



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117396599 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 12

(21) 申请号 202280036820.9

(22) 申请日 2022.05.20

(30) 优先权数据

63/191,781 2021.05.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/030345 2022.05.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/246259 EN 2022.11.24

(71) 申请人 基因泰克公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·米萨吉 B·M·卡斯特拉诺

唐丹明 A·J·阿什肯纳兹

B·R·斯内德科

(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.

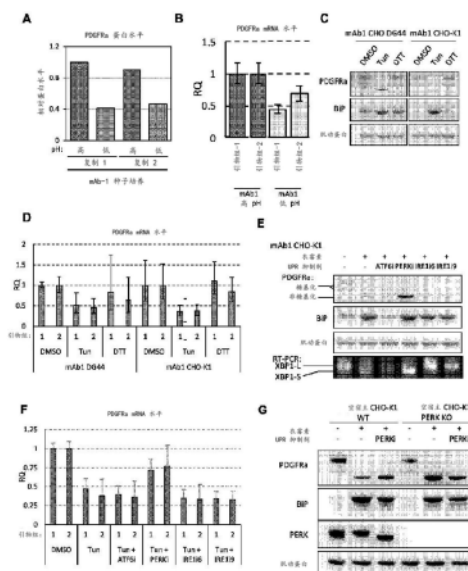
C12N 5/10 (2006.01)

(54) 发明名称

用于生产目的重组产物的经修饰的细胞

(57) 摘要

本公开涉及经修饰以减少或消除某些内源性细胞蛋白的表达的细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞),以及在目的重组产物例如重组蛋白、重组病毒颗粒或重组病毒载体的生产中使用此类细胞的方法。这些修饰经过专门选择以生成工程化细胞,所述工程化细胞在几个关键领域具有期望的特质,包括改进的细胞培养性能(例如,更高的活力和产物滴度)。



1. 一种经修饰的细胞,其中所述细胞经修饰以相对于两种或更多种内源性蛋白在未经修饰的细胞中的表达而减少或消除所述内源性蛋白的表达,其中:

(a) 具有减少或消除的表达的所述内源性蛋白中的一种或多种内源性蛋白在细胞培养期间促进所述经修饰的细胞的细胞凋亡;并且

(b) 具有减少或消除的表达的所述内源性蛋白中的一种或多种内源性蛋白调节未折叠蛋白反应 (UPR)。

2. 一种经修饰的细胞,其中所述细胞经修饰以相对于两种或更多种内源性蛋白在未经修饰的细胞中的表达而减少或消除所述内源性蛋白的表达,其中一种或多种内源性蛋白选自以下项组成的内源性蛋白组:细胞凋亡调节因子BCL2关联X蛋白 (BAX);和BCL2拮抗剂/杀伤因子1 (BAK);并且所述内源性蛋白中的一种内源性蛋白是蛋白激酶R样ER激酶 (PERK)。

3. 根据权利要求2所述的经修饰的细胞,其中BAX、BAK和PERK的表达被减少或消除。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞经工程化以表达目的重组产物。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞由表达目的重组产物的重组细胞生成。

6. 根据权利要求4或5所述的经修饰的细胞,其中所述一种或多种内源性蛋白不具有可检测的表达。

7. 根据权利要求4或5所述的经修饰的细胞,其中所述目的重组产物包括病毒载体。

8. 根据权利要求4或5所述的经修饰的细胞,其中所述目的重组产物包括病毒颗粒。

9. 根据权利要求4或5所述的经修饰的细胞,其中所述目的重组产物包括重组蛋白。

10. 根据权利要求9所述的经修饰的细胞,其中所述重组蛋白为抗体或抗体-融合蛋白或其抗原结合片段。

11. 根据权利要求10所述的经修饰的细胞,其中所述抗体为多特异性抗体或其抗原结合片段。

12. 根据权利要求10所述的经修饰的细胞,其中所述抗体由单个重链序列和单个轻链序列或其抗原结合片段组成。

13. 根据权利要求10至12中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述抗体为嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。

14. 根据权利要求10至13中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述抗体为单克隆抗体。

15. 根据权利要求4或5所述的经修饰的细胞,其中所述目的重组产物由在一个或多个靶向位置处整合在细胞基因组中的外源性核酸序列编码。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞不表达可检测的BAX、BAK和PERK。

17. 根据权利要求1至15中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞表达降低水平的BAX、BAK和PERK。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞为经修饰的动物细胞。

19. 根据权利要求18中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的动物细胞为经修饰的Sf9、CHO、HEK 293、HEK-293T、BHK、A549或HeLa细胞。

20. 一种组合物,其包含根据权利要求1至19中任一项所述的经修饰的细胞。
21. 一种生产目的重组产物的方法,所述方法包括:
 - (a) 培养根据权利要求1至19中任一项所述的经修饰的细胞;以及
 - (b) 从培养基或所述经修饰的细胞中回收所述目的重组产物,其中表达所述目的重组产物的所述经修饰的细胞表现出BAX、BAK和PERK的减少或消除的表达。
22. 一种用于生产经修饰的细胞的方法,所述方法包括:
 - (a) 在细胞中施加核酸酶辅助的和/或靶向核酸的BAX、BAK和PERK以减少或消除所述内源性基因的表达,以及
 - (b) 选择所述经修饰的细胞,其中与未经修饰的细胞相比,所述内源性基因的表达已减少或消除。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中在引入编码目的重组产物的外源性核酸之前或在引入编码所述目的重组产物的外源性核酸之后进行修饰。
24. 根据权利要求22至23中任一项所述的方法,其中核酸酶辅助的基因靶向系统选自由CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1、锌指核酸酶、TALEN或兆核酸酶组成的组。
25. 根据权利要求22至23中任一项所述的方法,其中基因表达的减少由RNA沉默介导。
26. 根据权利要求25所述的方法,其中RNA沉默选自由以下项组成的组:siRNA基因靶向和敲减;shRNA基因靶向和敲减;以及miRNA基因靶向和敲减。
27. 根据权利要求21和23至26中任一项所述的方法,其中所述目的重组产物由核酸序列编码。
28. 根据权利要求21和23至27中任一项所述的方法,其中所述核酸序列在一个或多个靶向位置处整合在所述经修饰的细胞的细胞基因组中。
29. 根据权利要求21和23至27中任一项所述的方法,其中由所述经修饰的细胞表达的所述目的重组产物由随机整合在所述经修饰的细胞的细胞基因组中的核酸序列编码。
30. 根据权利要求21和23至29中任一项所述的方法,其中所述目的重组产物包括病毒载体。
31. 根据权利要求21和23至29中任一项所述的方法,其中所述目的重组产物包括病毒颗粒。
32. 根据权利要求21和23至29中任一项所述的方法,其中所述目的重组产物包括重组蛋白。
33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述重组蛋白为抗体或抗体-融合蛋白或其抗原结合片段。
34. 根据权利要求33所述的方法,其中抗体为多特异性抗体或其抗原结合片段。
35. 根据权利要求33所述的方法,其中所述抗体由单个重链序列和单个轻链序列或其抗原结合片段组成。
36. 根据权利要求33至35中任一项所述的方法,其中所述抗体为嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。
37. 根据权利要求33至35中任一项所述的方法,其中所述抗体为单克隆抗体。
38. 根据权利要求21至37中任一项所述的方法,所述方法包括纯化目的产物,收获所述

目的产物和/或配制所述目的产物。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述经修饰的细胞为经修饰的动物细胞。

40. 根据权利要求21至38中任一项所述的方法,其中所述经修饰的动物细胞为经修饰的Sf9、CHO、HEK 293、HEK 293T、BHK、A549或HeLa细胞。

41. 根据权利要求1至40中任一项所述的经修饰的细胞,其中与包含野生型Bax、Bak和PERK基因中的每一者的多核苷酸和功能性拷贝的对应的分离的动物细胞相比,所述经修饰的细胞具有更高的比生产率。

42. 根据前述权利要求中任一项所述的经修饰的细胞,其中与包含Bax、Bak和PERK基因中的每一者的功能性拷贝的对应的分离的动物细胞相比,所述经修饰的细胞对细胞凋亡更具抗性。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞用于分批补料、灌注、强化过程、半连续灌注或连续灌注细胞培养过程。

用于生产目的重组产物的经修饰的细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年5月21日提交的美国临时申请号63/191,781的优先权,该美国临时申请的内容全文以引用方式并入,并且要求其优先权。

技术领域

[0003] 本公开涉及经修饰以减少或消除某些内源性蛋白的表达的细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞),以及在目的重组产物例如重组蛋白、重组病毒颗粒或重组病毒载体的生产中使用此类细胞的方法。这些修饰生成的工程化细胞在关键领域具有意想不到的协同特质,包括改善的活力和更高的产物滴度。

背景技术

[0004] 由于细胞生物学和免疫学的飞速发展,针对各种疾病(包括癌症、心血管疾病和代谢疾病)开发新型治疗性重组产物(例如,重组蛋白、重组病毒颗粒和重组病毒载体)的需求不断增加。这些候选生物药物通常通过能够表达目的产物的商业化细胞系进行生产。例如,CHO细胞已广泛用于生产单克隆抗体。

[0005] 由细胞表达某些蛋白质对细胞培养性能有害。例如,促进细胞凋亡的蛋白质可能减少培养物的活力和生产率。此外,在生物制药生产过程中,重组产物表达可能会产生引发细胞适应的高蛋白稳态负担。例如,细胞经常利用未折叠蛋白反应(UPR)来减轻增加的蛋白稳态负担。然而,UPR最终可能导致整体蛋白质翻译下降,从而对目的重组产物实现的滴度产生负面影响。

[0006] 因此,本领域需要用于生产目的重组产物(例如,重组蛋白、重组病毒颗粒或重组病毒载体)的更有效的方法、经修饰的细胞和组合物,其中表达目的重组产物的经修饰的细胞表现出改善的与涉及目的产物生产的细胞活力和滴度相关的属性。此类经改进的细胞可以通过修饰细胞的基因组(即细胞系工程化)来实现。

发明内容

[0007] 在某些实施例中,本公开提供一种经修饰的细胞,其中该细胞经修饰以相对于两种或更多种内源性蛋白在未经修饰的细胞中的表达而减少或消除该内源性蛋白的表达,其中:(a)具有减少或消除的表达的该内源性蛋白中的一种或多种内源性蛋白在细胞培养期间促进该经修饰的细胞的细胞凋亡;并且(b)具有减少或消除的表达的该内源性蛋白中的一种或多种内源性蛋白调节未折叠蛋白反应(UPR)。

[0008] 在某些实施例中,本公开涉及一种经修饰的细胞,其中该细胞经修饰以相对于两种或更多种内源性蛋白在未经修饰的细胞中的表达而减少或消除该内源性蛋白的表达,其中该一种或多种内源性蛋白选自由以下项组成的内源性蛋白组:细胞凋亡调节因子BCL2关联X蛋白(BAX);和BCL2拮抗剂/杀伤因子1(BAK);并且内源性蛋白中的一种内源性蛋白是蛋白激酶R样ER激酶(PERK)。

[0009] 在某些实施例中,本公开涉及一种经修饰的细胞,其中BAX、BAK和PERK的表达被减少或消除。

[0010] 在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中工程化经修饰的细胞以表达目的重组产物。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中从表达目的重组产物的重组细胞生成经修饰的细胞。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中一种或多种内源性蛋白不具有可检测的表达。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中目的重组产物包括病毒载体。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中目的重组产物包括病毒颗粒。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中目的重组产物包括重组蛋白。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中重组蛋白为抗体或抗体-融合蛋白其抗原结合片段。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中抗体为多特异性抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中抗体由单个重链序列和单个轻链序列或其抗原结合片段组成。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中抗体为嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中抗体为单克隆抗体。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中目的重组产物由在一个或多个靶向位置处整合在细胞基因组中的外源性核酸序列编码。

[0011] 在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中经修饰的细胞不表达可检测的BAX、BAK和PERK。在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中经修饰的细胞表达减少水平的BAX、BAK和PERK。

[0012] 在某些实施例中,本公开涉及上述经修饰的细胞,其中经修饰的细胞是经修饰的动物细胞。在某些实施例中,经修饰的动物细胞是经修饰的Sf9、CHO、HEK 293、HEK-293T、BHK、A549或HeLa细胞。

[0013] 在某些实施例中,本公开涉及一种包含上述经修饰的细胞的组合物。

[0014] 在某些实施例中,本公开涉及一种生产目的重组产物的方法,该方法包括:(a)培养上述经修饰的细胞;以及(b)从培养基或该经修饰的细胞中回收该目的重组产物,其中表达该目的重组产物的该经修饰的细胞表现出BAX、BAK和PERK的减少或消除的表达。

[0015] 在某些实施例中,本公开涉及一种用于生产经修饰的细胞的方法,该方法包括:(a)在细胞中施加核酸酶辅助的和/或靶向核酸的BAX、BAK和PERK以减少或消除所述内源性基因的表达,以及(b)选择经修饰的细胞,其中与未经修饰的细胞相比,所述内源性基因的表达已减少或消除。

[0016] 在上述用于生产经修饰的细胞的方法的某些实施例中,修饰在引入编码目的重组产物的外源性核酸之前或在引入编码目的重组产物的外源性核酸之后进行。在某些实施例中,核酸酶辅助的基因靶向系统选自由CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1、锌指核酸酶、TALEN或兆核酸酶组成的组。在某些实施例中,基因表达的减少由RNA沉默介导。在某些实施例中,RNA沉默选自由siRNA基因靶向和敲减、shRNA基因靶向和敲减、以及miRNA基因靶向和敲减组成的组。

[0017] 在某些实施例中,目的重组产物由核酸序列编码。在某些实施例中,核酸序列在一个或多个靶向位置处整合在经修饰的细胞的细胞基因组中。在某些实施例中,由经修饰的细胞表达的目的重组产物由随机整合在经修饰的细胞的细胞基因组中的核酸序列编码。

[0018] 在某些实施例中,目的重组产物包括病毒载体。在某些实施例中,目的重组产物包括病毒颗粒。在某些实施例中,目的重组产物包括重组蛋白。在某些实施例中,重组蛋白为抗体或抗体-融合蛋白或其抗原结合片段。在某些实施例中,抗体为多特异性抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,抗体可以由单个重链序列和单个轻链序列或其抗原结合片段组成。在某些实施例中,抗体为嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。在某些实施例中,抗体为单克隆抗体。

[0019] 在上述方法的某些实施例中,方法包括纯化目的产物,收获目的产物,及/或配制目的产物。

[0020] 在上述方法的某些实施例中,经修饰的细胞为经修饰的动物细胞。在某些实施例中,经修饰的动物细胞为经修饰的Sf9、CHO、HEK 293、HEK 293T、BHK、A549或HeLa细胞。

[0021] 在某些实施例中,本公开涉及一种经修饰的细胞,与包含野生型Bax、Bak和PERK基因中的每一者的多核苷酸和功能性拷贝的对应的分离的动物细胞相比,该经修饰的细胞具有更高的比生产率。

[0022] 在某些实施例中,本公开涉及一种经修饰的细胞,与包含Bax、Bak和PERK基因中的每一者的功能性拷贝的对应的分离的动物细胞相比,该经修饰的细胞对细胞凋亡更具抗性。

[0023] 在某些实施例中,本公开涉及一种经修饰的细胞,其用于分批补料、灌注、强化过程、半连续灌注或连续灌注细胞培养过程。

附图说明

[0024] 图1.PDGFRa通过UPR激活而下调。图1A和图1B描绘了当表达mAb1的CHO细胞在pH 7.07下生长时,PDGFRa蛋白水平和mRNA水平分别下调。图1C描绘了用化学UPR诱导剂:衣霉素和DTT处理的两种表达mAb1的宿主细胞系CHO DG44和CHO-K1的西方印迹分析。图1D描绘了用衣霉素和DTT处理的图1C的两种宿主细胞系中PDGFRa mRNA水平的qPCR分析。图1E描绘了在UPR途径特异性抑制剂存在下用衣霉素处理以激活UPR的表达mAb1的CHO-K1细胞的西方印迹分析。XBP-1的RT-PCR图显示IRE1 α RNA酶激活。图1F描绘了在UPR途径特异性抑制剂存在下用衣霉素处理的CHO-K1细胞中PDGFRa mRNA水平的qPCR分析。图1G描绘了用衣霉素和PERK抑制剂处理的WT和PERK KO空宿主CHO-K1 (克隆9) 细胞系的西方印迹分析。

[0025] 图2.图2A描绘了在不同UPR途径特异性抑制剂存在下用毒胡萝卜素处理以激活UPR的表达mAb1的CHO-K1细胞的西方印迹分析。XBP-1的RT-PCR图显示IRE1 α RNA酶激活。图2B描绘了在不同UPR途径特异性抑制剂存在下用衣霉素处理以激活UPR的空宿主CHO-K1细胞的西方印迹分析。图2C描绘了在不同UPR途径特异性抑制剂存在下用毒胡萝卜素处理的CHO-K1细胞中PDGFRa mRNA水平的qPCR分析。图2D描绘了针对PERK基因的Cas9-sgRNA的西方印迹分析,其中针对荧光素酶的sgRNA作为对照。图2E描述了使用Cas9敲除PERK后空宿主CHO-K1单细胞克隆的西方印迹分析。图1G中使用了克隆9。

[0026] 图3.PDGFRa信号传导对于细胞生长(例如,CHO细胞生长)是重要的,并且生长因子信号传导在PDGFRa抑制后完好无损。图3A是蛋白质合成、细胞周期进程和细胞增殖上游的PDGFRa和胰岛素受体(IR)信号传导的示意图。粗体箭头表示相应受体的激活更强。图3B描绘了在种子培养培养基中在存在或不存在PDGFRa抑制剂和/或胰岛素的情况下4天后的空

CHO-K1宿主细胞VCC和活力百分比。图3C描绘了在种子培养培养基中在存在或不存在PDGFRa抑制剂和/或胰岛素的情况下4天后(图3B)空宿主CHO-K1细胞的西方印迹分析。图3D描绘了在生产期间在存在PDGFRa抑制剂和/或胰岛素的情况下表达mAb2的CHO-K1细胞的第12天相对IVCC、活力百分比、相对滴度和相对Qp。

[0027] 图4.图4A描绘了在种子培养培养基中在增加PDGFRa抑制剂浓度的情况下4天后空宿主CHO-K1细胞活细胞计数(VCC)和活力百分比。图4B描绘了在种子培养培养基中在增加PDGFRa抑制剂浓度的情况下4天后空宿主CHO-K1细胞的西方印迹分析。图4C描绘了在存在或不存在10 μ M浓度的PERK抑制剂的情况下在生产中的表达mAb2的CHO-K1细胞的西方印迹分析。图4D描绘了在存在或不存在PERK抑制剂的情况下在生产表达mAb2的CHO-K1细胞期间,UPR、CHOP和GADD34的PERK分支的下游靶标的qPCR分析。

[0028] 图5.PDGFRa水平在PERK KO细胞系生产期间是稳定的。图5A描述了使用CRISPR-Cas9敲除PERK后表达mAb2的CHO-K1单细胞克隆的西方印迹分析。图5B描绘了表达mAb2的CHO-K1PERK KO细胞的第14天相对IVCC、活力百分比、相对滴度和相对Qp。图5C描述了生产表达mAb2的CHO-K1WT和PERK KO细胞的西方印迹分析。

[0029] 图6.PERK和Bax/Bak TKO协同增加生物过程结果。图6A描绘了在使用Cas9敲除PERK之后在种子培养中表达mAb3的CHO-K1单细胞克隆的西方印迹分析。各种表达mAb3的CHO-K1宿主在以下不同生物过程中的图6B描绘的总体滴度和图6C描绘的相对Qp:精益生产培养基、丰富生产培养基和使用丰富生产培养基的强化过程。图6D描绘了在丰富生产培养基中各种表达mAb3的CHO-K1宿主的西方印迹分析。图6E描述了在精益生产培养基和丰富生产培养基中重链和轻链mRNA水平的qPCR分析。

[0030] 图7.图7A描绘了在Bax/Bak DKO背景或PERK/Bax/Bak TKO背景中表达mAb3的池的6天生产的生物过程结果,显示了相对滴度、Qp和IVCC。图7B描绘了在WT、PERK KO、Bax/Bak DKO或PERK/Bax/Bak TKO背景中表达Fab1的池的14天生产的生物过程结果,显示了相对滴度、Qp和IVCC。

具体实施方式

[0031] 本公开涉及经修饰以减少或消除某些内源性蛋白的表达的细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞),以及在目的重组产物例如重组蛋白、重组病毒颗粒或重组病毒载体的生产中使用此类经修饰的细胞的方法。这些修饰生成的工程化细胞在几个关键领域具有期望的特质,包括改善的活力和更高的产物滴度。

[0032] 用于表达异源分子(诸如单克隆抗体)的常用方法中的一种方法是通过分批补料过程,其中细胞最初接种,并且然后在生产期过程中分批补料。生产过程期间的不同因素可能会导致生产和产物质量结果不佳。一个因素是由于异源分子的大量合成而增加的蛋白稳态应激。内质网(ER)能够通过激活未折叠蛋白反应(UPR)来适应这种应激。当ER达到其最大蛋白质折叠能力并且无法迎合增加的蛋白质合成和折叠需求时,通常会触发UPR。UPR具有三种已识别的ER跨膜蛋白,这些ER跨膜蛋白感知未折叠多肽的积累并通过激活信号传导途径来响应,该信号传导途径通过扩展ER、增加伴侣蛋白生产和减少总体蛋白质翻译来促进ER稳态。当这些过程无法缓解蛋白稳态应激时,持续的UPR激活可能导致凋亡细胞死亡。在正常条件下,这些UPR传感器与ER腔中称为免疫球蛋白结合蛋白(BiP)的ER伴侣蛋白结合,

从而使这些UPR传感器保持不活跃。当未折叠蛋白在ER腔中积累时,BiP与这些传感器分离,协助未折叠或错误折叠蛋白的折叠以便减少ER蛋白稳态应激,从而允许激活UPR受体。

[0033] 三个UPR传感器是肌醇需求酶1 (IRE1)、蛋白激酶R样ER激酶 (PERK) 和激活转录因子6 (ATF6)。UPR的IRE1分支是最保守的,并且IRE1既充当激酶又充当核糖核酸酶 (RNA酶)。IRE1参与XBP1 (X-盒结合蛋白1) mRNA转录物的非常规剪接。剪接生产XBP1的短形式,并且该短形式是调节UPR靶基因以增加ER的蛋白质折叠能力的转录因子。这些靶基因通过调节脂质生物合成酶和ERAD (ER相关降解) 组分来扩展和修饰ER。UPR的另一个分支PERK (蛋白激酶R样ER激酶) 是激酶,但缺乏核糖核酸酶活性;激活后,PERK通过磷酸化eIF2 α 来减少整体mRNA翻译,从而降低其活性。同时,含有短开放阅读框的mRNA子集会进行选择性的蛋白质翻译。这些mRNA中的一种mRNA编码激活转录因子4 (ATF4),该ATF4调节另一种称为C/EBP同源蛋白 (CHOP) 的转录因子的表达,该CHOP调节细胞凋亡途径的组分,包括Bim和死亡受体5 (DR5)。PERK的适度激活通过CHOP发挥细胞保护作用,但长时间激活PERK将导致细胞死亡。最后,UPR的ATF6分支涉及ATF6从ER到高尔基体的运输和蛋白水解激活。蛋白水解后,ATF6作为转录因子发挥作用,通过提高参与蛋白质折叠伴侣蛋白 (诸如BiP和GRP94) 和折叠酶 (诸如蛋白质二硫键异构酶) 的ER蛋白的生产来帮助增加ER容量。UPR的三个分支共同作用,通过降低总体蛋白质折叠负荷来减轻蛋白稳态应激,同时增加ER的蛋白质折叠能力。

[0034] 本公开至少部分基于以下发现:在表达Bax/Bak双敲除 (DKO) 抗体的细胞系中敲除PERK揭示了活力和生长的增加,并且令人惊讶地还显示出与对照细胞系相比在比生产率和滴度方面的协同增加。

[0035] 为清楚起见,但不作为限制,目前公开的主题的详细描述分为以下小节:

[0036] 5.1定义;

[0037] 5.2内源性蛋白的减少或消除的表达;

[0038] 5.3包含基因特异性修饰的细胞;

[0039] 5.4细胞培养方法;

[0040] 5.5目的重组产物的生产;以及

[0041] 5.6示例性非限制性实施例

[0042] 5.1.定义

[0043] 在本说明书中使用的术语在本公开的上下文中以及在使用每个术语的特定上下文中通常具有它们在本领域中的普通含义。某些术语在下文或说明书的其他地方讨论,以在描述本公开的组合物和方法以及如何制造和使用它们时向从业者提供额外的指导。

[0044] 如本文所用,当与权利要求和/或说明书中的术语“包含”结合使用时,“一个/种”或“一者”一词的使用可以表示“一个/一种/一者”,但也与“一个一种/一者或多个/多种/多者”、“至少一个/一种/一者”和“一个/一种/一者或超过一个/一种/一者”的含义一致。

[0045] 本文所使用的术语“包含”、“包括”、“具有”、“具备”、“可以”,“含有”及其变体旨在是开放式的过渡性短语、术语或词语,并不排除额外行为或结构的可能性。本公开还考虑其他实施方案“包括”本文所提出的实施方案或元件、“由其构成”和“基本上由其构成”,无论是否明确提出。

[0046] 术语“约”或“大致”是指在如本领域普通技术人员所确定的特定值的可接受误差范围内,所述可接受误差范围将部分地取决于如何测量或确定该值,即测量系统的局限性。

例如,按照本领域中的实践,“约”可以意谓3个或多于3个标准偏差。另选地,“约”可以表示给定值的至多20%,优选地至多10%,更优选地至多5%,并且更优选地至多1%的范围。另选地,特别是关于生物系统或过程,该术语可以意指在某一值的某一数量级内,优选地在5倍以内,更优选地在2倍以内。

[0047] 术语“细胞培养基”和“培养基”是指用于生长哺乳动物细胞的营养液,其通常提供来自以下一个或多个类别的至少一种成分:

[0048] 1) 能量来源,一般以碳水化合物(诸如葡萄糖)的形式存在;

[0049] 2) 所有必需氨基酸,且一般为二十种氨基酸加上半胱氨酸的基本组;

[0050] 3) 需求量在低浓度的维生素和/或其他有机化合物;

[0051] 4) 游离脂肪酸;和

[0052] 5) 微量元素,其中微量元素定义为无机化合物或天然存在的元素,其需求量通常在非常低的浓度,一般在微摩尔范围内。

[0053] 营养液可以任选地补充有来自以下任何类别的一种或多种成分:

[0054] 1) 激素和其他生长因子,例如胰岛素、转铁蛋白和表皮生长因子;

[0055] 2) 盐和缓冲剂,例如钙、镁和磷酸盐;

[0056] 3) 核苷和碱基,例如腺苷、胸苷和次黄嘌呤;和

[0057] 4) 蛋白质和组织水解物。

[0058] “培养”细胞是指在适合于细胞存活和/或生长和/或增殖的条件下使细胞与细胞培养基接触。

[0059] “分批培养”是指其中在培养过程开始时将用于细胞培养的所有组分(包括细胞和所有培养营养物)供应至培养生物反应器的培养。

[0060] 如本文所用,“分批补料细胞培养”是指分批培养,其中首先将细胞和培养基供应至培养生物反应器,并且在培养过程期间将另外的培养营养物连续或以不连续的增量供料至培养物,在终止培养之前进行或不进行定期的细胞和/或产物收获。

