包含内源性DHODH基因和内源性GS基因的细胞中的所述内源性DHODH基因失活,

[0136] (b1)在适合于产生其中所述内源性DHODH基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含尿苷的培养基中培养所述细胞,

[0137] (c1)回收所述细胞,在所述细胞中所述内源性DHODH基因部分或完全失活,

[0138] (d1)使所述细胞中的内源性GS基因失活,以及

[0139] (e1)在适合于产生其中所述内源性GS基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含谷氨酰胺的培养基中培养所述细胞。

[0140] 在替代性实施方案中,本发明的细胞系通过以下方式产生:

[0141] (a2)提供包含内源性GS基因和部分或完全失活的内源性DHODH基因的细胞,

[0142] (b2)使所述细胞中的内源性GS基因失活,以及

[0143] (c2)在适合于产生其中所述内源性GS基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含谷氨酰胺的培养基中培养所述细胞。

[0144] 在仍替代性实施方案中,本发明的细胞系通过以下方式产生:

[0145] (a3)提供包含内源性DHODH基因和部分或完全失活的内源性GS基因的细胞,

[0146] (b3)使所述细胞中的内源性DHODH基因失活,以及

[0147] (c3)在适合于产生其中所述内源性DHODH基因部分或完全失活的细胞系的条件下,在包含尿苷的培养基中培养所述细胞。

[0148] 包含通过CRISPR-Cas9方法完全或部分失活的内源性DHODH基因的CHO细胞系的产生在实施例2中得到更深入的例证。

[0149] 包含通过CRISPR-Cas9方法完全或部分失活的内源性DHODH基因并且进一步包含完全或部分失活的内源性GS基因的CHO细胞系的产生在实施例3中得到例证。

[0150] 包含完全或部分失活的内源性DHODH基因和完全或部分失活的内源性GS基因的细胞系(如CHO细胞系)的产生可以通过本领域已知的多种其他分子生物学技术产生。例如,可用于产生具有完全或部分失活的内源性DHODH基因和完全或部分失活的内源性GS基因的细胞系的其他基因编辑技术包括使用锌指核酸酶(ZFN)或转录因子样效应物核酸酶(TALEN)。Cre/Lox方法也可用于敲除DHODH基因和GS基因的一个或多个或所有等位基因。

[0151] 在特定实施方案中,本发明的细胞系进一步包含如下文“表达载体”章节中所定义的表达载体。

[0152] 所述表达载体可以通过技术人员熟知的任何合适的技术(如通过转染、特别是通过电穿孔或化学转染或转导)引入细胞系中。

[0153] 外源性DHODH和外源性GS

[0154] 由本发明中使用的表达载体中的一种编码的DHODH(还称为“外源性DHODH”)可以包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少60%、62%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%相同的序列或由其组成。其还可以包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的至少100、150、200、250、300或350个连续氨基酸的片段或由其组成,前提是所述蛋白质保留DHODH活性。

[0155] 在一些实施方案中,根据本发明的外源性DHODH包含与SEQ ID NO:2的序列和SEQ ID NO:4的序列两者至少60%、62%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%相同的序列或由其组成。

[0156] 在一些实施方案中,根据本发明的外源性DHODH是人DHODH,即人起源的DHODH。

[0157] 如本文所用,术语“人DHODH”是指包含SEQ ID NO:4或由其组成的序列的蛋白质以及展现出DHODH活性的所述蛋白质的变体。此类变体可以例如对应于人物种中天然存在的变体(如等位基因变体或剪接变体)。可替代地,此类变体可以对应于通过基因工程化获得的变体。在一个实施方案中,此类变体与SEQ ID NO:4的序列的不同之处仅在于与SEQ ID NO:4相比,存在至多150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异(所述变异包括取代、插入和缺失)。

[0158] 在特定实施方案中,所述人DHODH是与野生型序列相比包含G202A突变的变体,通常是包含氨基酸序列SEQ ID NO:28或由其组成的蛋白质。

[0159] 在一些实施方案中,所述外源性DHODH是仓鼠DHODH,即仓鼠起源的DHODH。所述仓鼠DHODH可以是例如中国仓鼠(灰仓鼠(Cetulus griseus))DHODH。

[0160] 如本文所用,术语“中国仓鼠DHODH”是指包含SEQ ID NO:2或由其组成的序列以及展现出DHODH活性的所述序列的变体。此类变体可以例如对应于仓鼠物种中天然存在的变体(如等位基因变体或剪接变体)。可替代地,此类变体可以对应于通过基因工程化获得的变体。在一个实施方案中,此类变体与SEQ ID NO:2的序列的不同之处仅在于与SEQ ID NO:2相比,存在至多150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异(所述变异包括取代、插入和缺失)。

[0161] 在另一个实施方案中,所述变体DHODH将具有DHODH活性,任选地具有与野生型蛋白质相同的活性水平,或野生型蛋白质的50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%或更高的活性水平。

[0162] 由本发明中使用的其他表达载体编码的GS(进一步称为“外源性GS”)可以包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8中的至少一个至少94.5%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、

97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%相同的序列或由其组成。其还可以包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的至少100、150、200、250、300或350个连续氨基酸的片段或由其组成，前提是所述蛋白质保留其GS活性。

[0163] 在具体实施方案中，根据本发明的外源性GS包含与SEQ ID NO:6的序列和SEQ ID NO:8的序列两者至少94.5%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%相同的序列或由其组成。

[0164] 在具体实施方案中，根据本发明的外源性GS包含与SEQ ID NO:6的序列至少97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%相同的序列或由其组成。如国际申请WO2013/186371中所示，这种GS在CHO细胞中、特别是在E94CHO细胞系中用作可选择标记物是特别有利的。

[0165] 在具体实施方案中，根据本发明的外源性GS是人GS，即人起源的GS。如本文所用，术语“人GS”是指具有包含SEQ ID NO:6或由其组成的序列以及展现出GS活性的所述序列的变体。此类变体可以例如对应于人物种中天然存在的变体(如等位基因变体或剪接变体)。可替代地，此类变体可以对应于通过基因工程化获得的变体。最优选地，此类变体与SEQ ID NO:6的序列的不同之处仅在于与SEQ ID NO:6相比，存在至多22、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异(所述变异包括取代、插入和缺失)。

[0166] 在另一个具体实施方案中，根据本发明的外源性GS是狗GS，即狗来源的GS。如本文所用，术语“狗GS”是指包含SEQ ID NO:8或由其组成的序列，以及展现出GS活性的所述序列的变体。此类变体可以例如对应于狗物种中天然存在的变体(如等位基因变体或剪接变体)。可替代地，此类变体可以对应于通过基因工程化获得的变体。最优选地，此类变体与SEQ ID NO:8的序列的不同之处仅在于与SEQ ID NO:8相比，存在至多22、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异(所述变异包括取代、插入和缺失)。

[0167] 在具体实施方案中，根据本发明的外源性GS包含至少1、2、3、4、5、6、10、15、16、20或22个以下氨基酸：12G、16V、18M、19S、331、49S、80V、82A、91K、116T、191A、269Y、282Q、350S、355L、356I、2T、68L、98L、107R、169R和2138，其中所述数字指示在SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8上的位置，并且字母指示氨基酸的性质(使用一个字母的遗传密码)。在更具体的实施方案中，根据本发明的外源性GS包含至少1、2、3、4、5或6个以下氨基酸：2T、68L、98L、107R、169R和2138。在另一个更具体的实施方案中，根据本发明的外源性GS包含至少1、2、3、4、5、6、10、15或16个以下氨基酸：12G、16V、18M、19S、331、49S、80V、82A、91K、116T、191A、269Y、282Q、350S、355L和356I。与CHO GS相比，上述氨基酸显现出对人和/或狗GS具有特异性。

[0168] 具有与本发明的查询氨基酸序列至少例如95%“相同”的氨基酸序列的多肽意指主题多肽的氨基酸序列与查询序列相同，但主题多肽序列可以包含查询氨基酸序列的每100个氨基酸中最多五个氨基酸改变。换言之，为了获得具有与查询氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列的多肽，可以主题序列中最多5%(100个中的5个)氨基酸残基可以是插入、缺失的或用另一个氨基酸取代。

[0169] 可以在变体序列的全长、参考序列的全长或两者上确定序列同一性。例如，可以使用全局比对计算同一性百分比(即在整个长度上比较这两个序列)。用于比较两个或更多个序列的同一性和同源性的方法是本领域熟知的。当进行全局比对时，可以使用例如

“needle”程序,当考虑两个序列的整个长度时,所述程序使用Needleman-Wunsch全局比对算法(Needleman和Wunsch(1970)J.Mol.Biol.48:443-453)来找到所述两个序列的最佳比对(包括空位)。此needle程序例如可以在ebi.ac.uk万维网站上获得。根据本发明的同一性百分比优选地使用EMBOSS::needle(全局)程序计算,其中采用“Gap Open”参数等于10.0、“Gap Extend”参数等于0.5以及Blosum62矩阵。

[0170] 与参考序列相比,参考序列的变体可以包含突变如缺失、插入和/或取代。在取代的情况下所述取代优选地对应于如下表中所示的保守取代。

[0171]

保守取代	氨基酸类型
Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Phe、Trp	具有脂肪族疏水性侧链的氨基酸
Ser、Tyr、Asn、Gln、Cys	具有不带电荷但极性侧链的氨基酸
Asp、Glu	具有酸性侧链的氨基酸
Lys、Arg、His	具有碱性侧链的氨基酸
Gly	中性侧链

[0172] 表达载体

[0173] 本发明的上下文中使用的表达载体适合于产生重组蛋白,并且包含编码二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)的序列或编码谷氨酰胺合成酶(GS)的序列。

[0174] 所述表达载体优选地是DNA载体。

[0175] 本发明的上下文中使用的表达载体中的一种包含编码如上文“外源性DHODH和外源性GS”章节中所定义的编码外源性DHODH的序列(i)。

[0176] 在具体实施方案中,所述表达载体将被引入其中的细胞系是CHO细胞系,并且所述外源性DHODH是异种起源的(即外源性DHODH不是仓鼠DHODH)。

[0177] 编码这种外源性DHODH的序列可以是天然存在的核苷酸序列。可替代地,编码这种DHODH的序列的三联密码子对于在CHO细胞中表达可以是偏倚的。用于偏倚序列以获得最佳表达的软件和算法是本领域已知的并且包括例如描述于Raab等人(2010)Syst Synth Biol.4:215-225中的算法。此算法不仅提供了对于表达的最佳可用密码子,而且还考虑了GC含量和不需要的DNA基序的不存在。

[0178] 例如,编码外源性DHODH的序列可以包含与SEQ ID NO:3的序列(即编码SEQ ID NO:4的人DHODH的序列,其已被设计用于在CHO细胞中最佳表达)和/或SEQ ID NO:1的序列(即编码SEQ ID NO:2的仓鼠DHODH的序列,其已被设计用于在CHO细胞中最佳表达)至少60%、62%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列或由其组成。

[0179] 在一个实施方案中,编码外源性DHODH的序列包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的序列或由所述序列组成。

[0180] 本发明的上下文中使用的其他表达载体包含编码如上文“外源性DHODH和外源性GS”章节中所定义的编码外源性GS的序列(ii)。

[0181] 在具体实施方案中,所述表达载体将被引入其中的细胞系是CHO细胞系,并且外源性GS是异种起源的(即所述外源性GS不是仓鼠GS)。

[0182] 编码这种外源性GS的序列可以是天然存在的核苷酸序列。可替代地,编码这种GS的序列的三联密码子对于在CHO细胞中表达可以是偏倚的。用于偏倚序列以获得最佳表达

的软件和算法是本领域已知的并且包括例如描述于Raab等人(2010)Syst Synth Biol.4:215-225中的算法。此算法不仅提供了对于表达的最佳可用密码子,而且还考虑了GC含量和不需要的DNA基序的不存在。

[0183] 例如,编码外源性GS的序列可以包含与SEQ ID NO:5的序列(即编码SEQ ID NO:6的人GS的序列,其已被设计用于在CHO细胞中最佳表达)和/或SEQ ID NO:7的序列(即编码SEQ ID NO:8的狗GS的序列,其已被设计用于在CHO细胞中最佳表达)至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列或由其组成。

[0184] 在一个实施方案中,编码所述GS的序列包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的序列或由其组成。

[0185] 在本发明的上下文中使用的表达载体中,编码上文定义的外源性DHODH的序列和/或编码上文定义的外源性GS的序列可以被置于本领域技术人员已知的任何启动子的控制之下。

[0186] 例如,编码上文定义的外源性DHODH的序列和/或编码上文定义的外源性GS的序列可以例如被置于适合于分别驱动DHODH和GS表达的启动子的控制之下,所述启动子例如猿猴空泡形成病毒40(SV40)启动子(例如SV40的晚期或早期启动子)、CMV启动子、延伸因子1启动子、GAPDH启动子、RPL37启动子、肌动蛋白启动子。例如,早期SV40启动子描述于Benoist和Chambon(1981)Nature 290:304-310以及Moreau等人(1981)Nucleic Acids Res.9:6047-6068中。特别地,所述SV40启动子是全长启动子。所述SV40启动子还可以具有含有72bp重复序列的复制起点。

[0187] 在一些实施方案中,所述SV40启动子不是其中位置128至270已被去除的SV40启动子,即所述SV40启动子不是韩国专利号10-0267720中描述的SV40启动子,而是转化1997年12月17日以保藏号KCTC 8860P保藏于KIST生物工程研究所的基因库(Gene Bank,Institute of Bioengineering)的大肠杆菌(E.coli)转化体。

[0188] 在其他实施方案中,编码上文定义的外源性DHODH的序列和/或编码上文定义的外源性GS的序列不被置于SV40启动子的控制之下。

[0189] 适合于产生重组蛋白的表达载体是本领域技术人员已知的。此类载体通常对应于包含复制起点和至少一个表达盒的表达载体,所述表达盒允许克隆和表达需要产生的重组蛋白。表达盒通常包含5'非翻译区(包含启动子和任选的增强子序列或由其组成)、一个或多个允许克隆编码所述重组蛋白的序列的限制性位点、3'非翻译区(例如聚A信号)以及任选的一个或多个内含子。所述启动子序列可以对应于本领域熟知的任何强启动子,例如像人CMV启动子。任选地,本发明的上下文中使用的表达载体包含原核复制起点(例如原核复制子,如大肠杆菌中的ColE1)和至少一个原核生物选择性标记基因(也称为原核可选择标记物),使得允许载体在原核细胞中复制。复制所述载体的细胞也表达原核生物选择性标记基因,因此可以被鉴定和选择。原核生物选择性标记基因是本领域技术人员熟知的。原核生物选择性标记基因的例子是例如编码赋予抗生素抗性的蛋白质的核酸序列(例如,编码赋予氨苄青霉素、氯霉素、杀稻瘟素或卡那霉素抗性的蛋白质的序列)。

[0190] 可以由本发明的表达载体表达的重组蛋白(I)和(II)可以对应于本领域技术人员感兴趣的任何蛋白。

[0191] 如本文所用,术语“蛋白质”意在包括肽(即少于50个氨基酸的氨基酸链)、多肽(即至少50个氨基酸的氨基酸链)、单体蛋白质(即由一个氨基酸链组成的蛋白质)和多聚体蛋白质(即由两个或更多个氨基酸链组成的蛋白质,例如像单克隆抗体)。

[0192] 本发明的上下文中使用的表达载体通常包含一定数量的表达盒,所述数量与构成所述蛋白质的不同氨基酸链的数量相同(例如,在单体蛋白质或同二聚体蛋白质的情况下为一个表达盒,在异二聚体蛋白质或单克隆抗体的情况为两个表达盒,等等)。

[0193] 可替代地,本发明的上下文中使用的表达载体可以仅包含一个表达盒,即使当需要产生异二聚体蛋白质或单克隆抗体时。在这种情况下,编码蛋白质的一种或多种其他氨基酸链的一种或多种序列存在于本发明的其他表达载体上。

[0194] 在特定实施方案中,重组蛋白(I)和(II)是单克隆抗体的不同臂。

[0195] 因此,在一些实施方案中,在本发明的上下文中使用的表达载体中的一种包含:

[0196] -被置于早期SV40启动子的控制之下的编码如上定义的外源性DHODH的序列;

[0197] -第一表达盒,其中编码所述抗体的第一臂的轻链的序列被置于CMV启动子的控制之下;

[0198] -第二表达盒,其中编码所述抗体的所述第一臂的重链的序列被置于CMV启动子的控制之下;

[0199] -原核复制起点;以及

[0200] -被置于其天然启动子的控制之下的用于原核细胞中的可选择标记物,即编码赋予氨苄青霉素抗性的蛋白质的序列。

[0201] 在该实施方案中,在本发明的上下文中使用的其他表达载体包含:

[0202] -被置于早期SV40启动子的控制之下的编码如上定义的外源性GS的序列;

[0203] -第一表达盒,其中编码所述抗体的第二臂的轻链的序列被置于CMV启动子的控制之下;