[0061] “灌注培养”,有时称为连续培养,是通过例如过滤、包裹、锚定至微载体等将细胞限制在培养物中的培养,并且连续地、逐步地或间歇地(或其任意组合)引入培养基并将其从培养生物反应器中去除。

[0062] 如本文所用,术语“细胞”是指动物细胞、哺乳动物细胞、培养的细胞、宿主细胞、重组细胞和重组宿主细胞。此类细胞通常是从动物(例如,哺乳动物)组织获得或源自哺乳动物组织的细胞系,当将其置于含有适当营养物质和/或生长因子的培养基中时能够生长和存活。

[0063] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指外源性核酸可被随后引入以创建重组细胞的细胞及其子代。这些宿主细胞也可以已被修饰(即,工程化)以改变或删除某些内源性宿主细胞蛋白的表达。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和来源于所述原代转化细胞的子代,不考虑传代次数。子代不需要与亲本细胞的核酸内容物完全一致,而是可能含有突变。本文包括如在原始转化细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变子代。将外源性核酸引入(例如,通过转染)至这些宿主细胞将创建源自原始“宿主细胞”、“宿主细胞系”或“宿主细胞系”的重组细胞。术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”也可以指此类重组细胞及其子代。

[0064] 术语“重组细胞”、“重组细胞系”和“重组细胞培养物”可互换使用,并且是指外源性核酸已被引入其中以使得能够表达目的重组产物的细胞及其子代。由此类细胞表达的重组产物可以是重组蛋白、重组病毒颗粒或重组病毒载体。

[0065] 术语“动物宿主细胞”或“动物细胞”是指源自动物的细胞系,当它们置于单层培养物中或含有适当营养物和生长因子的培养基中的悬浮培养物中时,能够生长和存活。除了下文描述的哺乳动物细胞之外,本公开上下文中合适的动物宿主细胞的示例可以包括但不限于无脊椎动物和非哺乳动物脊椎动物(例如,鸟类、爬行动物和两栖动物)细胞。无脊椎动物细胞的示例包括以下昆虫细胞:草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕(*Bombyx mori*)。参见例如,Luckow等人,Bio/Technology,6:47-55(1988);Miller等人.,in Genetic Engineering,Setlow,J.K.等人,编,第8卷(Plenum Publishing,1986).第277-279页;和Maeda等人,Nature,315:592-594(1985)

[0066] 术语“哺乳动物宿主细胞”或“哺乳动物细胞”是指源自哺乳动物的细胞系,当它们置于单层培养物中或含有适当营养物和生长因子的培养基中的悬浮培养物中时,能够生长和存活。特定细胞系的必需生长因子很容易凭经验确定而无需过度实验,例如Mammalian Cell Culture(Mather,J.P.编,Plenum Press,N.Y.1984)和Barnes与Sato,(1980)Cell,22:649中所述。通常,细胞能够表达并分泌大量特定目的蛋白质(例如糖蛋白)到培养基中。在本公开的上下文中合适的哺乳动物宿主细胞的示例可以包括中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO,Urlaub和Chasin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216 1980);dp12.CHO细胞(EP 307,247,公开于1989年3月15日);CHO-K1(ATCC,CCL-61);SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚肾系(亚克隆以用于在悬浮培养中生长的293或293细胞,Graham等人,J.Gen Virol.,36:59 1977);幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);小鼠塞尔托利氏细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.,23:243-2511980);猴肾细胞(CV1ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68 1982);MRC 5细胞;FS4细胞;以及人肝癌系(Hep G2)。在某些实施例中,哺乳动物细胞包括中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO,Urlaub和Chasin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216 1980);dp12.CHO细胞(EP 307,247,公开于1989年3月15日)。

[0067] 细胞培养的“生长期”是指细胞通常快速分裂的指数细胞生长期(对数期)。例如,细胞维持在生长期的持续时间可以根据细胞类型、细胞生长速率和/或培养条件而变。在某些实施例中,在这一期间,将细胞培养一段时间,一般在1至4天之间,并且在使细胞生长最大化的条件下。宿主细胞的生长周期的确定可以针对所设想的特定宿主细胞确定,而无需过度实验。“细胞生长最大化的时间段和此类条件下”等是指对于特定细胞系被确定为最适合细胞生长和分裂的那些培养条件。在某些实施例中,在生长期,细胞在含有必需添加剂的营养培养基中培养,通常在约30至40℃在潮湿的受控气氛中培养,从而实现特定细胞系的最佳生长。在某些实施例中,细胞在生长期维持约一天与四天之间的时间段,一般在二至三天之间。

[0068] 细胞培养物的“生产期”是指细胞生长达到/已达到稳定的时期。对数细胞生长通常在这一时期之前或期间减少,且蛋白质生产接管。在生产期,对数细胞生长已经结束,且蛋白质生产是主要的。在此期间,通常补充培养基以支持持续的蛋白质生产并获得所需的糖蛋白产物。分批补料和/或灌流细胞培养过程补充细胞培养基或在此期间提供新鲜培养基以实现和/或维持所需的细胞密度、活力和/或重组蛋白产物滴度。生产期可以以大规模执行。

[0069] 如本文所用的关于蛋白质活性的术语“活性”是指蛋白质的任何活性,包括但不限于酶活性、配体结合、药物转运、离子转运、蛋白质定位、受体结合和/或结构活性。这种活性可以通过减少或消除该蛋白质的表达来调节,例如减少或消除,从而减少或消除该蛋白质的存在。这种活性也可以通过改变编码该蛋白质的核酸序列来调节,例如减少或消除,使得所得修饰的蛋白质相对于野生型蛋白质表现出降低的或消除的活性。

[0070] 本文使用的名称或动词形式的术语“表达”是指在宿主细胞内发生的转录和翻译。宿主细胞中产物基因的表达水平可以基于细胞中存在的相对应mRNA的量或由细胞产生的由产物基因编码的蛋白质的量来确定。例如,从产物基因转录的mRNA理想地通过northern杂交来定量。Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第7.3-7.57页(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)。由产物基因编码的蛋白可以通过多种方法定量,例如,通过测定蛋白质的生物学活性或通过采用与这种活性无关的测定诸如使用能够与该蛋白质反应的抗体的蛋白质印迹法或放射免疫测定法。Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第18.1-18.88页(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)。

[0071] 如本文所用,“多肽”通常是指具有超过约十个氨基酸的肽和蛋白质。多肽可以与宿主细胞同源或优选地可以是外源性的,这意味着对于所利用的宿主细胞而言,这些多肽是异源的,即,是外来的,诸如中国仓鼠卵巢细胞生产的人蛋白质、或由哺乳动物细胞生产的酵母多肽。在某些实施方案中,使用哺乳动物多肽(最初源自哺乳动物生物体的多肽),更优选那些直接分泌到培养基中的多肽。

[0072] 术语“蛋白质”意为其链长足以产生更高水平的三级和/或四级结构的氨基酸序列。这是为了与“肽”或其他不具有此类结构的小分子量药物区分开。通常,本文的蛋白质将具有至少约15至20kD的分子量,优选至少约20kD。本文定义中涵盖的蛋白质的示例包括宿主细胞蛋白质以及所有哺乳动物蛋白质,特别是治疗性蛋白质和诊断性蛋白质,诸如治疗性抗体和诊断性抗体,并且一般是含有一个或多个二硫键的蛋白质,包括包含一个或多个链间和/或链内二硫键的多链多肽。

[0073] 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性抗体(例如,由单个重链序列和单个轻链序列组成的抗体,包括此类配对的多聚体)、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0074] 如本文所用,“抗体片段”、抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)或抗体的“抗原结合片段”是指除完整抗体以外的分子,其包含完整抗体的结合抗原的部分。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双体抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv和scFab);单结构域抗体(dAb);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。关

于某些抗体片段的综述,请参见Holliger和Hudson,Nature Biotechnology 23:1126-1136 (2005)。

[0075] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,在该抗体中重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同的来源或物种。

[0076] 抗体的“类别”是指抗体的重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五大类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且它们中的一些可以进一步分为亚类(同型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。在某些实施例中,抗体是IgG1同种型。在某些实施例中,抗体是IgG2同种型。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以归属于两种类型中的一种,该两种类型称为卡帕(κ)和兰姆达(λ)。

[0077] 如本文所用,术语“滴度”是指由细胞培养物产生的重组表达抗体的总量除以给定量的培养基体积。滴度通常以每毫升或每升培养基中的抗体毫克数为单位(mg/ml或mg/L)。在某些实施例中,滴度以每升培养基中的抗体克数(g/L)表示。滴度可以根据相对测量来表示或评估,例如与在不同培养条件下获得蛋白质产物相比,滴度增加的百分比。

[0078] 术语“核酸”、“核酸分子”或“多核苷酸”包括包含核苷酸聚合物的任何化合物和/或物质。每个核苷酸由碱基,特别是嘌呤或嘧啶碱基(即胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))、糖(即脱氧核糖或核糖)和磷酸酯基团构成。通常,核酸分子通过碱基序列进行描述,其中所述碱基代表核酸分子的一级结构(线性结构)。碱基序列通常表示为从5'至3'。在本文中,术语核酸分子涵盖脱氧核糖核酸(DNA)(包括例如互补DNA(cDNA)和基因组DNA)、核糖核酸(RNA)(特别是信使RNA(mRNA))、DNA或RNA的合成形式,以及包括这些分子中的两种或更多种的混合聚合物。核酸分子可以是线性的或环状的。此外,术语核酸分子包括有义链和反义链,以及单链和双链形式。此外,本文所描述的核酸分子可含有天然存在的或非天然存在的核苷酸。非天然存在的核苷酸的示例包括具有衍生化的糖或磷酸主链键或经化学修饰的残基的经修饰的核苷酸碱基。核酸分子还涵盖适合作为用于本公开的抗体的体外和/或体内(例如,在宿主或患者中)直接表达的载体的DNA和RNA分子。此类DNA(例如cDNA)或RNA(例如mRNA)载体可以是未修饰的或经修饰的。例如,可以对mRNA进行化学修饰以增强RNA载体的稳定性和/或所编码的分子的表达,使得可以将mRNA注射到受试者以在体内产生体内抗体(参见例如Stadler等人,Nature Medicine 2017,在线发表于2017年6月12日,doi:10.1038/nm.4356或EP 2 101 823B1)。

[0079] 如本文所用,术语“载体”是指能够转运与其相连接的另一核酸的核酸分子。

[0080] “人抗体”是这样的抗体,该抗体具有的氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列,或来源于利用人抗体全套库或其他人抗体编码序列的非人源的抗体的氨基酸序列。人抗体的该定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0081] “人源化”抗体是指这样的嵌合抗体,其包含来自非人CDR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基。在某些方面,人源化抗体将基本上包含所有的至少一个、通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有CDR对应于非人抗体的CDR,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。“人源化形式”的抗体,例如,非人抗体,是指已经进行过人源化的抗体。

[0082] 如本文所用的术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域中在序列上高变并确定

抗原结合特异性的各个区域,例如“互补决定区”(“CDR”)。

[0083] 通常,抗体包含六个CDR;三个在VH中(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),并且三个在VL中的(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。本文中的示例性CDR包括:

[0084] (a) 存在于氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、

[0085] 53-55(H2)和96-101(H3)处的高变环(Chothia和Lesk,J.

[0086] Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0087] (b) 存在于氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)处的CDR(Kabat等人,Sequences of

[0088] Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service, National

[0089] Institutes of Health,Bethesda,MD(1991));以及

[0090] (c) 存在于氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)和93-101(H3)处的抗原接触点(MacCallum等人J.

[0091] Mol.Biol.262:732-745(1996))。

[0092] 除非另有说明,否则CDR根据Kabat等人所述的方法(同上)确定。本领域的技术人员将理解,也可以根据Chothia(同上)、McCallum(同上)所述的方法或任何其他在科学上接受的命名系统来确定CDR名称。

[0093] “免疫缀合物”为与一种或多种异源分子(包括但不限于细胞毒性剂)缀合的抗体。

[0094] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即,除了可能的变体抗体(例如,含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的生产过程中生产,此类变体通常以少量形式存在)之外,包括该群体的个别抗体具有同一性和/或结合相同表位。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法生产抗体。例如,根据目前公开的主题所使用的单克隆抗体可通过多种技术制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法,以及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,在本文中描述了用于制备单克隆抗体的此类方法和其他示例性方法。

[0095] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个互补决定区(CDR)。(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可分别使用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域来进行分离,以筛选互补VL或VH结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0096] 如本文所用,术语“细胞密度”是指给定体积培养基中的细胞数量。在某些实施例中,高细胞密度是合乎需要的,因为它可以导致更高的蛋白质生产力。可以通过本领域已知的任何技术监测细胞密度,包括但不限于从培养物中提取样品并在显微镜下分析细胞,使用可商购的细胞计数装置或通过使用可商购的合适的探针引入生物反应器本身(或进入一个循环,培养基和悬浮细胞通过该循环然后返回生物反应器)。

[0097] 如本文所用,术语“重组蛋白”一般是指由“异源”(即对于所利用的宿主细胞而言是外来的)核酸(诸如编码被引入非人类宿主细胞的人抗体的核酸)编码的肽和蛋白,包括抗体。

[0098] 如本文所用,术语“重组病毒颗粒”一般是指可以天然存在或通过重组外源性核酸生产以用于疫苗生产的病毒颗粒。

[0099] 如本文所用,术语“重组病毒载体”一般是指已经修饰以表达外源性病毒元件来例如用于基因疗法的病毒载体,包括但不限于基于腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)、逆转录病毒、痘病毒、慢病毒的重组载体。

[0100] 5.2. 内源性蛋白的减少或消除的表达

[0101] 在某些实施例中,本公开涉及经修饰的细胞,例如CHO细胞,其中一种或多种内源性蛋白的表达被减少或消除。例如但不限于,用于减少或消除经修饰的细胞中内源性蛋白表达的方法包括:(1)例如通过将缺失、插入、取代或其组合引入基因中来修饰编码内源性蛋白或其组分的基因;(2)减少或消除编码内源性蛋白或其组分的mRNA的转录和/或稳定性;和(3)减少或消除编码内源性蛋白或其组分的mRNA的翻译。在某些实施例中,蛋白质表达的减少或消除是通过靶向基因组编辑获得的。例如,基于CRISPR/Cas9的基因组编辑可以用于修饰一个或多个靶基因,从而减少或消除靶向编辑的一个(或多个)基因的表达。

[0102] 在某些实施例中,靶向减少或消除的表达的内源性细胞蛋白中的一种或多种基于其在促进细胞凋亡中的作用来选择。由于细胞凋亡可以降低培养物活力和生产力,所以减少或消除此类蛋白质的表达可以对培养物活力和生产力产生积极影响。例如但不限于,基于其促进细胞凋亡的作用而选择的细胞蛋白是细胞凋亡调节因子BCL2关联X蛋白(BAX)或BCL2拮抗剂/杀伤因子1(BAK)。

[0103] 在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞表现出BAX的减少或消除的表达。在某些实施例中,如本文所用,BAX是指真核BAX细胞蛋白质,例如CHO BAX细胞蛋白质(Entrez Gene ID:100689032;GenBank ID:EF104643.1),及其功能变体。在某些实施例中,如本文所用,BAX的功能变体涵盖与用于生产目的重组产物的经修饰的细胞的野生型BAX序列具有50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的BAX序列。

[0104] 在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞表现出BAK的减少或消除的表达。在某些实施例中,如本文所用的BAK是指真核BAK细胞蛋白质,例如CHO BAK细胞蛋白质(GenBank ID:EF104644.1),及其功能变体。在某些实施例中,如本文所用,BAK的功能变体涵盖与用于生产目的重组产物的经修饰的细胞的野生型BAK序列具有50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的BAK序列。

[0105] 在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞表现出BAX和BAK的减少或消除的表达。

[0106] 在某些实施例中,靶向表达减少或消除的内源性细胞蛋白中的一种或多种基于其在调节未折叠蛋白反应(UPR)中的作用来选择。例如但不限于,基于其在调节UPR中的作用而选择的细胞蛋白是肌醇需求酶1(IRE1)、蛋白激酶R样ER激酶(PERK)或激活转录因子6(ATF6)。在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞表现出PERK的减少或消除的表达。在某些实施例中,如本文所用,PERK是指真核PERK细胞蛋白质,例如CHO PERK细胞蛋白质(Gene

ID:100765343;GenBank:EGW03658.1;和同种型NCBI参考序列:XP_027285344.2和NCBI参考序列:XP_016831844.1)及其功能变体。在某些实施例中,如本文所用,PERK的功能变体涵盖与用于生产目的重组产物的经修饰的细胞的野生型PERK序列具有50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的PERK序列。

[0107] 在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞表现出以下内源性蛋白的减少或消除的表达:BAX;BAK;和PERK。

[0108] 在某些实施例中,本公开的细胞经修饰以相对于一种或多种内源性细胞蛋白在未经修饰的(即“参考”)细胞中的表达而减少或消除该内源性细胞蛋白的表达。在某些实施例中,参考细胞是其中一种或多种特定内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)的表达不被减少或消除的细胞。在某些实施例中,参照细胞是包含编码BAX;BAK;和/或PERK的基因的至少一种或两种野生型等位基因的细胞。例如但不限于,参考细胞是具有编码BAX;BAK;和/或PERK的基因的两种野生型等位基因的细胞。在某些实施例中,参考细胞为WT细胞。在某些实施例中,减少或消除一种或多种内源性细胞蛋白的表达的修饰在引入编码目的重组产物的外源性核酸之前进行。在某些实施例中,减少或消除一种或多种内源性细胞蛋白的表达的修饰在引入编码目的重组产物的外源性核酸之后进行。

[0109] 在某些实施例中,一种或多种内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在已经修饰以减少或消除该内源性蛋白的表达的细胞中的表达为参考细胞(例如,WT细胞)中对应内源性蛋白表达的小于约90%、小于约80%、小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%或小于约1%。在某些实施例中,一种或多种内源性蛋白在已经修饰以减少或消除该内源性蛋白的表达的细胞中的表达为参考细胞(例如,WT细胞)中对应内源性蛋白表达的小于约90%、小于约80%、小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%或小于约1%。

[0110] 在某些实施例中,一种或多种内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在已经修饰以减少或消除该内源性蛋白的表达的细胞中的表达为参考细胞(例如,WT细胞)中对应内源性蛋白表达的至少约90%、至少约80%、至少约70%、至少约60%、至少约50%、至少约40%、至少约30%、至少约20%、至少约10%、至少约5%、至少约4%、至少约3%、至少约2%或至少约1%。在某些实施例中,一种或多种内源性蛋白在已经修饰以减少或消除该内源性蛋白的表达的宿主细胞中的表达为参考细胞(例如,WT细胞)中对应内源性蛋白表达的至少约90%、至少约80%、至少约70%、至少约60%、至少约50%、至少约40%、至少约30%、至少约20%、至少约10%、至少约5%、至少约4%、至少约3%、至少约2%或至少约1%。

[0111] 在某些实施例中,一种或多种特定内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在已经修饰以减少或消除该内源性蛋白的表达的细胞中的表达为参考细胞(例如,WT细胞)中对应内源性蛋白表达的不超过约90%、不超过约80%、不超过约70%、不超过约60%、不超过约50%、不超过约40%、不超过约30%、不超过约20%、不超过约10%、不超过约5%、不超过约4%、不超过约3%、不超过约2%或不超过约1%。在某些实施例中,一种或多种内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在已经修饰以减少或消除该内源性蛋白的表达的细胞中的表达为参考细胞(例如,WT细胞)中对应内源性蛋白表达的不超过约40%。在某些实

施例中,一种或多种内源性蛋白在已经修饰以减少或消除该内源性蛋白的表达的细胞中的表达为参考细胞(例如,WT细胞)中对应内源性蛋白表达的不超过约90%、不超过约80%、不超过约70%、不超过约60%、不超过约50%、不超过约40%、不超过约30%、不超过约20%、不超过约10%、不超过约5%、不超过约4%、不超过约3%、不超过约2%或不超过约1%。

[0112] 在某些实施例中,一种或多种内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在已经修饰以减少或消除该内源性蛋白的表达的细胞中的表达为参考细胞(例如,WT细胞)中对应内源性蛋白表达的约1%与约90%之间、约10%与约90%之间、约20%与约90%之间、约25%与约90%之间、约30%与约90%之间、约40%与约90%之间、约50%与约90%之间、约60%与约90%之间、约70%与约90%之间、约80%与约90%之间、约85%与约90%之间、约1%与约80%之间、约10%与约80%之间、约20%与约80%之间、约30%与约80%之间、约40%与约80%之间、约50%与约80%之间、约60%与约80%之间、约70%与约80%之间、约75%与约80%之间、约1%与约70%之间、约10%与约70%之间、约20%与约70%之间、约30%与约70%之间、约40%与约70%之间、约50%与约70%之间、约60%与约70%之间、约65%与约70%之间、约1%与约60%之间、约10%与约60%之间、约20%与约60%之间、约30%与约60%之间、约40%与约60%之间、约50%与约60%之间、约55%与约60%之间、约1%与约50%之间、约10%与约50%之间、约20%与约50%之间、约30%与约50%之间、约40%与约50%之间、约45%与约50%之间、约1%与约40%之间、约10%与约40%之间、约20%与约40%之间、约30%与约40%之间、约35%与约40%之间、约1%与约30%之间、约10%与约30%之间、约20%与约30%之间、约25%与约30%之间、约1%与约20%之间、约5%与约20%之间、约10%与约20%之间、约15%与约20%之间、约1%与约10%之间、约5%与约10%之间、约5%与约10%之间、约5%与约20%之间、约5%与约30%之间、约5%与约40%之间。在某些实施例中,一种或多种内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在已经修饰以减少或消除该内源性蛋白的表达的细胞中的表达为参考细胞(例如,WT细胞)中对应内源性蛋白表达的约1%与约90%之间、约10%与约90%之间、约20%与约90%之间、约25%与约90%之间、约30%与约90%之间、约40%与约90%之间、约50%与约90%之间、约60%与约90%之间、约70%与约90%之间、约80%与约90%之间、约85%与约90%之间、约1%与约80%之间、约10%与约80%之间、约20%与约80%之间、约30%与约80%之间、约40%与约80%之间、约50%与约80%之间、约60%与约80%之间、约70%与约80%之间、约75%与约80%之间、约1%与约70%之间、约10%与约70%之间、约20%与约70%之间、约30%与约70%之间、约40%与约70%之间、约50%与约70%之间、约60%与约70%之间、约65%与约70%之间、约1%与约60%之间、约10%与约60%之间、约20%与约60%之间、约30%与约60%之间、约40%与约60%之间、约50%与约60%之间、约55%与约60%之间、约1%与约50%之间、约10%与约50%之间、约20%与约50%之间、约30%与约50%之间、约40%与约50%之间、约45%与约50%之间、约1%与约40%之间、约10%与约40%之间、约20%与约40%之间、约30%与约40%之间、约35%与约40%之间、约1%与约30%之间、约10%与约30%之间、约20%与约30%之间、约25%与约30%之间、约1%与约20%之间、约5%与约20%之间、约10%与约20%之间、约15%与约20%之间、约1%与约10%之间、约5%与约10%之间、约5%与约20%之间、约5%与约30%之间、约5%与约40%之间。

[0113] 在某些实施例中,一种或多种内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在已经

修饰以减少或消除该内源性蛋白的表达的细胞中的表达为参考细胞(例如,WT细胞)中对应内源性蛋白表达的约5%与约40%之间。

[0114] 在某些实施例中,一种或多种内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在不同参考细胞(例如,包含相应基因的至少一种或两种野生型等位基因的细胞)中的表达水平可以变化。

[0115] 在某些实施例中,采用基因工程系统来减少或消除一种或多种特定内源性蛋白的表达(例如,BAX;BAK;和/或PERK表达)。本领域已知的各种基因工程系统可用于本文所公开的方法。此类系统的非限制性示例包括CRISPR/Cas系统、锌指核酸酶(ZFN)系统、转录活化因子样效应子核酸酶(TALEN)系统以及使用通过基因沉默减少或消除蛋白质表达的其他工具,诸如小干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)和microRNA(miRNA)。本领域已知的任何CRISPR/Cas系统,包括传统的、增强的或修饰的Cas系统,以及其他基于细菌的基因组切除工具诸如Cpf-1,都可以与本文所公开的方法一起使用。

[0116] 在某些实施例中,使一种或多种基因(例如,编码内源性蛋白(诸如BAX;BAK;和/或PERK多肽)的基因)的一部分缺失以减少或消除细胞中相应内源性蛋白的表达。在某些实施例中,至少约2%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%或至少约90%的该基因缺失。在某些实施例中,不超过约2%、不超过约5%、不超过约10%、不超过约15%、不超过约20%、不超过约25%、不超过约30%、不超过约35%、不超过约40%、不超过约45%、不超过约50%、不超过约55%、不超过约60%、不超过约65%、不超过约70%、不超过约75%、不超过约80%、不超过约85%或不超过约90%的该基因缺失。在某些实施例中,约2%与约90%之间、约10%与约90%之间、约20%与约90%之间、约25%与约90%之间、约30%与约90%之间、约40%与约90%之间、约50%与约90%之间、约60%与约90%之间、约70%与约90%之间、约80%与约90%之间、约85%与约90%之间、约2%与约80%之间、约10%与约80%之间、约20%与约80%之间、约30%与约80%之间、约40%与约80%之间、约50%与约80%之间、约60%与约80%之间、约70%与约80%之间、约75%与约80%之间、约2%与约70%之间、约10%与约70%之间、约20%与约70%之间、约30%与约70%之间、约40%与约70%之间、约50%与约70%之间、约60%与约70%之间、约65%与约70%之间、约2%与约60%之间、约10%与约60%之间、约20%与约60%之间、约30%与约60%之间、约40%与约60%之间、约50%与约60%之间、约55%与约60%之间、约2%与约50%之间、约10%与约50%之间、约20%与约50%之间、约30%与约50%之间、约40%与约50%之间、约45%与约50%之间、约2%与约40%之间、约10%与约40%之间、约20%与约40%之间、约30%与约40%之间、约35%与约40%之间、约2%与约30%之间、约10%与约30%之间、约20%与约30%之间、约25%与约30%之间、约2%与约20%之间、约5%与约20%之间、约10%与约20%之间、约15%与约20%之间、约2%与约10%之间、约5%与约10%之间或约2%与约5%之间的该基因缺失。

[0117] 在某些实施例中,编码BAX;BAK;和/或PERK多肽的基因的至少一个外显子在细胞中至少部分缺失。如本文所用,“部分地缺失”是指,例如,外显子的至少约2%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、

至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、不超过约2%、不超过约5%、不超过约10%、不超过约15%、不超过约20%、不超过约25%、不超过约30%、不超过约35%、不超过约40%、不超过约45%、不超过约50%、不超过约55%、不超过约60%、不超过约65%、不超过约70%、不超过约75%、不超过约80%、不超过约85%、不超过约90%、不超过约95%、约2%与约90%之间、约10%与约90%之间、约20%与约90%之间、约25%与约90%之间、约30%与约90%之间、约40%与约90%之间、约50%与约90%之间、约60%与约90%之间、约70%与约90%之间、约80%与约90%之间、约85%与约90%之间、约2%与约80%之间、约10%与约80%之间、约20%与约80%之间、约30%与约80%之间、约40%与约80%之间、约50%与约80%之间、约60%与约80%之间、约70%与约80%之间、约75%与约80%之间、约2%与约70%之间、约10%与约70%之间、约20%与约70%之间、约30%与约70%之间、约40%与约70%之间、约50%与约70%之间、约60%与约70%之间、约65%与约70%之间、约2%与约60%之间、约10%与约60%之间、约20%与约60%之间、约30%与约60%之间、约40%与约60%之间、约50%与约60%之间、约55%与约60%之间、约2%与约50%之间、约10%与约50%之间、约20%与约50%之间、约30%与约50%之间、约40%与约50%之间、约45%与约50%之间、约2%与约40%之间、约10%与约40%之间、约20%与约40%之间、约30%与约40%之间、约35%与约40%之间、约2%与约30%之间、约10%与约30%之间、约20%与约30%之间、约25%与约30%之间、约2%与约20%之间、约5%与约20%之间、约10%与约20%之间、约15%与约20%、约2%与约10%之间、约5%与约10%之间或约2%与约5%之间的区域缺失。

[0118] 在某些非限制性实施例中,采用CRISPR/Cas9系统来减少或消除一种或多种内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在细胞中的表达。成簇的规则间隔短回文重复(CRISPR)系统为在原核细胞中发现的基因组编辑工具。当用于基因组编辑时,该系统包括Cas9(一种能够利用crRNA作为其向导来修饰DNA的蛋白质)、CRISPR RNA(crRNA,其含有:RNA,该RNA由Cas9使用以将其引导到宿主DNA的正确片段;以及一个区,该区结合至tracrRNA(通常以发夹环形式),与Cas9形成活性复合物),和反式活化crRNA(tracrRNA,其结合至crRNA并与Cas9形成活性复合物)。术语“指导RNA”和“gRNA”是指促进RNA引导的核酸酶(诸如Cas9)与靶序列(例如细胞中的基因组或游离序列)特异性缔合(或“靶向”)的任何核酸。gRNA可以是单分子的(包含单个RNA分子,且替代性地称为嵌合的)或模块化的(包含一个以上,通常是两个独立的RNA分子,诸如crRNA和tracrRNA,它们通常彼此缔合,例如通过双工化)。

[0119] CRISPR/Cas9策略可以采用载体来转染细胞。指导RNA(gRNA)可以针对每种应用进行设计,因为这是Cas9用来鉴定并直接结合至细胞中靶DNA的序列。多个crRNA和该tracrRNA可以包装在一起以形成单指导RNA(sgRNA)。sgRNA可以与Cas9基因连接在一起并制成载体,以便转染到细胞中。

[0120] 在某些实施例中,用于减少或消除一种或多种内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)的表达的CRISPR/Cas9系统包含Cas9分子和一种或多种gRNA,该gRNA包含与编码内源性蛋白或其组分的基因的靶序列互补的靶向结构域。在某些实施例中,靶基因是编码内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)的基因区域。靶序列可以是基因内的任何外显

子或内含子区。

[0121] 在某些实施例中,将gRNA在单个载体中施用于细胞,并且将Cas9分子在第二载体中施用于细胞。在某些实施例中,将gRNA和Cas9分子在单个载体中施用于细胞。替代性地,每个gRNA和Cas9分子都可以通过独立的载体施用。在某些实施例中,CRISPR/Cas9系统可以作为包含与一种或多种gRNA复合的Cas9蛋白的核糖核蛋白复合物(RNP)递送至细胞,例如,通过电穿孔递送(关于将RNP递送至细胞的其他方法参见例如,DeWitt等人,Methods 121-122:9-15(2017))。在某些实施例中,向细胞施用CRISPR/Cas9系统导致减少或消除内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)的表达。

[0122] 在某些实施例中,基因工程系统是用于减少或消除一种或多种特定内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在细胞中的表达的ZFN系统。ZFN可以用作限制性内切酶,它是通过将锌指DNA结合结构域与DNA切割结构域结合而产生的。可以对锌指结构域进行工程化以靶向特定的DNA序列,从而使锌指核酸酶靶向基因组内的所需序列。各个ZFN的DNA结合结构域通常包括多个单独的锌指重复序列,并且每个锌指重复序列都可以识别多个碱基对。生成新锌指结构域的最常用方法是组合已知特异性的较小锌指“模块”。ZFN中最常见的切割结构域是来自IIs型限制性核酸内切酶FokI的非特异性切割结构域。ZFN通过在靶DNA序列中产生双链断裂(DSB)来调节蛋白质的表达,在没有同源模板的情况下,双链断裂将会通过非同源末端连接(NHEJ)进行修复。这种修复可导致碱基对的缺失或插入,生产移码并阻止有害蛋白质的生产(Durai等人,Nucleic Acids Res.;33(18):5978-90(2005))。多对ZFN也可用于完全去除基因组序列的整个大片段(Lee等人,Genome Res.;20(1):81-9(2010))。

[0123] 在某些实施例中,基因工程系统是用于减少或消除一种或多种特定内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在细胞中的表达的TALEN系统。TALEN为限制性内切酶,其可以经工程化来切割特定的DNA序列。TALEN系统的运行原理与ZFN相似。TALEN是通过将转录活化因子样效应子DNA结合结构域与DNA切割结构域相结合而产生的。转录活化因子样效应子(TALE)由33至34个氨基酸重复基序组成,具有两个可变位置,对特定核苷酸具有很强的识别能力。通过组装这些TALE的阵列,可以对TALE DNA结合结构域进行工程化以结合所需的DNA序列,从而引导核酸酶在基因组中的特定位置切割(Boch等人,Nature Biotechnology;29(2):135-6(2011))。在某些实施例中,靶基因编码BAX;BAK;和/或PERK。

[0124] 在某些实施例中,一种或多种特定内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)的表达可以使用具有与相应核酸(例如,mRNA)互补的序列的寡核苷酸来减少或消除。此类寡核苷酸的非限制性示例包括小干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)和微小RNA(miRNA)。在某些实施例中,此类寡核苷酸可以与BAX;BAK;和/或PERK核酸序列的至少一部分同源,其中该部分相对于相对应核酸序列的同源性为至少约75%或至少约80%或至少约85%或至少约90%或至少约95%或至少约98%。在某些非限制性实施例中,该互补部分可构成至少10个核苷酸或至少15个核苷酸或至少20个核苷酸或至少25个核苷酸或至少30个核苷酸,且反义核酸、shRNA、mRNA或siRNA分子的长度可至多15或至多20或至多25或至多30或至多35或至多40或至多45或至多50或至多75或至多100个核苷酸。反义核酸、shRNA、mRNA或siRNA分子可以包含DNA或非典型或非天然存在的残基,例如但不限于,硫代磷酸酯残基。

[0125] 可以使用病毒载体(例如,逆转录病毒载体诸如 γ -逆转录病毒载体和慢病毒载

体)将本文所公开的基因工程系统递送到细胞中。逆转录病毒载体和适当的包装线的组合是合适的,其中衣壳蛋白将具有感染人类细胞的功能。已知多种生产双嗜性病毒的细胞系,包括但不限于PA12 (Miller等人 (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller等人 (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); 和CRIP (Danos等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464)。非双嗜性颗粒也是合适的,例如,用VSVG、RD114或GALV包膜和本领域已知的任何其他颗粒假性化的颗粒。可能的转导方法还包括细胞与生产细胞的直接共培养(例如,通过Bregni等人 (1992) Blood 80:1418-1422的方法进行),或与单独的病毒上清液或含有或不含适当的生长因子和聚阳离子的浓缩载体原液一起培养(例如,通过Xu等人 (1994) Exp. Hemat. 22:223-230; 和Hughes等人 (1992) J. Clin. Invest. 89:1817中所述的溶剂)。

[0126] 其他转导病毒载体可用于修饰本文所公开的细胞。在某些实施例中,所选择的载体表现出高效的感染以及稳定的整合和表达(参见例如,Cayouette等人, Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido等人, Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer等人, Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini等人, Science 272:263-267, 1996; 和Miyoshi等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997)。可以使用的其他病毒载体包括例如腺病毒、慢病毒和腺相关病毒载体、牛痘病毒、牛乳头状瘤病毒或疱疹病毒, 诸如Epstein-Barr病毒(也参见,例如, Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis等人, BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev等人, Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta等人, Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Miller等人, Biotechnology 7:980-990, 1989; LeGal La Salle等人, Science 259:988-990, 1993; 和Johnson, Chest 107:77S-83S, 1995的载体)。逆转录病毒载体尤其得到充分开发并已用于临床环境(Rosenberg等人, N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderson等人, 美国专利第5,399,346号)。

[0127] 非病毒方法也可用于本文所公开的细胞的基因工程。例如,可以通过以下方式将核酸分子引入细胞:在脂质转染存在下施用核酸(Feigner等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono等人, Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham等人, Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger等人, Methods in Enzymology 101:512, 1983),去唾液酸糖粘蛋白-聚赖氨酸结合(Wu等人, Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu等人, Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989),或通过在手术条件下微注射(Wolff等人, Science 247:1465, 1990)。其他用于基因转移的非病毒方法包括使用磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和原生质体融合进行体外转染。脂质体也可能有利于将核酸分子递送到细胞中。将正常基因移植到受试者的受影响组织中也可以通过以下方式来完成:将正常核酸离体转移到可培养的细胞类型(例如,自体或异源原代细胞或其后代)中,然后将该细胞(或其后代)注射到目的组织或全身注射。

[0128] 5.3包含基因特异性修饰的细胞

[0129] 在一个方面,本公开涉及具有一种或多种内源性蛋白的减少或消除的表达的细胞或包含一种或多种细胞(例如,动物细胞)的组合物。在某些实施例中,细胞具有BAX; BAK; 和/或PERK多肽的减少或消除的表达。

[0130] 如本文所用,消除的表达是指与参考细胞相比,消除特定内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在细胞中的表达。如本文所用,减少的表达是指与参考细胞相比,减少内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)在细胞中的表达。

[0131] 可与本公开主题关联使用的细胞的非限制性示例包括无脊椎动物和非哺乳动物脊椎动物(例如,鸟类、爬行动物和两栖动物)细胞,例如,草地贪夜蛾细胞、埃及伊蚊细胞、白纹伊蚊细胞、黑腹果蝇细胞和家蚕细胞;或者哺乳动物细胞,例如,CHO细胞(例如,DHFR CHO细胞)、dp12.CHO细胞、CHO-K1(ATCC、CCL-61)、SV40转化的猴肾CV1系(例如,COS-7ATCC CRL-1651)、人胚肾系(例如,HEK 293细胞或亚克隆以用于在悬浮培养中生长的HEK 293细胞)、幼仓鼠肾细胞(例如,BHK,ATCC CCL 10)、小鼠塞尔托利氏细胞(例如TM4)、猴肾细胞(例如CV1ATCC CCL 70)、非洲绿猴肾细胞(例如VERO-76、ATCC CRL-1587)、人宫颈癌细胞(例如HELA、ATCC CCL 2)、犬肾细胞(例如,MDCK、ATCC CCL 34)、布法罗大鼠肝细胞(例如,BRL 3A、ATCC CRL 1442)、人肺细胞(例如,W138、ATCC CCL 75)、人肝细胞(例如,Hep G2、HB 8065)、小鼠乳腺肿瘤(例如,MMT 060562、ATCC CCL51)、TRI细胞、MRC 5细胞、FS4细胞、人肝癌细胞系(例如Hep G2)、骨髓瘤细胞系(例如,Y0、NS0和Sp2/0)。在某些实施例中,细胞为CHO细胞。CHO细胞的其他非限制性示例包括CHO K1SV细胞、CHO DG44细胞、CHO DUKXB-11细胞、CHOK1S细胞和CHO K1M细胞。

[0132] 在某些实施例中,本文所公开的细胞表达目的重组产物。在某些实施例中,目的重组产物是重组蛋白。在某些实施例中,目的重组产物为单克隆抗体。目的重组产物的其他非限制性示例在第5.5节中提供。

[0133] 在某些实施例中,本文所公开的细胞可用于生产商业上有用的量的目的重组产物。在某些实施例中,本文所公开的细胞至少部分地经由相对于参考细胞(例如,WT细胞)较高的生产率和较高的滴度以及增加/延长的活力来促进商业上有用的量的目的重组产物的生产。

[0134] 在某些实施例中,本文所公开的细胞可包含编码目的重组产物的核酸。在某些实施例中,核酸可以存在于一种或多种载体(例如,表达载体)中。载体的一种类型是“质粒”,其是指另外的DNA链段可以连接到其中的环状双链DNA环。载体的另一种类型是病毒载体,其中另外的DNA链段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的细胞(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加体哺乳动物载体)中自主复制。在导入细胞中之后,将其其他载体(例如,非附加体哺乳动物载体)整合到细胞的基因组中,从而与细胞基因组一起复制。此外,某些载体(表达载体)能够引导与其可操作地连接的核酸的表达。通常,在重组DNA技术中有用的表达载体通常是质粒(载体)的形式。用于本公开中的表达载体的另外非限制性示例包括起到等效功能的病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0135] 在某些实施例中,可以将编码目的重组产物的核酸引入细胞中,如本文所公开。在某些实施例中,可以通过本领域已知的任何方法将核酸引入细胞中,包括但不限于转染、电穿孔、显微注射、用含有核酸序列的病毒或噬菌体载体感染、细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移、原生质球融合等。在某些实施例中,细胞是真核细胞,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施例中,细胞为淋巴细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。

[0136] 在某些实施例中,编码目的重组产物的核酸可以随机整合在宿主细胞基因组中

(“随机整合”或“RI”)。例如但不限于,编码目的重组产物的核酸可以随机整合在细胞的基因组中,该细胞也已经修饰以减少或消除一种或多种特定内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)的表达。

[0137] 在某些实施例中,编码目的重组产物的核酸可以以靶向方式整合在宿主细胞基因组中(如本文详细描述“靶向整合”或“TI”)。例如但不限于,编码目的重组产物的核酸可以以靶向方式整合在细胞的基因组中,该细胞已经修饰以减少或消除一种或多种特定内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK多肽)的表达。在某些实施例中,使用TI宿主细胞引入编码目的重组产物的核酸将提供稳健、稳定的细胞培养性能以及较低的所得目的重组产物中的序列变体风险。TI宿主细胞及其使用策略详细描述于美国专利申请公开第US20210002669号中,其内容通过引用整体并入。

[0138] 在采用靶向整合的某些实施例中,外源性核苷酸序列整合在TI宿主细胞的基因组的特定基因座内的位点。在某些实施例中,外源性核苷酸序列整合于其中的基因座与以下序列至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约99.9%同源,这些序列选自Contig NW_006874047.1、NW_006884592.1、NW_006881296.1、NW_003616412.1、NW_003615063.1、NW_006882936.1和NW_003615411.1。

[0139] 在某些实施例中,紧邻整合的外源性序列的5'端的核苷酸序列选自由以下项组成的组:NW_006874047.1的核苷酸41190-45269、NW_006884592.1的核苷酸63590-207911、NW_006881296.1的核苷酸253831-491909、NW_003616412.1的核苷酸69303-79768、NW_003615063.1的核苷酸293481-315265、NW_006882936.1的核苷酸2650443-2662054或NW_003615411.1的核苷酸82214-97705以及与其至少50%同源的序列。在某些实施例中,紧邻整合的外源性序列的5'端的核苷酸序列与以下核苷酸至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约99.9%同源:NW_006874047.1的核苷酸41190-45269、NW_006884592.1的核苷酸63590-207911、NW_006881296.1的核苷酸253831-491909、NW_003616412.1的核苷酸69303-79768、NW_003615063.1的核苷酸293481-315265、NW_006882936.1的核苷酸2650443-2662054或NW_003615411.1的核苷酸82214-97705。

[0140] 在某些实施例中,紧邻整合的外源性序列的3'端的核苷酸序列选自由以下项组成的组:NW_006874047.1的核苷酸45270-45490、NW_006884592.1的核苷酸207912-792374、NW_006881296.1的核苷酸491910-667813、NW_003616412.1的核苷酸79769-100059、NW_003615063.1的核苷酸315266-362442、NW_006882936.1的核苷酸2662055-2701768或NW_003615411.1的核苷酸97706-105117以及与其至少50%同源的序列。在某些实施例中,紧邻整合的外源性序列的3'端的核苷酸序列与以下核苷酸至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约99.9%同源:NW_006874047.1的核苷酸45270-45490、NW_006884592.1的核苷酸207912-792374、NW_006881296.1的核苷酸491910-667813、NW_003616412.1的核苷酸79769-100059、NW_003615063.1的核苷酸315266-362442、NW_006882936.1的核苷酸2662055-2701768或NW_003615411.1的核苷酸97706-105117。

[0141] 在某些实施例中,整合的外源性序列在5'端侧接有选自由以下项组成的组的核苷酸序列:NW_006874047.1的核苷酸41190-45269、NW_006884592.1的核苷酸63590-207911、

NW_006881296.1的核苷酸253831-491909、NW_003616412.1的核苷酸69303-79768、NW_003615063.1的核苷酸293481-315265、NW_006882936.1的核苷酸2650443-2662054和NW_003615411.1的核苷酸82214-97705以及与其至少50%同源的序列。在某些实施例中,整合的外源性序列在3'端侧接有选自以下项组成的组的核苷酸序列:NW_006874047.1的核苷酸45270-45490、NW_006884592.1的核苷酸207912-792374、NW_006881296.1的核苷酸491910-667813、NW_003616412.1的核苷酸79769-100059、NW_003615063.1的核苷酸315266-362442、NW_006882936.1的核苷酸2662055-2701768和NW_003615411.1的核苷酸97706-105117以及与其至少50%同源的序列。在某些实施例中,侧接整合的外源性核苷酸序列的5'端的核苷酸序列与以下核苷酸至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约99.9%同源:NW_006874047.1的核苷酸41190-45269、NW_006884592.1的核苷酸63590-207911、NW_006881296.1的核苷酸253831-491909、NW_003616412.1的核苷酸69303-79768、NW_003615063.1的核苷酸293481-315265、NW_006882936.1的核苷酸2650443-2662054和NW_003615411.1的核苷酸82214-97705。在某些实施例中,侧接整合的外源性核苷酸序列的3'端的核苷酸序列与以下核苷酸至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约99.9%同源:NW_006874047.1的核苷酸45270-45490、NW_006884592.1的核苷酸207912-792374、NW_006881296.1的核苷酸491910-667813、NW_003616412.1的核苷酸79769-100059、NW_003615063.1的核苷酸315266-362442、NW_006882936.1的核苷酸2662055-2701768和NW_003615411.1的核苷酸97706-105117。

[0142] 在某些实施例中,整合的外源性核苷酸序列可操作地连接至选自以下组成的组的核苷酸序列:Contigs NW_006874047.1、NW_006884592.1、NW_006881296.1、NW_003616412.1、NW_003615063.1、NW_006882936.1、和NW_003615411.1以及与其至少50%同源的序列。在某些实施例中,可操作地连接至外源性核苷酸序列的核苷酸序列与选自以下组成的组的序列至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约99.9%同源:Contig NW_006874047.1、NW_006884592.1、NW_006881296.1、NW_003616412.1、NW_003615063.1、NW_006882936.1和NW_003615411.1。

[0143] 在某些实施例中,可以使用基于转座酶的整合将编码目的产物的核酸整合在宿主细胞基因组中。基于转座酶的整合技术公开于例如Trubitsyna等人,Nucleic Acids Res. 45(10):e89(2017),Li等人,PNAS 110(25):E2279-E2287(2013)和WO 2004/009792,该参考文献全文以引用方式并入本文。

[0144] 在某些实施例中,编码目的重组产物的核酸可以随机整合在宿主细胞基因组中(“随机整合”或“RI”)。在某些实施例中,随机整合可由本领域中已知的任何方法或系统介导。在某些实施例中,随机整合由MaxCyte **STX®** 电穿孔系统介导。

[0145] 在某些实施例中,靶向整合可与随机整合组合。在某些实施例中,靶向整合可在随机整合之后。在某些实施例中,随机整合之后可以是靶向整合。例如但不限于,编码目的重组产物的核酸可以随机整合到细胞的基因组中,该细胞已被调节以减少或消除一种或多种特定内源性蛋白(例如,BAX;BAK;和/或PERK)的表达,并且编码相同目的重组产物的核酸可以以靶向方式整合到细胞的基因组中。

[0146] 在某些实施例中,本文所公开的细胞包含一种或多种改变的基因。在某些实施例

中,对基因的改变减少或消除了内源性蛋白的表达。在某些实施例中,本文所公开的细胞包含一种或多种改变的BAX;BAK;和/或PERK基因。在某些实施例中,改变的BAX;BAK;和/或PERK基因后续转录物编码具有减少或消除的表达的内源性蛋白。在某些实施例中,该一种或多种改变的基因通过编码区的破坏而得到改变。在某些实施例中,基因改变包括双等位基因改变。在某些实施例中,基因改变包括1个或更多个碱基对、2个或更多个碱基对、3个或更多个碱基对、4个或更多个碱基对、5个或更多个碱基对、6个或更多个碱基对、7个或更多个碱基对、8个或更多个碱基对、9个或更多个碱基对、10个或更多个碱基对、11个或更多个碱基对、12个或更多个碱基对、13个或更多个碱基对、14个或更多个碱基对、15个或更多个碱基对、16个或更多个碱基对、17个或更多个碱基对、18个或更多个碱基对、19个或更多个碱基对或20个或更多个碱基对的缺失。

[0147] 在某些实施例中,本公开涉及修饰的细胞或包含一种或多种修饰的细胞的组合物,其中修饰的细胞或包含一种或多种修饰的细胞的组合物表现出以下特征中的一种或多种:1)相对于缺乏修饰的类似细胞,经修饰的细胞表现出改善的细胞培养性能;以及2)与缺乏修饰的类似细胞相比,经修饰的细胞表现出改善的活力。

[0148] 在某些实施例中,本公开涉及细胞或包含一种或多种细胞的组合物,其具有所有以下特征:1)相对于缺乏修饰的类似细胞,经修饰的细胞表现出改善的细胞培养性能;以及2)与缺乏修饰的类似细胞相比,经修饰的细胞表现出改善的活力。

[0149] 在某些实施例中,相对于缺乏修饰的类似细胞,本发明的经修饰的细胞表现出改善的细胞培养性能。在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞表现出改善的细胞培养性能,原因是:i)增加/延长的活力和更健康的代谢线粒体;和/或ii)更高的生产率和更高的滴度。在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞表现出由于BAX;BAK和/或PERK的减少或消除的表达而增加/延长的活力和更健康的代谢线粒体。在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞表现出由于BAX的减少或消除的表达而增加/延长的活力和更健康的代谢线粒体。在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞表现出由于BAK的减少或消除的表达而增加/延长的活力和更健康的代谢线粒体。在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞表现出由于PERK的减少或消除的表达而更高的生产力和更高的滴度。在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞表现出由于BAX;BAK和/或PERK的减少或消除的表达而增加/延长的活力和改善的细胞培养性能。

[0150] 在某些实施例中,本公开涉及经修饰的细胞或包含一种或多种TI细胞的组合物,其表现出改善的细胞培养性能。在某些实施例中,本公开的TI细胞表现出BAX;BAK;和PERK的减少或消除的表达。在某些实施例中,本公开的TI细胞表现出BAX的减少或消除的表达。在某些实施例中,本公开的TI细胞表现出BAK的减少或消除的表达。在某些实施例中,本公开的TI细胞表现出PERK的减少或消除的表达。

[0151] 在某些实施例中,细胞为细胞系。在某些实施例中,细胞为已经培养某些代数的细胞系。在某些实施例中,细胞为原代细胞。

[0152] 在某些实施例中,如果在10、20、30、50、100、200或300代中,目的多肽的表达水平保持在某些水平、提高或降低20%以下,则该目的多肽的表达稳定。在某些实施例中,如果培养物可在不经任何选择的情况下得以保持,则该目的多肽的表达稳定。在某些实施例中,如果目的基因的多肽产物达到约1g/L、约2g/L、约3g/L、约4g/L、约5g/L、约10g/L、约12g/L、

约14g/L或约16g/L,则目的多肽的表达水平高。

[0153] 可利用常规的细胞生物学方法将目的外源性核苷酸或载体引入宿主细胞中,这些细胞生物学方法包括但不限于转染、转导、电穿孔或注射。在某些实施例中,利用基于化学的转染方法将目的外源性核苷酸或载体引入宿主细胞中,这些基于化学的转染方法包括基于脂质的转染方法、基于磷酸钙的转染方法、基于阳离子聚合物的转染方法或基于纳米颗粒的转染方法。在某些实施例中,利用病毒介导的转导将目的外源性核苷酸或载体引入宿主细胞中,这些方法包括但不限于慢病毒、逆转录病毒、腺病毒或腺相关病毒介导的转导。在某些实施例中,通过基因枪介导的注射将目的外源性核苷酸或载体引入宿主细胞中。在某些实施例中,使用本文所述的方法将DNA和RNA分子均引入宿主细胞中。

[0154] 5.4. 细胞培养方法

[0155] 在一个方面,本公开提供一种用于生产目的重组产物的方法,该方法包括培养本文所公开的经修饰的细胞。本领域已知的用于哺乳动物细胞的合适培养条件可以用于培养本文所公开的经修饰的细胞(J. Immunol. Methods (1983) 56:221-234) 或者可以由技术人员容易地确定(参见例如,Animal Cell Culture: A Practical Approach第2版, Rickwood, D. 和 Hames, B. D., 编. Oxford University Press, New York (1992))。

[0156] 细胞培养物可以在适合被培养的特定细胞的培养基中制备。市售培养基诸如Ham's F10 (Sigma)、基本必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 和杜尔贝科改良伊格尔培养基 (DMEM, Sigma) 是示例性的营养液。此外, Ham和Wallace, (1979) Meth. Enz., 58:44; Barnes和Sato, (1980) Anal. Biochem., 102:255; 美国专利号4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 5,122,469或美国专利。号4,560,655; 国际公开号WO 90/03430; 和WO 87/00195中描述的培养基中的任一种都可以用作培养基; 所有参考文献的公开均以引用方式并入本文。这些培养基中的任何一种都可以根据需要补充激素和/或其他生长因子(诸如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(诸如HEPES)、核苷(诸如腺苷和胸苷)、抗生素(诸如庆大霉素(正泰霉素))、微量元素(定义为通常以微摩尔范围的最终浓度存在的无机化合物)、脂质(诸如亚油酸或其他脂肪酸)及其合适的载体以及葡萄糖或等效能源。也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何其他必要的补充剂。