[0204] -第二表达盒,其中编码所述抗体的所述第二臂的重链的序列被置于CMV启动子的控制之下;

[0205] -原核复制起点;以及

[0206] -被置于其天然启动子的控制之下的用于原核细胞中的可选择标记物,即编码赋予氨苄青霉素抗性的蛋白质的序列。

[0207] 贯穿整个说明书,术语“重组蛋白”是指任何需要产生的重组蛋白。其可以例如对应于治疗性和/或预防性蛋白质,即旨在用作药剂(包括疫苗)的蛋白质。在具体实施方案中,所述需要产生的重组蛋白既不是DHODH也不是GS。在另一个具体的实施方案中,所述需要产生的重组蛋白是抗体,例如单克隆抗体。在仍另一个具体的实施方案中,所述需要产生的重组蛋白是抗原性蛋白质。

[0208] 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用,并且具体涵盖任何同种型(如lgG、lgM、lgA、lgD和lgE)的单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(包括双特异性和三特异性抗体)、抗体片段(例如像Fv、scFv、ds、Fab、Fab’或$F(ab')_2$片段)、单结构域抗体及其片段以及包含抗体片段的融合蛋白。与特异性抗原反应的抗体可以通过重组方法(如选择噬菌体或类似载体中的重组抗体的文库)或者通过用抗原或抗原编码核酸免疫动物产生。

[0209] 如本文所用,“单克隆抗体”是从基本上均质的抗体的群体获得的抗体,所述基本上均质的抗体的群体即形成该群体的抗体基本上相同,但可能以少量存在可能天然存在的突变。这些抗体针对单个表位(或在多特异性单克隆抗体的情况下是一组表位),因此具有高度特异性。

[0210] 典型的单克隆抗体由通过二硫键连接的两个相同的重链和两个相同的轻链组成。每条重链和轻链都含有恒定区和可变区。每个可变区含有称为“互补决定区”(“CDR”)或“高变区”的三个片段,其主要负责结合抗原的表位。它们通常被称为CDR1、CDR2和CDR3,从N末端依次编号(参见Kabat等人,Sequences of Proteins ofImmunological Interest,第5版,National Institute of Health,Bethesda,MD,1991)。可变区的更高度保守的部分称为“框架区”。

[0211] 所述单克隆抗体可以是例如鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

[0212] 单克隆抗体可以是双特异性或三特异性抗体。

[0213] 当所述需要产生的重组蛋白是单克隆抗体时,根据本发明的表达载体可以包含适合于克隆抗体轻链的第一表达盒和适合于克隆所述抗体重链的第二表达盒。

[0214] 在具体实施方案中,所述第一和第二表达盒各自包含巨细胞病毒(CMV)启动子,例如来自人或鼠CMV的CMV启动子。更具体地,所述第一和第二表达式盒可以包含:

[0215] -CMV立即早期增强子启动子(例如具有描述于Teschendorf等人(2002)Anticancer Res.22:3325-3330中的序列的一种);或

[0216] -来自小鼠CMV的IE2启动子/增强子(例如具有描述于Chatellard等人(2007)Biotechnol Bioeng.96:106-117中的序列的一种);或

[0217] -hCMV-MIE调节元件(例如具有WO 89/01036中描述的序列的一种)。

[0218] 术语“抗原性蛋白质”在本文中以最广泛的含义使用,并且覆盖单独的或与佐剂组合的任何能够产生免疫应答的蛋白质。其可以旨在用于预防性疫苗或治疗性疫苗中。在具体实施方案中,所述抗原性蛋白质是疫苗蛋白,即旨在用于预防性疫苗中的蛋白质。

[0219] 所述表达载体可以包含编码目的重组蛋白的至少一个序列(例如,编码单体蛋白质的一个序列、编码抗体链的一个序列或分别编码抗体轻链和抗体重链的两个序列),或者其可以是空的(即不含编码目的重组蛋白的这种序列)。

[0220] 表达系统、试剂盒、方法和用途

[0221] 本发明提供了一种表达系统,所述表达系统包含:

[0222] (A)如上文的“细胞系”章节中所定义的细胞系,其包含如上文的“细胞系”章节中所定义的部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的内源性GS基因,

[0223] (B)如上文的“表达载体”章节中所定义的表达载体,其包含编码哺乳动物DHODH的核苷酸序列(i)和至少一个用于表达重组蛋白(I)的表达盒,其中所述DHODH包含与序列SEQ ID NO:2或序列SEQ ID NO:4至少60%相同的序列,以及

[0224] (C)如上文的“表达载体”章节中所定义的表达载体,其包含编码哺乳动物GS的核苷酸序列(ii)和至少一个用于表达重组蛋白(II)的表达盒,其中所述GS包含与序列SEQ ID NO:6或序列SEQ ID NO:8至少94.5%相同的序列。

[0225] 本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含(i)含有如上文的“表达载体”章节中所定义的表达载体的根据本发明的细胞系或根据本发明的表达系统,以及(ii)如上所定义

的不含尿苷和谷氨酰胺的培养基。

[0226] 所述试剂盒可以包含如上所述的编码外源性DHODH的表达载体和/或编码外源性GS的表达载体(在所述表达系统中)。在这种试剂盒中,所述载体优选地是空的,因为这允许克隆本领域技术人员感兴趣的蛋白质。另外,所述表达载体优选地与这种试剂盒中的细胞系分离。

[0227] 所述试剂盒进一步包含如上文的“细胞系”章节中所定义的不含尿苷和谷氨酰胺的培养基。

[0228] 所述试剂盒可以进一步包含适合于培育所述细胞系的培养基、适合于将所述载体转染至所述细胞系中的培养基、包装材料和/或用于使用所述表达系统的说明书。

[0229] 在特定实施方案中,所述试剂盒不含DHODH抑制剂和/或GS抑制剂。

[0230] DHODH抑制剂的例子包括二辛可宁酸、布喹那(6-氟-2-(2'-氟-1,1'-联苯-4-基)-3-甲基-4-喹啉甲酸)、萘醌衍生物(如二氯烯丙基散沫花素)、异噁唑衍生物(如来氟米特(5-甲基-N-[4-(三氟甲基)苯基]-异噁唑-4-甲酰胺)及其活性代谢物特立氟胺((2Z)-2-氰基-3-羟基-N-[4-(三氟甲基)苯基]丁-2-酰胺))、喹诺酮甲酸、萘醌、异噁唑、苯氧基喹啉、redoxal和衍生物、散沫花素、拉帕醇(Iapachol)、阿托伐醌和(8-氯-4-(2-氯-4-氟-苯氧基)喹啉)。DHODH的抑制剂可能能够使DHODH活性抑制至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。

[0231] 在特定实施方案中,所述试剂盒不含特立氟胺。

[0232] GS抑制剂的例子包括甲硫氨酸亚砜亚胺、甲硫氨酸砜、草丁膦、烟草野火病菌氨酸-β-内酰胺、α-甲基甲硫氨酸亚砜亚胺、α-乙基甲硫氨酸亚砜亚胺、乙硫氨酸亚砜亚胺、α-甲基乙硫氨酸亚砜亚胺、丙硫氨酸亚砜亚胺、α-甲基丙硫氨酸亚砜亚胺、γ-羟基草丁膦、γ-乙酰氧基草丁膦、α-甲基草丁膦、α-乙基草丁膦、环己烷草丁膦、环戊烷草丁膦、四氢呋喃草丁膦、s-膦酰基甲基同型半胱氨酸、s-膦酰基甲基同型半胱氨酸亚砜、s-膦酰基甲基同型半胱氨酸砜、4-(膦酰基乙酰基)-L-α-氨基丁酸酯、苏式-4-羟基-D-谷氨酸、苏式-4-氟-D,L-谷氨酸、赤式-4-氟-D,L-谷氨酸、2-氨基-4-[(膦酰基甲基)羟基氧膦基]丁酸、丙氨酸、2-氨基-4-膦酰基丁酸、2-氨基-2-甲基-4-膦酰基丁酸、4-氨基-4-膦酰基丁酸、4-氨基-4-(羟基甲基氧膦基)丁酸、4-氨基-4-甲基-4-膦酰基丁酸、4-氨基-4-(羟基甲基氧膦基)-4-甲基丁酸、4-氨基-4-膦酰基丁酰胺、2-氨基-4-膦酰基丁酸、2-甲氧基羰基-4-膦酰基丁酸、4-氨基-4-膦酰基丁酸甲酯、氧烷菌素(oxetin)、IF7和IF17多肽、(3-氨基3-羧基丙基)-(膦酰基甲基)次膦酸、N-羟基-L-2,4-二氨基丁酸酯、3-氨基-3-羧基丙烷-磺酰胺和5-羟基赖氨酸。GS的抑制剂可能能够使GS活性抑制至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。

[0233] 在特定实施方案中,所述试剂盒不含甲硫氨酸亚砜亚胺。

[0234] 本发明进一步提供了包含如上文的“表达载体”章节中定义的表达载体的根据本发明的细胞系、根据本发明的表达系统或根据本发明的试剂盒用于体外产生重组蛋白的用途。

[0235] 在特定实施方案中,所述细胞系、表达系统或试剂盒与如上定义的不含尿苷和谷氨酰胺、更特别地是在不存在DHODH抑制剂和/或GS抑制剂的情况下的培养基组合使用。

[0236] 本发明进一步提供了根据本发明的表达系统、包含如上文的“表达载体”章节中所

定义的表达载体的根据本发明的细胞系或根据本发明的试剂盒用于特别是在不存在DHODH抑制剂和/或GS抑制剂的情况下分离在体外产生高水平的重组蛋白的克隆细胞(“高生产克隆”)的用途。

[0237] 在本发明的上下文中,术语“高水平的重组蛋白”旨在意指在培养基中重组蛋白的浓度为至少0.05g/l、优选至少0.1g/l、仍优选至少0.2g/l、更优选在0.3g/l与1g/l之间。重组蛋白的浓度可以通过本领域技术人员熟知的方法确定,特别包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、卡尺技术(caliper technology)和对应于所述重组蛋白的纯化蛋白的浓度范围。

[0238] 本发明还提供了一种产生重组蛋白的体外方法,所述体外方法包括以下步骤:

[0239] A)a1)提供包含如上文的“表达载体”章节中所定义的表达载体的根据本发明的细胞系;

[0240] 或

[0241] a2)提供根据本发明的细胞系,以及

[0242] a2')将如上文的“表达载体”章节中所定义的表达载体引入步骤a2)中提供的细胞系中;

[0243] 或

[0244] a3)提供包含内源性DHODH基因和内源性GS基因的细胞系,

[0245] a3')使步骤a3)中提供的细胞系中的所述内源性DHODH基因和所述内源性GS基因部分或完全失活,以及

[0246] a3")将如上文“表达载体”章节中所定义的表达载体引入步骤a3')中获得的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中;

[0247] 或

[0248] a4)提供包含内源性GS基因和部分或完全失活的内源性DHODH基因的细胞,

[0249] a4')使步骤a4)中提供的细胞系中的所述内源性GS基因部分或完全失活,以及

[0250] a4")将如上文“表达载体”章节中所定义的表达载体引入步骤a4')中获得的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中;

[0251] 或

[0252] a5)提供包含内源性DHODH基因和部分或完全失活的内源性GS基因的细胞,

[0253] a5')使步骤a5)中提供的细胞系中的所述内源性DHODH基因部分或完全失活,以及

[0254] a5")将如上文“表达载体”章节中所定义的表达载体引入步骤a5')中获得的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中;

[0255] B)在适合于产生所述重组蛋白的条件下培养所述细胞系;以及

[0256] C)分离和/或纯化所述重组蛋白。

[0257] 在特定实施方案中,上述方法的步骤B)在不含尿苷和谷氨酰胺、更特别地也不含DHODH抑制剂和/或GS抑制剂的培养基中进行,并且特别包括以下子步骤:选择尽管不存在尿苷和谷氨酰胺、特别是在不存在DHODH抑制剂和/或GS抑制剂的情况下但仍生长的转染的细胞。

[0258] 本发明还提供了一种分离产生高水平的重组蛋白的克隆细胞的体外方法,所述方法包括以下步骤或由以下步骤组成:

[0259] A)a1)提供包含如上文的“表达载体”章节中所定义的表达载体的根据本发明的细胞系;

[0260] 或

[0261] a2)提供根据本发明的细胞系,以及

[0262] a2')将如上文的“表达载体”章节中所定义的表达载体引入步骤a2)中提供的细胞系中;

[0263] 或

[0264] a3)提供包含内源性DHODH基因和内源性GS基因的细胞系,

[0265] a3')使步骤a3)中提供的细胞系中的所述内源性DHODH基因和所述内源性GS基因部分或完全失活,以及

[0266] a3")将如上文“表达载体”章节中所定义的表达载体引入步骤a3')中获得的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中;

[0267] 或

[0268] a4)提供包含内源性GS基因和部分或完全失活的内源性DHODH基因的细胞,

[0269] a4')使步骤a4)中提供的细胞系中的所述内源性GS基因部分或完全失活,以及

[0270] a4")将如上文“表达载体”章节中所定义的表达载体引入步骤a4')中获得的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中;

[0271] 或

[0272] a5)提供包含内源性DHODH基因和部分或完全失活的内源性GS基因的细胞,

[0273] a5')使步骤a5)中提供的细胞系中的所述内源性DHODH基因部分或完全失活,以及

[0274] a5")将如上文“表达载体”章节中所定义的表达载体引入步骤a5')中获得的包含部分或完全失活的内源性DHODH基因和部分或完全失活的GS基因的细胞系中;

[0275] B)在适合于产生所述重组蛋白的条件下培养所述细胞系;以及

[0276] C)分离产生高水平的重组蛋白的克隆。

[0277] 在特定实施方案中,上述方法的步骤B)在不含尿苷和谷氨酰胺、更特别地也不含DHODH抑制剂和/或GS抑制剂的培养基中进行,并且特别包括以下子步骤:选择尽管不存在尿苷和谷氨酰胺、特别是在不存在DHODH抑制剂和/或GS抑制剂的情况下但仍生长的转染的细胞。

[0278] 在步骤a2')、a3")、a4")或a5")中,所述表达载体可以通过技术人员熟知的任何技术(如通过转染、特别是通过电穿孔或化学转染或转导)引入所述细胞系中。

[0279] 适合于产生重组蛋白的条件是本领域技术人员熟知的。例如可以使用实施例中描述的方案。

[0280] 在具体实施方案中,步骤B)中使用的培养基包含渐减浓度的尿苷和渐减浓度的谷氨酰胺。这允许选择其中已经扩增了载体来源的外源性DHODH基因和载体来源的外源性GS基因(以及因此编码所述重组蛋白的序列)的克隆。

[0281] 上述方法可以进一步包括将所述重组蛋白配制成药物组合物的步骤。

[0282] 贯穿整个说明书,术语如“包含”(“comprises”、“comprised”和“comprising”)具有在大多数专利管辖范围、优选在所讨论的管辖范围中归于它们的含义;例如它们可以意指“包括”(“includes”、“included”、“including”)等。术语如“由……组成”、“基本上

由……组成”(“consisting essentially of”和“consists essentially of”)具有在大多数专利管辖范围、优选在所讨论的管辖范围中赋予它们的含义;例如它们意味着排除全部、大部分其他要素或全部但可忽略量的其他要素除外,它们允许未明确列举的要素,但排除在现有技术中发现的或影响本发明的基本或新颖特征的要素。

[0283] 贯穿本说明书的正文引用了若干文献。将本文中引用的每个文献(包括任何期刊文章或摘要、已公开或未公开的专利申请、已发布的专利、制造商的规范、说明书等)均通过引用特此并入。然而,不承认本文中引用的任何文献实际上是关于本发明的现有技术。

[0284] 参考以下附图和实施例对本发明作进一步描述,所述附图和实施例仅用于说明,并不旨在限制本发明。

[0285] 本发明由权利要求书限定,权利要求书应在说明书和附图的帮助下进行解释。

[0286] 序列的简要描述

[0287]

SEQ ID NO:	描述
1	编码中国仓鼠(灰仓鼠(*Cricetulus griseus*))起源的DHODH的cDNA序列
2	中国仓鼠起源的DHODH的氨基酸序列
3	编码人起源的DHODH的cDNA序列
4	人起源的DHODH的氨基酸序列
5	编码人起源的GS的cDNA序列
6	人起源的GS的氨基酸序列
7	编码狗(狼(*Canis lupus*))起源的GS的cDNA序列
8	狗起源的GS的氨基酸序列
9	中国仓鼠起源的GS的氨基酸序列
10	用于产生DHODH gRNA的相应DNA片段
11	用于获得DHODH gRNA(序列1')的寡核苷酸
12	用于获得DHODH gRNA(序列1')的寡核苷酸

[0288]