[0157] 在某些实施例中,已经修饰以减少和/或消除特定内源性蛋白的活性的细胞为CHO细胞。任何合适的培养基都可用于培养本公开的CHO细胞。在某些实施例中,用于培养CHO细胞的合适培养基可以含有基础培养基组分,诸如基于DMEM/HAM F-12的制剂(关于DMEM和HAM F12培养基的组成,参见American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas,第六版,1988,第346-349页中的培养基制剂)(美国专利号5,122,469中所述的培养基制剂是特别适当的),其中一些组分(诸如氨基酸、盐、糖和维生素)的浓度有所改变,并且任选地含有甘氨酸、次黄嘌呤和胸苷;重组人胰岛素、水解的蛋白胍诸如Primatone HS或Primatone RL (Sheffield, England) 或等效物;细胞保护剂诸如Pluronic F68或等效的pluronic多元醇;庆大霉素;和微量元素。

[0158] 在某些实施例中,已经修饰以减少和/或消除特定内源性蛋白(例如,BAX; BAK; 和/或PERK多肽)的表达的细胞为表达重组产物的细胞。重组产物可以通过在多种细胞培养条件下使表达目的重组产物的细胞生长来生产。例如,用于大规模或小规模重组产物生产的细胞培养程序在本公开的范围内可能是有用的。在后两种系统中,可以使用包括但不限于

流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶培养、摇瓶培养或搅拌罐生物反应器系统的程序,使用或不使用微载体,并且替代性地以分批、分批补料或连续模式操作。

[0159] 在某些实施例中,本公开的细胞培养在搅拌罐生物反应器系统中进行并且采用分批补料培养程序。在分批补料培养中,最初将细胞和培养基供应至培养皿,并且在培养期间将另外的培养营养物连续或以不连续的增量供料至培养物,在终止培养之前进行或不进行定期的细胞和/或产物收获。分批补料培养可以包括例如半连续分批补料培养,其中周期性地去除全培养物(包括细胞和培养基)并用新鲜培养基代替。分批补料培养与简单分配培养的区别之处在于,在分批补料培养中,在培养过程开始时将用于细胞培养的所有组分(包括细胞和所有培养营养物)供应至培养皿。分批补料培养可以进一步与灌流培养区别开来,因为在该过程中不从培养容器中除去上清液(在灌流培养中,细胞通过例如过滤、封装、锚定到微载体等而被限制在培养物中,并且培养基连续或间歇地引入并从培养容器中去除)。

[0160] 在某些实施例中,培养物中的细胞可以根据适用于特定细胞和预期的特定生产计划的任何方案或程序进行增殖。因此,本公开预期了单步或多步培养程序。在单步培养中,将细胞接种到培养环境中,并且在细胞培养的单个生产期内采用本公开的过程。替代性地,设想了一种多阶段培养。在多阶段培养中,细胞可以在多个步骤或时期内培养。例如,细胞可以在第一步或生长期培养中生长,其中将可能从储存中取出的细胞接种到适合促进生长和高活力的培养基中。通过向细胞培养物中添加新鲜培养基,可以将细胞维持在生长期一段合适的时间。

[0161] 在某些实施例中,设计分批补料或连续细胞培养条件以增强哺乳动物细胞在细胞培养的生长期内的生长。在生长期,细胞在使生长最大化的条件下生长一段时间。培养条件,诸如温度、pH、溶解氧(dO₂)等,是那些与特定宿主一起使用的条件,且对普通技术人员而言将会是显而易见的。通常,使用酸(例如CO₂)或碱(例如Na₂CO₃或NaOH)将pH调节到约6.5与7.5之间的水平。用于培养哺乳动物细胞诸如CHO细胞的合适温度范围为约30℃至38℃,并且合适的dO₂为空气饱和度的5%-90%之间。

[0162] 在特定阶段,细胞可用于接种细胞培养的生产期或步骤。替代性地,如上所述,生产期或步骤可以与接种或生长期或步骤连续。

[0163] 在某些实施例中,本公开中描述的培养方法可以进一步包括从细胞培养物例如从细胞培养物的生产期收获重组产物。在某些实施例中,通过本公开的细胞培养方法生产的重组产物可以从第三生物反应器例如生产生物反应器中收获。例如,但不限于,所公开的方法可以包括在细胞培养物的生产期完成时收获重组产物。可替代地或另外地,可以在生产期完成之前收获重组产物。在某些实施例中,一旦达到特定的细胞密度,就可以从细胞培养物中收获重组产物。例如,但不限于,细胞密度在收获前可以是约 2.0×10^7 个细胞/mL至约 5.0×10^7 个细胞/mL。

[0164] 在某些实施例中,从细胞培养物中收获产物可以包括离心、过滤、声波分离、絮凝和细胞去除技术中的一种或多种。

[0165] 在某些实施例中,目的重组产物可以从细胞分泌或者可以是膜结合蛋白、胞质蛋白或核蛋白。在某些实施例中,可溶形式的重组产物可以从条件细胞培养基中纯化,并且膜结合形式的重组产物可以通过从表达细胞制备总膜级分并用非离子洗涤剂诸如TRITON®X-100(EMD Biosciences, San Diego, Calif.)提取该膜来纯化。在某些实施例

中,可以通过裂解细胞(例如,通过机械力、超声处理和/或洗涤剂)、通过离心去除细胞膜级分并保留上清液来制备胞质蛋白或核蛋白。

[0166] 5.5目的重组产物的生产

[0167] 本公开的细胞和/或方法可用于生产可由本文所公开的细胞表达的任何目的重组产物。

[0168] 5.5.1病毒颗粒和病毒载体产物

[0169] 在某些实施例中,本公开的细胞和/或方法可用于生产病毒颗粒或病毒载体。在某些实施例中,本公开的方法可用于生产病毒颗粒。在某些实施例中,本公开的方法可用于生产病毒载体。在某些实施例中,本公开的方法可用于表达病毒多肽。此类多肽的非限制性示例包括病毒蛋白、病毒结构(Cap)蛋白、病毒包装(Rep)蛋白、AAV衣壳蛋白和病毒辅助蛋白。在某些实施例中,病毒多肽为AAV病毒多肽。

[0170] 在某些实施例中,可用于涉及生产病毒颗粒或病毒载体的细胞包括但不限于:人胚肾系(例如,HEK 293细胞或亚克隆以在悬浮培养中生长的HEK 293细胞)、人宫颈癌细胞(例如,HELA、ATCC CCL 2)、人肺细胞(例如,W138、ATCC CCL 75)、人肝细胞(例如,Hep G2、HB 8065)、人肝癌细胞系(例如,Hep G2)、骨髓瘤细胞系(例如,Y0、NS0和Sp2/0)、通过SV40转化的猴肾CV1系(例如,COS-7ATCC CRL-1651)、幼仓鼠肾细胞(例如,BHK、ATCC CCL 10)、小鼠支持细胞(例如,TM4)、猴肾细胞(例如,CV1ATCC CCL 70)、非洲绿猴肾细胞(例如,VERO-76、ATCC CRL-1587)、犬肾细胞(例如,MDCK、ATCC CCL 34)、水牛大鼠肝细胞(例如,BRL 3A、ATCC CRL 1442)、小鼠乳腺肿瘤(例如,MMT 060562、ATCC CCL51)、TRI细胞、MRC 5细胞和FS4细胞。在某些实施例中,细胞为CHO细胞。CHO细胞的其他非限制性示例包括CHO K1SV细胞、CHO DG44细胞、CHO DUKXB-11细胞、CHOK1S细胞和CHO K1M细胞

[0171] 在某些实施例中,可由通过本文所述的方法生产的病毒颗粒携带的目的基因的示例包括哺乳动物多肽,诸如,例如,肾素;生长激素,包括人类生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状旁腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;卵泡刺激素;降钙素;促黄体素;胰高血糖素;瘦素;凝血因子诸如VIII因子、IX因子、组织因子和维勒布兰德氏(von Willebrands)因子;抗凝血因子诸如蛋白C;心钠素;肺表面活性剂;纤溶酶原激活剂,诸如尿激酶或人类尿或组织型纤溶酶原激活剂(t-PA);蛙皮素(bombesin);凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子- β ;肿瘤坏死因子受体诸如死亡受体5和CD120;TNF相关的细胞凋亡诱导配体(TRAIL);B细胞成熟抗原(BCMA);B淋巴细胞刺激因子(BLyS);增殖诱导配体(APRIL);脑啡肽酶;RANTES(调节正常表达和分泌的T细胞活化);人类巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白诸如人类血清白蛋白;缪勒管(Muellerian)抑制物质;松弛素A链;松弛素B链;松弛素原;小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白,诸如 β -内酰胺酶、DNA酶;IgE;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA),诸如CTLA-4;抑制素;激活素;血小板衍生内皮细胞生长因子(PD-ECGF);血管内皮生长因子家族蛋白(例如,VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和P1GF);血小板衍生生长因子(PDGF)家族蛋白(例如,PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D及其二聚体);成纤维细胞生长因子(FGF)家族诸如aFGF、bFGF、FGF4和FGF9;表皮生长因子(EGF);激素或生长因子的受体诸如VEGF受体(例如,VEGFR1、VEGFR2和VEGFR3),表皮生长因子(EGF)受体(例如,ErbB1、ErbB2、ErbB3和ErbB4受体),血小板衍生生长因子(PDGF)受体(例如,PDGFR- α 和PDGFR- β),和成纤维细胞生长因子

受体;TIE配体(血管生成素、ANGPT1、ANGPT2);血管生成素受体诸如TIE1和TIE2;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子诸如骨源性神经营养因子(BDNF),神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、神经营养蛋白-5或神经营养蛋白-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6)或神经生长因子诸如NGF-b;转化生长因子(TGF)诸如TGF- α 和TGF- β ,包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4或TGF- β 5;胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I),胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP);CD蛋白诸如CD3、CD4、CD8、CD19和CD20;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白(BMP);趋化因子诸如CXCL12和CXCR4;干扰素诸如干扰素- α 、 β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),例如,M-CSF、GM-CSF和G-CSF;细胞因子诸如白介素(IL),例如,IL-1至IL-10;中期因子;超氧化物歧化酶;T细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原诸如,例如,AIDS包膜的一部分;转运蛋白;归巢受体;寻址蛋白;调节蛋白;整合素诸如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM;肝配蛋白;Bv8; δ 样配体4(DLL4);De1-1;BMP9;BMP10;卵泡抑素;肝细胞生长因子(HGF)/散射因子(SF);Alk1;Robo4;ESM1;串珠素;EGF样结构域7(EGFL7);CTGF及其家族成员;血小板反应蛋白诸如血小板反应蛋白1和血小板反应蛋白2;胶原蛋白诸如胶原蛋白IV和胶原蛋白XVIII;神经纤毛蛋白诸如NRP1和NRP2;多效生长因子(PTN);颗粒蛋白原;多育曲菌素;Notch蛋白诸如Notch1和Notch4;导蛋白诸如Sema3A、Sema3C和Sema3F;肿瘤相关抗原诸如CA125(卵巢癌抗原);免疫粘附素;以上列出的任何多肽以及抗体(包括抗体片段)的片段和/或变体与一个或多个蛋白(包括例如以上列出的任何蛋白)结合。

[0172] 在一些实施例中,由通过本公开的哺乳动物细胞生产的病毒颗粒携带的目的基因可编码蛋白质,该蛋白质结合至任何蛋白质或与其发生相互作用,这些蛋白质包括但不限于选自以下项组成的组的细胞因子、细胞因子相关蛋白质和细胞因子受体:8MPI、8MP2、8MP38(GDF10)、8MP4、8MP6、8MP8、CSF1(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(G-CSF)、EPO、FGF1(α FGF)、FGF2(β FGF)、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFN81、IFNG、IFNWI、FEL1、FEL1(EPSELON)、FEL1(ZETA)、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17B、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、LTA(TNF- β)、LTB、TNF(TNF- α)、TNFSF4(OX40配体)、TNFSF5(CD40配体)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27配体)、TNFSF8(CD30配体)、TNFSF9(4-1BB配体)、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(TRANSE)、TNFSF12(APO3L)、TNFSF13(April)、TNFSF13B、TNFSF14(HVEM-L)、TNFSF15(VEGI)、TNFSF18、HGF(VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、IL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP(瘦素)、PTN和THPO.k。

[0173] 在一些实施例中,由通过本公开的哺乳动物细胞生产的病毒颗粒携带的目的基因可编码蛋白质,该蛋白质结合至选自以下项组成的组的细胞因子、细胞因子受体或细胞因子相关蛋白质或与其发生相互作用:CCL1(1-309)、CCL2(MCP-1/MCAF)、CCL3(MIP-I α)、

CCL4 (MIP-1 β)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CCL11 (嗜酸性粒细胞趋化因子)、CCL 13 (MCP-4)、CCL 15 (MIP-1 δ)、CCL 16 (HCC-4)、CCL 17 (TARC)、CCL 18 (PARC)、CCL 19 (MDP-3 β)、CCL20 (MIP-3 α)、CCL21 (SLC/exodus-2)、CCL22 (MDC/STC-1)、CCL23 (MPIF-1)、CCL24 (MPIF-2/嗜酸性粒细胞趋化因子-2)、CCL25 (TECK)、CCL26 (嗜酸性粒细胞趋化因子-3)、CCL27 (CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1 (GRO1)、CXCL2 (GRO2)、CXCL3 (GRO3)、CXCL5 (ENA-78)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCL 10 (IP 10)、CXCL 11 (1-TAC)、CXCL 12 (SDF1)、CXCL 13、CXCL 14、CXCL 16、PF4 (CXCL4)、PPBP (CXCL7)、CX3CL 1 (SCYDI)、SCYE1、XCL1 (淋巴细胞趋化因子)、XCL2 (SCM-1 β)、BLRI (MDR15)、CCBP2 (D6/JAB61)、CCR1 (CKR1/HM145)、CCR2 (mcp-IR β /IRA)、CCR3 (CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5 (CMKBR5/ChemR13)、CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR7 (CKR7/EBI1)、CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9 (GPR-9-6)、CCRL1 (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CX3CR1 (V28)、CXCR4、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR81 (FKSG80)、CXCR3 (GPR9/CKR-L2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、HM74、IL8RA (IL8 α)、IL8RB (IL8 β)、LTB4R (GPR16)、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5、C5R1、CSF3、GRCC10 (C10)、EPO、FY (DARC)、GDF5、HDF1、HDF1 α 、DL8、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2和VHL。在一些实施例中,本公开的哺乳动物细胞表达的多肽可以与以下项结合或相应作用:0772P (CA125,MUC16) (即卵巢癌抗原),ABCF1;ACVR1;ACVR1B;ACVR2;ACVR2B;ACVRL1;ADORA2A;蛋白聚糖;AGR2;AICDA;AIF1;AIG1;AKAP1;AKAP2;AMH;AMHR2; β 淀粉样蛋白;ANGPTL;ANGPT2;ANGPTL3;ANGPTL4;ANPEP;APC;APOC1;AR;ASLG659;ASPHD1 (含有天冬氨酸 β -羟化酶结构域的1;LOC253982);AZGP1 (锌-a-糖蛋白);B7.1;B7.2;BAD;BAFF-R (B细胞活化因子受体,BLyS受体3,BR3;BAG1;BAI1;BCL2;BCL6;BDNF;BLNK;BLRI (MDR15);BMP1;BMP2;BMP3B (GDF10);BMP4;BMP6;BMP8;BMPIR1A;BMPIR1B (骨形态发生蛋白受体-IB型);BMPIR2;BPAG1 (网蛋白);BRCA1;短蛋白聚糖;C19或f10 (IL27w);C3;C4A;C5;C5R1;CANT1;CASP1;CASP4;CAV1;CCBP2 (D6/JAB61);CCL1 (1-309);CCL11 (嗜酸细胞活化趋化因子);CCL13 (MCP-4);CCL15 (MIP1 δ);CCL16 (HCC-4);CCL17 (TARC);CCL18 (PARC);CCL19 (MIP-3 β);CCL2 (MCP-1);MCAF;CCL20 (MIP-3 α);CCL21 (MTP-2);SLC;exodus-2;CCL22 (MDC/STC-1);CCL23 (MPIF-1);CCL24 (MPIF-2/嗜酸细胞活化趋化因子-2);CCL25 (TECK);CCL26 (嗜酸细胞活化趋化因子-3);CCL27 (CTACK/ILC);CCL28;CCL3 (MTP-1 α);CCL4 (MDP-1 β);CCL5 (RANTES);CCL7 (MCP-3);CCL8 (mcp-2);CCNA1;CCNA2;CCND1;CCNE1;CCNE2;CCR1 (CKR1/HM145);CCR2 (mcp-IR β /RA);CCR3 (CKR/CMKBR3);CCR4;CCR5 (CMKBR5/ChemR13);CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6);CCR7 (CKBR7/EBI1);CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1);CCR9 (GPR-9-6);CCRL1 (VSHK1);CCRL2 (L-CCR);CD164;CD19;CD1C;CD20;CD200;CD22 (B细胞受体CD22-B同种型);CD24;CD28;CD3;CD37;CD38;CD3E;CD3G;CD3Z;CD4;CD40;CD40L;CD44;CD45RB;CD52;CD69;CD72;CD74;CD79A (CD79 α ,免疫球蛋白相关 α ,B细胞特异性蛋白);CD79B;CDS;CD80;CD81;CD83;CD86;CDH1 (E-钙粘蛋白);CDH10;CDH12;CDH13;CDH18;CDH19;CDH20;CDH5;CDH7;CDH8;CDH9;CDK2;CDK3;CDK4;CDK5;CDK6;CDK7;CDK9;CDKN1A (p21/WAF1/Cip1);CDKN1B (p27/Kip1);CDKN1C;CDKN2A (P16INK4a);CDKN2B;CDKN2C;CDKN3;CEBPB;CER1;CHGA;CHGB;几丁质酶;CHST10;CKLFSF2;CKLFSF3;CKLFSF4;CKLFSF5;CKLFSF6;CKLFSF7;CKLFSF8;CLDN3;CLDN7 (密封蛋白-7);CLL-1 (CLEC12A,MICL和DCAL2);CLN3;CLU (丛生蛋白);CMKLR1;CMKOR1 (RDC1);CNR1;COL 18A1;

COL1A1;COL4A3;COL6A1;补体因子D;CR2;CRP;CRIPTO(CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、畸胎瘤衍生生长因子);CSFI(M-CSF);CSF2(GM-CSF);CSF3(GCSF);CTLA4;CTNNB1(b-连环蛋白);CTSB(组织蛋白酶B);CX3CL1(SCYDI);CX3CR1(V28);CXCL1(GR01);CXCL10(IP-10);CXCL11(I-TAC/IP-9);CXCL12(SDF1);CXCL13;CXCL14;CXCL16;CXCL2(GR02);CXCL3(GR03);CXCL5(ENA-78/LIX);CXCL6(GCP-2);CXCL9(MIG);CXCR3(GPR9/CKR-L2);CXCR4;CXCR5(伯基特淋巴瘤受体1,G蛋白偶联受体);CXCR6(TYMSTR/STRL33/Bonzo);CYB5;CYC1;CYSLTR1;DAB2IP;DES;DKFZp451J0118;DNCLI;DPP4;E16(LAT1,SLC7A5);E2F1;ECGF1;EDG1;EFNA1;EFNA3;EFNB2;EGF;EGFR;ELAC2;ENG;EN01;EN02;EN03;EPHB4;EphB2R;EP0;ERBB2(Her-2);EREG;ERK8;ESR1;ESR2;ETBR(内皮素B型受体);F3(TF);FADD;FasL;FASN;FCER1A;FCER2;FCGR3A;FcRH1(Fc受体样蛋白1);FcRH2(IFGP4、IRTA4、SPAP1A(含磷酸酶锚蛋白1a的SH2结构域)、SPAP1B、SPAP1C);FGF;FGF1(α FGF);FGF10;FGF11;FGF12;FGF12B;FGF13;FGF14;FGF16;FGF17;FGF18;FGF19;FGF2(bFGF);FGF20;FGF21;FGF22;FGF23;FGF3(int-2);FGF4(HST);FGF5;FGF6(HST-2);FGF7(KGF);FGF8;FGF9;FGFR;FGFR3;FIGF(VEGFD);FEL1(EPSILON);FIL1(ZETA);FLJ12584;FLJ25530;FLRT1(纤连蛋白);FLT1;FOS;FOSL1(FRA-1);FY(DARC);GABRP(GABAa);GAGEB1;GAGEC1;GALNAC4S-6ST;GATA3;GDF5;GDNF-Ra1(GDNF家族受体 α 1);GFRA1;GDNFR;GDNFRA;RETL1;TRNR1;RET1L;GDNFR- α 1;GFR- α -1);GEDA;GFI1;GGT1;GM-CSF;GNAS1;GNRHI;GPR2(CCR10);GPR19(G蛋白偶联受体19;Mm.4787);GPR31;GPR44;GPR54(KISS1受体;KISS1R;GPR54;HOT7T175;AXOR12);GPR81(FKSG80);GPR172A(G蛋白偶联受体172A;GPCR41;FLJ11856;D15Erttd747e);GRCC10(C10);GRP;GSN(凝溶胶蛋白);GSTP1;HAVCR2;HDAC4;HDAC5;HDAC7A;HDAC9;HGF;HIF1A;HOP1;组胺和组胺受体;HLA-A;HLA-DOB(MHC II类分子(Ia抗原)的 β 亚基);HLA-DRA;HM74;HMOXI;HUMCYT2A;ICEBERG;ICOSL;1D2;IFN- α ;IFNA1;IFNA2;IFNA4;IFNA5;IFNA6;IFNA7;IFNB1;IFN γ ;DFNW1;IGBP1;IGF1;IGF1R;IGF2;IGFBP2;IGFBP3;IGFBP6;IL-1;IL10;IL10RA;IL10RB;IL11;IL11RA;IL-12;IL12A;IL12B;IL12RB1;IL12RB2;IL13;IL13RA1;IL13RA2;IL14;IL15;IL15RA;IL16;IL17;IL17B;IL17C;IL17R;IL18;IL18BP;IL18R1;IL18RAP;IL19;IL1A;IL1B;IL1F10;IL1F5;IL1F6;IL1F7;IL1F8;IL1F9;IL1HY1;IL1R1;IL1R2;IL1RAP;IL1RAPL1;IL1RAPL2;IL1RL1;IL1RL2;ILIRN;IL2;IL20;IL20R α ;IL21R;IL22;IL-22c;IL22R;IL22RA2;IL23;IL24;IL25;IL26;IL27;IL28A;IL28B;IL29;IL2RA;IL2RB;IL2RG;IL3;IL30;IL3RA;IL4;IL4R;IL5;IL5RA;IL6;IL6R;IL6ST(糖蛋白130);甲型流感;乙型流感;EL7;EL7R;EL8;IL8RA;DL8RB;IL8RB;DL9;DL9R;DLK;INHA;INHBA;INSL3;INSL4;IRAK1;IRTA2(免疫球蛋白超家族受体易位相关2);ERAK2;ITGA1;ITGA2;ITGA3;ITGA6(a6整合素);ITGAV;ITGB3;ITGB4(b4整合素); α 4 β 7和 α E β 7整合素异二聚体;JAG1;JAK1;JAK3;JUN;K6HF;KAI1;KDR;KITLG;KLF5(GC方框BP);KLF6;KLK10;KLK12;KLK13;KLK14;KLK15;KLK3;KLK4;KLK5;KLK6;KLK9;KRT1;KRT19(角蛋白19);KRT2A;KHTHB6(头发特异性H型角蛋白);LAMAS;LEP(瘦素);LGR5(富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5;GPR49,GPR67);Lingo-p75;Lingo-Troy;LPS;LTA(TNF-b);LTB;LTB4R(GPR16);LTB4R2;LTBR;LY64(淋巴细胞抗原64(RP105),富含亮氨酸重复序列(LRR)家族的I型膜蛋白);Ly6E(淋巴细胞抗原6复合物,位点E;Ly67,RIG-E,SCA-2,TSA-1);Ly6G6D(淋巴细胞抗原6复合物,位点G6D;Ly6-D,MEGT1);LY6K(淋巴细胞抗原6复合物,位点K;LY6K;HSJ001348;FLJ35226);MACMARCKS;MAG或OMgp;MAP2K7(c-Jun);MDK;MDP;MIB1;中期因子;

MEF;MIP-2;MKI67;(Ki-67);MMP2;MMP9;MPF(MPF、MSLN、SMR、巨核细胞增强因子、间皮素);MS4A1;MSG783(RNF124,假设蛋白FLJ20315);MSMB;MT3(金属硫蛋白-111);MTSS1;MUC1(粘蛋白);MYC;MY088;Napi3b(也称为NaPi2b)(NAPI-3B、NPTIIb、SLC34A2、溶质载体家族34(磷酸钠)、成员2、II型钠依赖性磷酸盐转运蛋白3b);NCA;NCK2;神经蛋白聚糖;NFKB1;NFKB2;NGFB(NGF);NGFR;NgR Lingo;NgR-Nogo66(Nogo);NgR-p75;NgR-Troy;NME1(NM23A);NOX5;NPPB;NR0B1;NR0B2;NR1D1;NR1D2;NR1H2;NR1H3;NR1H4;NR112;NR113;NR2C1;NR2C2;NR2E1;NR2E3;NR2F1;NR2F2;NR2F6;NR3C1;NR3C2;NR4A1;NR4A2;NR4A3;NR5A1;NR5A2;NR6A1;NRP1;NRP2;NT5E;NTN4;ODZI;OPRD1;OX40;P2RX7;P2X5(嘌呤能受体P2X配体门控离子通道5);PAP;PART1;PATE;PAWR;PCA3;PCNA;PD-L1;PD-L2;PD-1;POGFA;POGFB;PECAM1;PF4(CXCL4);PGF;PGR;磷酸酶蛋白聚糖;PIAS2;PIK3CG;PLAU(uPA);PLG;PLXDC1;PMEL17(银同系物);SILV;D12S53E;PMEL17;SI;SIL);PPBP(CXCL7);PPID;PRI;PRKCQ;PRKDI;PRL;PROC;PROK2;PSAP;PSCA hlg(2700050C12Rik,C530008016Rik,RIKEN cDNA 2700050C12,RIKEN cDNA 2700050C12基因);PTAFR;PTEN;PTGS2(COX-2);PTN;RAC2(p21-Rac2);RARB;RET(ret原癌基因;MEN2A;HSCR1;MEN2B;MTC1;PTC;CDHF12;Hs.168114;RET51;RET-ELE1);RGS1;RGS13;RGS3;RNF110(ZNF144);ROBO2;S100A2;SCGB1D2(亲脂素B);SCGB2A1(乳房珠蛋白2);SCGB2A2(乳房珠蛋白1);SCYE1(内皮单核细胞激活细胞因子);SDF2;Sema 5b(FLJ10372,KIAA1445,Mm.42015,SEMA5B,SEMA5B、脑信号蛋白5b Hlog、sema结构域、七个血小板反应蛋白重复序列(1型和1型样)、跨膜结构域(TM)和短胞质结构域(脑信号蛋白)5B);SERPINA1;SERPINA3;SERPINB5(丝抑蛋白);SERPINE1(PAI-1);SERPDMF1;SHBG;SLA2;SLC2A2;SLC33A1;SLC43A1;SLIT2;SPPI;SPRR1B(Spr1);ST6GAL1;STAB1;STAT6;STEAP(前列腺六段跨膜上皮抗原);STEAP2(HGNC_8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前列腺癌相关基因1、前列腺癌相关性蛋白1、前列腺的六段跨膜上皮抗原2、六段跨膜前列腺蛋白);TB4R2;TBX21;TCPIO;TOGFI;TEK;TENB2(假定跨膜蛋白聚糖);TGFA;TGFB1;TGFB1I1;TGFB2;TGFB3;TGFB1;TGFBRI;TGFBRI2;TGFBRI3;THIL;THBS1(血小板反应蛋白-1);THBS2;THBS4;THPO;TIE(Tie-1);TMP3;组织因子;TLR1;TLR2;TLR3;TLR4;TLR5;TLR6;TLR7;TLR8;TLR9;TLR10;TMEFF1(具有EGF样和两个卵泡抑制素样结构域1的跨膜蛋白1;Tomoregulin-1);TMEM46(shisa同系物2);TNF;TNF-a;TNFAEP2(B94);TNFAIP3;TNFRSF11A;TNFRSF1A;TNFRSF1B;TNFRSF21;TNFRSF5;TNFRSF6(Fas);TNFRSF7;TNFRSF8;TNFRSF9;TNFSF10(TRAIL);TNFSF11(TRANSE);TNFSF12(AP03L);TNFSF13(April);TNFSF13B;TNFSF14(HVEM-L);TNFSF15(VEGI);TNFSF18;TNFSF4(OX40配体);TNFSF5(CD40配体);TNFSF6(FasL);TNFSF7(CD27配体);TNFSFS(CD30配体);TNFSF9(4-1BB配体);TOLLIP;Toll样受体;TOP2A(拓扑异构酶Ea);TP53;TPM1;TPM2;TRADD;TMEM118(环指蛋白,跨膜2;RNFT2;FLJ14627);TRAF1;TRAF2;TRAF3;TRAF4;TRAF5;TRAF6;TREM1;TREM2;TrpM4(BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、瞬时受体电位阳离子通道、亚家族M、成员4);TRPC6;TSLP;TWEAK;酪氨酸酶(TYR;OCA1A;OCA1A;酪氨酸酶;SHEP3);VEGF;VEGFB;VEGFC;多功能蛋白聚糖;VHL C5;VLA-4;XCL1(淋巴细胞趋化因子);XCL2(SCM-1b);XCRI(GPR5/CCXCR1);YY1;和/或ZFPM2。

[0174] 根据本公开的哺乳动物细胞可以封装许多其他病毒成分和/或其他目的基因,并且以上列表并非意在限制。

[0175] 5.5.2重组蛋白产物

[0176] 在某些实施例中,本公开的细胞和/或方法可用于生产重组蛋白,例如,重组哺乳动物蛋白。此类重组蛋白的非限制性示例包括激素、受体、融合蛋白(包括抗体融合蛋白,例如抗体-细胞因子融合蛋白)、调节因子、生长因子、补系统因子、酶、凝血因子、抗凝血因子、激酶、细胞因子、CD蛋白、白介素、治疗性蛋白质、诊断蛋白质和抗体。本公开的细胞和/或方法对正在生产的分子(例如,抗体)不是特异性的。

[0177] 在某些实施例中,本公开的方法可用于生产抗体,包括治疗性和诊断性抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,通过本公开的细胞和方法生产的抗体可以是但不限于单特异性抗体(例如,由单个重链序列和单个轻链序列组成的抗体,包括此类配对的多聚体)、多特异性抗体及其抗原结合片段。例如,但不限于,多特异性抗体可以是双特异性抗体、双表位抗体、T细胞依赖性双特异性抗体(TDB)、双重作用FAb(DAF)或其抗原结合片段。

[0178] 5.5.2.1多特异性抗体

[0179] 在某些方面,通过本文所提供的细胞和方法生产的抗体为多特异性抗体,例如,双特异性抗体。“多特异性抗体”为单克隆抗体,其对于至少两个不同位点(即,不同抗原上的不同表位)具有结合特异性(即,双特异性的)或对于相同抗原上的不同表位具有结合特异性(即,双表位的)。在某些方面,多特异性抗体具有三种或更多种结合特异性。可以将多特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段,如本文所述。

[0180] 制备多特异性抗体的技术包括但不限于,具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见,Milstein和Cuello,Nature 305:537(1983))和“杵臼”工程化(参见例如,美国专利号5,731,168和Atwell等人,J.Mol.Biol.270:26(1997))。多特异性抗体也可以通过以下方法制备:工程静电控制效应来制造抗体Fc-异二聚体分子(参见例如,WO 2009/089004);交联两个或多个抗体或片段(参见例如,美国专利号4,676,980和Brennan等人,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链生产双特异性抗体(参见例如,Kostelny等人,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992)和WO 2011/034605);使用通用轻链技术来规避轻链错配问题(参见例如,WO 98/50431);使用“双体抗体”技术来制备双特异性抗体片段(参见例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));以及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如,Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994));以及例如Tutt等人J.Immunol.147:60(1991)所述的方法制备三特异性抗体。

[0181] 本文还包括具有三个或更多个抗原结合位点的工程化抗体,包括例如“章鱼抗体”或者DVD-Ig(参见例如,WO 2001/77342和WO 2008/024715)。具有三个或更多个抗原结合位点的多特异性抗体的其他非限制性示例可以在WO 2010/115589、WO 2010/112193、WO 2010/136172、WO 2010/145792和WO 2013/026831中找到。双特异性抗体或其抗原结合片段还包括“双作用FAb”或“DAF”(参见例如US 2008/0069820和WO 2015/095539)。

[0182] 多特异性抗体也可以以不对称形式提供,其中在具有相同抗原特异性的一个或多个结合臂中有结构域互换,即通过交换VH/VL结构域(参见例如,WO 2009/080252和WO 2015/150447)、CH1/CL结构域(参见例如,WO 2009/080253)或完整的Fab臂(参见例如,WO 2009/080251、WO 2016/016299,还参见Schaefer等人,PNAS,108(2011)1187-1191,以及Klein等人,MAbs 8(2016)1010-20)。在某些实施例中,多特异性抗体包含交叉Fab片段。术语“交叉Fab片段”或“xFab片段”或“交换型Fab片段”是指这样的Fab片段,其中重链和轻链的可变区或恒定区被交换。交叉Fab片段包含由轻链可变区(VL)和重链恒定区1(CH1)组成

的多肽链,以及由重链可变区(VH)和轻链恒定区(CL)组成的多肽链。还可以通过将荷电或非荷电的氨基酸突变引入结构域界面以指导正确的Fab配对,以对不对称Fab臂进行工程化。参见例如WO 2016/172485。

[0183] 多特异性抗体的各种其他分子形式是在本领域中已知的并且包括在本文中(参见例如Spiess等人,Mol.Immunol.67(2015)95-106)。

[0184] 在某些实施例中,本文还包括的一种特定类型的多特异性抗体是这样的双特异性抗体,该双特异性抗体设计用于同时结合靶细胞(例如,肿瘤细胞)上的表面抗原和T细胞受体(TCR)复合物的活化不变组分(诸如CD3),以用于再靶向T细胞以杀伤靶细胞。

[0185] 可以用于此目的的双特异性抗体格式的其他非限制性示例包括但不限于所谓的“BiTE”(双特异性T细胞接合剂)分子,其中两个scFv分子通过柔性接头融合(参见例如,WO 2004/106381、WO 2005/061547、WO 2007/042261和WO 2008/119567,Nagorsen和Bäuerle,Exp Cell Res 317,1255-1260(2011));双体抗体(Holliger等人,Prot.Eng.9,299-305(1996))及其衍生物,诸如串联双体抗体(“TandAb”;Kipriyanov等人,J Mol Biol 293,41-56(1999));“DART”(双重亲和力再靶向)分子,其基于双体抗体格式,但特征在于用于额外稳定性的C末端二硫桥(Johnson等人,J Mol Biol 399,436-449(2010)),以及所谓的三功能抗体(triomab),是完整的杂交小鼠/大鼠IgG分子(综述于Seimetz等人,Cancer Treat.Rev.36,458-467(2010)中)。本文所包含的特定的T细胞双特异性抗体形式描述于以下文献中:WO 2013/026833;WO 2013/026839;WO 2016/020309;Bacac等人,Oncoimmunology 5(8)(2016)e1203498。

[0186] 5.5.2.2抗体片段

[0187] 在某些方面,通过本文所提供的细胞和方法产生的抗体为抗体片段。例如,但不限于,抗体片段为Fab'、Fab'-SH或F(ab')₂片段,特别是Fab片段。木瓜蛋白酶消化完整抗体产生两个称为“Fab”片段的相同的抗原结合片段,每个“Fab”片段含有重链可变结构域和轻链可变结构域(分别为VH和VL)以及轻链的恒定结构域(CL)和重链的第一恒定结构域(CH1)。因此,术语“Fab片段”是指包括包含VL结构域和CL结构域的轻链以及包含VH结构域和CH1结构域的重链片段的抗体片段。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于Fab'片段在CH1结构域的羧基末端添加了残基,这些残基包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是Fab'片段,其中恒定结构域的半胱氨酸残基具有游离巯基。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,该片段具有两个抗原结合位点(两个Fab片段)和Fc区的一部分。对于包括挽救受体结合表位残基且具有延长的体内半衰期的Fab片段和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5869046。

[0188] 在某些实施例中,抗体片段为双体抗体、三体抗体或四体抗体。“双体抗体”为具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。参见例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003);和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。关于三体抗体和四体抗体的描述也可参见Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。

[0189] 在另一个方面,抗体片段为单链Fab片段。“单链Fab片段”或“scFab”是由抗体重链可变结构域(VH)、抗体重链恒定结构域1(CH1)、抗体轻链可变结构域(VL)、抗体轻链恒定结构域(CL)和接头组成的多肽,其中所述抗体结构域和所述接头在N末端至C末端方向上具有

以下顺序中的一种:a)VH-CH1-接头-VL-CL、b)VL-CL-接头-VH-CH1、c)VH-CL-接头-VL-CH1,或d)VL-CH1-接头-VH-CL。特别地,所述接头是至少30个氨基酸,优选地在32个与50个氨基酸之间的多肽。所述单链Fab片段经由CL结构域与CH1结构域之间的天然二硫键而稳定化。此外,这些单链Fab片段可以通过经由插入半胱氨酸残基(例如,根据Kabat编号的可变重链中的44位和可变轻链中的100位)生成链间二硫键,而进一步稳定化。

[0190] 在另一方面,抗体片段是单链可变片段(scFv)。“单链可变片段”或“scFv”是抗体的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)的融合蛋白,是通过接头连接的。特别地,接头为10个至约25个氨基酸的短多肽,并且通常富含甘氨酸以获得柔性,以及富含丝氨酸或苏氨酸以获得溶解性,并且可以将VH的N末端与VL的C末端连接,或反之亦然。尽管去除了恒定区并且引入了接头,但该蛋白质仍保留了原始抗体的特异性。关于scFv片段的综述,参见例如Plückthun,载于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编辑(Springer-Verlag,New York),第269至第315页(1994);还可参见W0 93/16185;以及美国专利号5,571,894和5,587,458。

[0191] 在另一方面,抗体片段是单结构域抗体。“单结构域抗体”是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或者抗体的全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些方面,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例如美国专利号6,248,516B1)。

[0192] 在某些方面,通过本文所提供的细胞和方法产生的抗体融合蛋白为抗体-细胞因子融合蛋白。虽然此类抗体-细胞因子融合蛋白可包括全长抗体,但在某些实施例中,抗体-细胞因子融合蛋白的抗体是抗体片段,例如,单链可变片段(scFv)、双体抗体、aFab片段,或小免疫蛋白(SIP)。在某些实施例中,细胞因子可以融合到抗体的N末端或C末端。在某些实施例中,抗体-细胞因子融合蛋白的细胞因子包含多个亚基。在某些实施例中,细胞因子的亚基是相同的(同源的)。在某些实施例中,细胞因子的亚基是不同的(异源的)。在某些实施例中,细胞因子的亚基与同一抗体融合。在某些实施例中,细胞因子的亚基与不同的抗体融合。有关抗体-细胞因子融合蛋白的概述,参见例如,Murer等人,N Biotechnol.,52:42-53(2019)。

[0193] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化。

[0194] 5.5.2.3嵌合抗体和人源化抗体

[0195] 在某些方面,通过本文所提供的细胞和方法生产的抗体为嵌合抗体。某些嵌合抗体例如描述于以下参考文献:美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(诸如猴)的可变区)和人恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体为其中类别或亚类已经与亲本抗体的类别或亚类改变的“类别转换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0196] 在某些方面,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以减少对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中CDR(或其部分)源自非人抗体,并且FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在某些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,CDR残基所来源的抗体)的相应残基取代,例如,以恢复或改善抗体

特异性或亲合力。

[0197] 人源化抗体及其制备方法例如综述于以下参考文献:Almagro和Fransson, *Front.Biosci.* 13:1619-1633(2008), 并且进一步例如描述于以下参考文献:Riechmann等人, *Nature* 332:323-329(1988); Queen等人, *Proc.Nat'l Acad.Sci.USA* 86:10029-10033(1989); 美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409; Kashmiri等人, *Methods* 36:25-34(2005) (描述特异性决定区(SDR)移植); Padlan, *Mol.Immunol.* 28:489-498(1991) (描述“表面再塑”); Dall'Acqua等人, *Methods* 36:43-60(2005) (描述“FR改组”); 以及Osbourne等人, *Methods* 36:61-68(2005) 和Klimka等人, *Br.J.Cancer*, 83:252-260(2000) (描述FR改组的“导向选择”方法)。

[0198] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见例如, Sims等人 *J.Immunol.* 151:2296(1993)); 源自轻链或重链可变区特定亚组的人抗体的共有序列的框架区(参见例如, Carter等人 *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89:4285(1992); 和Presta等人 *J.Immunol.*, 151:2623(1993)); 人成熟(体细胞突变)框架区或人种系框架区(参见例如, Almagro和Fransson, *Front.Biosci.* 13:1619-1633(2008)); 以及源自筛选FR文库的框架区(参见例如, Baca等人, *J.Biol.Chem.* 272:10678-10684(1997) 和Rosok等人, *J.Biol.Chem.* 271:22611-22618(1996))。

[0199] 5.5.2.4人抗体

[0200] 在某些方面,通过本文提供的细胞和方法生产的抗体为人抗体。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。人抗体一般描述于:van Dijk和van de Winkel, *Curr.Opin.Pharmacol.* 5:368-74(2001) 和Lonberg, *Curr.Opin.Immunol.* 20:450-459(2008)。

[0201] 可以通过以下方式来制备人抗体:将免疫原施用于转基因动物,所述转基因动物已被修饰以响应于抗原激发而生产具有人可变区的完整人抗体或完整抗体。此类动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座,所述全部或部分人免疫球蛋白基因座替代内源性免疫球蛋白基因座,或者在动物的染色体外存在或随机整合至动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被灭活。关于从转基因动物得到人抗体的方法的综述参见Lonberg, *Nat.Biotech.* 23:1117-1125(2005)。也参见,例如,描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584; 描述HUMAB®技术的美国专利号5,770,429; 描述K-MOUSE®技术的美国专利号7,041,870, 以及描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公开号US2007/0061900。可以进一步修饰(例如通过与不同的人恒定区组合)来自此类动物产生的完整抗体的人可变区。

[0202] 人抗体也可以通过基于杂交瘤的方法制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系。(参见例如, Kozbor *J.Immunol.*, 133:3001(1984); Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 以及Boerner等人, *J.Immunol.*, 147:86(1991))。通过人B细胞杂交瘤技术生产的人抗体也描述于:Li等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 103:3557-3562(2006)。另外的方法包括例如在美国专利号7,189,826(描述了从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体) 和Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268(2006) (描述了人-人杂交瘤) 中描述的那些方法。人类杂交瘤技术(Trioma技术)也

描述于Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)和Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)中。

[0203] 5.5.2.5靶分子

[0204] 可通过本文公开的细胞和方法生产的抗体靶向的分子的非限制性示例包括可溶性血清蛋白及其受体和其他膜结合蛋白(例如,粘附素)。在某些实施例中,通过本文所公开的细胞和方法生产的抗体能够结合至选自由以下项组成的组的一种、两种或更多种细胞因子、细胞因子相关蛋白质和细胞因子受体:8MPI、8MP2、8MP38(GDF10)、8MP4、8MP6、8MP8、CSF1(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(G-CSF)、EPO、FGF1(α FGF)、FGF2(β FGF)、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFN81、IFNG、IFNWI、FEL1、FEL1(EPELON)、FEL1(ZETA)、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17B、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFBb3、LTA(TNF- β)、LTB、TNF(TNF- α)、TNFSF4(OX40配体)、TNFSF5(CD40配体)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27配体)、TNFSF8(CD30配体)、TNFSF9(4-1BB配体)、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(TRANCE)、TNFSF12(APO3L)、TNFSF13(April)、TNFSF13B、TNFSF14(HVEM-L)、TNFSF15(VEGI)、TNFSF18、HGF(VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、IL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP(瘦素)、PTN和THPO.k

[0205] 在某些实施例中,通过本文所公开的细胞和方法生产的抗体能够结合至选自由以下项组成的组的细胞因子、细胞因子受体或细胞因子相关蛋白质:CCL1(1-309)、CCL2(MCP-1/MCAF)、CCL3(MIP-1 α)、CCL4(MIP-1 β)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL8(mcp-2)、CCL11(嗜酸性粒细胞趋化因子)、CCL13(MCP-4)、CCL15(MIP-1 δ)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TARC)、CCL18(PARC)、CCL19(MDP-3b)、CCL20(MIP-3 α)、CCL21(SLC/exodus-2)、CCL22(MDC/STC-1)、CCL23(MPIF-1)、CCL24(MPIF-2/嗜酸性粒细胞趋化因子-2)、CCL25(TECK)、CCL26(嗜酸性粒细胞趋化因子-3)、CCL27(CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1(GRO1)、CXCL2(GRO2)、CXCL3(GRO3)、CXCL5(ENA-78)、CXCL6(GCP-2)、CXCL9(MIG)、CXCL10(IP10)、CXCL11(1-TAC)、CXCL12(SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、PF4(CXCL4)、PPBP(CXCL7)、CX3CL1(SCYDI)、SCYE1、XCL1(淋巴细胞趋化因子)、XCL2(SCM-1 β)、BLRI(MDR15)、CCBP2(D6/JAB61)、CCRI(CKRI/HM145)、CCR2(mcp-IRB-IRA)、CCR3(CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5(CMKBR5/ChemR13)、CCR6(CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR7(CKR7/EBI1)、CCR8(CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9(GPR-9-6)、CCRL1(VSHK1)、CCRL2(L-CCR)、XCR1(GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1(RDC1)、CX3CR1(V28)、CXCR4、GPR2(CCR10)、GPR31、GPR81(FKSG80)、CXCR3(GPR9/CKR-L2)、CXCR6(TYMSTR/STRL33/Bonzo)、HM74、IL8RA(IL8R α)、IL8RB(IL8R β)、LTB4R(GPR16)、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5、C5R1、CSF3、GRCC10(C10)、EPO、FY(DARC)、GDF5、HDF1、HDF1 α 、DL8、PRL、RGS3、RGS13、

SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2和VHL。

[0206] 在某些实施例中,通过本文所公开的方法生产的抗体(例如,多特异性抗体诸如双特异性抗体)能够结合至选自以下的一种或多种靶分子:0772P(CA125,MUC16)(即卵巢癌抗原),ABCF1;ACVR1;ACVR1B;ACVR2;ACVR2B;ACVRL1;ADORA2A;蛋白聚糖;AGR2;AICDA;AIF1;AIG1;AKAP1;AKAP2;AMH;AMHR2; β 淀粉样蛋白;ANGPTL;ANGPT2;ANGPTL3;ANGPTL4;ANPEP;APC;APOC1;AR;ASLG659;ASPHD1(含有1的天冬氨酸 β -羟化酶结构域;LOC253982);AZGP1(锌-a-糖蛋白);B7.1;B7.2;BAD;BAFF-R(B细胞活化因子受体,BLyS受体3,BR3;BAG1;BAI1;BCL2;BCL6;BDNF;BLNK;BLRI(MDR15);BMP1;BMP2;BMP3B(GDF10);BMP4;BMP6;BMP8;BMPIR1A;BMPIR1B(骨形态发生蛋白受体-IB型);BMPIR2;BPAG1(网蛋白);BRCA1;短蛋白聚糖;C19或f10(IL27w);C3;C4A;C5;C5R1;CANT1;CASP1;CASP4;CAV1;CCBP2(D6/JAB61);CCL1(1-309);CCL11(嗜酸细胞活化趋化因子);CCL13(MCP-4);CCL15(MIP1 δ);CCL16(HCC-4);CCL17(TARC);CCL18(PARC);CCL19(MIP-3 β);CCL2(MCP-1);MCAF;CCL20(MIP-3 α);CCL21(MTP-2);SLC;exodus-2;CCL22(MDC/STC-1);CCL23(MPIF-1);CCL24(MPIF-2/嗜酸细胞活化趋化因子-2);CCL25(TECK);CCL26(嗜酸细胞活化趋化因子-3);CCL27(CTACK/ILC);CCL28;CCL3(MTP-1 α);CCL4(MDP-1 β);CCL5(RANTES);CCL7(MCP-3);CCL8(mcp-2);CCNA1;CCNA2;CCND1;CCNE1;CCNE2;CCR1(CKRI/HM145);CCR2(mcp-1R β /RA);CCR3(CKR/CMKBR3);CCR4;CCR5(CMKBR5/ChemR13);CCR6(CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6);CCR7(CKBR7/EBI1);CCR8(CMKBR8/TER1/CKR-L1);CCR9(GPR-9-6);CCRL1(VSHK1);CCRL2(L-CCR);CD164;CD19;CD1C;CD20;CD200;CD22(B细胞受体CD22-B同种型);CD24;CD28;CD3;CD37;CD38;CD3E;CD3G;CD3Z;CD4;CD40;CD40L;CD44;CD45RB;CD52;CD69;CD72;CD74;CD79A(CD79 α ,免疫球蛋白相关 α ,B细胞特异性蛋白);CD79B;CDS;CD80;CD81;CD83;CD86;CDH1(E-钙粘蛋白);CDH10;CDH12;CDH13;CDH18;CDH19;CDH20;CDH5;CDH7;CDH8;CDH9;CDK2;CDK3;CDK4;CDK5;CDK6;CDK7;CDK9;CDKN1A(p21/WAF1/Cip1);CDKN1B(p27/Kip1);CDKN1C;CDKN2A(P16INK4a);CDKN2B;CDKN2C;CDKN3;CEBPB;CER1;CHGA;CHGB;几丁质酶;CHST10;CKLFSF2;CKLFSF3;CKLFSF4;CKLFSF5;CKLFSF6;CKLFSF7;CKLFSF8;CLDN3;CLDN7(密封蛋白-7);CLL-1(CLEC12A,MICL和DCAL2);CLN3;CLU(丛生蛋白);CMKLR1;CMKOR1(RDC1);CNR1;COL18A1;COL1A1;COL4A3;COL6A1;补体因子D;CR2;CRP;CRIPTO(CR,CR1,CRGF,CRIPTO,TDGF1、畸胎瘤衍生生长因子);CSFI(M-CSF);CSF2(GM-CSF);CSF3(GCSF);CTLA4;CTNNB1(b-连环蛋白);CTSB(组织蛋白酶B);CX3CL1(SCYDI);CX3CR1(V28);CXCL1(GR01);CXCL10(IP-10);CXCL11(I-TAC/IP-9);CXCL12(SDF1);CXCL13;CXCL14;CXCL16;CXCL2(GR02);CXCL3(GR03);CXCL5(ENA-78/LIX);CXCL6(GCP-2);CXCL9(MIG);CXCR3(GPR9/CKR-L2);CXCR4;CXCR5(伯基特淋巴瘤受体1,G蛋白偶联受体);CXCR6(TYMSTR/STRL33/Bonzo);CYB5;CYC1;CYSLTR1;DAB2IP;DES;DKFZp451J0118;DNCLI;DPP4;E16(LAT1,SLC7A5);E2F1;ECGF1;EDG1;EFNA1;EFNA3;EFNB2;EGF;EGFR;ELAC2;ENG;ENO1;ENO2;ENO3;EPHB4;EphB2R;EP0;ERBB2(Her-2);EREG;ERK8;ESR1;ESR2;ETBR(内皮素B型受体);F3(TF);FADD;FasL;FASN;FCER1A;FCER2;FCGR3A;FcRH1(Fc受体样蛋白1);FcRH2(IFGP4,IRTA4,SPAP1A(含磷酸酶锚蛋白1a的SH2结构域)、SPAP1B、SPAP1C);FGF;FGF1(α FGF);FGF10;FGF11;FGF12;FGF12B;FGF13;FGF14;FGF16;FGF17;FGF18;FGF19;FGF2(bFGF);FGF20;FGF21;FGF22;FGF23;FGF3(int-2);FGF4(HST);FGF5;FGF6(HST-2);FGF7(KGF);FGF8;FGF9;FGFR;FGFR3;FIGF(VEGFD);FEL1(EPSILON);

FIL1 (ZETA); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (纤连蛋白); FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-1); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GDNF-Ra1 (GDNF家族受体 α 1); GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR- α 1; GFR- α -1); GEDA; GFI1; GGT1; GM-CSF; GNASI; GNRHI; GPR2 (CCR10); GPR19 (G蛋白偶联受体19; Mm. 4787); GPR31; GPR44; GPR54 (KISS1受体; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR12); GPR81 (FKSG80); GPR172A (G蛋白偶联受体172A; GPCR41; FLJ11856; D15Erttd747e); GRCC10 (C10); GRP; GSN (凝溶胶蛋白); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HGF; HIF1A; HOP1; 组胺和组胺受体; HLA-A; HLA-DOB (MHC II类分子(Ia抗原)的 β 亚基); HLA-DRA; HM74; HMOXI; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; 1D2; IFN- α ; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFN γ ; DFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2; ILIRN; IL2; IL20; IL20 α ; IL21R; IL22; IL-22c; IL22R; IL22RA2; IL23; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (糖蛋白130); 甲型流感; 乙型流感; EL7; EL7R; EL8; IL8RA; DL8RB; IL8RB; DL9; DL9R; DLK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAK1; IRTA2 (免疫球蛋白超家族受体易位相关2); ERAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (a6整合素); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (b4整合素); α 4 β 7和 α E β 7整合素异二聚体; JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; KITLG; KLF5 (GC方框BP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19 (角蛋白19); KRT2A; KHTHB6 (头发特异性H型角蛋白); LAMAS (瘦素); LGR5 (富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5; GPR49, GPR67); Lingo-p75; Lingo-Troy; LPS; LTA (TNF-b); LTB; LTB4R (GPR16); LTB4R2; LTBR; LY64 (淋巴细胞抗原64 (RP105), 富含亮氨酸重复序列 (LRR) 家族的I型膜蛋白); Ly6E (淋巴细胞抗原6复合物, 位点E; Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1); Ly6G6D (淋巴细胞抗原6复合物, 位点G6D; Ly6-D, MEGT1); LY6K (淋巴细胞抗原6复合物, 位点K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226); MACMARCKS; MAG或OMgp; MAP2K7 (c-Jun); MDK; MDP; MIB1; 中期因子; MEF; MIP-2; MKI67; (Ki-67); MMP2; MMP9; MPF (MPF、MSLN、SMR、巨核细胞增强因子、间皮素); MS4A1; MSG783 (RNF124, 假设蛋白FLJ20315); MSMB; MT3 (金属硫蛋白-111); MTSS1; MUC1 (粘蛋白); MYC; MY088; Napi3b (也称为NaPi2b) (NAPI-3B、NPTIIb、SLC34A2、溶质载体家族34 (磷酸钠)、成员2、II型钠依赖性磷酸盐转运蛋白3b); NCA; NCK2; 神经蛋白聚糖; NFKB1; NFKB2; NGFB (NGF); NGFR; NgR Lingo; NgR-Nogo66 (Nogo); NgR-p75; NgR-Troy; NME1 (NM23A); NOX5; NPPB; NROB1; NROB2; NR1D1; NR1D2; NR1H2; NR1H3; NR1H4; NR112; NR113; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1; NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRP1; NRP2; NT5E; NTN4; ODZI; OPRD1; OX40; P2RX7; P2X5 (嘌呤能受体P2X配体门控离子通道5); PAP; PART1; PATE; PAWR; PCA3; PCNA; PD-L1; PD-L2; PD-1; POGFA; POGFB; PECAM1; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; 磷酸酶蛋白聚糖; PIAS2; PIK3CG; PLAU (uPA); PLG; PLXDC1; PMEL17 (银同系物; SILV; D12S53E; PMEL17; SI; SIL); PPBP (CXCL7); PPID; PRI; PRKCQ; PRKDI; PRL; PROC; PROK2; PSAP; PSCA h1g (2700050C12Rik, C530008016Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKENcDNA 2700050C12基因); PTAFR; PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; RAC2 (p21-Rac2); RARB; RET (RET原癌基