13	用于获得DHODH gRNA（序列2'）的寡核苷酸
14	用于获得DHODH gRNA（序列2'）的寡核苷酸
15	用于获得DHODH gRNA（序列3'）的寡核苷酸
16	用于获得DHODH gRNA（序列3'）的寡核苷酸
17	用于获得DHODH gRNA（序列4'）的寡核苷酸
18	用于获得DHODH gRNA（序列4'）的寡核苷酸
19	用于获得DHODH gRNA（序列5'）的寡核苷酸
20	用于获得DHODH gRNA（序列5'）的寡核苷酸
21	用于获得DHODH gRNA（序列6'）的寡核苷酸
22	用于获得DHODH gRNA（序列6'）的寡核苷酸
23	用于获得DHODH gRNA（序列7'）的寡核苷酸
24	用于获得DHODH gRNA（序列7'）的寡核苷酸
25	用于获得DHODH gRNA（序列8'）的寡核苷酸
26	用于获得DHODH gRNA（序列8'）的寡核苷酸
27	CHO DHODH基因序列
28	人DHODH G202A的氨基酸序列
29	由GS-1 gRNA靶向的DNA序列
30	由GS-2 gRNA靶向的DNA序列
31	CHO GS基因序列
32	GS1_F引物
33	GS1_R引物
34	编码中国仓鼠起源的GS的cDNA序列
35	实施例5的GS F引物
36	实施例5的GS R引物

[0289] 实施例

[0290] 实施例1:获得CHO 9E4细胞系

[0291] 此实施例描述了从以编号ATCC CCL-61可商购自ATCC的CHO-K1细胞系获得CHO 9E4细胞系。

[0292] 1.CHO-K1细胞系

[0293] 从ATCC获得在1969年在存在小牛血清的情况下冷冻的CHO-K1细胞(ATCC CCL-61)的小瓶。

[0294] 2.在Ex-Cell™ 302培养基中解冻小瓶并制备CHO-LG-APF库

[0295] 将CHO-K1小瓶直接在补充有4mM谷氨酰胺的Ex-Cell™ 302培养基(SAFC)中解冻，并在静态支持物上扩增，然后在旋转器中扩增。将所得的CHO-LG-APF库在12次传代和17.3个世代之后在Ex-Cell™ 302培养基中冷冻。

[0296] 3.将Ex-Cell™ 302培养基中的CHO-LG-APF库解冻并制备ABC-024P22库

[0297] 将CHO-LG-APF小瓶在Ex-Cell™ 302培养基中解冻并扩增。将所得的ABC-024P22库在18.5个世代后解冻。

[0298] 4.使CMV07-024库适应CDCHO融合培养基并制备ABC-003库

[0299] 将CMV07-024库解冻并使其直接适应补充有4mM谷氨酰胺的Ex-cell™ CDCHO融合培养基(SAFC)，并在摇床中适应12.5个世代，直到将在Ex-cell™ CDCHO融合培养基中的ABC-003库冷冻。

[0300] 5.将在CDCHO融合培养基中的ABC-003库解冻并在CDCHO融合培养基中制备ABC-053库将ABC-003小瓶在CDCHO融合培养基中解冻，并且在稀释后将ABC-53库在4.2个世代后冷冻。

[0301] 6.将在CDCHO融合培养基中的ABC-053库解冻，在CDCHO融合培养基中选择、克隆和制备P15A11库将ABC-053库在补充有4mM谷氨酰胺的Ex-cell™ CDCHO融合培养基(SAFC)中解冻。在培养物扩增后，将所述培养物通过有限稀释在板中进行克隆，然后在CDCHO融合培养基中扩增。将由此克隆产生的克隆P15A11的库冷冻。此克隆和扩增对应于约94个世代。

[0302] 7.将在CDCHO融合培养基中的P15A11库解冻，通过直接在CDCHO中传代来使库适应并在CDCHO培养基中制备CHOSP10-002库将P15A11库在补充有4mM谷氨酰胺的Ex-cell™ CDCHO融合培养基(SAFC)中解冻，并且在CDCHO融合培养基中2次传代后，将细胞在CDCHO培养基中稀释。在CDCHO培养基中3次传代后，将CHOSP10-002库在总共15.9个世代后冷冻。

[0303] 8.将在CDCHO培养基中的CHOSP10-002库解冻，扩增，通过离心消除团块并通过在96孔板中无团块的情况下传代培养进行选择，在6孔板和摇床中扩增以在CDCHO培养基中制备CHOSP10-012库将CHOSP10-002库在补充有6mM谷氨酰胺的CDCHO培养基(Invitrogen)中解冻，然后进行扩增。将培养物离心以消除细胞团块并继续培养仅从上清液分离的细胞。在这一阶段，从解冻起，产生了11.3个世代。

[0304] 将此培养物以每孔10个细胞分装在96孔板中。将具有单独地在悬浮液中增殖的细胞的孔在6孔板中扩增，然后在摇床中扩增。存在23.2个另外的世代直到CHOSP10-012库被冷冻。

[0305] 9.将CHOSP10-012库解冻，扩增并制备CHOSP11-008库(9E4库)

[0306] 将CHOSP10-012库在补充有6mM谷氨酰胺的CDCHO培养基(Invitrogen)中解冻，然后从锥形瓶阶段扩增到17L生物反应器。

[0307] 将9E4库在总共10个世代后冷冻。

[0308] 实施例2：产生其中DHODH基因无效的CHO细胞系

[0309] A-CRISPR CAS9指导RNA(gRNA)的设计和构建

[0310] 为了使CHO细胞中的DHDOH基因无效，诸位发明人首先从恢复仓鼠DHODH基因序列开始并使用公众可获得的Tefor软件设计不同的指导RNA(gRNA)以用于在CHO基因组中用CRISPR-Cas9转染。具有内含子和外显子的整个CHO DHODH序列如图1中所示。

[0311] 所述软件确定了可以靶向DHODH基因的8个序列：

[0312] 序列1’

[0313] GGATGCAGCCATCATCCTTGGTTTT(SEQ ID NO:11)

[0314] CAAGGATGATGGCTGCATCCCGGTG(SEQ ID NO:12)

[0315] 序列2’

[0316] GATGCAGCCATCATCCTTGGGTTTT(SEQ ID NO:13)

[0317] CCAAGGATGATGGCTGCATCCGGTG(SEQ ID NO:14)

[0318] 序列3’

[0319] GCAGCCATCATCCTTGGGGGGTTTT(SEQ ID NO:15)

[0320] CCCCCAAGGATGATGGCTGCCGGTG(SEQ ID NO:16)

[0321] 序列4’

[0322] GCCATCATCCTTGGGGGAGGGTTTT(SEQ ID NO:17)

[0323] CCCCCCAAGGATGATGGCCGGTG(SEQ ID NO:18)

[0324] 序列5'

[0325] GCTATTCGCTTCACGTCCCTGTTTT(SEQ ID NO:19)

[0326] AGGGACGTGAAGCGAATAGCCGGTG(SEQ ID NO:20)

[0327] 序列6'

[0328] GCCTCTACAAACTGGGCTTTGTTTT(SEQ ID NO:21)

[0329] AAAGCCCAGTTTGTAGAGGCCGGTG(SEQ ID NO:22)

[0330] 序列7'

[0331] GGCTTTGGGTTTGTCGAGGTGTTTT(SEQ ID NO:23)

[0332] ACCTCGACAAACCCAAAGCCCGGTG(SEQ ID NO:24)

[0333] 序列8'

[0334] GCTGGTCTGAGGAGCCTACAGTTTT(SEQ ID NO:25)

[0335] TGTAGGCTCCTCAGACCAGCCGGTG(SEQ ID NO:26)

[0336] 虽然测试并克隆了8个序列,但在8个序列中,只有四个克隆序列被转染并且只有一个成功敲除DHODH基因。以下20核苷酸序列GGATGCAGCCATCATCCTTG(SEQ ID NO:10)用作相应的DNA片段,以用于产生gRNA。其靶向DHODH基因的第二外显子。为了获得合适的gRNA的转录,两个寡核苷酸GGATGCAGCCATCATCCTTGGTTTT(oligo1',SEQ ID NO:11)和CAAGGATGATGGCTGCATCCCGGTG(oligo2',SEQ ID NO:12)被合成制备、退火并克隆在pCM3561(由Invitrogen商业化)的独特BaeI位点。

[0337] 克隆的DNA序列因此在U6启动子的控制之下,并且在DNA被转染在CHO细胞中后,其被转录成含有与tracrRNA融合的crRNA的单个转录单元。crRNA部分对于DHODH基因的第二外显子具有特异性,而tracrRNA被Cas9酶本身识别。

[0338] B-用于CRISPR-Cas9基因编辑的材料的制备

[0339] 如实施例1中所公开的,从购自ATCC的CHO K-1细胞分离并选择CHO 9E4细胞,并使其在针对中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的生长优化的补充有6mM L-谷氨酰胺的CDCHO无血清和化学成分确定的培养基中在37℃下在8% CO_2和80%湿度的培养箱中以悬浮培养物的形式生长和维持。

[0340] 将10μg sgRNA表达载体(pCM3561)用补充有20μM S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的1μL BaeI酶以5个单位/μl在25℃下消化1小时,然后使用1%琼脂糖凝胶通过电泳分离消化的质粒。然后通过凝胶提取试剂盒(Qiagen Kit)回收所得sgRNA克隆载体。

[0341] 使用T4DNA连接酶(Biolabs)连接sgRNA克隆载体和退火的指导寡核苷酸,并将其在室温下孵育10min。

[0342] 将5μL连接产物添加至50μL大肠杆菌DH5a感受态细胞(Invitrogen)。

[0343] 将细胞和DNA在冰上孵育30min,然后在42℃下热激45s。添加500mL S.O.C培养基后,在37℃下(以800rpm)孵育1小时,使细菌有时间产生在质粒骨架上编码的抗生素抗性蛋白。孵育后,将每个管涂布在一个补充有100μg/mL氨苄青霉素的LB上。将培养皿在37℃下孵育过夜。阴性对照(用水代替插入DNA)用于评价转化的成功。

[0344] 对于扩增步骤,每次构建选择两个菌落并将所述菌落接种在管中的补充有100μg/

ml氨苄青霉素的2mL LB培养基中,将其置于培养箱中过夜(37℃,700rpm)。通过离心收获过夜孵育的培养物。使用QIAprep Miniprep Kit™(QIAGEN)回收扩增的DNA(在EB缓冲液中洗脱)。然后通过Sanger测序(有义和反义测序,GATC Company)检查目的指导寡核苷酸的序列。在Vector NTI软件(Thermofisher Scientific)上通过比对验证后,将相应的菌落用于接种补充有100μg/ml氨苄青霉素的200mL LB培养基。孵育24小时后,通过在4℃下以6000g离心15min来收获细菌。使用EndoFree Plasmid Maxi Kit™(QIAGEN)制备MaxiPrep。通过添加室温异丙醇使DNA沉淀。离心1h(4℃,8000rpm)后,将DNA沉淀物用无内毒素的室温70%乙醇洗涤。短暂新的离心后,将沉淀物风干1h,并重新溶解在合适体积的无内毒素无菌水中,以使DNA浓度为5mg/mL。使用nanodrop设备测量DNA浓度。

[0345] 制备了四种不同的质粒,即pBH6840质粒(KO DHODH序列1')、pBH6841质粒(KO DHODH序列2')、pBH6842质粒(KO DHODH序列5')和pBH6843质粒(KO DHODH序列7')。在CHO DHODH基因中的靶标显示在序列SEQ ID NO:27上。

[0346] C-CRISPR-Cas9基因编辑

[0347] 使用MaxCyte STX及其CHO定义的方案通过电穿孔进行转染。它们是在OC-100(每次转染2000万个细胞)处理组件中进行的。

[0348] 转染前一天,将细胞以1.5×10^6个细胞/mL接种在补充有6mM L-谷氨酰胺的CDCHO培养基中。

[0349] 转染当天,用ViCell装置(Beckman&Coulter)对细胞进行编号。将所需数量的细胞以250g离心10min,并丢弃上清液。

[0350] 对于每个转染条件,将20×10^6个细胞以250g离心10min。将沉淀物用70μL Maxcyte缓冲液重悬。添加30μg DNA,并将混合物(细胞、缓冲液和DNA)转移到100μL Maxcyte电穿孔盒中。使用的处理组件是特定于100μL盒的OC-100,并选择针对CHO的优化程序。

[0351] 进行以下转染。

[0352]

T1	pBH6840	KO DHODH序列1'
T2	pBH6841	KO DHODH序列4'
T3	pBH6842	KO DHODH序列5'
T4	pBH6843	KO DHODH序列7'
T5	不含ADN	H2O

[0353] 在电穿孔后,将细胞转移到25mL工作锥形烧瓶中。将它们放入37℃、5% CO_2静态培养箱中持续45min。然后添加补充有6mM L-谷氨酰胺的25mL CDCHO培养基以使细胞重悬,并将锥形烧瓶放入37℃、5% CO_2、70%湿度、110rpm摇床中。

[0354] 电穿孔后的第二天,通过有限稀释从上述CHO9E4转染池中接种每孔单个细胞。大约20天后,一旦细胞达到约90%汇合度并在显微镜下检查时显现为健康的,就将细胞分装至有或没有尿苷的2个新的96孔板中。

[0355] 针对其对于缺乏尿苷的敏感性选择若干个克隆。使这些克隆适应以在补充有6mM谷氨酰胺和5mM尿苷的CDCHO培养基中生长。

[0356] 为了证实基因编辑成功,使用Qiagen DNeasy kit™(Qiagen)从CRISPR-Cas9克隆细胞提取基因组DNA。使用对于由CRISPR-Cas9靶向的DHODH基因座区域的适当引物进行PCR

来扩增靶基因座,并使用覆盖潜在缺失区域的PCR片段通过NGS对PCR产物进行测序。

[0357] 由此产生了DHODH的克隆KO2和KO19敲除。

[0358] 实施例3:产生其中DHODH基因和GS基因无效的CHO细胞系

[0359] A-CRISPR-Cas9指导RNA(gRNA)的设计和构建

[0360] 为了使实施例2中获得的CHO KO DHODH KO2和KO19细胞系中的GS基因无效,诸位发明人首先从恢复中国仓鼠GS基因序列开始并使用公众可获得的Tefor软件设计两种不同的指导RNA(gRNA)以用于在CHO基因组中用CRISPR-Cas9蛋白转染。

[0361] 所述软件确定了可以靶向GS基因的2个最佳序列。选择了两个靶向序列,一个靶向外显子6且另一个靶向CHO GS基因的外显子6的附近。

[0362] GS-1gRNA序列靶向gagtatgtgaagactttg(SEQ ID NO:29),然后是CHO GS基因组序列内的PAM序列(ngg)。

[0363] GS-2gRNA序列靶向ccatctttattctcatgggg(SEQ ID NO:30),然后是CHO GS基因组序列内的PAM序列(ngg)。

[0364] 在CHO GS基因内的靶标显示在序列SEQ ID NO:31上。

[0365] B-用于CRISPR-Cas9基因编辑的材料的制备

[0366] 转染前24h在补充有6mM谷氨酰胺和5mM尿苷的预温热的CD CHO培养基中稀释两个KO2和KO19敲除DHODH克隆,以在所需最终体积中实现1.5×10^6个细胞/mL的最终细胞密度。将烧瓶在以115rpm旋转的5mm轨道摇床平台上在含有空气中8% CO_2的加湿气氛的37℃培养箱中孵育。

[0367] 在分子生物学实验室的经典条件下,如下制备crRNA::tracrRNA复合物:分别针对每种crRNA-(一种用于GS-1gRNA且一种用于GS-2gRNA);两种特异性crRNA、恒定tracRNA和纯化的spCAS9蛋白由Integrated DNA Technologies(IDT,鲁汶,比利时)提供。

[0368] cr:tracrRNA混合物

[0369]

组分	量x1
crRNA	5μl(500pmol)
tracrRNA	5μl(500pmol)
总计	10μl

[0370] 1.将混合物在95℃下孵育5min

[0371] a.热循环仪的设置如下:

[0372] i.95℃ 5min

[0373] ii.20℃保持(然后放置在工作台上)

[0374] 2.将复合物在室温下冷却,并且如下制备RNP:

[0375] RNP复合物

[0376]

组分	量x1(μl)
cr:RNA/tracrRNA混合物	10
SpCas9	7(70μg)
总计	17

[0377] 将所有组分混合并在室温下孵育20min,并且在孵育期间,对细胞进行计数。收获足够数量的细胞,每个转染实验计数100万个细胞。将培育的细胞在室温下以250g离心

10min,并且在不干扰细胞沉淀物的情况下小心地去除上清液。

[0378] C-CRISPR-Cas9基因编辑

[0379] 转染混合物

[0380]

组分	量x1(μl)
RPN复合物	17
MaxCyte缓冲液	73
总计	90

[0381] 对于每种转染条件,将1x10^6个细胞沉淀物用90μl转染混合物(RNP复合物和含有crRNA::tracrRNA复合物的MaxCyte缓冲液)重悬,并转移到100μl Maxcyte电穿孔盒中。