因;MEN2A;HSCR1;MEN2B;MTC1;PTC;CDHF12;Hs.168114;RET51;RET-ELE1);RGS1;RGS13;RGS3;RNF110 (ZNF144);ROBO2;S100A2;SCGB1D2 (亲脂素B);SCGB2A1 (乳房珠蛋白2);SCGB2A2 (乳房珠蛋白1);SCYE1 (内皮单核细胞激活细胞因子);SDF2;Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG、脑信号蛋白5b Hlog、sema结构域、七个血小板反应蛋白重复序列(1型和1型样)、跨膜结构域(TM)和短胞质结构域(脑信号蛋白)5B);SERPINA1;SERPINA3;SERPINB5 (丝抑蛋白);SERPINE1 (PAI-1);SERPDMF1;SHBG;SLA2;SLC2A2;SLC33A1;SLC43A1;SLIT2;SPPI;SPRR1B (Spr1);ST6GAL1;STABI;STAT6;STEAP (前列腺六段跨膜上皮抗原);STEAP2 (HGNC_8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前列腺癌相关基因1、前列腺癌相关性蛋白1、前列腺的六段跨膜上皮抗原2、六段跨膜前列腺蛋白);TB4R2;TBX21;TCPI0;TOGFI;TEK;TENB2 (假定跨膜蛋白聚糖);TGFA;TGFB1;TGFB1I;TGFB2;TGFB3;TGFB1;TGFBRI;TGFB2;TGFB3;THIL;THBS1 (血小板反应蛋白-1);THBS2;THBS4;THP0;TIE (Tie-1);TMP3;组织因子;TLR1;TLR2;TLR3;TLR4;TLR5;TLR6;TLR7;TLR8;TLR9;TLR10;TMEFF1 (具有EGF样和两个卵泡抑制素样结构域1的跨膜蛋白1;Tomoregulin-1);TMEM46 (shisa同系物2);TNF;TNF-a;TNFAEP2 (B94);TNFAIP3;TNFRSF11A;TNFRSF1A;TNFRSF1B;TNFRSF21;TNFRSF5;TNFRSF6 (Fas);TNFRSF7;TNFRSF8;TNFRSF9;TNFSF10 (TRAIL);TNFSF11 (TRANCE);TNFSF12 (AP03L);TNFSF13 (April);TNFSF13B;TNFSF14 (HVEM-L);TNFSF15 (VEGI);TNFSF18;TNFSF4 (OX40配体);TNFSF5 (CD40配体);TNFSF6 (FasL);TNFSF7 (CD27配体);TNFSFS (CD30配体);TNFSF9 (4-1BB配体);TOLLIP;Toll样受体;TOP2A (拓扑异构酶Ea);TP53;TPM1;TPM2;TRADD;TMEM118 (环指蛋白,跨膜2;RNFT2;FLJ14627);TRAF1;TRAF2;TRAF3;TRAF4;TRAF5;TRAF6;TREM1;TREM2;TrpM4 (BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、瞬时受体电位阳离子通道、亚家族M、成员4);TRPC6;TSLP;TWEAK;酪氨酸酶 (TYR;OCA1A;OCA1A;酪氨酸酶;SHEP3);VEGF;VEGFB;VEGFC;多功能蛋白聚糖;VHL C5;VLA-4;XCL1 (淋巴细胞趋化因子);XCL2 (SCM-1b);XCRI (GPR5/CCXCR1);YY1;和ZFPM2。

[0207] 在某些实例中,通过本文所公开的方法生产的抗体能够与CD蛋白质结合,诸如CD3、CD4、CD5、CD16、CD19、CD20、CD21 (CR2 (补体受体2)或C3DR (C3d/爱泼斯坦巴尔病毒受体)或Hs.73792);CD33;CD34;CD64;CD72 (B细胞分化抗原CD72、Lyb-2);CD79b (CD79B、CD79 β 、Ig β (免疫球蛋白相关 β)、B29);ErbB受体家族的CD200成员,诸如EGF受体、HER2、HER3或HER4受体;细胞粘附分子,诸如LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 α 4/ β 7整合素和 α v/ β 3整合素,包括其 α 亚基或 β 亚基 (例如,抗CD11a、抗CD18或抗CD11b抗体);生长因子,诸如VEGF-A、VEGF-C;组织因子 (TF); α 干扰素 (α IFN);TNF α 、白介素,诸如IL-1 β 、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-13、IL-17AF、IL-1S、IL-13R α 1、IL13R α 2、IL-4R、IL-5R、IL-9R、IgE;血型抗原;flk2/flt3受体;肥胖 (OB) 受体;mp1受体;CTLA-4;RANKL、RANK、RSV F蛋白、蛋白C等。

[0208] 在某些实施例中,本文所提供的细胞和方法可用于生产抗体 (或多特异性抗体,诸如双特异性抗体),该抗体特异性地结合至补体蛋白C5 (例如,特异性地结合至人C5的抗C5激动剂抗体)。在某些实施例中,抗C5抗体包含1、2、3、4、5或6个选自以下项的CDR: (a) 重链可变区CDR1,其包含SSYYMA (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列; (b) 重链可变区CDR2,其包含AIFTGSGAEYKAEWAKG (SEQ ID NO:26) 的氨基酸序列; (c) 重链可变区CDR3,其包含DAGYDYPHTAMHY (SEQ ID NO:27) 的氨基酸序列; (d) 轻链可变区CDR1,其包含RASQGISSSLA

(SEQ ID NO:28)的氨基酸序列; (e) 轻链可变区CDR2,其包含GASETES (SEQ ID NO:29)的氨基酸序列;以及 (f) 轻链可变区CDR3,其包含QNTKVGSSYGNT (SEQ ID NO:30)的氨基酸序列。例如,在某些实施例中,抗C5抗体包含重链可变结构域 (VH) 序列,该VH序列包含一个、两个或三个选自以下的CDR: (a) 重链可变区CDR1,其包含(SSYMA (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列; (b) 重链可变区CDR2,其包含AIFTGSGAEYKAEWAKG (SEQ ID NO:26)的氨基酸序列; (c) 重链可变区CDR3,其包含DAGYDYPHTAMHY (SEQ ID NO:27)的氨基酸序列;和/或轻链可变结构域 (VL) 序列,该VL序列包含一个、两个或三个选自以下项的CDR: (d) 轻链可变区CDR1,其包含RASQGISSSLA (SEQ ID NO:28)的氨基酸序列; (e) 轻链可变区CDR2,其包含GASETES (SEQ ID NO:29)的氨基酸序列;以及 (f) 轻链可变区CDR3,其包含QNTKVGSSYGNT (SEQ ID NO:30)的氨基酸序列。上述重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3以及轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的序列在US2016/0176954中分别公开为SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123和SEQ ID NO:125。(参见US2016/0176954中的表7和表8。)

[0209] 在某些实施例中,抗C5抗体包含分别为以下的VH和VL序列

[0210] QVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTVH SSYYMAWVRQAPGKGLEWVGAIIFTGSGAEY KAEWAKGRVT ISKDTSKNQVVLMTNMDPV DTATYYCASD AGYDYPHTAM HYWGQGTLLV VSS (SEQ ID NO:31)

[0211] 和

[0212] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SSLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASETESGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQNTKVGSSYGNT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:32),包括那些序列的翻译后修饰。上述VH和VL序列在US2016/0176954中分别公开为SEQ ID NO:106和SEQ ID NO:111。(参见US2016/0176954中的表7和表8。)在某些实施例中,抗C5抗体为305L015 (参见US2016/0176954)。

[0213] 在某些实施例中,通过本文所公开的方法生产的抗体能够结合至OX40 (例如,特异性地结合至人OX40的抗OX40激动剂抗体)。在某些实施例中,抗OX40抗体包含1、2、3、4、5或6个选自以下项的CDR: (a) 重链可变区CDR1,其包含DSYMS (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列; (b) 重链可变区CDR2,其包含DMYPDNGDSSYNQKFRE (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列; (c) 重链可变区CDR3,其包含APRWYFSV (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列; (d) 轻链可变区CDR1,其包含RASQDISNYLN (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列; (e) 轻链可变区CDR2,其包含YTSRLRS (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;以及 (f) 轻链可变区CDR3,其包含QQGHTLPPT (SEQ ID NO:7)的氨基酸序列。例如,在某些实施例中,抗OX40抗体包含重链可变结构域 (VH) 序列,该VH序列包含一个、两个或三个选自以下的CDR: (a) 重链可变区CDR1,其包含DSYMS (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列; (b) 重链可变区CDR2,其包含DMYPDNGDSSYNQKFRE (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列;以及 (c) 重链可变区CDR3,其包含APRWYFSV (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;和/或轻链可变结构域 (VL) 序列,该VL序列包含一个、两个或三个选自以下项的CDR: (a) 轻链可变区CDR1,其包含RASQDISNYLN (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列; (b) 轻链可变区CDR2,其包含YTSRLRS (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;以及 (c) 轻链可变区CDR3,其包含QQGHTLPPT (SEQ ID NO:7)的氨基酸序列。在某些实施例中,抗OX40抗体包含分别为以下的VH和VL序列

[0214] EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DSYMSWVRQA PGQGLEWIGD MYPDNGDSSYNQKFRERVIT TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCVLAP RWYFSVWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:8)

[0215] 和

[0216] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKPGKAPKLLIYY TSRLRSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQGHTLPPTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:9), 包括那些序列的翻译后修饰。

[0217] 在某些实施例中, 抗OX40抗体包含1、2、3、4、5或6个选自以下项的CDR: (a) 重链可变区CDR1, 其包含NYLIE (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列; (b) 重链可变区CDR2, 其包含VINPGSGDTYYSEKFKG (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列; (c) 重链可变区CDR3, 其包含DRLDY (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列; (d) 轻链可变区CDR1, 其包含HASQDISSYIV (SEQ ID NO:13) 的氨基酸序列; (e) 轻链可变区CDR2, 其包含HGTNLED (SEQ ID NO:14) 的氨基酸序列; 以及 (f) 轻链可变区CDR3, 其包含VHYAQFPYT (SEQ ID NO:15) 的氨基酸序列。例如, 在某些实施例中, 抗OX40抗体包含重链可变结构域 (VH) 序列, 该VH序列包含一个、两个或三个选自以下的CDR: (a) 重链可变区CDR1, 其包含NYLIE (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列; (b) 重链可变区CDR2, 其包含VINPGSGDTYYSEKFKG (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列; 以及 (c) 重链可变区CDR3, 其包含DRLDY (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列; 和/或轻链可变结构域 (VL) 序列, 该VL序列包含一个、两个或三个选自以下项的CDR: (a) 轻链可变区CDR1, 其包含HASQDISSYIV (SEQ ID NO:13) 的氨基酸序列; (b) 轻链可变区CDR2, 其包含HGTNLED (SEQ ID NO:14) 的氨基酸序列; 以及 (c) 轻链可变区CDR3, 其包含VHYAQFPYT (SEQ ID NO:15) 的氨基酸序列。在某些实施例中, 抗OX40抗体包含分别为以下的VH和VL序列

[0218] EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYAFT NYLIEWVRQA PGQGLEWIGV INPGSGDTYY SEKFKGRVTI TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARDR LDYWGQGTIV TVSS (SEQ ID NO:16)

[0219] 和

[0220] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCHASQDIS SYIVWYQQKPGKAPKLLIYH GTNLEDGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCVH YAQFPYTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:17), 包括那些序列的翻译后修饰。

[0221] WO 2015/153513中提供了有关抗OX40抗体的进一步细节, 其全文以引用方式并入本文。

[0222] 在某些实例中, 通过本文所提供的细胞和方法生产的抗体能够结合至乙型流感病毒血凝素, 即“flub” (例如, 在体外和/或体内结合来自Yamagata谱系的乙型流感病毒的血凝素、结合来自Victoria谱系的乙型流感病毒的血凝素或结合来自Yamagata谱系、Victoria谱系和祖先谱系的乙型流感病毒的血凝素的抗体)。WO 2015/148806中描述了有关抗FluB抗体的进一步细节, 其全文以引用方式并入本文。

[0223] 在某些实施例中, 通过本文所提供的细胞和方法生产的抗体能够结合至低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) -1或LRP-8或转铁蛋白受体以及选自由以下项组成的组的至少一种靶标: β -分泌酶 (BACE1或BACE2)、 α -分泌酶、 γ -分泌酶、 τ -分泌酶、淀粉样前体蛋白 (APP)、死亡受体6 (DR6)、淀粉样蛋白 β 、 α -突触核蛋白、帕金森蛋白、亨廷顿蛋白、p75NTR、CD40和半胱天冬酶-6。

[0224] 在某些实施例中, 通过本文所提供的细胞和方法生产的抗体为抗CD40的人IgG2抗体。在某些实施例中, 抗CD40抗体为RG7876。

[0225] 在某些实施例中, 本公开的细胞和方法可用于生产多肽。例如, 但不限于, 多肽为

靶向免疫细胞因子。在某些实施例中,靶向免疫细胞因子为CEA-IL2v免疫细胞因子。在某些实施例中,CEA-IL2v免疫细胞因子为RG7813。在某些实施例中,靶向免疫细胞因子为FAP-IL2v免疫细胞因子。在某些实施例中,FAP-IL2v免疫细胞因子为RG7461。

[0226] 在某些实施例中,通过本文所提供的细胞和方法生产的多特异性抗体(诸如双特异性抗体)能够结合至CEA和至少一种额外的靶分子。在某些实施例中,根据本文所提供的方法生产的多特异性抗体(诸如双特异性抗体)能够结合至肿瘤靶向细胞因子和至少一种额外的靶分子。在某些实施例中,根据本文所提供的方法生产的多特异性抗体(诸如双特异性抗体)融合至IL2v(即,白介素2变体)并且结合基于IL1的免疫细胞因子和至少一种额外的靶分子。在某些实施例中,根据本文所提供的方法生产的多特异性抗体(诸如双特异性抗体)为T细胞双特异性抗体(即,双特异性T细胞接合子或BiTE)。

[0227] 在某些实施例中,根据本文所提供的方法生产的多特异性抗体(诸如双特异性抗体)能够结合至选自以下的至少两种靶分子:IL-1 α 和IL-1 β 、IL-12和IL-1S;IL-13和IL-9;IL-13和IL-4;IL-13和IL-5;IL-5和IL-4;IL-13和IL-1 β ;IL-13和IL-25;IL-13和TARC;IL-13和MDC;IL-13和MEF;IL-13和TGF- $\sim$;IL-13和LHR激动剂;IL-12和TWEAK、IL-13和CL25;IL-13和SPRR2a;IL-13和SPRR2b;IL-13和ADAMS、IL-13和PED2、IL17A和IL17F、CEA和CD3、CD3和CD19、CD138和CD20;CD138和CD40;CD19和CD20;CD20和CD3;CD3S和CD13S;CD3S和CD20;CD3S和CD40;CD40和CD20;CD-S和IL-6;CD20和BR3、TNF α 和TGF- β 、TNF α 和IL-1 β ;TNF α 和IL-2、TNF α 和IL-3、TNF α 和IL-4、TNF α 和IL-5、TNF α 和IL6、TNF α 和IL8、TNF α 和IL-9、TNF α 和IL-10、TNF α 和IL-11、TNF α 和IL-12、TNF α 和IL-13、TNF α 和IL-14、TNF α 和IL-15、TNF α 和IL-16、TNF α 和IL-17、TNF α 和IL-18、TNF α 和IL-19、TNF α 和IL-20、TNF α 和IL-23、TNF α 和IFN α 、TNF α 和CD4、TNF α 和VEGF、TNF α 和MIF、TNF α 和ICAM-1、TNF α 和PGE4、TNF α 和PEG2、TNF α 和RANK配体、TNF α 和Te38、TNF α 和BAFF、TNF α 和CD22、TNF α 和CTLA-4、TNF α 和GP130、TNF α 和IL-12p40、VEGF和血管生成素、VEGF和HER2、VEGF-A和HER2、VEGF-A和PDGF、HER1和HER2、VEGFA和ANG2、VEGF-A和VEGF-C、VEGF-C和VEGF-D、HER2和DR5、VEGF和IL-8、VEGF和MET、VEGFR和MET受体、EGFR和MET、VEGFR和EGFR、HER2和CD64、HER2和CD3、HER2和CD16、HER2和HER3;EGFR(HER1)和HER2、EGFR和HER3、EGFR和HER4、IL-14和IL-13、IL-13和CD40L、IL4和CD40L、TNFR1和IL-1R、TNFR1和IL-6R和TNFR1和IL-18R、EpCAM和CD3、MAPG和CD28、EGFR和CD64、CSPGs和RGM A;CTLA-4和BTN02;IGF1和IGF2;IGF1/2和Erb2B;MAG和RGM A;NgR和RGM A;NogoA和RGM A;OMGp和RGM A;POL-1和CTLA-4;以及RGM A和RGM B。

[0228] 在某些实施例中,根据本文所提供的方法生产的多特异性抗体(诸如双特异性抗体)为抗CEA/抗CD3双特异性抗体。在某些实施例中,抗CEA/抗CD3双特异性抗体为RG7802。在某些实施例中,抗CEA/抗CD3双特异性抗体包含以下提供的SEQ ID NO:18-21中列出的氨基酸序列:

DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCKASAAVG TYVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRKRGVPS
 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCHQ YYTYPLFTFG QGTKLEIKRT VAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL
 TLSKADYEKH KVIACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 18)

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCGSSTGAVT TSNYANWVQE KPGQAFRGLI GGTKNKRAPGT
 PARFSGSLLG GKAAALTLGA QPEDEAEYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLS SASTKGPSVF
 PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV
 TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSC (SEQ ID NO: 19)

[0229]

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT EFGMNWVRQA PGQGLEWMGW INTKTGEATY
 VEEFKGRVTF TTDSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARWD FAYYVEAMDY WGQGTITVTS
 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
 SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDGGGS GGGGSEVQLL
 ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL EWVSRIRSKY NNYATYYADS
 VKGRFTISRD DSKNTLYLQM NSLRAEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTITVTVSS
 ASVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD
 SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVIACEVT HQGLSSPVTK SFNRGECDKT HTCPPCPAPE
 AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE
 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALGAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
 CRDELTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSLKLTVD
 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 20)

[0230]

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT EFGMNWVRQA PGQGLEWMG WINTKTGEATY
 VEEFKGRVTF TTDSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARWD FAYYVEAMD YWGQGTITVTS
 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTS GVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHT CPPCPAPEAAG
 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVH NAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALGAPIEKTI SKAKGQPRE PQVCTLPSPRD
 ELTKNQVSLV CAVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFF LVSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K (SEQ ID NO: 21)

[0231] WO 2014/121712中提供了有关抗CEA/抗CD3双特异性抗体的进一步细节,其全文以引用方式并入本文。

[0232] 在某些实施例中,通过本文所公开的细胞和方法生产的多特异性抗体(诸如双特异性抗体)为抗VEGF/抗血管生成素双特异性抗体。在某些实施例中,抗VEGF/抗血管生成素双特异性抗体为Crossmab。在某些实施例中,抗VEGF/抗血管生成素双特异性抗体为RG7716。在某些实施例中,抗CEA/抗CD3双特异性抗体包含以下提供的SEQ ID NO:22-25中列出的氨基酸序列:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYDFT HYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGPEY
 AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP YYYGTSHWYF DVWGQGTLLV
 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA
 AGGPSVFLFP PKPKDTLMAS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLAQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC
 RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN AYTQKSLSLG PGK (SEQ ID NO: 22)

[0233]

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYYMHWVRQA PGQGLEWMGW INPNSGGTNY
 AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSLRSDD TAVYYCARSP NPYYDSSGY YYPGAFDIWG
 QGTMVTVSSA SVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSTYSLST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC DKTH
 TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMAS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV
 HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLAQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVCTLPPS RDELTKNQVS LSCAVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF
 FLVSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN AYTQKSLSLG PGK (SEQ ID NO: 23)
 DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQK GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS
 RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 24)

[0234]

SYVLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER
 FSGNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHWVFG GGTCLTVLSS ASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSC (SEQ ID NO: 25)

[0235] 在某些实施例中,通过本文所公开的方法生产的多特异性抗体(诸如双特异性抗体)为抗Ang2/抗VEGF双特异性抗体。在某些实施例中,抗Ang2/抗VEGF双特异性抗体为RG7221。在某些实施例中,抗Ang2/抗VEGF双特异性抗体为CAS编号1448221-05-3。

[0236] 任选地与其他分子缀合的可溶性抗原或其片段可以用作产生抗体的免疫原。对于跨膜分子,诸如受体、其片段(例如,受体的细胞外结构域)可以用作免疫原。可替代地,可以将表达跨膜分子的细胞用作免疫原。这样的细胞可以源自天然来源(例如,癌细胞系),或者可以是已经通过重组技术转化以表达跨膜分子的细胞。可用于制备抗体的其他抗原及其形式对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0237] 在某些实施例中,通过本文所公开的细胞和方法生产的多肽(例如,抗体)能够结合至、可以进一步缀合至化学分子诸如染料或细胞毒剂诸如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即,放射性缀合物)。包含使用本文所述方法生产的抗体或双特异性抗体的免疫缀合物可含有缀合至仅一条重链或仅一条轻链的恒定区的细胞毒性剂。

[0238] 5.5.2.6抗体变体

[0239] 在某些方面,考虑了本文所提供的抗体的氨基酸序列变体,例如第5.5.5节中提供的抗体。例如,可能期望改变抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成为来制备。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内残基的缺失、和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以实现最终构建体,前提条件是最终构建体具有所需特征,例如抗原结合。

[0240] 5.5.2.6.1取代、插入和缺失变体

[0241] 在某些方面,提供了具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。用于取代诱变的目的位点包括CDR和FR。保守取代在表1中的“优选取代”标题下示出。更多实质性改变提供于表1的“示例性取代”标题下,并且在下文参考氨基酸侧链类别进行了进一步描述。可以将氨基酸取代引入目的抗体中,并筛选所需活性(例如,保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC)的产物。

[0242] 表1

[0243]

原始 残基	示例性 取代	优选的 取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正 亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr

[0244]	Thr (T)	Val; Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0245] 可根据共同的侧链特性将氨基酸分组：

[0246] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0247] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0248] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0249] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0250] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0251] (6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

[0252] 非保守性取代将需要用这些类别中的一个的成员交换另一类别的成员。

[0253] 一种类型的取代变体涉及取代亲本抗体（例如，人源化抗体或人抗体）的一个或多个高可变区残基。通常，相对于亲本抗体，选为用于进一步研究的一个或多个所得变体将在某些生物学特性方面（例如，亲和力增加、免疫原性降低）有改变（例如，改善）和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体是亲合力成熟抗体，其可例如使用诸如本文所述的那些的基于噬菌体展示的亲合力成熟技术方便地产生。简要地说，对一个或多个CDR残基进行突变并且将变体抗体展示在噬菌体上并针对特定生物学活性（例如结合亲和力）进行筛选。

[0254] 可在CDR中作出改变（例如，取代），例如，以改善抗体亲合力。此类改变可以在CDR“热点”中进行，即由在体细胞成熟过程期间经历高频突变的密码子编码的残基（参见例如，Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)），和/或接触抗原的残基，测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建并自二级文库重新选择而实现的亲和力成熟已被例如Hoogenboom等人在Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等人编, Human Press, Totowa, NJ, (2001)) 中进行描述。在亲和力成熟的某些方面，通过多种方法（例如，易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变）的任何一种将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建一个二级文库。随后对该文库进行筛选以鉴别具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及CDR定向方法，其中将若干CDR残基（例如，每次4至6个残基）随机化。参与抗原结合的CDR残基可以例如使用丙氨酸扫描突变或建模来特异性地鉴定。具体而言，常常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0255] 在某些方面，取代、插入或缺失可发生在一个或多个CDR内，只要此类改变基本上不降低抗原结合分子的抗原结合能力即可。例如，可在CDR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变（例如，如本文提供的保守性取代）。这样的改变可以例如在CDR中的抗原接触残基的外部。在上文提供的某些变体VH和VL序列中，每个CDR要么保持不变，要么包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0256] 可用于鉴别可被靶向诱变的抗体残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”，如Cunningham和Wells (1989) Science, 244:1081-1085所述。在此方法中，鉴别残基或一组靶

残基(例如,带电残基,诸如arg、asp、his、lys和glu)并用中性或带负电的氨基酸(例如,丙氨酸或多丙氨酸)替换以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代展示功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。替代性地或另外地,可以使用抗原-抗体复合物的晶体结构鉴别抗体与抗原之间的接触点。可靶向或消除作为取代的候选的此类接触残基和相邻残基。可筛选变体以确定它们是否具备期望的特性。

[0257] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括将抗体的N末端或C末端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如,对于ADEPT(抗体定向酶前药治疗))或多肽融合。

[0258] 5.5.2.6.2糖基化变体

[0259] 在某些方面,改变本文提供的抗体以增加或降低抗体糖基化的程度。糖基化位点向抗体的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以产生或去除一个或多个糖基化位点而方便地实现。

[0260] 当抗体包含Fc区时,与其相连的寡糖可以被改变。由哺乳动物细胞生产的天然抗体通常包含支链的双触角寡糖,所述双触角寡糖通常通过N-键合连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸、以及附接于双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些方面中,可对本公开的抗体中的寡糖进行修饰,以产生具有某些改善的特性的抗体变体。