[0382] 使用的处理组件是特定于100μl盒的OC-100,并选择针对CHO的优化程序。使用此特定的Maxcyte设计程序对细胞进行电穿孔。

[0383] 对于恢复期,将转染的细胞在37℃、40min且无搅拌的情况下立即转移到125ml烧瓶中。添加补充有6mM谷氨酰胺和5mM尿苷的25ml预温热的CD CHO培养基,并将转染的培养物在37℃下在8% CO_2和80%湿度的培养箱中维持。

[0384] 在转染后一天,通过有限稀释上述KO2和KO19DHODH克隆转染池,将每孔单个细胞接种于96孔板中,对应于每孔0.5个细胞。将含有具有生长潜力的克隆的96孔板在37℃下在8% CO_2和80%湿度的培养箱中维持。

[0385] 在生长15至25天后,观察到细胞占据良好,并且在细胞达到约90%汇合度并且在显微镜下检查时显现为健康时,将生长的细胞分装至有或没有谷氨酰胺的两个新的96孔板中,以验证它们的谷氨酰胺营养缺陷型。

[0386] 针对其对于缺乏谷氨酰胺的敏感性选择九十六个克隆。使这些克隆适应以在补充有6mM谷氨酰胺和5mM尿苷的CD CHO中生长。

[0387] 为了确认基因编辑是成功的,从CRISPR-Cas9克隆细胞中提取基因组DNA,并通过靶向NGS测序验证两个GS基因等位基因的破坏。

[0388] 即,使用Pure Link™基因组DNA迷你试剂盒(Invitrogen目录号K1820-01),使用1至5×10^6个克隆的CHO细胞制备基因组DNA(gDNA)。

[0389] 更具体地,将5×10^6个细胞在室温下以250g离心10min,并小心去除生长培养基。将沉淀物重悬于200μl PBS中。将20μl蛋白酶K/RNA酶和200μl裂解/结合缓冲液添加到样品中并在55℃下孵育10min。将样品管以10,000g离心1min。将200μl 95%-100%乙醇添加到裂解物中,然后将其涡旋。将旋转柱添加到收集管中,并将制备的裂解物添加到旋转柱中。将旋转柱和收集管组合在室温下以10,000g离心1min,然后弃去流过物。接下来,添加500μl洗涤缓冲液1,将旋转柱和收集管组合在室温下以10,000g离心1min,并弃去流过物。接下来,添加500μl洗涤缓冲液2,将旋转柱和收集管组合在室温下以10,000g离心3min,并弃去流过物。将旋转柱添加到新的微量离心管中,并将100μl洗脱缓冲液添加到旋转柱中。将样品在室温下孵育1min,然后在室温下以最大速度离心1min。由于将提取的DNA收集在微量离心管中,因此将柱取出并弃去。

[0390] 使用由NextSeq 500Mid Output Kit v2.5(300次循环)(参考号:20024905)推动的Illumina corporation技术,从50ng基因组DNA开始,使用两次连续的PCR扩增对应于潜在修饰区域的目的区域。第一次PCR对应于使用以下正向和反向PCR引物对引用区域的特异

性扩增。

[0391]

名称	序列	SEQ ID NO:
GS1_F引物	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGGCCTTATTCTAAAGGTCAACA	32
GS1_R引物	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATTCTCCTCCCGCATGG	33

[0392] 这些引物是合成制备的，并且在5'端包含通用的衔接子F-衔接子(Rd1SP，33个核苷酸)和R-衔接子(Rd2SP，34个核苷酸)。如果未观察到缺失，则扩增序列的理论大小为399个核苷酸。

[0393] 在第二次PCR中，重新扩增此片段，以便使用T5i5索引引物和T7i7索引引物并基于上述通用序列Rd1SP和Rd2SP进行索引。索引允许多个片段的混合。

[0394] 测序后，验证了两个等位基因的GS基因组序列中的缺失，证实了两个GS基因等位基因的破坏。

[0395] 实施例4:抗体产生测定

[0396] 使用实施例3中获得的双GS DHODH敲除细胞产生三特异性抗体。

[0397] 设计、构建表达载体并且产生浓度为5mg/ml的所述表达载体。在这些载体中，表达盒和选择标记物(GS cDNA或DHODH G202A cDNA)与ITR(反向末端重复序列)邻接，从而允许使用piggybac转座子系统以将表达盒和选择标记物主动整合到CHO生产细胞的基因组中。

[0398] 共转染突变的piggybac转座酶的质粒(Yusa等人(2011)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 108:1531-1536)以允许转座酶的瞬时表达。

[0399] 所使用的细胞系是CHO 9E4_SP11(实施例1中公开)以及实施例3中公开的DHODH和GS基因的敲除克隆。

[0400] 将CHO 9E4_SP11在补充有6mM L-谷氨酰胺的CDCHO培养基中培养。将双KO克隆在补充有6mM L-谷氨酰胺和5mM尿苷的CDCHO培养基中培养。

[0401] 在开始时将待转染的细胞在125ml锥形烧瓶中的25mL工作中培养并且扩增直到活细胞的数量足以进行所有转染。

[0402] 在FectoPRO® (Polyplus)转染前一天，将细胞在补充有6mM谷氨酰胺和5mM尿苷的CD CHO培养基中以1.5×10^6个细胞/ml稀释。

[0403] 在转染当天，将2.8ml稀释的细胞悬浮液在补充有6mM L-谷氨酰胺和5mM尿苷的CD CHO中以1.1×10^6个细胞/ml分布在24DW板中。按照制造商推荐的方案，将FectoPRO®试剂涡旋5s并且旋转减慢，然后将每孔6.2μl添加到空的96MTP孔板中。在第二个96MTP孔板中，将3.1μg DNA(表达盒DNA的90％和转座酶表达质粒pBH6209的10％)在200μl CD CHO培养基中稀释，然后将培养物中稀释的DNA一次性全部分布到纯FectoPRO®试剂中，以分别用于每个孔。将溶液立即均质化，并在室温下孵育10min。将FectoPRO®/DNA转染混合物倒入先前分布在24孔板中的制备的细胞上，并将培养物在37℃、190rpm和8％CO_2下孵育。

[0404] 电穿孔后二十四小时(第1天)，用ViCell XR对细胞进行计数。将全细胞培养物在25℃下以250g离心10min，并小心地吸出培养基。对于CHO 9E4WT细胞，将沉淀物用补充有30％ FeedB和25μM特立氟胺的预温热的CD OPTiCHO培养基重悬，并且对于双KO GS/DHODH细胞，将沉淀物用没有任何选择压力或谷氨酰胺/尿苷添加的预温热的CD OPTiCHO培养基

重悬。

[0405] 转染后第3天，用Invitrogen™ Countess™装置对细胞进行计数。将全细胞培养物在25℃下以250g离心10min，并小心地弃去上清液。对于CHO 9E4WT细胞，将沉淀物用补充有30％ FeedB和25μM特立氟胺的预温热的CD OPTiCHO培养基重悬，并且对于双KO GS/DHODH细胞，将沉淀物用没有任何选择压力或谷氨酰胺/尿苷添加的预温热的CD OPTiCHO培养基重悬。

[0406] 在转染后第14天，将全部培养物在4℃下以250g离心10min，将含有所产生的目的蛋白的上清液通过0.22μm PES过滤器过滤，并使用Octet机器人测量抗体靶标滴度。

[0407] 下表概述了三特异性抗体的转染条件。

[0408]

用于转染的表达载体	细胞	选择标记物	转染培养基的天数	转染后选择培养基
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO1	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO2	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO3	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO4	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO5	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO6	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO7	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO8	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO9	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO10	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO11	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO12	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO13	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO14	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO15	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO16	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO17	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO18	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO19	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	双KO20	GS/DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	9E4WT	GS/DHODH	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	9E4WT	GS/DHODH	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00080/pVA4-0081	9E4WT	GS/DHODH	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX + TNF
pVA4-00080/pVA4-0081	9E4WT	GS/DHODH	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX + TNF

[0409]

[0410] Gln:谷氨酰胺,Uri:尿苷,TNF:特立氟胺,MSX:L-甲硫氨酸亚砜亚胺

[0411] 获得了以下结果。

[0412]

	孔的数量
测试的	192
占据的	96
占据的%	50
Gln敏感克隆的数量	45
Gln敏感的%	47

[0413]

	第3天的CHO细胞活力		第7天的CHO细胞活力	
	活细胞（$\times 10^6$/ml）	活力（%）	活细胞（$\times 10^6$/ml）	活力（%）
双KO1	1.75	87.01	6.56	97.17
双KO2	2.05	87.73	6.45	97.98
双KO3	2.7	88.75	7.57	97.77
双KO4	2.45	88.59	4.53	98.31
双KO5	2.64	86.26	6.3	94.85
双KO6	2.77	87.12	7.71	96.58
双KO7	2.8	84.65	7.62	96.17
双KO8	2.55	87.35	7.94	96.97
双KO9	2.45	86.18	7.42	96.7
双KO10	1.87	87.96	6.56	96.17
双KO11	2.4	83.81	7.39	95.83
双KO12	2.01	87.9	4.89	96.85
双KO13	2.53	88.21	6.07	97.8
双KO14	2.1	84.82	7.41	96.3
双KO15	2.17	85.85	7.03	97.82
双KO16	2.06	85.5	7.15	97.34
双KO17	2.6	85.95	8.06	97.23
双KO18	2.4	88.15	6.96	97.38
双KO19	2.5	85.82	7.5	96.04
双KO20	2.6	88.34	7.43	98.28
9E4 WT + MSX+TNF	1.64	68.3	4.4	91.3

[0414] 第10天和第14天的三特异性抗体产量示于图2。

[0415] 如图2所示，十个克隆在没有任何选择压力特立氟胺/L-甲硫氨酸亚砜亚胺或谷氨酰胺/尿苷添加的情况下展示出良好的产量。

[0416] 这些双KO克隆产生的三特异性抗体在与现有技术选择系统相同的范围内，即在0.3g/l与0.5g/l之间，其中克隆双KO20具有特别高的产量。

[0417] 实施例5：双KO20克隆的表型和基因型分析

[0418] 由于克隆双KO20是最有前途的，因此对此克隆进行了进一步的分析。

[0419] A-表型分析

[0420] 通过蛋白质印迹进一步研究了此克隆中编码GS的基因的失活。

[0421] 制备了用于双KO GS/DHODH的CHO培养基。它是通过在37℃培养箱中放置而在37℃下预温热30min的含有6mM谷氨酰胺和5mM尿苷的CD-CHO培养基。为了制备CHO细胞，用ViCell XR对细胞进行计数，并且将其在预温热的补充培养基中稀释。然后将细胞在以115rpm旋转的5mm轨道摇床平台上在含有空气中8%CO_2的加湿气氛的37℃培养箱中孵育。

[0422] 在15ml管中，在5分钟内以800g收获一千万个细胞。根据供应商的建议，去除上清

液，并将沉淀物用1ml M-PER缓冲液重悬。在4℃下孵育30min后，在1.5mL Eppendorf管中以12000rpm在15min内进行新的离心。然后收集800μL上清液用于蛋白质印迹测定。通过BCA测定确定上清液的蛋白质浓度。

[0423] 将4.4μg样品加载到SDS-PAGE上。使用iBlot®凝胶转移工具(Life Technologies)通过将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上进行蛋白质印迹分析。将硝酸纤维素膜用BSA和5％乳粉在PBS-T缓冲液(12mM磷酸钠(pH 7.4)、137mM NaCl、2.7mM KCl、0.05％Tween®20)中的混合物封闭。然后将硝酸纤维素膜与一抗(来自Sigma(G2781)的抗谷氨酰胺合成酶)在室温下孵育1小时，然后与HRP缀合的抗兔二抗在室温下孵育1小时。然后使用ECL试剂进行蛋白质印迹检测，使含有表位的蛋白质可视化。

[0424] 对于对照样品(野生型CHO)，观察到与谷氨酰胺合成酶的预期分子量(约45kDa)相对应的条带，而对于来自双KO20克隆的样品，没有观察到所述条带。因此，这种蛋白质印迹分析表明，在来自双KO20克隆的样品中不存在谷氨酰胺合成酶。此结果证实了此生产性克隆中内源性谷氨酰胺合成酶(GS)基因的完全失活。

[0425] 在进一步的分析中，进一步研究了此克隆的基因型。目的在于鉴定GS基因组序列中负责KO的突变。CRISPR切割的靶序列位于GS基因的外显子6的附近，特别是在外显子6与外显子7之间的内含子中。

[0426] 为了扩增目的序列，在邻接的外显子上从内含子的任一侧设计了PCR引物。

[0427]

扩增引物	名称	靶向GS基因位点	序列	SEQ ID NO:
正向	PCR_GS_for1	外显子6的3’端	acctttgaccccaagc	35
反向	PCR_GS_rev2	外显子7的3’端	cgtcgccagtctcattg	36

[0428] 如实施例3中部分C所述，从双KO20克隆提取基因组DNA。它允许以150ng/μl获得98μl的DNA。

[0429] 进行PCR并在琼脂糖凝胶电泳上控制PCR产物。预期分子量为879bp。诸位发明人观察到预期分子量周围的轻微条带和主要的较小条带(约400-500bp)，所述较小条带指示来自双KO20克隆的样品中的gDNA的几个群体。因此，进行的PCR扩增允许获得2种类型的扩增子。

[0430] 然后将获得的扩增子克隆到穿梭载体中。细菌转化后，已经培育了一些菌落，然后通过小量制备纯化质粒DNA。DNA小量制备后，对含有扩增子的质粒进行测序，其中引物与穿梭载体中的插入位点邻接。

[0431] 将获得的序列与GS基因的理论完整序列比对。

[0432] 最大的扩增子对应于外显子6与7之间的内含子的存在，其中此内含子缺失约39bp。

[0433] 较短的扩增子对应于外显子6与7之间的内含子的完全缺失。

[0434] 关于这些分析，诸位发明人得出结论，双KO20克隆是具有2个gDNA群体的GS(一个内含子完全缺失且一个内含子中有39bp缺失)的KO。编码GS的基因中的这些修饰导致GS表达完全失活。

SEQUENCE LISTING
<110> 赛诺菲
<120> 用于治疗性蛋白质生产的高产重组中国仓鼠卵巢细胞系的产生
<130> BEX 21P1358
<150> EP20306068.6
<151> 2020-09-21
<160> 36
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 1188
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus
<400> 1
atggcttggc ggcagatgcg gaagagagcc ctggacgccg ctatcatcct gggaggcgga 60
ggcctgctgt tcacctctta cctgacagcc accggcgacg accacttcta cgccgagtac 120
ctgatgcctg ccctgcagag actgctggac cctgagtctg cccaccggct ggccatcaga 180
ttcacctccc tgggcctgct gcccagagcc accttccagg actccgacat gctggaagtg 240
cgggtgctgg gccacaagtt cagaaacccc gtgggaatcg ccgctggctt cgacaagcac 300
ggcgaggctg tggacggcct gtacaagctg ggcttcggct tcgtggaagt gggctccgtg 360
acaccccagc cccaggaagg caaccccaga cctagagtgt tccggctgcc tgaggaccag 420
gccgtgatca acagatacgg cttcaactcc cacggcctgt ccgtggtgga acaccggctg 480
agagccagac agcagaagca gaacaagctg accgccgacg gcctgccccc gggcatcaat 540
ctgggcaaga acaagacctc cgaggacgct gccgccgact acgtggaagg cgtgcgagtg 600
ctgggacctc tggccgatta cctggtcgtg aacgtgtcct cccccaacac cgctggcctg 660
agaagcctgc agggaaaggc cgagctgaga aggctgctgg ccaaggtgct gcaggaacgg 720
gacgctctga agggcgccca gaaacctgcc gtgctcgtga agatcgcccc tgacctgacc 780
gcccaggaca aagaggatat cgcctccgtg gccagagagc tgggcatcga cggactgatc 840
gtgaccaaca ccaccgtgtc tcggcctacc ggactgcagg gcgctctgag atctgagatg 900
ggcggcctgt ctggcaagcc tctgagggac ctgtccaccc agaccatcag agagatgtac 960
accctgaccc agggccggat ccccatcatt ggagtgggcg gagtgtcctc tggccaggac 1020
gccctggaaa agatccaggc tggcgcctct ctggtgcagc tgtataccgc cctgaccttt 1080
ctgggccctc ccgtggtggt gcgagtgaag agagaactgg aagccctgct gaaagagcgg 1140
ggcttcaaca ccgtgaccga ggccatcggc gctgaccaca gaagatga 1188
<210> 2
<211> 395
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus
<400> 2

Met Ala Trp Arg Gln Met Arg Lys Arg Ala Leu Asp Ala Ala Ile Ile
1 5 10 15
Leu Gly Gly Gly Gly Leu Leu Phe Thr Ser Tyr Leu Thr Ala Thr Gly
20 25 30
Asp Asp His Phe Tyr Ala Glu Tyr Leu Met Pro Ala Leu Gln Arg Leu
35 40 45
Leu Asp Pro Glu Ser Ala His Arg Leu Ala Ile Arg Phe Thr Ser Leu
50 55 60
Gly Leu Leu Pro Arg Ala Thr Phe Gln Asp Ser Asp Met Leu Glu Val
65 70 75 80
Arg Val Leu Gly His Lys Phe Arg Asn Pro Val Gly Ile Ala Ala Gly
85 90 95
Phe Asp Lys His Gly Glu Ala Val Asp Gly Leu Tyr Lys Leu Gly Phe
100 105 110
Gly Phe Val Glu Val Gly Ser Val Thr Pro Gln Pro Gln Glu Gly Asn
115 120 125
Pro Arg Pro Arg Val Phe Arg Leu Pro Glu Asp Gln Ala Val Ile Asn
130 135 140
Arg Tyr Gly Phe Asn Ser His Gly Leu Ser Val Val Glu His Arg Leu
145 150 155 160
Arg Ala Arg Gln Gln Lys Gln Asn Lys Leu Thr Ala Asp Gly Leu Pro
165 170 175
Leu Gly Ile Asn Leu Gly Lys Asn Lys Thr Ser Glu Asp Ala Ala Ala
180 185 190
Asp Tyr Val Glu Gly Val Arg Val Leu Gly Pro Leu Ala Asp Tyr Leu
195 200 205
Val Val Asn Val Ser Ser Pro Asn Thr Ala Gly Leu Arg Ser Leu Gln
210 215 220
Gly Lys Ala Glu Leu Arg Arg Leu Leu Ala Lys Val Leu Gln Glu Arg
225 230 235 240
Asp Ala Leu Lys Gly Ala Gln Lys Pro Ala Val Leu Val Lys Ile Ala
245 250 255
Pro Asp Leu Thr Ala Gln Asp Lys Glu Asp Ile Ala Ser Val Ala Arg
260 265 270
Glu Leu Gly Ile Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Thr Thr Val Ser Arg
275 280 285
Pro Thr Gly Leu Gln Gly Ala Leu Arg Ser Glu Met Gly Gly Leu Ser
290 295 300
Gly Lys Pro Leu Arg Asp Leu Ser Thr Gln Thr Ile Arg Glu Met Tyr

305 310 315 320
Thr Leu Thr Gln Gly Arg Ile Pro Ile Ile Gly Val Gly Gly Val Ser
325 330 335
Ser Gly Gln Asp Ala Leu Glu Lys Ile Gln Ala Gly Ala Ser Leu Val
340 345 350
Gln Leu Tyr Thr Ala Leu Thr Phe Leu Gly Pro Pro Val Val Val Arg
355 360 365
Val Lys Arg Glu Leu Glu Ala Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Asn Thr
370 375 380
Val Thr Glu Ala Ile Gly Ala Asp His Arg Arg
385 390 395

<210> 3
<211> 1188
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 3
atggcttggc ggcacctgaa gaagagggcc caggacgccg tgatcatcct gggaggcgga 60
ggcctgctgt tcgcctctta cctgatggct accggcgacg agcggttcta cgccgagcat 120
ctgatgccca cactgcaggg cctgctggac cctgagtctg cccatagact ggccgtgcgg 180
ttcacctccc tgggactgct gcctagagcc cggttccagg actccgacat gctggaagtg 240
cgggtgctgg gccacaagtt cagaaacccc gtgggaatcg ccgctggctt cgacaagcac 300
ggcgaggctg tggacggcct gtacaagatg ggcttcggct tcgtggaaat cggctccgtg 360
acccccaagc cccaggaagg caaccccaga cctcgggtgt tcagactgcc tgaggaccag 420
gctgtgatca acagatacgg cttcaactcc cacggcctgt ccgtggtgga acaccggctg 480
agagccagac agcagaagca ggccaagctg accgaggatg gcctgcctct gggagtgaac 540
ctgggcaaga acaagacctc cgtggacgcc gccgaggatt acgctgaagg cgtgcgagtg 600
ctgggacccc tggctgatta cctggtcgtg aacgtgtcct cccccaacac cgctggcctg 660
agatctctgc agggcaaggc cgagctgcgg agactgctga caaaggtgct gcaggaacgc 720
gacggcctgc ggagagtgca tagacctgcc gtgctcgtga agatcgcccc cgacctgacc 780
agccaggaca aagaggatat cgcctccgtc gtgaaagagc tgggcatcga cggactgatc 840
gtgaccaaca ccaccgtgtc taggcctgcc ggactgcagg gggctctgag atctgaaacc 900
ggcggactgt ccggcaagcc tctgagggat ctgtccaccc agaccatcag agagatgtac 960
gccctgaccc agggccgggt gccaatcatt ggagtgggcg gagtgtcctc cggccaggat 1020
gccctggaaa agatcagagc cggcgcttcc ctggtgcagc tgtacaccgc tctgaccttt 1080
tggggccctc ccgtcgtggg caaagtgaag agagagctgg aagccctgct gaaagagcag 1140
ggatttggcg gcgtgaccga tgccatcggc gctgaccaca gaagatga 1188

<210> 4
<211> 395
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Trp Arg His Leu Lys Lys Arg Ala Gln Asp Ala Val Ile Ile
1 5 10 15
Leu Gly Gly Gly Gly Leu Leu Phe Ala Ser Tyr Leu Met Ala Thr Gly
20 25 30
Asp Glu Arg Phe Tyr Ala Glu His Leu Met Pro Thr Leu Gln Gly Leu
35 40 45
Leu Asp Pro Glu Ser Ala His Arg Leu Ala Val Arg Phe Thr Ser Leu
50 55 60
Gly Leu Leu Pro Arg Ala Arg Phe Gln Asp Ser Asp Met Leu Glu Val
65 70 75 80
Arg Val Leu Gly His Lys Phe Arg Asn Pro Val Gly Ile Ala Ala Gly
85 90 95
Phe Asp Lys His Gly Glu Ala Val Asp Gly Leu Tyr Lys Met Gly Phe
100 105 110
Gly Phe Val Glu Ile Gly Ser Val Thr Pro Lys Pro Gln Glu Gly Asn
115 120 125
Pro Arg Pro Arg Val Phe Arg Leu Pro Glu Asp Gln Ala Val Ile Asn
130 135 140
Arg Tyr Gly Phe Asn Ser His Gly Leu Ser Val Val Glu His Arg Leu
145 150 155 160
Arg Ala Arg Gln Gln Lys Gln Ala Lys Leu Thr Glu Asp Gly Leu Pro
165 170 175
Leu Gly Val Asn Leu Gly Lys Asn Lys Thr Ser Val Asp Ala Ala Glu
180 185 190
Asp Tyr Ala Glu Gly Val Arg Val Leu Gly Pro Leu Ala Asp Tyr Leu
195 200 205
Val Val Asn Val Ser Ser Pro Asn Thr Ala Gly Leu Arg Ser Leu Gln
210 215 220
Gly Lys Ala Glu Leu Arg Arg Leu Leu Thr Lys Val Leu Gln Glu Arg
225 230 235 240
Asp Gly Leu Arg Arg Val His Arg Pro Ala Val Leu Val Lys Ile Ala
245 250 255
Pro Asp Leu Thr Ser Gln Asp Lys Glu Asp Ile Ala Ser Val Val Lys
260 265 270
Glu Leu Gly Ile Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Thr Thr Val Ser Arg
275 280 285
Pro Ala Gly Leu Gln Gly Ala Leu Arg Ser Glu Thr Gly Gly Leu Ser

290 295 300

Gly Lys Pro Leu Arg Asp Leu Ser Thr Gln Thr Ile Arg Glu Met Tyr
305 310 315 320

Ala Leu Thr Gln Gly Arg Val Pro Ile Ile Gly Val Gly Gly Val Ser
325 330 335

Ser Gly Gln Asp Ala Leu Glu Lys Ile Arg Ala Gly Ala Ser Leu Val
340 345 350

Gln Leu Tyr Thr Ala Leu Thr Phe Trp Gly Pro Pro Val Val Gly Lys
355 360 365

Val Lys Arg Glu Leu Glu Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gly Phe Gly Gly
370 375 380

Val Thr Asp Ala Ile Gly Ala Asp His Arg Arg
385 390 395

<210> 5

<211> 1122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atgaccacct ccgcctccag ccacctgaac aagggcatca aacaggtgta catgagcctg 60
ccccagggcg agaaggtgca ggccatgtac atctggatcg acggcaccgg cgagggactg 120
cggtgcaaga ccagaaccct ggactccgag cctaagtgcg tggaagaact gcccgagtgg 180
aacttcgacg gctcctccac cctgcagtcc gagggctcca actccgacat gtacctggtg 240
cctgccgcca tgttccggga ccctttccgg aaggacccca acaagctggt gctgtgcgag 300
gtgttcaagt acaacagacg gcctgccgag acaaacctgc ggcatacctg caagcggatc 360
atggacatgg tgtccaacca gcacccttgg tttggcatgg aacaggagta caccctgatg 420
ggcaccgacg gccacccctt cggctggcct tctaacggct tccctggccc ccagggcccc 480
tactattgtg gcgtgggcgc cgaccgggcc tacggcagag atatcgtgga agcccactac 540
cgggcctgcc tgtacgccgg agtgaagatc gccggcacca acgccgaagt gatgcccgcc 600
cagtgggagt tccagatcgg cccttgcgag ggcatctcca tgggcgatca cctgtgggtg 660
gcccggttca tcctgcacag agtgtgcgag gacttcggcg tgatcgccac cttcgacccc 720
aagcccatcc ccggcaactg gaacggcgct ggctgccaca ccaacttctc caccaaggcc 780
atgcgggaag agaacggcct gaagtacatc gaggaagcca tcgagaagct gtccaagcgg 840
caccagtacc acatcagagc ctacgaccct aagggcggcc tggacaacgc cagaaggctg 900
accggctttc acgagacatc caacatcaac gacttctctg ccggcgtggc caacagatcc 960
gcctccatcc ggatccctag aaccgtgggc caggaaaaga agggctactt cgaggacaga 1020
cggccctccg ccaactgcga ccccttagc gtgaccgagg ccctgatccg gacctgcctg 1080
ctgaacgaga caggcgacga gcccttccag tacaagaact ga 1122

<210> 6

<211> 373

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Met Thr Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Val
1 5 10 15
Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30
Ile Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45
Ser Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
50 55 60
Ser Ser Thr Leu Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Val
65 70 75 80
Pro Ala Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95
Val Leu Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Arg Pro Ala Glu Thr Asn
100 105 110
Leu Arg His Thr Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
115 120 125
Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
130 135 140
His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro
145 150 155 160
Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Arg Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val
165 170 175
Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Ala Gly
180 185 190
Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro
195 200 205
Cys Glu Gly Ile Ser Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala Arg Phe Ile
210 215 220
Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro
225 230 235 240
Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
245 250 255
Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Tyr Ile Glu Glu
260 265 270
Ala Ile Glu Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285

Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300
Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Ser
305 310 315 320
Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335
Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Phe Ser Val Thr
340 345 350
Glu Ala Leu Ile Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365
Phe Gln Tyr Lys Asn
370

<210> 7
<211> 1122
<212> DNA
<213> Canis lupus
<400> 7
atggccacct ccgcctccag ccacctgaac aagggcatca aacaggtgta catgagcctg 60
ccccagggcg agaaggtgca ggccatgtac atctggatcg acggcaccgg cgagggactg 120
cggtgcaaga ccagaaccct ggactccgag cccaagggcg tggaagaact gcccgagtgg 180
aacttcgacg gctcctccac cttccagtcc gagggctcca actccgacat gtacctggtg 240
cctgccgcca tgttccggga ccctttccgg aaggacccca acaagctggt gttctgcgag 300
gtgttcaagt acaaccggaa gcccgccgag acaaacctgc ggcatacctg caagcggatc 360
atggacatgg tgtccaacca gcacccttgg tttggcatgg aacaggagta caccctgatg 420
ggcaccgacg gccacccctt cggctggcct tctaacggct tccctggccc ccagggcccc 480
tactattgtg gcgtgggcgc cgacaaggcc tacggcagag acatcgtgga agcccactac 540
cgggcctgcc tgtacgccgg catcaagatc gctggcacca acgccgaagt gatgcccgcc 600
cagtgggagt tccagatcgg cccttgcgag ggcatcgaca tgggcgatca cctgtgggtg 660
gcccggttca tcctgcacag agtgtgcgag gacttcggcg tgatcgccac cttcgacccc 720
aagcccatcc ccggcaactg gaacggcgct ggctgccaca ccaacttctc caccaaggcc 780
atgcgggaag agaacggcct gaagtacatc gaggaatcca tcgagaagct gtccaagcgg 840
caccagtacc acatccgggc ctacgacccc aagggcggcc tggataacgc cagacggctg 900
accggcttcc acgagacatc caacatcaac gacttctctg ccggcgtggc caacagaggc 960
gcctccatcc ggatcccccg gaccgtgggc caggaaaaga agggctactt cgaggacaga 1020
cggccctccg ccaactgcga ccccttagc gtgaccgagg ccctgatccg gacctgcctg 1080
ctgaacgaga caggcgacga gcccttccag tacaagaact ga 1122

<210> 8
<211> 373
<212> PRT

<213> Canis lupus

<400> 8

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Val
1 5 10 15
Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30
Ile Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45
Ser Glu Pro Lys Gly Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
50 55 60
Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Val
65 70 75 80
Pro Ala Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu
85 90 95
Val Phe Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Lys Pro Ala Glu Thr Asn
100 105 110
Leu Arg His Thr Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
115 120 125
Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly
130 135 140
His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro
145 150 155 160
Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Lys Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val
165 170 175
Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Ile Lys Ile Ala Gly
180 185 190
Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro
195 200 205
Cys Glu Gly Ile Asp Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala Arg Phe Ile
210 215 220
Leu His Arg Val Cys Glu Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Pro
225 230 235 240
Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
245 250 255
Ser Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Tyr Ile Glu Glu
260 265 270
Ser Ile Glu Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285
Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His

290 295 300

Glu Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335

Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Phe Ser Val Thr
340 345 350

Glu Ala Leu Ile Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
355 360 365

Phe Gln Tyr Lys Asn
370

<210> 9

<211> 373

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 9

Met Ala Thr Ser Ala Ser Ser His Leu Asn Lys Gly Ile Lys Gln Met
1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp
20 25 30

Val Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp
35 40 45

Cys Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly
50 55 60

Ser Ser Thr Phe Gln Ser Glu Ser Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Ser
65 70 75 80

Pro Val Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Glu Pro Asn Lys Leu
85 90 95

Val Phe Cys Glu Val Phe Lys Tyr Asn Gln Lys Pro Ala Glu Thr Asn
100 105 110

Leu Arg His Thr Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His
115 120 125

Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Leu Gly Thr Asp Gly
130 135 140

His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asp Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Leu
145 150 155 160

Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Lys Ala Tyr Arg Arg Asp Ile Met
165 170 175

Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Thr Gly

180 185 190
Thr Tyr Ala Glu Val Lys His Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro
195 200 205
Cys Glu Gly Ile Arg Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala Arg Phe Ile
210 215 220
Leu His Arg Val Cys Lys Asp Phe Gly Val Ile Ala Thr Phe Asp Ser
225 230 235 240
Lys Pro Ile Pro Gly Asn Trp Asn Gly Ala Gly Cys His Thr Asn Phe
245 250 255
Ser Thr Lys Thr Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys His Ile Lys Glu
260 265 270
Ala Ile Glu Lys Leu Ser Lys Arg His Arg Tyr His Ile Arg Ala Tyr
275 280 285
Asp Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His
290 295 300
Lys Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asp Arg Ser
305 310 315 320
Ala Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr
325 330 335
Phe Glu Ala Arg Cys Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Phe Ala Val Thr
340 345 350
Glu Ala Ile Val Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Gln Pro
355 360 365
Phe Gln Tyr Lys Asn
370

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> corresponding piece of DNA for generating DHODH gRNA
<400> 10
ggatgcagcc atcatccttg 20

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence1')