[0261] 一方面,提供了具有非岩藻糖基化的寡糖的抗体变体,即缺少(直接或间接地)连接在Fc区的岩藻糖的寡糖结构。这样的非岩藻糖基化的寡糖(也称为“去岩藻糖基化”的寡糖)特别是N-连接的寡糖,其缺少在双触角寡糖结构的茎中连接第一GlcNAc的岩藻糖残基。一方面,提供了与天然或亲本抗体相比在Fc区中具有增加比例的非岩藻糖基化寡糖的抗体变体。例如,非岩藻糖基化寡糖的比例可以为至少约20%、至少约40%、至少约60%、至少约80%或甚至约100%(即不存在岩藻糖基化寡糖)。非岩藻糖基化寡糖的百分比,如例如WO 2006/082515中所述,如通过MALDI-TOF质谱法测量的,是缺少岩藻糖残基的寡糖的(平均)量相对于与Asn 297连接的所有寡糖(例如复杂、杂合和高甘露糖结构)之和。Asn297是指位于Fc区中约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可以位于位置297上游或下游大约 ± 3 个氨基酸,即在位置294与300之间。在Fc区中具有非岩藻糖基化寡糖比例增加的此类抗体可具有改善的Fc γ RIIIa受体结合和/或改善的效应子功能,特别是改善的ADCC功能。参见例如US 2003/0157108和US2004/0093621。

[0262] 能够生产岩藻糖基化减少的抗体的细胞系的示例包括缺乏蛋白质岩藻糖基化的Lec13CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);US2003/0157108;和WO 2004/056312,尤其是实例11),以及敲除细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因、FUT8、敲除CHO细胞(参见例如,Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614-622(2004);Kanda等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO 2003/085107),或具有减少或取消的GDP岩藻糖合成或转运蛋白活性的细胞(参见例如,US2004259150、US2005031613、US2004132140、US2004110282)。

[0263] 在另一方面,抗体变体提供了二等分的寡糖,例如,其中连接至抗体的Fc区的双触角寡糖被GlcNAc二等分。如上所述,这样的抗体变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于例如Umana等人,Nat Biotechnol 17,176-180 (1999);Ferrara等人,Biotechn Bioeng 93,851-861 (2006);WO 99/54342;WO 2004/065540,WO 2003/011878。

[0264] 还提供了在连接于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这样的抗体变体可以具有改善的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087、WO 1998/58964和WO 1999/22764中。

[0265] 5.5.2.6.3Fc区变体

[0266] 在某些方面,一个或多个氨基酸修饰可以引入本文提供的抗体的Fc区中,从而生成Fc区变体。Fc区变体可包括人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区),其在一个或多个氨基酸位置上包括氨基酸修饰(例如取代)。

[0267] 在某些方面,本公开考虑具有一些但不是全部效应子功能的抗体变体,这使其成为其中抗体的体内半衰期很重要而某些效应子功能(诸如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC))不必要或有害的应用的理想候选者。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定,以确认CDC和/或ADCC活性的降低/消耗。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞、NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达汇总于Ravetch和Kinet,Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)的第464页表3中。评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性示例描述于美国专利号5,500,362(参见例如,Hellstrom, I.等人Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986))和Hellstrom, I等人,Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985);5,821,337(参见Bruggemann, M.等人, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987))。替代性地,可使用非放射性测定方法(参见,例如,用于流式细胞术的ACT1™非放射性细胞毒性测定(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA);以及CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI)。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地,目的分子的ADCC活性可以在体内评估,例如,在动物模型(诸如在Clynes等人Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)中公开的动物模型)中评估。也可以进行C1q结合测定法以确认抗体不能结合C1q,并且因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为评估补体活化,可以进行CDC测定(参见例如,Gazzano-Santoro等人, J. Immunol. Methods 202:163 (1996);Cragg, M. S.等人, Blood 101:1045-1052 (2003);以及Cragg, M. S.和M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004))。FcRn结合和体内清除/半衰期测定也可以使用本领域已知的方法执行(参见例如Petkova, S. B.等人, Int' l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006);WO 2013/120929A1)。

[0268] 具有减少的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一者或多者的取代的那些(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327处的两个或更多个处具有取代的Fc突变体,包括所谓的“DANA”Fc突变体,其残基265和297被取代为丙氨酸(美国专利号7,332,581)。

[0269] 描述了具有改善的或降低的与FcR的结合的某些抗体变体。(参见例如,美国专利

号6,737,056;WO 2004/056312,以及Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

[0270] 在某些方面,抗体变体包含具有一个或多个改善ADCC的氨基酸取代的Fc区,例如,在Fc区的298、333和/或334位的取代(残基的EU编号)。

[0271] 在某些方面,抗体变体包含具有一个或多个减少Fc γ R结合的氨基酸取代的Fc区,例如Fc区的234位和235位的取代(残基的EU编号)。一方面,取代是L234A和L235A(LALA)。在某些方面,抗体变体进一步包含在源自人IgG1Fc区的Fc区中的D265A和/或P329G。在一个方面,在源自人IgG1Fc区的Fc区中,取代是L234A、L235A和P329G(LALA-PG)。(参见例如WO 2012/130831)。在另一个方面,在源自人IgG1Fc区的Fc区中,取代是L234A、L235A和D265A(LALA-DA)。

[0272] 在一些实例中,在Fc区中进行改变,产生改变(即,改善或减少)的C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,如美国专利号6194551、WO 99/51642和Idusogie等人J.Immunol.164:4178-4184(2000)。

[0273] 具有增加的半衰期和改善的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合,负责将母体IgG转移至胎儿的抗体(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))描述于US2005/0014934(Hinton等人)中。那些抗体包含Fc区,该Fc区中具有改善Fc区与FcRn的结合的一个或多个取代。此类Fc变体包括在以下Fc区残基中的一处或多处具有取代的Fc变体:238、252、254、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如对Fc区残基434的取代(参见例如,美国专利号7371826;Dall'Acqua,W.F.等人J.Biol.Chem.281(2006)23514-23524)。

[0274] 通过定点诱变已经鉴定了对小鼠Fc-小鼠FcRn相互作用至关重要的Fc区残基(参见例如,Dall'Acqua,W.F.等人J.Immunol.169(2002)5171-5180)。残基I253、H310、H433、N434和H435(EU索引编号)参与相互作用(Medesan,C.等人,Eur.J.Immunol.26(1996)2533;Firan,M.等人,Int.Immunol.13(2001)993;Kim,J.K.等人,Eur.J.Immunol.24(1994)542)。发现残基I253、H310和H435对于人Fc与鼠FcRn的相互作用至关重要(Kim,J.K.等人,Eur.J.Immunol.29(1999)2819)。对人Fc-人FcRn复合物的研究已表明,残基I253、S254、H435和Y436对于该相互作用至关重要(Firan,M.等人,Int.Immunol.13(2001)993;Shields,R.L.,等人,J.Biol.Chem.276(2001)6591-6604)。在Yeung,Y.A.等人(J.Immunol.182(2009)7667-7671)中已经报道并且检查了残基248至259和301至317和376至382和424至437的各种突变体。

[0275] 在某些方面,抗体变体包含具有一个或多个减少FcRn结合的氨基酸取代的Fc区,例如,在Fc区的253、和/或310和/或435位的取代(残基的EU编号)。在某些方面,抗体变体包含在位置253、310和435位具有氨基酸取代的Fc区。一方面,在衍生自人IgG1Fc区的Fc区中,取代是I253A、H310A和H435A。参见例如,Grevys,A.等人,J.Immunol.194(2015)5497-5508。

[0276] 在某些方面,抗体变体包含具有一个或多个减少FcRn结合的氨基酸取代的Fc区,例如,在Fc区的310、和/或433和/或436位的取代(残基的EU编号)。在某些方面,抗体变体包含在位置310、433和436位具有氨基酸取代的Fc区。一方面,在衍生自人IgG1Fc区的Fc区中,取代是H310A、H433A和Y436A。(参见,例如,WO 2014/177460A1)。

[0277] 在某些方面,抗体变体包含具有一个或多个增加FcRn结合的氨基酸取代的Fc区,例如,在Fc区的252、和/或254和/或256位的取代(残基的EU编号)。在某些方面,抗体变体包

含在位置252、254和256位具有氨基酸取代的Fc区。一方面,在衍生自人IgG1Fc区的Fc区中,取代是M252Y、S254T和T256E。也参见Duncan&Winter, Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351关于Fc区变体的其它实例。

[0278] 如本文报道的抗体的重链的C末端可以是以氨基酸残基PGK结束的完整C末端。重链的C末端可以是缩短的C末端,在所述缩短的C末端中已经去除了一个或两个C末端氨基酸残基。在一个优选的方面,重链的C末端是以PG结束的缩短的C末端。在本文报道的所有方面的一个方面,如本文所指定的包含包括C末端CH3结构域的重链的抗体,包含C末端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,氨基酸位置的EU索引编号)。在本文报道的所有方面的一个方面中,如本文所指定的包含包括C末端CH3结构域的重链的抗体,包含C末端甘氨酸残基(G446,氨基酸位置的EU索引编号)。

[0279] 5.5.2.6.4半胱氨酸工程化的抗体变体

[0280] 在某些方面,可能需要生产半胱氨酸工程化改造的抗体,例如THIOMABTM抗体,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定实施例中,取代的残基存在于抗体的可接近位点。如本文进一步描述的,通过用半胱氨酸取代那些残基,从而将反应性硫醇基团定位于抗体的可及位点,并且可用于将抗体与其他部分(诸如药物部分或接头-药物部分)缀合,以产生免疫缀合物。半胱氨酸工程化改造的抗体可以如例如在美国专利号7,521,541、830,930、7,855,275、9,000,130或WO 2016040856中所述产生。

[0281] 5.5.2.6.5抗体衍生物

[0282] 在某些方面,本文提供的抗体可以经进一步修饰以包括本领域已知且容易得到的额外的非蛋白质部分。适合于抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性示例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)和葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在制造中可具有优势。聚合物可具有任何分子量,并且可具有支链或不具有支链。附接至抗体的聚合物的数目可变,并且如果附接了超过一个聚合物,那么它们可以为相同或不同的分子。通常,可基于以下考虑因素测定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于抗体待改善的特定特性或功能、抗体衍生物是否将用于限定条件下的疗法等。

[0283] 5.5.2.7免疫缀合物

[0284] 本公开还提供了包括本文所公开的抗体的免疫缀合物,该抗体与一种或多种治疗剂如细胞毒性剂、化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如,蛋白质毒素,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段)或放射性同位素缀合(化学键合)。

[0285] 一方面,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体缀合至上述一种或多种治疗剂。通常使用接头将抗体连接至一种或多种治疗剂。Pharmacol Review 68:3-19(2016)中列出了ADC技术的概述,其包括治疗剂、药物和接头的实例。

[0286] 在另一个方面,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的本文所述的抗体,该酶活性毒素或其片段包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒蛋白质A链、相思豆毒蛋白质A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲霉素、油

桐蛋白、石竹黄素蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、姜黄素、巴豆素、肥皂草抑制剂、明胶、米托菌素、局限曲霉素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌素。

[0287] 在另一个方面,免疫缀合物包括与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的本文所述的抗体。多种放射性同位素可用于制备放射性缀合物。例如At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212和Lu的放射性同位素。当放射性缀合物用于检测时,它可能包含用于闪烁显像研究的放射性原子,例如,tc99m或I123,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,mri)的自旋标记物,诸如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0288] 可以使用多种双功能蛋白偶联剂,诸如N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨基酯的双官能衍生物(诸如己二酸二甲酯盐酸盐)、活性酯(诸如辛酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛(诸如戊二醛)、双叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)制备抗体和细胞毒性剂的缀合物。例如,可以如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)为一种示例性螯合剂,用于将放射性核苷酸缀合至抗体。参见WO 94/11026。接头可以为促进细胞中细胞毒性药物释放的“可切割接头”。例如,可以使用对酸不稳定的接头、肽酶敏感的接头、对光不稳定的接头、二甲基接头或含二硫键的接头(Chari等人,Cancer Res.52:127-131(1992);美国专利号5,208,020)。

[0289] 本文的免疫缀合物或ADC明确考虑但不限于用交联剂制备的此类缀合物,包括但不限于市售的(例如,来自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A) BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC、磺基-SMPB和SVSB(琥珀酰亚氨基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)。

[0290] 5.6示例性非限制性实施例

[0291] A.一种经修饰的细胞,其中所述细胞经修饰以相对于两种或更多种内源性蛋白在未经修饰的细胞中的表达而减少或消除所述内源性蛋白的表达,其中:

[0292] (a) 具有减少或消除的表达的所述内源性蛋白中的一种或多种内源性蛋白在细胞培养期间促进所述经修饰的细胞的细胞凋亡;并且

[0293] (b) 具有减少或消除的表达的所述内源性蛋白中的一种或多种内源性蛋白调节未折叠蛋白反应(UPR)。

[0294] B.一种经修饰的细胞,其中所述细胞经修饰以相对于两种或更多种内源性蛋白在未经修饰的细胞中的表达而减少或消除所述内源性蛋白的表达,其中一种或多种内源性蛋白选自以下项组成的内源性蛋白组:细胞凋亡调节因子BCL2关联X蛋白(BAX);和BCL2拮抗剂/杀伤因子1(BAK);并且内源性蛋白中的一种内源性蛋白是蛋白激酶R样ER激酶(PERK)。

[0295] B1.根据B所述的经修饰的细胞,其中BAX、BAK和PERK的表达被减少或消除。

[0296] B2.根据A至B1中任一项所述的经修饰的细胞,其中工程化所述经修饰的细胞以表

达目的重组产物。

[0297] B3. 根据A至B1中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞由表达目的重组产物的重组细胞生成。

[0298] B4. 根据B2或B3所述的经修饰的细胞,其中所述一种或多种内源性蛋白不具有可检测的表达。

[0299] B5. 根据B2或B3所述的经修饰的细胞,其中所述目的重组产物包括病毒载体。

[0300] B6. 根据B2或B3所述的经修饰的细胞,其中所述目的重组产物包括病毒颗粒。

[0301] B7. 根据B2或B3所述的经修饰的细胞,其中所述目的重组产物包括重组蛋白。

[0302] B8. 根据B7所述的经修饰的细胞,其中所述重组蛋白为抗体或抗体-融合蛋白或其抗原结合片段。

[0303] B9. 根据B8所述的经修饰的细胞,其中所述抗体为多特异性抗体或其抗原结合片段。

[0304] B10. 根据B8所述的经修饰的细胞,其中所述抗体由单个重链序列和单个轻链序列或其抗原结合片段组成。

[0305] B11. 根据B8至B10中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述抗体为嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。

[0306] B12. 根据B8至B11中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述抗体为单克隆抗体。

[0307] B13. 根据B2或B3所述的经修饰的细胞,其中所述目的重组产物由在一个或多个靶向位置处整合在细胞基因组中的外源性核酸序列编码。

[0308] B14. 根据A至B13中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞不表达可检测的BAX、BAK和PERK。

[0309] B15. 根据A至B13中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞表达减少水平的BAX、BAK和PERK。

[0310] B16. 根据A至B15中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞为经修饰的动物细胞。

[0311] B17. 根据B16所述的经修饰的动物细胞,其中所述经修饰的动物细胞为经修饰的Sf9、CHO、HEK 293、HEK-293T、BHK、A549或HeLa细胞。

[0312] B18. 一种组合物,其包含根据A至B17中任一项所述的经修饰的细胞。

[0313] B19. 一种生产目的重组产物的方法,所述方法包括:

[0314] (a) 培养A至B17中任一项所述的经修饰的细胞;以及

[0315] (b) 从培养基或所述经修饰的细胞中回收所述目的重组产物,

[0316] 其中表达所述目的重组产物的所述经修饰的细胞表现出BAX、BAK和PERK的减少或消除的表达。

[0317] C. 一种用于生产经修饰的细胞的方法,所述方法包括:

[0318] (a) 在细胞中施加核酸酶辅助的和/或靶向核酸的BAX、BAK和PERK以减少或消除所述内源性基因的表达,以及

[0319] (b) 选择所述经修饰的细胞,其中与未经修饰的细胞相比,所述内源性基因的表达已减少或消除。

[0320] C1. 根据C所述的方法,其中在引入编码目的重组产物的外源性核酸之前或在引入

编码目的重组产物的外源性核酸之后进行修饰。

[0321] C2. 根据C或C1所述的方法,其中所述核酸酶辅助的基因靶向系统选自由CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1、锌指核酸酶、TALEN或兆核酸酶组成的组。

[0322] C3. 根据C或C1所述的方法,其中基因表达的减少由RNA沉默介导。

[0323] C4. 根据C3所述的方法,其中RNA沉默选自由siRNA基因靶向和敲减、shRNA基因靶向和敲减以及miRNA基因靶向和敲减组成的组。

[0324] C5. 根据B19和C1至C4中任一项所述的方法,其中所述目的重组产物由核酸序列编码。

[0325] C6. 根据B19和C1至C5中任一项所述的方法,其中所述核酸序列在一个或多个靶向位置处整合在所述经修饰的细胞的细胞基因组中。

[0326] C7. 根据B19和C1至C5中任一项所述的方法,其中由所述经修饰的细胞表达的所述目的重组产物由随机整合在所述经修饰的细胞的细胞基因组中的核酸序列编码。

[0327] C8. 根据B19和C1至C7中任一项所述的方法,其中所述目的重组产物包括病毒载体。

[0328] C9. 根据B19和C1至C7中任一项所述的方法,其中所述目的重组产物包括病毒颗粒。

[0329] C10. 根据B19和C1至C7中任一项所述的方法,其中所述目的重组产物包括重组蛋白。

[0330] C11. 根据C10所述的方法,其中所述重组蛋白为抗体或抗体-融合蛋白或其抗原结合片段。

[0331] C12. 根据C11所述的方法,其中抗体为多特异性抗体或其抗原结合片段。

[0332] C13. 根据C11所述的方法,其中抗体由单个重链序列和单个轻链序列或其抗原结合片段组成。

[0333] C14. 根据C11至C13中任一项所述的方法,其中所述抗体为嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。

[0334] C15. 根据C11至C13中任一项所述的方法,其中所述抗体为单克隆抗体。

[0335] C16. 根据B19至C15中任一项所述的方法,所述方法包括纯化所述目的产物,收获所述目的产物和/或配制所述目的产物。

[0336] C17. 根据C16所述的方法,其中所述经修饰的细胞为经修饰的动物细胞。

[0337] C18. 根据B19至C17中任一项所述的方法,其中所述经修饰的动物细胞为经修饰的Sf9、CHO、HEK 293、HEK 293T、BHK、A549或HeLa细胞。

[0338] C19. 根据A至C18中任一项所述的经修饰的细胞或方法,其中与包含野生型Bax、Bak和PERK基因中的每一者的多核苷酸和功能性拷贝的对应的分离的动物细胞相比,所述经修饰的细胞具有更高的比生产率。

[0339] C20. 根据A至C19中任一项所述的经修饰的细胞或方法,其中与包含所述Bax、Bak和PERK基因中的每一者的功能性拷贝的对应的分离的动物细胞相比,所述经修饰的细胞对细胞凋亡更具抗性。

[0340] C21. 根据A至C20中任一项所述的经修饰的细胞或方法,其中所述经修饰的细胞用于分批补料、灌流、强化过程、半连续灌流或连续灌流细胞培养过程。

[0341] 6.实例

[0342] 以下实例仅是对当前公开的主题的说明,不应以任何方式视为限制。

[0343] 材料和方法

[0344] 载体构建体、细胞培养条件和生产

[0345] 作为两个独立单元的重链(HC)和轻链(LC)的表达均由其各自的巨细胞病毒(CMV)启动子和调节元件指导。质粒编码二氢叶酸还原酶(DHFR)或嘌呤霉素作为由猿猴病毒(SV)40早期启动子和增强子元件指导的选择标志物。在HC DNA和LC DNA的3'区域中使用SV40晚期聚腺苷酸化(poly A)信号序列。在以150rpm、37℃和5%CO₂摇动的50mL管式旋转容器中的专有无血清的基于DMEM/F12的培养基中培养细胞,并且每3至4天以4x10⁵个细胞/mL的接种密度传代(Hu等人,2013)。

[0346] 进行分批补料生产培养,其中利用专有的化学成分确定的培养基,使用不同的容器(管式旋转和AMBR15),并在第3、7和10天进行大剂量补料,如前所述(Hsu、Aulakh、Traul和Yuk,2012)。在生产测定期间,在所有培养物中都使用抗细胞聚集剂以防止由于死亡细胞释放DNA导致的细胞聚集。使用精益或丰富生产培养基以低(1-2x10⁶个细胞/mL)或高(10x10⁶个细胞/mL)接种密度接种细胞。在第3天,培养物温度从37℃转变为35℃。滴度使用具有UV检测的蛋白A亲和色谱确定。使用Vi-Cell XR仪器(Beckman Coulter Item#383721)确定活力百分比和活细胞计数。

[0347] CRISPR/Cas9介导的PERK破坏(EIF2AK3)

[0348] sgRNA引物序列如下:

[0349] PERK sgRNA 1:5' AGTCACGGCGGGCACTCGCG

[0350] PERK sgRNA 2:5' TACGGCCGAAGTGACCGTGG

[0351] PERK sgRNA 3:5' GCGTGACTCATGTTCGCCAG

[0352] 荧光素酶sgRNA:5' ATCCTGTCCCTAGTGCCCC

[0353] 洗涤五百万个细胞并悬浮在缓冲液R(Neon 100uL试剂盒目录号:MPK10025Invitrogen)中。将五微克Cas9:sgRNA RNP复合物添加到细胞培养混合物中。使用1,620V的3x 10ms脉冲对细胞进行电穿孔。将转染的细胞培养3天,然后经由有限稀释进行单细胞克隆。通过西方印迹分析针对PERK敲除筛选池和单细胞克隆。

[0354] 检测IRE1αRNA酶活性的RT-PCR分析

[0355] CHO-XBP1s正向引物:5' CCTTGTAATTGAGAACCAGG

[0356] CHO-XBP1s反向引物:5' CCAAAAGGATATCAGACTCGG

[0357] 使用来自Applied Biosystems的Power SYBR Green RNA-to CT-1步试剂盒和方案(#4389986)。

[0358] 免疫印迹和试剂

[0359] 将150万个细胞在含有蛋白酶抑制剂混合物(Roche不含EDTA的迷你片剂混合物)的1x NP40缓冲液(10mM Tris,pH 8.0,0.5%NP40,150mM NaCl,10mM DTT和5mM MgCl₂)中在冰上裂解20min。对裂解物进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(4-12%Tris甘氨酸)并转移至硝酸纤维素膜。用于tris缓冲盐水(TBS)-0.1%Tween缓冲液中的5%牛奶封闭后,用相应的抗体对膜进行印迹。使用HRP缀合的抗兔抗体和SuperSignal West Dura持久性底物使印迹可视化。使用以下抑制剂:ATF6i(10μM Ceapin-A7(Gallagher

等人,2016))、PERKi (10 μ M化合物39 (Axten等人,2012))、IRE1i6 (10 μ M 4u8c (Cross等人,2012))、IRE1i9 (10 μ M内部/Genentech)、PDGFRi (5-20 μ M Abcam,AG-1296)。使用以下抗体:抗PDGFRa (Cell Signaling Technology (CST),D1E1E)、兔抗BiP (C50B12,Cell Signaling Technology,3177)、兔抗PERK (CST,C33E10)、小鼠抗 β -肌动蛋白-HRP (AC-15) (Abcam,ab49900)、兔抗磷酸化Akt (Ser473) (CST,D9E)、兔抗Akt (CST,5G3)、兔裂解半胱天冬酶3 (CST,asp175)、山羊抗人IgG-HRP (MP Biomedicals,0855252)、兔IRE1a (CST,14C10)、小鼠抗磷酸化IRE1、小鼠抗XBP1、兔抗Bax (Abcam,ab32503)、兔抗Bak (CST,D4E4)、驴抗兔HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories,Inc.,711-035-152)、兔抗sod2 (CST,D3X8F)

[0360] 实例1:UPR激活减弱PDGFRa转录并下调其表达

[0361] 先前描述了一个有趣的现象,其中由特定CHO细胞系中较低pH条件触发的种子培养培养物中UPR的激活会对靶标pH下生产培养基中的培养物生长产生负面影响 (Tung等人,2018)。当暴露于低pH条件时,在该细胞系中检测到高细胞内BiP水平,这与生产期间的低生长曲线和不良的生物过程结果相关 (Tung等人,2018)。为了更好地了解低pH条件与高pH条件下生产培养物生长减少的根本机制,将种子培养培养物维持在高和低pH条件下,并通过质谱进行蛋白质组学分析。在低pH条件下观察到PDGFRa蛋白表达水平的显著降低 (图1A),这与PDGFRa基因的转录减弱有关 (图1B)。由于高细胞内BiP水平表明UPR激活,因此决定研究CHO细胞中UPR与降低的PDGFRa水平之间的潜在相关性。使用衣霉素 (Tun,强UPR诱导剂) 和DTT (弱UPR诱导剂) 在两种表达抗体 (mAb1) 的CHO宿主系CHO DG44和CHO-K1的种子培养培养物中化学诱导UPR。在最佳pH条件下并且使用强UPR诱导剂 (Tun) 的情况下,在两种CHO宿主背景中,全功能PDGFRa水平在蛋白质和mRNA水平上均降低 (图1C和1D)。注意到作为UPR激活指示物的BiP水平响应于强和弱的UPR化学诱导剂而相应增加 (图1C)。在衣霉素处理后观察到的较低分子量PDGFRa蛋白带代表该蛋白质的非糖基化形式,因为衣霉素处理抑制蛋白质糖基化 (图1C)。

[0362] 为了进一步剖析UPR的哪个分支负责调节PDGFRa水平,使用强UPR诱导剂 (衣霉素和毒胡萝卜素) 在用针对UPR途径的ATF6、PERK或IRE1a分支的特定抑制剂处理的CHO-K1细胞中诱导UPR (图1E、1F以及图2A、2B和2C)。这些数据表明,抑制UPR途径的PERK分支挽救了PDGFRa在蛋白质水平 (图1E) 和mRNA水平 (图1F) 上的下调,而不影响UPR其他分支的激活,如衣霉素 (图1E) 和毒胡萝卜素 (图2A) 处理的培养物中的细胞内BiP蛋白和XBP-1RNA加工水平均增加所证明的。在表达抗体的细胞 (图1E和图2A) 和空宿主细胞 (图2B) 中均发生经由激活UPR途径的PERK分支引起的PDGFRa下调。在PERK抑制剂存在下观察到的PERK蛋白分子量稍低可能是由于这种特定抑制剂对PERK的共价修饰 (图2B)。

[0363] 此外,设计并测试sgRNA以使用CRISPR-Cas9敲除CHO-K1细胞中的PERK基因 (图2D),并且对用最佳敲除表型 (sgPERK#2) 转染的池进行单细胞克隆,以分离不表达PERK蛋白的空CHO-K1宿主细胞系 (图2E)。评估这些空CHO-K1PERK KO宿主细胞系的生长、转染速率、选择培养基中的回收率和培养性能以鉴定出总体培养性能与野生型 (WT) CHO-K1宿主相当的PERK KO宿主细胞系。然后用或不用衣霉素和PERK抑制剂处理空WT和空PERK KO宿主细胞系 (克隆9,图2E) 以评估UPR诱导后的PDGFRa调节 (图1G)。相对于WT对照,PDGFRa表达在UPR诱导后没有下调,并且PERK抑制剂的添加没有进一步稳定PERK KO宿主中的PDGFRa表达 (图1G)。