<400> 11
ggatgcagcc atcatccttg gtttt 25
<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence1')
<400> 12
caaggatgat ggctgcatcc cggtg 25
<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence2')
<400> 13
gatgcagcca tcatccttgg gtttt 25
<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence2')
<400> 14
ccaaggatga tggctgcatc cggtg 25
<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence3')
<400> 15
gcagccatca tccttggggg gtttt 25
<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence3')
<400> 16
cccccaagga tgatggctgc cggtg 25
<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence4')
<400> 17
gccatcatcc ttgggggagg gtttt 25
<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence4')
<400> 18
cctccccccaa ggatgatggc cggtg 25
<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence5')
<400> 19
gctattcgct tcacgtccct gtttt 25
<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence5')
<400> 20
agggacgtga agcgaatagc cggtg 25
<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence6')
<400> 21
gcctctacaa actgggcttt gtttt 25
<210> 22
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence6')
<400> 22
aaagcccagt ttgtagaggc cggtg 25
<210> 23
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence7')
<400> 23
ggctttgggt ttgtcgaggt gtttt 25
<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence7')
<400> 24
acctcgacaa acccaaagcc cggtg 25
<210> 25
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence8')
<400> 25
gctggtctga ggagcctaca gtttt 25
<210> 26
<211> 25
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> oligonucleotide used for obtaining DHODH gRNA (Sequence8')
<400> 26
tgtaggctcc tcagaccagc cggtg 25
<210> 27
<211> 14437
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus
<220>
<221> misc_feature
<222> (1992)..(2015)
<223> target of plasmids pBH6840 KO DHODH SEQ1 and pBH6841 KO DHODH SEQ4
<220>
<221> misc_feature
<222> (2129)..(2147)
<223> target of plasmids pBH6842 KO DHODH SEQ5
<220>
<221> misc_feature
<222> (4015)..(4047)
<223> target of plasmids pBH6843 KO DHODH SEQ7
<400> 27
ccgagcccac attctccaat ggagtggagg cagaggcggg cccagtggca gaaggagcat 60
ggcgtggaga cagatgagag tgagtctgtt gcgggtgctt acgcttgttc ggaaaacagg 120
ttgggagtgg acgaggctgg gagattgaaa ggctggggcc cttgcagtgt gggctgcatg 180
tgtgctcagc taggggcatg caaaaagcaa gcgtgctggg cagaggctga gttgattgtg 240
agagatcgcg ggctttttt ttttttttt tcttaaactg agctagtatc gggcccctgt 300
gagcacatgg tggctagcat tatggaaagg atccagggcg gaatgaaata agacacgcag 360
ccacccttcc agataaagtg tggttagaat gggagtcccg tgcgaagagt ccgtagattg 420
tgtccctggc ttgggaaaga gtgcgcagat attgtttctt gacacgtgag aatttctccc 480
tccagaggag ggagaatgaa tacttggttt gctgtacagg caaatctgat cacatcctct 540
acttccttat ttagtggaca aatcccatta aaaatataat cactgattgt ggtgaggggt 600
tgtgctgtga catgggagct ggaaccgaac tctgcactta accactgaac catctccagc 660
ccccaaatct gtattttggc tgacaccccc acatttctcc taccttactt taagaaatgc 720
tttcctttta gttccaaaca gacctgtctt cctctacccc attctctggc ccttctcatt 780
ggcttcagcc acctagagat tccttctcca gctgcttcct cctctttagc ttttgtgtct 840
ccttggaaag tcaaccttag cctggaagga gcctcaagat ccttccatta cttatctctt 900
cgtgtcagtt ttcttgggtt tgtgtttaca tggccattaa tttctctctt cattagatag 960

attacacact tctgaaggac agggacctgg tgtggtttgc ttgcctttgg tgaaggattg 1020
aatgaatgca ttagccactt ggcatctggc agtgataatt atcaaaaagc attgtgagcc 1080
tcctttgaac tagggtagtg attctctacc cagagtgtga agctatgttt gtattacaac 1140
cacttttata ttatacacat aggacatttc aggccagtaa cttttctagg tataatttta 1200
aaatatagac accatgtcct aactacagta taaaggagaa atgaaaacat gtatttcagt 1260
atgtagaagt cagaacacag ttcacctaca tagatggcca ggtgtttaag cctctattta 1320
gaaggtgtgc gttggtatac aaacagcact gtataccctt tctggtgggg ttttaggaac 1380
agtgaccaag tcttagtaat gttttgtgca aactgtacaa ttgtccttaa attacaaggt 1440
atctttattt ctgtaaaagt caccctgtac atgtaaacca tgtggttgtg tggtgaacta 1500
tagcttgctt cttgcctctc ctattatcct cagataatag gaagttttcc tcacataaat 1560
agcaatagca agttcaaaca tcatacagta catagggaaa ctagtgtgtt agctttaatt 1620
aaagaagaat attgacagga ctgatttctc cacaccaaat gtattagcat cattccctca 1680
ttaactagta aaaattttcc catgtgaccc ctaggggca gtactgcctg tcttgaaaat 1740
tccctgcctg gtccttagga aaatattcag ggctagaacc catgtaagca gtgtaggtac 1800
tgcatctacc tttgtagatg tgtaagtggg caggatatga agggggacag tgtgagcagg 1860
gaaggactgt cactttgtgt agttgttatg tcctctgggc aggtgtgaag ggtcaggaag 1920
ggtactgcag gctggtctga tggggttccc catggggcct tttctctccc ccactagaag 1980
cgggccctgg atgcagccat catccttggg ggaggaggac ttctcttcac ctcttacctg 2040
acagccacgg gcgatgacca tttctatgct gaatatctga tgccggccct gcagaggctg 2100
ctagacccag aatcagccca ccggctagct attcgcttca cgtccctggg gctccttcct 2160
cgagctacat ttcaggactc tgacatgctg gtaggtcccc cggtcaccct gtgttacatt 2220
tgtgtttgta ggggaggtca catccttcag cacttcggta ttcctctgct gccactgggc 2280
ttttgaaaac cagagctgca ggttcacaag cagctgggac ctggagccca gcccgaggaa 2340
gggacttttc ttctgtgtta caccctgtac ttacagaaca gcactcagca tatagccggt 2400
gcttacagct ttaatcctca cagataccct ttgagggagg tcctatctca tctccatcta 2460
caaatcagga aactgaggta cagactaagt aagtgacttg cccaaggtca cacagctggg 2520
aggtggcagg accaggattc aaacctatag agtttgactc cagtgtccaa ccttggtcac 2580
tggcctgcct tgctgagatc cctctgctga acaggaacat cttctggagt cattaagcag 2640
ctactggatg caggggacag ggtcagcagg gaagggctgt cacttgtaga tactgtgtcc 2700
tctgtctgga taggtgtgaa gtctcagagt gggtgctgca gcctggcctg atgggtccgt 2760
cctttccccc catcagaagc agaccctggc tgtagtcatc accctgaggg gtggaggact 2820
taagtcctag gcaacctcct gccccagcca cattcagcca caactcactc ctgtggccca 2880
cctggcacca tttataacag agccagtgtg gcccttctac tgtctctctg aatgctcccc 2940
ttttgagatg ggcctaggtt gtccaggttg gtctcaaact tggggtccca aatgatttca 3000
gaatctcagc ttcctgagta agtgggatca cacagtatgc accactgtgc gcagtggtcc 3060
ctgttccccg atagccaggc cggttgatac tcttagcccg attcaccttt ctcggttttc 3120
taagtcttca gttttctatc atgacgagac tctcctgggg gaggggatg gctgggtgct 3180
tctggaatgc ttggctgacc cggtctcctg attgaccggt tttaccataa tctcaaagaa 3240
gcctgacatc aacaccccag gctctgtcac acagccaggg atgagaactg gcttgagggt 3300

agcctcaagg aaggcctgtt ctagctgaac ttctcgcctc atggttatga agtgctgcgt 3360
gcacattttt accttccttg tgctcattct cgtctcctgt ggattttgag agcatgtagc 3420
tttccccttg gggactggcc tctaagagct cactggcagc accattgcct gccagtgtcc 3480
acccttcagc tctccatggt gcccatgggc tggcttcttg acagttatgg aggaagggcc 3540
agctagggct tgtatgctag gctggctaca ggctacctca aggctggtga caccaaggac 3600
tccttctcct gcccaggttg agtagatagg aagatacaca gtaattgtgc aagacagcac 3660
ctgtctcctc ttcacttgtg gtgggacact atctttctct ccccactgcc ttgagacccc 3720
ctggtgacag actccagcag acatcagaag cacctgcaga atgctgatgc agatagatac 3780
cccagggtgt ccttcctccc aaagatccct attttctggg cccagtgatg cttagcaagc 3840
tccaggggaa ttcttataca gtatgctggg atccctgctg tgagaaccac ttggtatagc 3900
tgcttatacc tctgacctgt ctccttccca ggaagtgaga gtcctgggcc ataaattccg 3960
aaatccggta gggattgctg cgggatttga caagcacggg gaagctgtag atggcctcta 4020
caaactgggc tttgggtttg tcgaggtagg aagtgtgact ccccagcctc aggaaggaaa 4080
ccccagaccc agagtgttcc gcctcccgga ggaccaagct gtcattaaca ggtaggtggt 4140
ggctcaatgt catagggaca tctcctcccc tgctgggatc tctgagatgg aacctgtttt 4200
gtgcttttct catatgatca gtggacagtc tgtcctttgg gatagtcagg agcacctttg 4260
aacacctgtt gtgtactagg cagctctcgc cccaaccttg ggaaacagct gttaggattt 4320
taccaggtat tcccactgag gctctgagag ctggtgctgg ttgcaaagaa cagcttggga 4380
aggcttgggc tgttgggctt cagtgtgagc ttttttacat tgttgctcta ttgcctttgt 4440
ccaatgttgg ctaacaggaa tataatgatc tcacatgtaa tttgaaatat tctaatgatg 4500
cattaaaaac tagtgaactt gataatacat ttataattat tatattttta attattatga 4560
tttaattata aacagtgtgt tctaaagtca ttttaacctg cagtcaatgt aaaaatcatt 4620
ggttaactat cgtcctcttt ttattggttt ccggtccccc aatgccttta cttctggttc 4680
ctctcacttg gccagggctg gtggccacaa gcttcagcag cgttggtact gtacaggtga 4740
cccttgcttt caatgaacag ggacatggta ttcaaatgta cagctgctct taggaggaga 4800
atccttcgac tgtatgaagc cttgcggttt gttgttctgt atagttagta taactgcaaa 4860
gggaagacct tcgtactttt tgctaggaga tttttggaga acctccttgt ggggattttg 4920
gcaggcctgt ggcagtgctt cctactgctt gtttcaggaa actgatttac aagtcataga 4980
tctttctgtt acattacagg cagggactga tgtctttagg actggccaga caaaatactt 5040
gtgtttctga tttggctgtt acaagtgact tcgggtctta ggatgatggt acttgggaca 5100
gggagtggtg agggacaggc acctgtgctc ttgggcatgt gcgaacttag ccttcttgct 5160
catatacaca gtgtgtgttc agtataggca tgctaacgga tgggtattta cacctgcaga 5220
cccacatgcc acaatccatg cagtgttgct ctggctgcaa gcaacaaagt gatgtaacca 5280
gatctcattt gttatcattc ttgtcactag cacaaaataa ctgacagcag gcagcttaag 5340
gaatggggtc aggtattttg gctcacagtt tgaggggaca cgccctcccg gtggcaggag 5400
cctgaggcag agggtcactc tgtacctaca gtgaggaagc agcaagggaa ggatgctggt 5460
gcttgggtct ctttctccgt cttgctcagc tggggtgtga atccatggtg ctgcccatgt 5520
ttgcggtggg tcttccctgc tccattcaac cttcccagaa acagtcttcc agacacacaa 5580
caggtgtgtt tccatggtga ctctaagtca catctagttg acaatgaagc ataaccagtg 5640

gtgagagcat ggaaatggtc tcaggtacgt tttccaaact gccacctttt aattccaccc 5700
cttacctgtg ggtttatgtg ctccaggtac ggattcaaca gccacgggct ctcagtggtg 5760
gaacacaggc tacgggccag acagcagaag cagaacaagc tcactgcagg taaactcagg 5820
tgttgtggga gggacttact aactctatta caaagaaaca tggggagggc atgggattca 5880
gcaataagaa acaaatgagc aaacaattaa aaccccacag aacaactcag gggattgtcc 5940
agcttctacc acagcctcaa aggtctcaac cagatggcat aattcagcaa aaccttgctg 6000
gtctctggca tccatggaac ctgaattgtg tcttaactta ggggcttgaa gatcagcaga 6060
gagcatgtgt ggagctaaga tgcgccccga gttcatcttc ccacatcccg ccctgctgct 6120
gtccttctgt tcactgtgta aatagtgtgt attagttctg gaagagctac agaagagaat 6180
agagttgtca cactcctgtc cttccactca ggggaccagc tgtcctcaaa tctcacttcg 6240
gaaacaacct ttgcttttgg tggattctca tggagacgct ccagtttgtc ctctgtggtc 6300
tgcatggctc tctgaagtgc attttggggt caaagccctg ggtggtggcc cccctcccca 6360
tgtctccctg tgtggcttct gcagtccatg gagatttttc tcctttgcct ctggaatgtc 6420
tttcaggagg tcttagtctc atttgatgtc cccatagtgt gacaattaag ccaaggactt 6480
ctgcatttat ttgaggagct aaggaagaga gggctgaagc atttgacgag tttagagggt 6540
gggaacagga aatgacaatg tttaaaaaaa cccctggttt tgacggaacc gggtctgcca 6600
gccctgtaga accttgaaca caatgtttgt ggtttgtggc gttctcctgc ctcctgcctt 6660
ccgtttcttc gttttaatgc cttctgtggg ctaggtttat tgccattgtc ctgtgtccac 6720
ccttcatcct cattctgtgc cctcacagtc actggagtga ggccaagttc tgtgtctttg 6780
ccctgcctac atgtgtctgc tgacagctag cagcctcata gaaacttttc atcagcacca 6840
tgcctaggaa ccctagtgga tagaagagac tgtgctttgt gtaaagtgta gttcagcctt 6900
cctgactcca gaactgtgac tgtgggcagg tgaccactaa tgaaaggctc agttgcctct 6960
tggaagccat actctcaatc cagtttactt gtgctaaagc ttacagtgat cctggcttgc 7020
tgggtgctag acttgaagct ttgagacctt gttctgtata tagtctaatc cctggctcca 7080
cccagcccac ttaggaaatt agttacacaa atcttacttt taagttgatg acccagaaga 7140
tgacgggttg tgagagatgg actgtgagaa gggggctagc aatacagtgg gggatgttgc 7200
ccgtgtcctc cctggcctgg tatgggtgag ctgacttggt gttctaggtc tggctggatt 7260
ggcagatgga cagcagcctg ggccactgac atactaggag ttgtaagaaa gttgagttgt 7320
aataaagatg aatccaggaa actcctttct gccaaagaga acatgagtct gaaagagcat 7380
ttttctagag gcttggcctt ttgagagtga caggggggcag gtgtgagtaa ttacacccag 7440
gccccaggag tgtcttgagg ctacagagat gtatcatcac cctaattata agttcttttc 7500
tcagagaaca agaaagattt attacacact tccatctact ttttaggcat gatagttgaa 7560
aacatttcct agtgttttcc tgtgtagctc aggctggcct cagacttaca gcaatcctcc 7620
tgcagactaa atttccatgt gtggcctcca gtgttttata cttttgtttt taatcatttc 7680
acatacagtc ccttgaccaa ggctcatgag attcaggttg ttcttgctga catgcccatc 7740
aatacctgcc tactctctct tttgttatct ctcaaaccac tgatctgtga atatagcaag 7800
tgtcattggg agtcatttta ttgctacata cttcaagaag agcagtagta tttgtttttt 7860
tccccatgtc cctgatttgt ctggactcag atccttggcc acccatgcag tcagtgttgg 7920
ggatgggttc catctcatgg attgggcctt aaatacaatc agattctggt tggttactcc 7980

cgcagctttg tgctactgtt tcactagtgc atccagggca ggtcatcatt gtagatcaaa 8040
agatgtgtag cggggttggt gtttaccttt ctcctttggt aacatgcaga atacctccca 8100
gtaccatgga caccaccaga gggatgaagg ctgtaggtag gcaccagctc gacttctccc 8160
tatttaataa cttgtgtagg tgttgtcttt agcaatagag ccttgtcagt tttcagagag 8220
caaccaatat ccttgacaat agcctgggtt gtttgggtat tctcatgggg ccccttggc 8280
caacaacttc tttgaaagtc tggtcaaatt cttcactaaa accatctggc actgggcatt 8340
ttttggttgg gaggctttta tgactgcttc tattttacta ggggttataa gtttgtttac 8400
attgcttatc cgatcttgat ttaactttag tagatggtat gtatcaagaa aattattcat 8460
ttattttcaa ttttccattt aggtagagta taggttttta aaacacatcc ctatgattct 8520
ttggatttcc ttggtgtctg ttgttatgtc actcttttca tctctaattt tgttaatttg 8580
gatctttcct ctttgccttt taattaattt ggctaagggt ttgtcaatct tactggtttt 8640
ctcaaagaac caactcttcg tttcattgat tctttgcatt atttttgtct gtttctattt 8700
cattgatttc agccctgagt ttgattattt cctgccatct actcctcctg ggtgtgactt 8760
cttgttgttc tagagctttc aggtgtgcta gtatgaaatc tctctaattt atgtaggcac 8820
ttagtgctac ataaagtttt gggtttttgt tttgttttga cctatttttc attcagtagt 8880
gagttgttca gtttcagttg ttcagtttcc atgagtttgt aagctttctg ttgtttttgt 8940
aggtgttgat attcagcttt aatctgtggt ggtatgatag ggtattattt cagttttctt 9000
gtatcttttg agacttgctt tatggcctag tatatggtca gttttggaga aagttccatg 9060
aggtgctgag aagaaacgtt ttgtgtttgg gtgaaatgtt ctataaatta ggtccatttg 9120
gtttaacaca tcatttagct ccatcatttc tttgttcagt ttttgtctgg atgacctgtc 9180
tattgtcgag agttggggag tatcaaagta tcccactatg tgtgtgtgtg tgcggagggg 9240
tcaatatgtg atttaagcta tagtagagtt tcttttatga acttggatgc ctttgtgctt 9300
ggtgcataga tgtttagaat ttcaatatcc tcttggtggg tttttccttt gatgagtatg 9360
tagtttcctt ccctatctat ctcttgatta gatttgattt gaaatctatt ctgtcatata 9420
ttaaaatggc ttcacccatt tgctttcttg tccatttgct tggaatatct ttttccatcc 9480
ttttactctg aggtgatatc tatccttgat gttaaagtat gtttcttgga ttcagttaaa 9540
gaatgaatcc tatttttgaa cccaattttt tagtctgtgt cttatttatt gggaaattga 9600
ggccactgat atcagtgttt gttgattcct gttatattat tgttatggcg taggcccctt 9660
ccctttgat ttgctggtct gagattattt attcaggctg aagttttcct tgtagtacct 9720
tctatcaagc tggatttgta gacagaaacc acttaagttt cattttattg tagattgtca 9780
ttctttcttc atctctgtga ttaaatgttt tgctggctat agtagtctgg gctggcatct 9840
gtggtagaat gtctgcccag gacctttgac ttttagagtc tcgattgaag tcaggggtta 9900
ttctaatagg tttgtctgcc gttatatgtt atctggtctt tctctattgt ggcttttggt 9960
attctttctt tgttctgtac attctgtttt ttgattatta tgtgttgtgg ggaatttatt 10020
tttggcccag tccgtttggt gttctatttg tttcttatac catgataggc acttccttct 10080
ttaggttagg taacttttca tctgtgattt tgttgaaaat attttctgtg cctttgacct 10140
gggtttcttc tccttttgct atccctgtta cttatagatt tttggtgttt tcatagtatc 10200
ctagatttcc tggatgtttt gtgcctggat tttgttttct ttctttttt gtagatttaa 10260
cattttcttt gactgcagta tccttgtctc ctatcttgtc ctcagtgctt gagactctgt 10320

cttccatttc ttgtatgatt ttggtgaggc ttgcttctaa gatttctgtt ctagttccta 10380
aatttttcat ttccagcttt acctcaattt gggttttctt tagcaattcc atttcctctt 10440
tcatgtgttg aacaattttc ttcatttcat tgcactgttt gtgttttcat taatgggttt 10500
attcatatct tctttaggga ccttgaacat attcataata gctattctga gagccttgtc 10560
ttatgcttcc ctgtattgca tttctcggag cctgctgtgg tagggttgct gggctctagt 10620
ggagacatgt cgttctggct gttactgggt ttttacactg gtgtctaggc gactgggttt 10680
gagaagattg taattctagg tgctgatatc tggtcttgtt tttgttgggg tgatgttcag 10740
ttccttggtt tctgttgccc ccccccctca gggggggtgt ggtaactgga ttggttgcct 10800
ggtagggaat gcttctgaga tcctgccaga accctgccac tggcagtctt gggtagaaag 10860
tgtttctagg tgttgggagc tgacactaat gattgaggat gggttagaag cagtggtggc 10920
gggagagtcc acaggaggag gagagctggg tgtgccacca gggtctgcac agaggcctgg 10980
gaatgagaac agagatgaag gtgaggcctc agcaggtagt ctgctacaag gttgggataa 11040
ggctgggaga ttggaacttg gggacaggag ggagagtgaa gatcgcagac ccatcccctg 11100
gccaggtggg ggaagcctgg aggagaagat ctgtgtgatc tgctggaaat gggtcccttа 11160
gtaacttctt gaagtttctt tgattttgag gctgctgttg ggggtcccct gtatgccaag 11220
catgtggtat atcactgaga tagaatctcc atagccctgc ttctttttg agactgggtc 11280
tcatatcggc caggttggcc ttgaactagc tatgttgacc ttgaactttt ccttacctat 11340
acctgagaac tgggattaca agtgcccatc acacccagct tcctattgtt tttgcttttt 11400
tcctagtatt taagcttctg gcttccccat taaaatttaa aagatgaaag gcttagtaca 11460
cgggaagcat ccttgaaggt gcacacactt gccatataga gaggatgaag tggttctaag 11520
tcatcaggca gcagccccag gatcagacag ttcacattct ccatcatctg gttcagggga 11580
gccccacctg tactctgaat gttgcctggg aaactgtggg gacacactct tgatatttac 11640
agatgggctg cctctgggaa taaacctggg gaagaataag acttcggagg atgctgctgc 11700
agactatgta gagggtgttc gtgtcctggg ccccttggct gactacctgg tggtgaatgt 11760
gtccagtccc aacactgctg gtctgaggag cctacaggga aaggctgagc tgcgccgcct 11820
gctggccaag gtgtgtcatt acaccatcac atgcctgttg tccttactcc ttttcattct 11880
tcaggtgaag attcaggaca actgaggaga aactgttctt cacagctggc ctaggagccc 11940
tcatcacaca ttttccaagt accctctcat gtctcacagc cccggtcata cacaatagac 12000
agttcactgc tttaaaacca caggcaagca gagcagagca ggcggggctc ccatgtatca 12060
ctctgtcccc agaactgtga atgctcagca cttgtgacac acctccttgt ttgttttcag 12120
gaacaaaatc aaaaccttg agcagttatc tcggcggggg gtgcgggggt gggggaattg 12180
ctggtgcttt agttgacctt aggtgaaaat gctggcctgc actgcggggc tatgggctgg 12240
gtccccatct ctggcttgtc aacctaggtg ctgcaggaga gggacgcttt gaagggagcg 12300
cagaagccag cagtgctggt gaagatcgcc cccgacctca cggcccagga caaggaggac 12360
attgccagtg tggcgagaga ggtttgagtt ggggtggtcc agggcagggt gggggtagcc 12420
ttcatcgtcc actgctgctg ggataacaca gaagggcatg attggtgact tcctctgtgt 12480
gaagtggaca gctggttgat tgtctgtcat tgtatagttc atctggtagc aaacagtgag 12540
tttgaaaatg tgtttggtga gtctttttct tgcttctgat ctgtcttcat ccagaaagtc 12600
tgaggcctgt gctagtctct gccagtctca cctgggactt agaatggtgt ctgtcccttt 12660

ccagcttgtg taaacaccag gcttctctgg ctaaaaaggt agtaggaaca cagtctgctg 12720
ttctggactt cagtcttgtt ctactgtgta ctccctgaga tactcacaga cagcttgttc 12780
taagggtcaa actctgtgta ggcactgtga tgggttcagc aggagatgct gctgtgtctt 12840
cagcattgag aggctaattc tgatggcttc tccaatcaag atgtaggtga ggcctgtgag 12900
ggtcttgctc tgcagagctg gcccctggcc tggtggctgc ttcaatcctc aaaagacagt 12960
ttccttgagt acttcagatc catggcttaa ggctcttttt ctgtcttgtg ctgcagctgg 13020
gcattgatgg attaattgtc acaaacacca cagtgagtcg cccgactggc ctccaaggtg 13080
ctctgcgttc tgagatggga ggactgagcg ggaagccact ccgagatctg tcgacccaga 13140
ccatccggga gatgtacacc ctcactcaag gtaaggcttt tttgtttgtt tgtttgaggc 13200
aggatttctc tgtttaacac ctctggctgt cctggaactc acttggtaga ccaggctggc 13260
ctggaactca cagcttccct agtgctggga ttaaaggcat gtgccaccat tgcctggcta 13320
aggcaagact tctttggaca aatgtgaggt cctggatctt ccctcattca ctgtgtttgc 13380
tgagaactct ggttctgccc tcatcggctg tgtttgctgg gactgaggcc tgatggagcc 13440
ctgggtcttt agccctccct tcccggcctt gctatgtgct tctctccagg caggattccc 13500
attatcgggg ttggtggtgt gagcagtggg caagatgcgc tggagaagat ccaggcaggg 13560
gcctccctgg tgcagctgta cacggccctc accttcctgg ggccacccgt cgtggtcagg 13620
gtcaagcgtg agctggaggc acttctaaag tgagtagggt tcgatgcagc tgagacgtag 13680
aaagtgacac ttgtcatcag tctattgtgt actcccagag ggccggaggg aacactgagg 13740
gcatggtggg acgatttctc tgctgcagct ttggccaagg acaaacagtg ccagaggaat 13800
tcagaatgct tctgaggcag ggctcattac aaggcaggac ttgccacttg cccaggggct 13860
gggcatggag gatgaagtag taatttacat tgactcagtg tctggaagct gcaggttata 13920
aagtcacttc ccttcctgca cagaaggcct ggctgtacat atgtgcaggg gcctgggtga 13980
gggcagagta gcagtggttg taaggtgtgt tgggtgggac ggtgtggtaa gcggtgtgct 14040
catggtgagt gtgggcttcc ttaggacagg ctatttgttt tctgtccaga gagcggggtt 14100
ttaacacagt cacagaagcc attggagcag atcatcggag gtgacggttc ctgccagatg 14160
ccccatccag aacgtgccca ccaactcaag caagccttgt ggctgcatca taagaggaag 14220
atctgtctca agctatgtcc cttgactgtg tgacctggct ggactgcata agccagtcac 14280
ggttatcact agacagtaaa ggctttctct aatgagacca tgaactctac agtcactttc 14340
tggatctaag tcctgggatc cctcagtatt ataaggacat tggctctttg ggaggaaaaa 14400
tcatggagaa aataaagcca tttcaatctg ttttcaa 14437

<210> 28
<211> 395
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> amino acid sequence of human DHODH G202A
<400> 28

Met Ala Trp Arg His Leu Lys Lys Arg Ala Gln Asp Ala Val Ile Ile
1 5 10 15

Leu Gly Gly Gly Gly Leu Leu Phe Ala Ser Tyr Leu Met Ala Thr Gly
20 25 30
Asp Glu Arg Phe Tyr Ala Glu His Leu Met Pro Thr Leu Gln Gly Leu
35 40 45
Leu Asp Pro Glu Ser Ala His Arg Leu Ala Val Arg Phe Thr Ser Leu
50 55 60
Gly Leu Leu Pro Arg Ala Arg Phe Gln Asp Ser Asp Met Leu Glu Val
65 70 75 80
Arg Val Leu Gly His Lys Phe Arg Asn Pro Val Gly Ile Ala Ala Gly
85 90 95
Phe Asp Lys His Gly Glu Ala Val Asp Gly Leu Tyr Lys Met Gly Phe
100 105 110
Gly Phe Val Glu Ile Gly Ser Val Thr Pro Lys Pro Gln Glu Gly Asn
115 120 125
Pro Arg Pro Arg Val Phe Arg Leu Pro Glu Asp Gln Ala Val Ile Asn
130 135 140
Arg Tyr Gly Phe Asn Ser His Gly Leu Ser Val Val Glu His Arg Leu
145 150 155 160
Arg Ala Arg Gln Gln Lys Gln Ala Lys Leu Thr Glu Asp Gly Leu Pro
165 170 175
Leu Gly Val Asn Leu Gly Lys Asn Lys Thr Ser Val Asp Ala Ala Glu
180 185 190
Asp Tyr Ala Glu Gly Val Arg Val Leu Ala Pro Leu Ala Asp Tyr Leu
195 200 205
Val Val Asn Val Ser Ser Pro Asn Thr Ala Gly Leu Arg Ser Leu Gln
210 215 220
Gly Lys Ala Glu Leu Arg Arg Leu Leu Thr Lys Val Leu Gln Glu Arg
225 230 235 240
Asp Gly Leu Arg Arg Val His Arg Pro Ala Val Leu Val Lys Ile Ala
245 250 255
Pro Asp Leu Thr Ser Gln Asp Lys Glu Asp Ile Ala Ser Val Val Lys
260 265 270
Glu Leu Gly Ile Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Thr Thr Val Ser Arg
275 280 285
Pro Ala Gly Leu Gln Gly Ala Leu Arg Ser Glu Thr Gly Gly Leu Ser
290 295 300
Gly Lys Pro Leu Arg Asp Leu Ser Thr Gln Thr Ile Arg Glu Met Tyr
305 310 315 320
Ala Leu Thr Gln Gly Arg Val Pro Ile Ile Gly Val Gly Gly Val Ser

325 330 335
Ser Gly Gln Asp Ala Leu Glu Lys Ile Arg Ala Gly Ala Ser Leu Val
340 345 350
Gln Leu Tyr Thr Ala Leu Thr Phe Trp Gly Pro Pro Val Val Gly Lys
355 360 365
Val Lys Arg Glu Leu Glu Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gly Phe Gly Gly
370 375 380
Val Thr Asp Ala Ile Gly Ala Asp His Arg Arg
385 390 395

<210> 29
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> corresponding piece of DNA for generating GS gRNA
<400> 29
gagtatgtga agactttg 18

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> corresponding piece of DNA for generating GS gRNA
<400> 30
ccatctttat tctcatgggg 20

<210> 31
<211> 5562
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus
<220>
<221> misc_feature
<222> (4467)..(4484)
<223> target of GS-1 gRNA
<220>
<221> misc_feature
<222> (4611)..(4630)
<223> target of GS-2 gRNA
<400> 31
accttccacc atggccacct cagcaagttc ccacttgaac aaaaacatca agcaaatgta 60

cttgtgcctg ccccagggtg agaaagtcca agccatgtat atctgggttg atggtactgg 120
agaaggactg cgctgcaaaa cccgcaccct ggactgtgag cccaagtgtg tagaaggtga 180
gcatgggcag gagcaggaca tgtgcctgga agtgggcaag cagcctgaga tttgaccttc 240
cttctgtttt gtttgcaaag tctttcaaaa gcaggtctct tcaggcctca gtcagtcacc 300
cgtaagctgc cgagtagtct ggaggcatag aaaacaatgg aggcctttat ttagatggaa 360
tcttgtgtgt gctggtacac tgaagaaaaa tattgggtca tatttgtagg gggtgggagg 420
ttggagtatt gctaacctag ccaaccccag gaacctagtt tgaaagacct gtaactagaa 480
tatgctatca agtttataga gcagtggttc tcaacctttc aaatgcttta cacttgaata 540
caactcctca tgttctggtg attaccccca tcccaaccat tgctaacttc ttaactgaaa 600
tttcactact gctacgaatc ataatgtatc tgtgtttttg gatggtctta ggtgacccct 660
gtgaaagggt tgtgagacca tcctcaaagg ggttgtgacc tacaggttga gacccttttg 720
agtgctgtgt ttattagtat ttatacagtg gaattctggg tgcaaagcac atgctccaaa 780
gtagtttctc tgggactggc catttgtttt cagatgggga tacttttaaa aacttgcaaa 840
ggaaccaaaa aaaaaaaaaa tgcagaaaaa aggaggggggg ggagggcacg cctttaatcc 900
cagtacttgg gaggcagagg caggcggatc tctgtgagtt gaagcccagc ctggtctaca 960
agagctagtt ccaggacagc ctccaaagcc acagagaaac cctgtctcaa aacaaacaaa 1020
cacacaaaaa aattaaaaaa aaaaaaaaac tttcaaagga gacctgtttt attttagttg 1080
tggcctttgt tttggtagga agggcagcta gtttaggatg agtttttatt attctaagat 1140
gttgccgttt gagtgaatga atgaccagat gacagcatat aacatgtact tgttacttgg 1200
cagaagtagg taggtcgttc tgtttctgcc ttcagctcat aggtaactgg ggagacaaac 1260
tggccccaaa acaaggaaaa ggaacaagtg gtaggagagc aactgtttcc tcatctacaa 1320
gagcacagcc tgagctacaa cagtcaggcc cggagaggga tgagagaagg gaggggatga 1380
ggtggcctag tgagggagtc agttttgctc tgtgccatga gtgtctcact cactggaagt 1440
ggtgtcagaa tgactggtgc acagtagact tacagagagg actcatctgt ttgttgcttg 1500
ggtggttctt gtgatgcagt gctcttggga acctcagaag gaggaacata gggataggtg 1560
ggcatagaca tcaggttgtc cctaattaat gatgatacat ttacatacat gccactcaga 1620
agacacagta gattttcagt gatggaaata tgatgagagg ctagctgtct tgtgtgtata 1680
tttttaataa atttttaata aatttcatgt gtgtgagtca gtgcgtgtgt gcgtttgctc 1740
gcccagtgct gtgccagcag aggtctgagg agggtgtgag aatcccagga actgaagtta 1800
acagttgtgg ttaagagtac ttatcactcg ttaccagcac ctacatggtg gctcacaacc 1860
atctgtaact ccaatttcag gggctccaac cccctcttct gcaggcatac acttgcacag 1920
atatacatgc aagtaaaaca cccctacaca cataaaaata aatacgtctt cttaaaagtt 1980
aattttccat ctttatttgg cccagagtta cctgagtgga attttgatgg ctctagtacc 2040
tttcagtctg agggctccaa cagtgacatg tatctcagcc ctgttgccat gtttcgggac 2100
cccttccgca gagatcccaa caagctggtg ttctgtgaag ttttcaagta caaccggaag 2160
cctgcaggtg tgtatggggt gggcgtgaat gtcttaagaa tctagggatg gatgatcaga 2220
tgtccatcct tctaccctga acttgcctgc tgaaaaacag tgtggtccgc ccctccatgg 2280
tccctttttat tggttgtata aacagtgttg aatcttccat ctgtttgctg ataggggtcc 2340
ccagtgacag tcttgatctg cttctacatt taaaaagctg taattcgtac ttaagcgttt 2400

tggggtttaa ctactagatc tgccatttat tgccagtgac cttggcatac tttgccccat 2460
gcttctattt tgctgaatta tgtgtagaga gagacgagac agagcatgct tgaactgagg 2520
gcgtactgtg ctctgtgtgg aagtcaaccg acaacctgtg gaatcagttc tctcctgctg 2580
tatttgtaga ttctggaggt ggaactcagg ttgccatgag cattatgatt cctggctaag 2640
ctgtttgccc atgaagcctt ctgtacctgc tcatagaatt ttgtttatgc cgtgctatcc 2700
atactcagtt ttcagatagc ttcttaaacc cagggaactc taatttacat aaactctctt 2760
ccagtactgc cagtaaggct tggtggccct ataccttcag tacctctgtt ttgaaaagga 2820
agtattgttg gtcaagggta tgtacctcag catggcagcc atggggttcc tggctgtgcc 2880
gcttgcccta taacctgggc acgtcaccaa acaccctctc tcagggcttc attttctcat 2940
ttgtgaaagt gaagattgct aacactcatc tcaaactcag ttaaatgata aattgctttt 3000
ctagcttggg aattgttttc agttacactc acctctccct cgctttctct ctcttttttg 3060
taccagccaa tactgtgtaa tttagcactc agactcacct ggaatgtaaa cctaatggac 3120
aaattattct cagtaaaatg acagctctgg ccttaagtgc ctacgaaact agggaatacg 3180
tttgacaagc aggagcagct gtcttgtgaa tagagggtgg aagtgtctgg catgtggtac 3240
ttggaaagtg gccagcgtgc agataggatg aacacttgtt ttgctctcac tccattccca 3300
tgagatttca tagctgactt taattataaa aagtctctca gccttttcct gcaaatgtac 3360
tatcattgct tcttcacagt ggttgggcct gagtaggtcc agcctatgat gacttcagct 3420
gtgtaagagt tgaggacact actccttaca gcatgttgat gctttattcc tagagaccaa 3480
tttaaggcac tcgtgtaaac ggataatgga catggtgagc aaccagcacc cctggtttgg 3540
aatggaacag gagtatactc tgatgggaac agatgggcac ccttttggtt ggccttccaa 3600
tggctttcct gggccccaag gtaagttccc caggtgaaat aaaagcttcc tccccataag 3660
ttcttactgt ccagagacag gagcagctcc caaatcagca aacagactgg cagctgaaaa 3720
taacagactg tccttgcatc cctcaaatcc agatgtgctt tgaatttaaa gtgacaggat 3780
ggtgatgaga tggctcagtg ggtaaaggtg cttgccacca ggcttgacag cccgagttta 3840
tccctgagac ccatataagt tattctctga ccatctgcac atgcatgcat atacaaaaag 3900
tgaaaagcta ttcagagtgg gcagtagttc taccaaggct acagcaaaga ggaaagacct 3960
agcctcctac ctgcaggtga agacaggatg tgcgaaagca agtcttagga ccttgtcatt 4020
ttctggcttt ggggggttat ggactctgat tcttcactga ttgctcttga ttctccttca 4080
ggtccgtatt actgtggtgt gggcgcagac aaagcctatg gcagggatat cgtggaggct 4140
cactaccgcg cctgcttgta tgctggggtc aagattacag gaacaaatgc tgaggtcatg 4200
cctgcccagg taaatggcac tattctgttc cttttcctcc cctctgaaga cttggcacat 4260
ggggactttg gttaacaagg gtgatgactt aaaagtggtt cagggtagag gtaagtagaa 4320
caagctagga gcttgagttg gcctgaacag ttagttggcc ttattctaaa ggtcaacatg 4380
ttctttctag tgggaattcc aaataggacc ctgtgaagga atccgcatgg gagatcatct 4440
ctgggtggcc cgtttcatct tgcatcgagt atgtgaagac tttggggtaa tagcaacctt 4500
tgaccccaag cccattcctg ggaactggaa tggtgcaggc tgccatacca actttagcac 4560
caaggccatg cgggaggaga atggtctgaa gtaagtagct tcctctggag ccatctttat 4620
tctcatgggg tggaagggct ttgtgttagg gttgggaaag ttggacttct cacaaactac 4680
atgccatgct cttcgtgttt gtcataagcc tatcgttttg tacccgttgg agaagtgaca 4740

gtactctagg aatagaatta cagctgtgat atgggaaagt tgtcacgtag gttcaagcat 4800
ttaaaggtct ttagtaagaa ctaaatacac atacaagcaa gtgggtgact taattcttac 4860
tgatgggaag aggccagtga tgggggtctt cccatccaaa agataattgg tattacatgt 4920
tgaggactgg tctgaagcac ttgagacata ggtcacaagg cagacacagc ctgcatcaag 4980
tatttattgg tttcttatgg aactcatgcc tgctcctgcc cttgaaggac aggtttctag 5040
tgacaaggtc agaccctcac ctttactgct tccaccaggc acatcgagga ggccatcgag 5100
aaactaagca agcggcaccg gtaccacatt cgagcctacg atcccaaggg gggcctggac 5160
aatgcccgtc gtctgactgg gttccacgaa acgtccaaca tcaacgactt ttctgctggt 5220
gtcgccaatc gcagtgccag catccgcatt ccccggactg tcggccagga gaagaaaggt 5280
tactttgaag accgccgccc ctctgccaat tgtgacccct ttgcagtgac agaagccatc 5340
gtccgcacat gccttctcaa tgagactggc gacgagccct tccaatacaa aaactaatta 5400
gactttgagt gatcttgagc ctttcctagt tcatcccacc ccgccccagc tgtctcattg 5460
taactcaaag gatggaatat caaggtcttt ttattcctcg tgcccagtta atcttgcttt 5520
tattggtcag aatagaggag tcaagttctt aatccctata ca 5562

<210> 32
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> GS1_F primer
<400> 32
acactctttc cctacacgac gctcttccga tcttggcctt attctaaagg tcaaca 56

<210> 33
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> GS1_R primer
<400> 33
gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctcattct cctcccgcat gg 52

<210> 34
<211> 1417
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus
<400> 34
ccgagccgag aatgggagta gagccgactg cttgattccc acaccaatct cctcgccgct 60
ctcacttcgc ctcgttctcg tggctcgtgg ccctgtccac cccgtccatc atcccgccgg 120
ccaccgctca gagcaccttc caccatggcc acctcagcaa gttcccactt gaacaaaaac 180
atcaagcaaa tgtacttgtg cctgccccag ggtgagaaag tccaagccat gtatatctgg 240

gttgatggta ctggagaagg actgcgctgc aaaacccgca ccctggactg tgagcccaag 300
tgtgtagaag agttacctga gtggaatttt gatggctcta gtacctttca gtctgagggc 360
tccaacagtg acatgtatct cagccctgtt gccatgtttc gggacccctt ccgcagagat 420
cccaacaagc tggtgttctg tgaagttttc aagtacaacc ggaagcctgc agagaccaat 480
ttaaggcact cgtgtaaacg gataatggac atggtgagca accagcaccc ctggtttgga 540
atggaacagg agtatactct gatgggaaca gatgggcacc cttttggttg gccttccaat 600
ggctttcctg ggccccaagg tccgtattac tgtggtgtgg gcgcagacaa agcctatggc 660
agggatatcg mggaggctca ctaccgcgcc tgcttgtatg ctggggtcaa gattacagga 720
acaaatgctg aggtcatgcc tgcccagtgg gaattccaaa taggaccctg tgaaggaatc 780
cgcaggagat catctctggg tggcccgttt catcttgcat cgagtatgtg aagactttgg 840
ggtaatagca acctttgacc ccaagcccat tcctgggaac tggaatggtg caggctgcca 900
taccaacttt agcaccaagg ccatgcggga ggagaatggt ctgaagcaca tcgaggaggc 960
catcgagaaa ctaagcaagc ggcaccggta ccacattcga gcctacgatc ccaaggggg 1020
cctggacaat gcccgtggtc tgactgggtt ccacgaaacg tccaacatca acgacttttc 1080
tgctggtgtc gccaatcgca gtgccagcat ccgcattccc cggactgtcg gccaggagaa 1140
gaaaggttac tttgaagacc gccgcccctc tgccaattgt gacccctttg cagtgacaga 1200
agccatcgtc cgcacatgcc ttctcaatga gactggcgac gagcccttcc aatacaaaaa 1260
ctaattagac tttgagtgat cttgagcctt tcctagttca tcccaccccg ccccagctgt 1320
ctcattgtaa ctcaaaggat ggaatatcaa ggtcttttta ttcctcgtgc ccagttaatc 1380
ttgcttttat tggtcagaat agaggagtca agttctt 1417

<210> 35
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> GS F primer
<400> 35
acctttgacc ccaagc 16

<210> 36
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> GS R primer
<400> 36
cgtcgccagt ctcattg 17

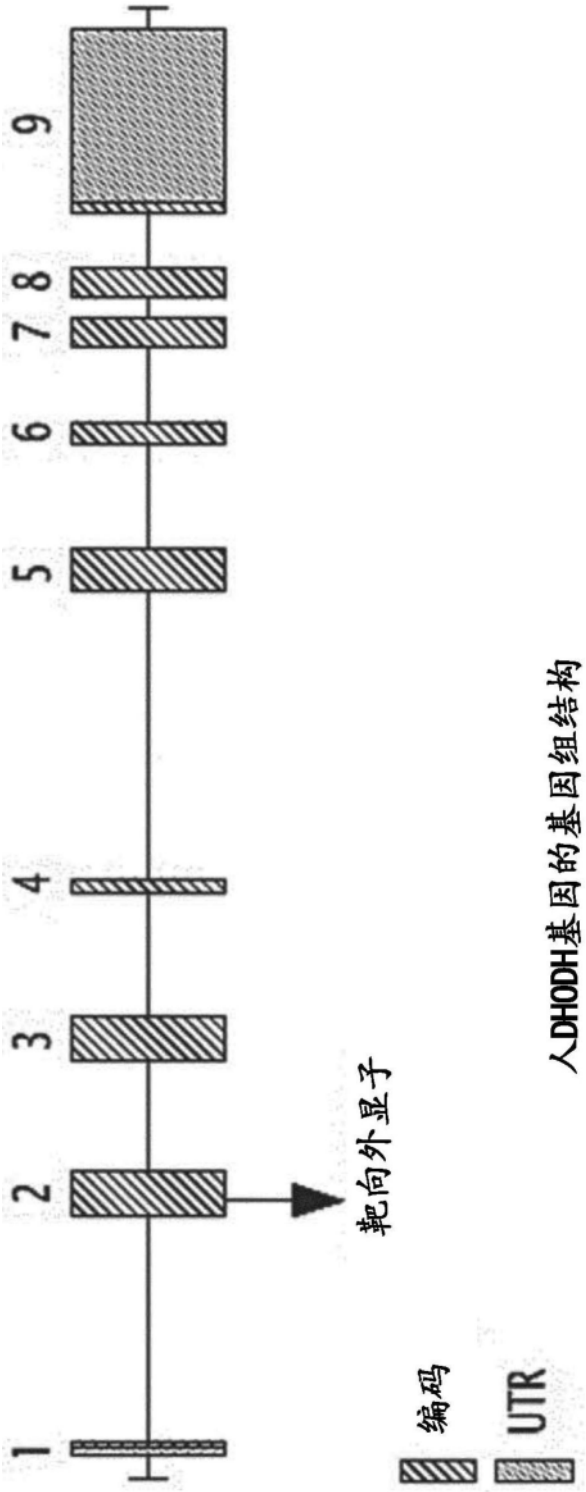


FIG.1

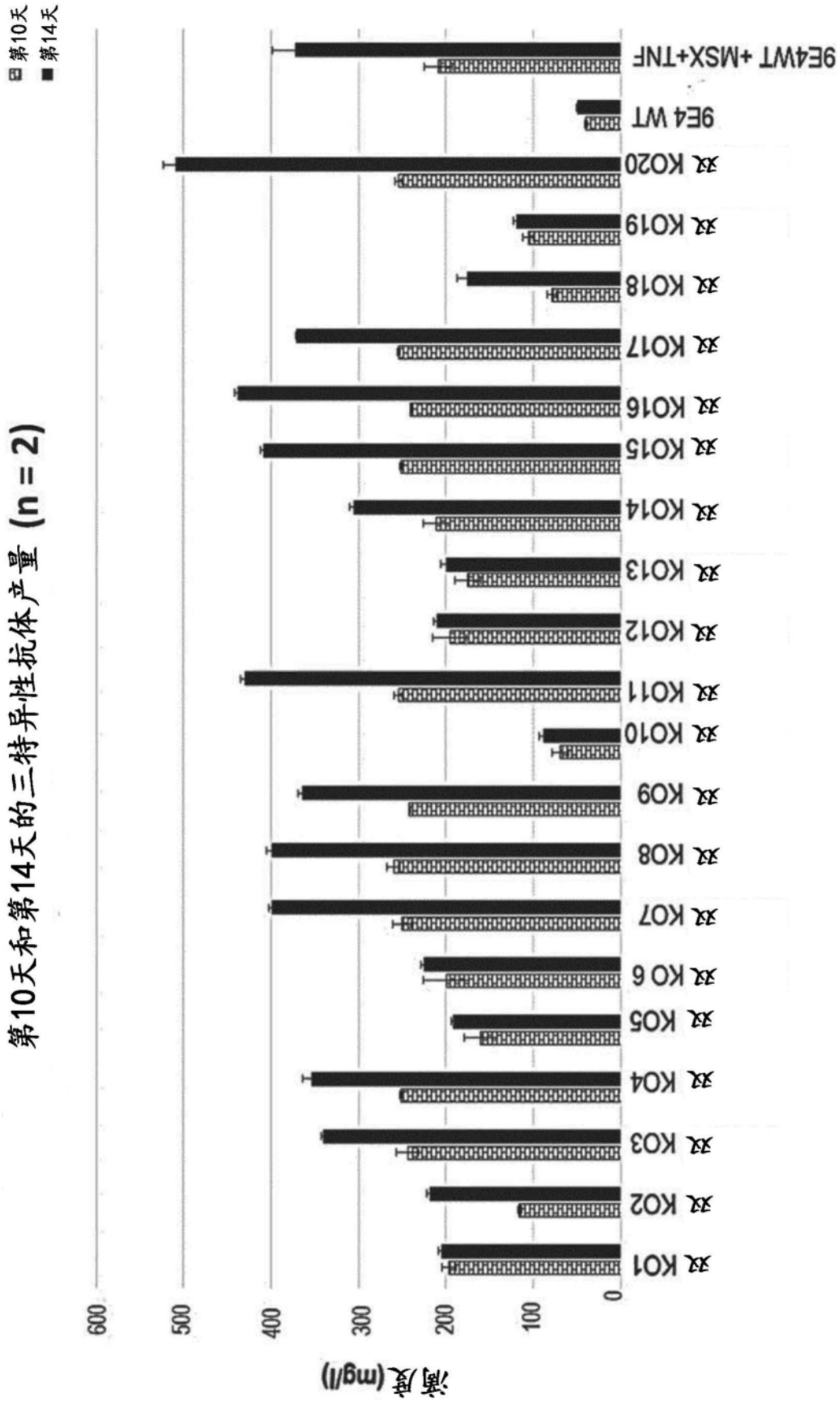

第10天和第14天的三特异性抗体产量 (n = 2)
第10天
第14天
滴度 (mg/l)
0
100
200
300
400
500
600
双 KO1
双 KO2
双 KO3
双 KO4
双 KO5
双 KO 6
双 KO7
双 KO8
双 KO9
双 KO10
双 KO11
双 KO12
双 KO13
双 KO14
双 KO15
双 KO16
双 KO17
双 KO18
双 KO19
双 KO20
9E4 WT
9E4WT +MSX+TNF

FIG.2