[0364] 这项对我们的表达抗体的细胞系中的一种(mAb1CHO DG44)的研究揭示,当细胞源自暴露于低pH的种子培养培养物时,转录下调以及由此产生的PDGFRa蛋白表达降低可能是生产期间生长结果不良的原因(图1A和1B)。以前显示了这种生长结果不良与指示UPR激活的细胞内BiP水平升高相关(Tung等人,2018)。当UPR被化学诱导时,PDGFRa蛋白水平也由于转录下调而降低,这种现象可以通过UPR途径的PERK分支的化学抑制来逆转,表明PERK激活介导PDGFRa下调(图1C、1D、1E、1F以及图2A、2B和2C)。这在PERK KO细胞系中UPR的化学诱导未导致PDGFRa表达下调时得到进一步证实(图1G)。

[0365] 实例2:PDGFRa信号传导途径对于CHO培养物生长至关重要,并且与胰岛素信号传导途径并行发挥作用

[0366] 以前显示了UPR诱导的不良生长曲线与PDGFRa水平下降相关(图1A和1B)(Tung等人,2018)。PDGFRa和胰岛素信号传导途径具有重叠的下游靶标(图3A),然而胰岛素信号传导负向调节PDGFRa信号传导(Cirri等人,2005)。为了测试PDGFRa信号传导途径在CHO细胞生长中的重要性,在不同浓度的PDGFRa抑制剂存在下培养空宿主CHO-K1细胞,由于Akt信号传导途径减弱(图3C),该抑制剂在20 μ M浓度下减少细胞生长约50%(图3B)。与未处理的培养物相比,向用PDGFRa抑制剂处理的CHO培养物中添加胰岛素部分挽救细胞生长(图3B)并增加Akt磷酸化,并且从而增加其激活(图3C)。这些发现证实,PDGFRa和胰岛素信号传导途径确实在CHO细胞中具有重叠的下游靶标,并且Akt信号传导途径在PDGFRa抑制剂存在下保持完整(图3B和3C)。PDGFRa信号传导对于CHO生产培养物生长也是重要的,因为它在分批补料生产的第3天的抑制显著降低了表达抗体(mAb2)的CHO细胞系中的细胞生长,而不影响细胞活力(图3D)。类似于种子培养培养物(图3B),在生产培养的第3天添加胰岛素部分挽救了观察到的细胞生长抑制(图3D)。

[0367] 证明了PDGFRa信号传导途径对于在不含任何生长因子的化学成分确定的培养基中培养的我们的CHO细胞中的细胞生长至关重要(图4A和4B),这表明我们的CHO细胞分泌PDGFRa配体,或者PDGFRa信号传导途径在这些细胞中具有固有活性。当PDGFRa信号传导被抑制时,向培养基中添加胰岛素部分挽救了细胞生长,这意味着PDGFRa抑制剂具有特异性并且不影响下游信号传导(图3B和3C),因为PDGFRa和胰岛素受体(IR)都具有部分重叠的信号传导途径(图3A)。

[0368] 在生产培养物中也观察到UPR的PERK分支引起的PDGFRa下调,其中PDGFRa水平在接近培养期结束时下降,与PERK活性水平较高相一致,如其下游靶蛋白mRNA水平激增所证明的(图4C和4D)。PERK的化学抑制阻止了其下游靶标的转录增加并且还在生产期间稳定了PDGFRa水平(图4C和4D)。

[0369] 实例3:在生产期间UPR的PERK分支的激活减弱PDGFRa信号传导,降低比生产力并促进培养物活力

[0370] 在不存在(对照)或存在PERK抑制剂(在生产第3天添加)的情况下,使用表达mAb2的CHO-K1细胞系,在生产培养物中监测PERK激活与PDGFRa表达下调之间的相关性。在生产培养的第13天和第14天观察到的PDGFRa下调(图4C,左图)与CHOP和GADD34基因的mRNA水平增加相关,这些基因是PERK的下游靶标(Marciniak等人,2004),表明PERK信号传导途径的激活(图4D)。添加PERK抑制剂阻断了PERK信号传导(CHOP和GADD34mRNA水平没有增加)并阻止了PDGFRa表达的下调(图4C右图和4D)。由于使用PERK抑制剂的成本高昂,并且不能完全

排除其对培养细胞的潜在脱靶活性,因此决定生成表达mAb2的PERK KO CHO-K1细胞系,以直接研究该信号传导途径在PDGFR α 下调和生产培养性能中的作用。

[0371] 使用CRISPR-Cas9技术敲除表达mAb2的CHO-K1细胞系中的PERK基因,并且在单细胞克隆后,在生产培养物中评估具有与亲本细胞系(图5A,加下划线的克隆)相当的生长曲线的衍生PERK KO细胞系(图5B和5C)。与亲本细胞系相比,PERK KO细胞系总体上显示出生长和活力下降(图5B),然而,与WT亲本细胞系相比,所有PERK KO细胞系都具有更高的比生产力,并且大部分具有更高的滴度(图5B)。在生产期间对这些细胞系的西方印迹分析证实,与WT亲本细胞系相比,PERK KO细胞系中的PDGFR α 水平稳定,在生产接近结束时,WT亲本细胞系展示出降低的PDGFR α 表达水平(图5C)。PERK KO细胞系中细胞内BiP蛋白的较高水平表明UPR激活增加(图5C),而观察到的细胞生长和活力的降低(图5B)与半胱天冬酶-3裂解增加相关,这意味着细胞凋亡途径在生产培养接近结束时激活(图5C)。WT或PERK KO细胞系表达的抗体具有相当的产物质量。

[0372] 这些发现证实,UPR的PERK分支的激活下调种子培养和生产培养物二者中的PDGFR α 表达。有趣的是,PERK KO培养物在生产期间展示出较低的总体活力和生长,但滴度和比生产力较高(图5B)。这些培养物中增加的细胞内BiP水平和较高水平的半胱天冬酶-3裂解分别指示UPR和细胞凋亡途径的激活,并且与较低的培养物活力相关(图5C)。生产期间较高水平的比生产力可能会引发细胞凋亡,并且早期PERK激活可能会通过简单地降低这些细胞的比生产力来减弱细胞凋亡。

[0373] 实例4:在Bax/Bak双敲除CHO细胞系中敲除PERK通过增强转基因转录和减弱细胞凋亡性细胞死亡显著增加比生产力和滴度

[0374] 由于PERK KO克隆在生产期间显示出更高水平的细胞凋亡(图5C),因此在表达mAb3的WT细胞系或表达mAb3的Bax/Bak双敲除(DKO)细胞系池中敲除PERK基因(图6A)。Bax/Bak是作用于线粒体以引发细胞凋亡性细胞死亡的蛋白质(Taylor、Cullen和Martin, 2008),并且与WT CHO细胞系相比,这些基因的缺失使细胞系更能抵抗细胞凋亡,并有可能提高长生产过程期间的活力和生产力(Misaghi、Qu、Snowden、Chang和Snedcor, 2013)。单细胞分选后,将PERK/Bax/Bak三重敲除(TKO)克隆(图6A)与三个不同生产平台上的对照(WT、PERK KO和Bax/Bak DKO池)进行比较:1)使用精益生产培养基,2)使用丰富生产培养基,以及3)在强化过程中使用丰富生产培养基。与对照相比,TKO克隆表现出更好的生物过程结果,显示出更高的滴度和相对比生产力(图6B和6C,以及表2),同时所有生产平台上保持相当的产物质量属性(表3)。测试PERK/Bax/Bak TKO池和克隆的类似生产平台清楚地揭示,PERK基因的缺失使表达抗体(mAb3)或Fab(Fab1)的CHO细胞的比生产力更高(图7A、7B和表4)。这些数据表明,观察到的Bax/Bak/PERK TKO CHO细胞比生产力的增加不是克隆或产物特异性的,而是一种普遍现象。

[0375] 表2. 表达mAb3的CHO-K1TKO细胞在不同生物过程中的生物过程结果。

[0376]

	参数	滴度 (g/L)		相对 Qp		相对 IVCC		%活力	
		10	14	10	14	10	14	10	14
精益生产培养基	WT	0.86	1.16	1.00	0.84	1.00	1.60	98.0	5.4
	PERK KO 1	0.71	0.72	0.85	0.59	0.97	1.44	88.5	1.1
	PERK KO 2	0.66	0.69	0.80	0.55	0.96	1.46	97.8	1.1
	BB DKO	0.67	1.10	1.04	0.86	0.75	1.49	99.0	97.0
	TKO 1	1.42	2.59	3.14	2.82	0.53	1.07	96.5	94.1
	TKO 2	1.55	2.62	3.45	2.86	0.52	1.07	97.4	94.4
	TKO 3	1.52	2.50	2.96	2.43	0.60	1.20	97.3	93.9
	TKO 4	1.36	2.54	2.87	2.64	0.55	1.12	96.1	94.2
丰富生产培养基	WT	1.72	1.85	1.00	0.85	1.00	1.27	97.7	0.0
	PERK KO 1	1.31	1.15	0.86	0.60	0.89	1.12	94.2	0.0
	PERK KO 2	1.18	1.23	0.80	0.66	0.85	1.09	96.6	0.0
	BB DKO	1.74	2.48	1.06	0.91	0.95	1.58	98.7	96.1
	TKO 1	3.66	5.30	2.68	2.32	0.79	1.33	92.9	91.7
	TKO 2	3.78	5.20	3.12	2.60	0.70	1.16	92.7	89.4
	TKO 3	4.30	6.48	3.14	2.81	0.79	1.34	95.4	90.6
	TKO 4	3.66	5.32	2.36	2.06	0.90	1.50	95.3	91.3
强化的丰富生产培养基	WT	3.76	3.82	1.00	0.87	1.00	1.17	94.0	63.7
	PERK KO 1	1.86	1.94	0.53	0.46	0.94	1.13	95.0	77.9
	PERK KO 2	1.84	1.92	0.49	0.41	1.01	1.23	97.0	85.3
	BB DKO	4.16	5.05	1.09	1.07	1.01	1.25	98.6	96.0
	TKO 1	7.44	8.38	2.24	2.10	0.88	1.06	97.5	89.9
	TKO 2	7.36	8.28	2.35	2.29	0.83	0.96	92.0	55.8

[0377] 表3. 表达mAb3的CHO-K1TKO细胞在不同生物过程中的产物质量。

[0378]

	参数	聚集体	%电荷变体		
		%HMWS	酸性	主要的	碱性
精益生产培养基	WT	4.39	32.12	61.02	6.86
	PERK KO 1	3.83	36.47	57.19	0.35
	PERK KO 2	3.31	34.80	57.76	7.43
	BB DKO	19.69	33.24	60.22	6.53
	TKO 1	10.16	32.12	62.46	5.41
	TKO 2	13.71	33.25	61.64	5.11
	TKO 3	16.24	32.87	61.57	5.57
	TKO 4	11.54	30.98	63.54	5.48
丰富生产培养基	WT	3.04	39.35	52.39	8.26
	PERK KO 1	2.70	38.70	54.92	6.39
	PERK KO 2	2.89	38.54	56.11	5.35
	BB DKO	14.19	38.71	55.09	6.21
	TKO 1	12.03	41.65	53.82	4.53
	TKO 2	13.16	42.73	52.52	4.76
	TKO 3	15.70	43.82	51.83	4.35
	TKO 4	11.90	40.77	53.48	5.75

[0379] 表4. Bax/Bak DKO和PERK/Bax/Bak TKO的单细胞克隆的生物过程结果。

[0380]

mAb3 CHO-K1 生产 - TKO 单细胞克隆				
第 14 天参数	相对滴度	相对 Qp	相对 IVCC	
WT	1.00	1.00	1.00	
DKO 池	1.34	1.08	1.24	
TKO 平均值	3.02	2.89	1.05	
TKO 1	2.87	2.74	1.05	
TKO 2	2.82	3.08	0.92	
TKO 3	3.51	3.32	1.06	
TKO 4	2.88	2.43	1.19	
mAb3 CHO-K1 生产 - DKO 单细胞克隆				
第 14 天参数	相对滴度	相对 Qp	相对 IVCC	
WT 平均值	1.00	1.00	1.00	
DKO 平均值	1.21	1.03	1.15	
WT1	0.65	0.54	1.16	
WT2	1.23	1.34	0.88	
WT3	1.12	1.12	0.96	
BB DKO1	1.34	0.82	1.58	
BB DKO2	1.04	0.94	1.06	
BB DKO3	1.16	1.21	0.92	
BB DKO4	1.01	0.99	0.97	
BB DKO5	1.52	1.20	1.22	

[0381] 西方印迹分析揭示,相对于亲本系,PERK/Bax/Bak TKO克隆在种子培养(图6A)和生产培养基(图6D)中具有更高的细胞内抗体重链和轻链水平。另外,与亲本系相比,TKO克隆在生产中展示出更稳定的PDGFR α 表达并且没有半胱天冬酶-3裂解,这指示细胞凋亡途径的抑制(图6D)。有趣的是,PERK/Bax/Bak TKO克隆具有较高水平的IRE1 α 、磷酸化IRE1 α 和显著较高水平的剪接XBP-1转录因子,表明这些细胞在生产中经历增加的蛋白质翻译和蛋白稳态应激(图6D)。TKO克隆还展示出较高水平的Sod2蛋白,这意味着活性氧(ROS)途径的激

活(图6D)。这些发现表明,在生产期间激活UPR的PERK分支通过减少蛋白质翻译以及减弱IRE1a和ROS途径,从而减轻生产培养中的细胞凋亡性细胞死亡来累积地减少蛋白稳态应激。与亲本细胞系相比,对这些生产过程的进一步研究将比生产力的增加与TKO克隆中重链和轻链转录物的mRNA水平的增加联系起来(图6E)。这表明UPR的PERK分支直接或间接地通过减弱IRE1a或PDGFRa信号传导来减少生产期间来自CMV启动子的转基因转录。

[0382] 如上所述,为了防止由于PERK KO细胞系中比生产力增加而引起的细胞凋亡,在表达抗体的Bax/Bak双敲除细胞系中敲除PERK(图6A)。令人兴奋的是,与亲本系相比,TKO克隆在生产期间的协同效应产生更高的总滴度(高达8g/L)和相对比生产力,同时具有相当的IVCC和活力(图6B、6C和表2)。这种协同效应可以由PERK缺失引起的IRE1a信号传导增加(PERK已被显示减弱UPR的IRE1a分支(Chang等人,2018)),以及由Bax和Bak基因缺失产生的细胞凋亡信号传导途径减弱引起的IRE1a活性延长来解释。在生产期间观察到我们的TKO克隆中IRE1a信号传导增加并延长,这指示IRE1a磷酸化程度更高并且其下游靶标(剪接的XBP-1)的存在增加(图6D)。XBP-1已被显示暂时改善生物过程结果(Rajendra、Hougland、Schmitt和Barnard,2015),并且观察到的抗体转录水平增加(图6E)表明或者UPR的PERK分支的激活减弱来自CMV启动子的转基因转录,或者PDGFRa和/或IRE1a信号传导直接或通过其下游靶标在增强来自CMV启动子的转录中发挥作用。然而,这些信号传导途径之间的确切机制和相互作用仍有待确定。

[0383] 本公开中呈现的发现表明,表达抗体的CHO细胞中UPR的慢性激活可主要通过下调PDGFRa水平的PERK途径引发生长不良。这些细胞中的UPR主要是由ER中的蛋白稳态应激引起的,该蛋白稳态应可以由范围从细胞培养参数到表达蛋白质的氨基酸序列和组成的许多不同因素触发。怀疑这是当蛋白质生产增加并因此增加ER负担时促进适应性生长的一种方式。通过调节PDGFRa水平来减缓细胞增殖和代谢可以为ER扩张提供更多时间,这也受到PERK途径的调节。敲除PERK途径可能会使细胞生长,但也可能导致细胞凋亡,因为细胞无法适应高比生产力和蛋白质合成率带来的额外压力。为了绕过这个问题,敲除PERK途径同时删除细胞凋亡途径的组分(Bax/Bak基因)实现了高比生产力和增加的细胞活力二者。因此,本公开提出,在具有减弱的细胞凋亡途径的哺乳动物蛋白表达宿主细胞系中敲除PERK可以显著增加比生产力并因此增加培养物滴度。

[0384] 本申请全文引用的所有附图和所有参考文献、专利和公开的专利申请以及登录号的内容通过引用明确并入本文。

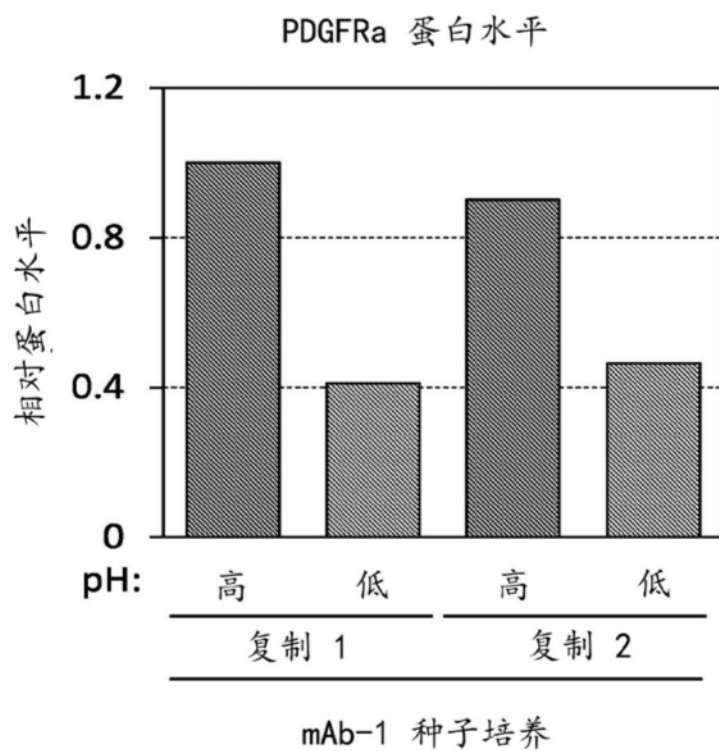


图1A

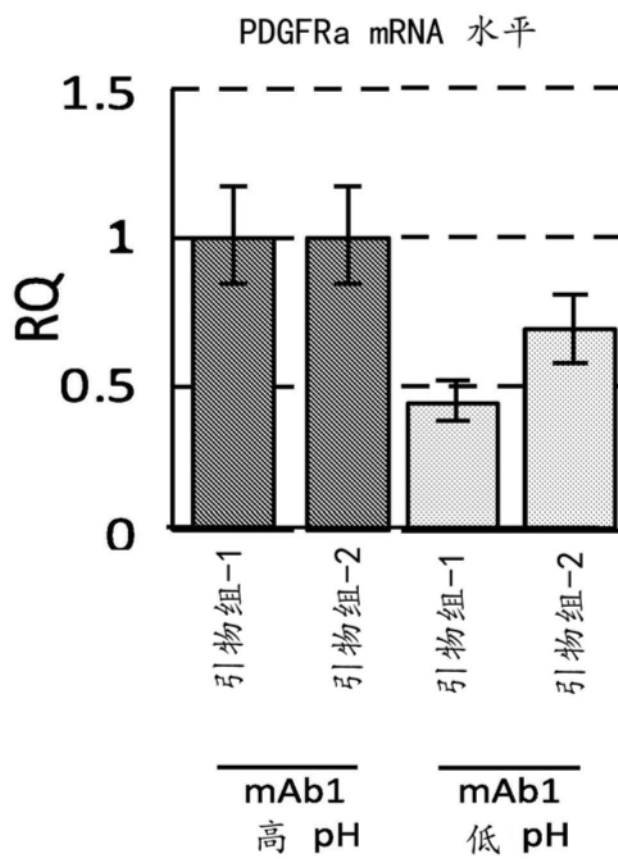


图1B

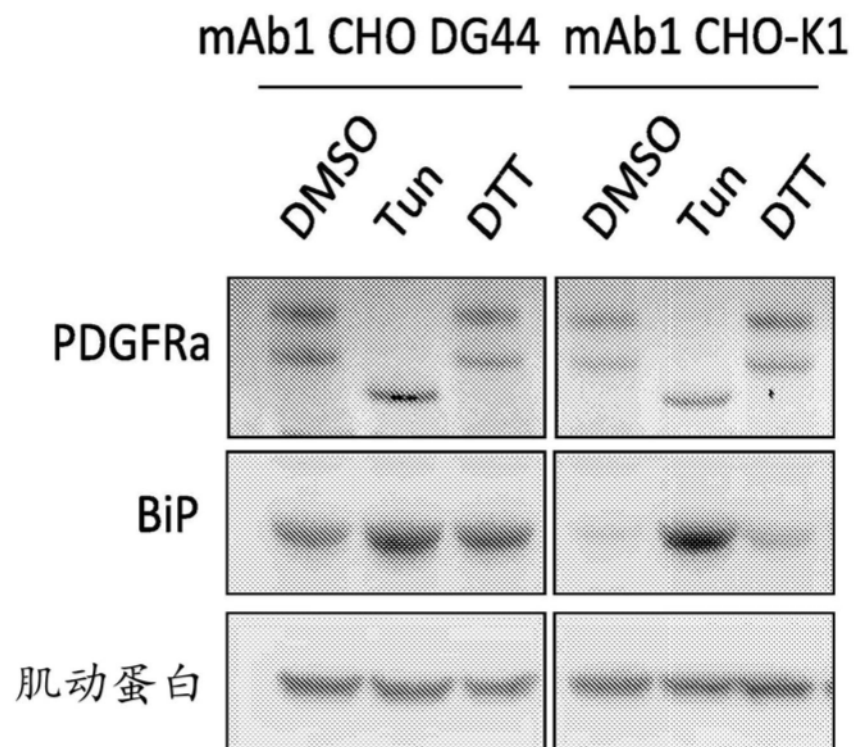


图1C

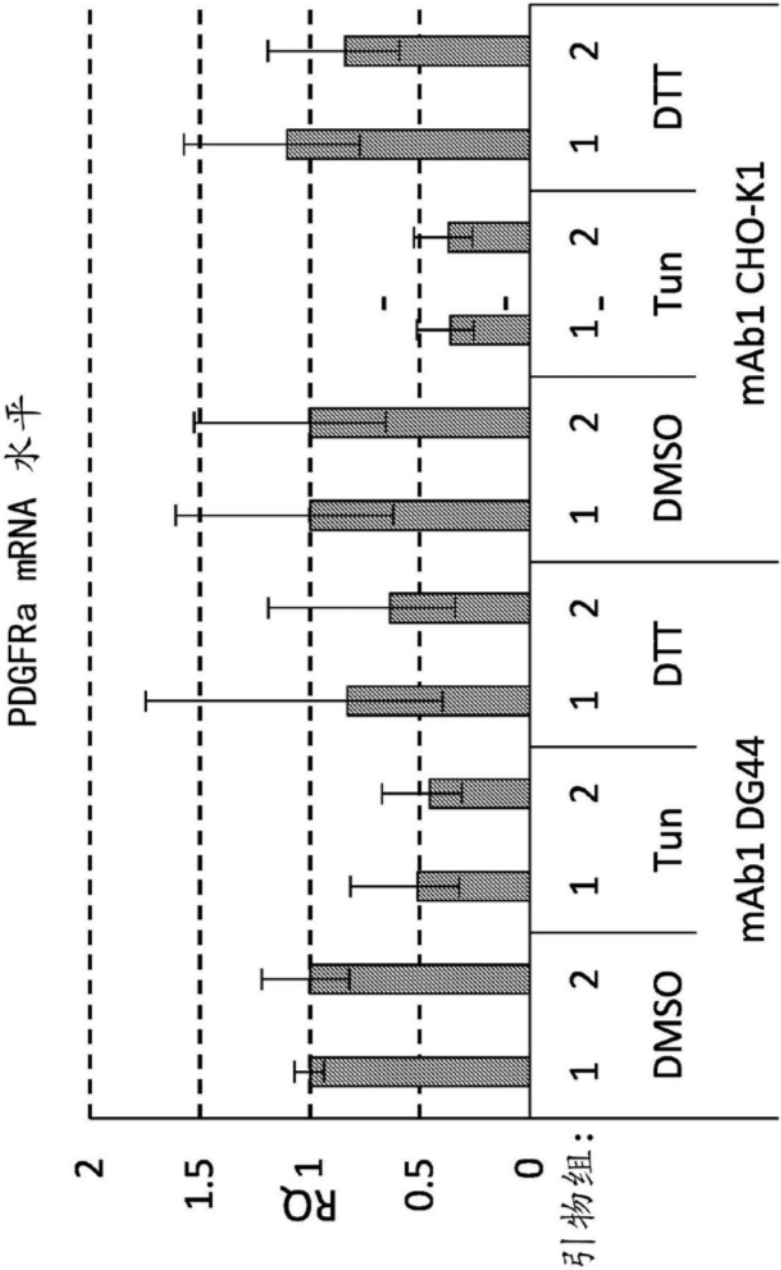


图1D

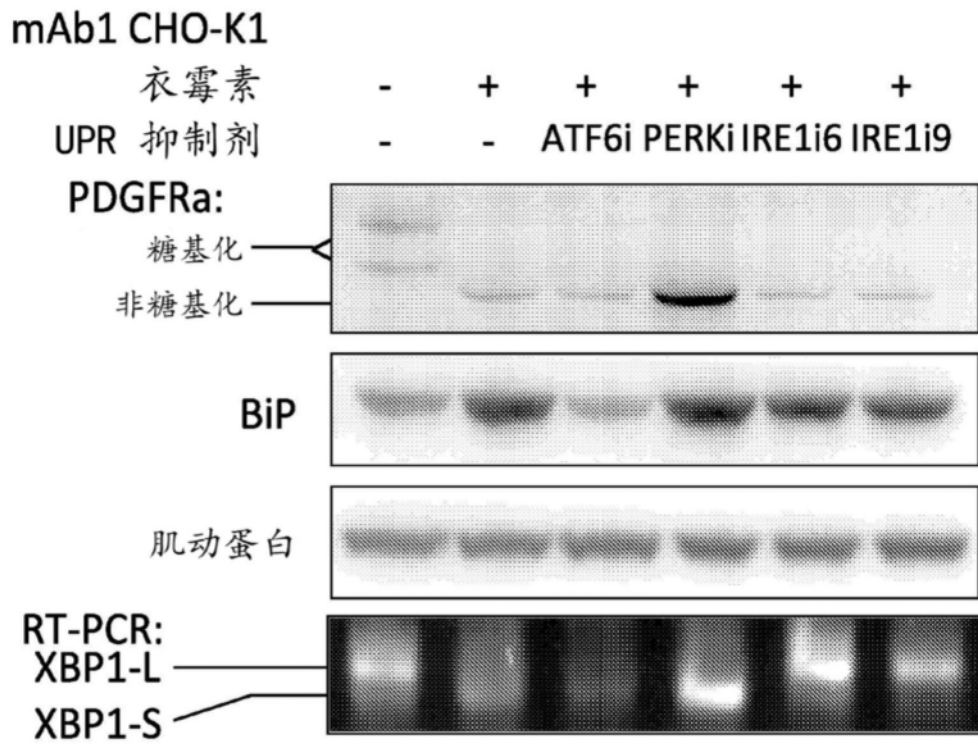


图1E

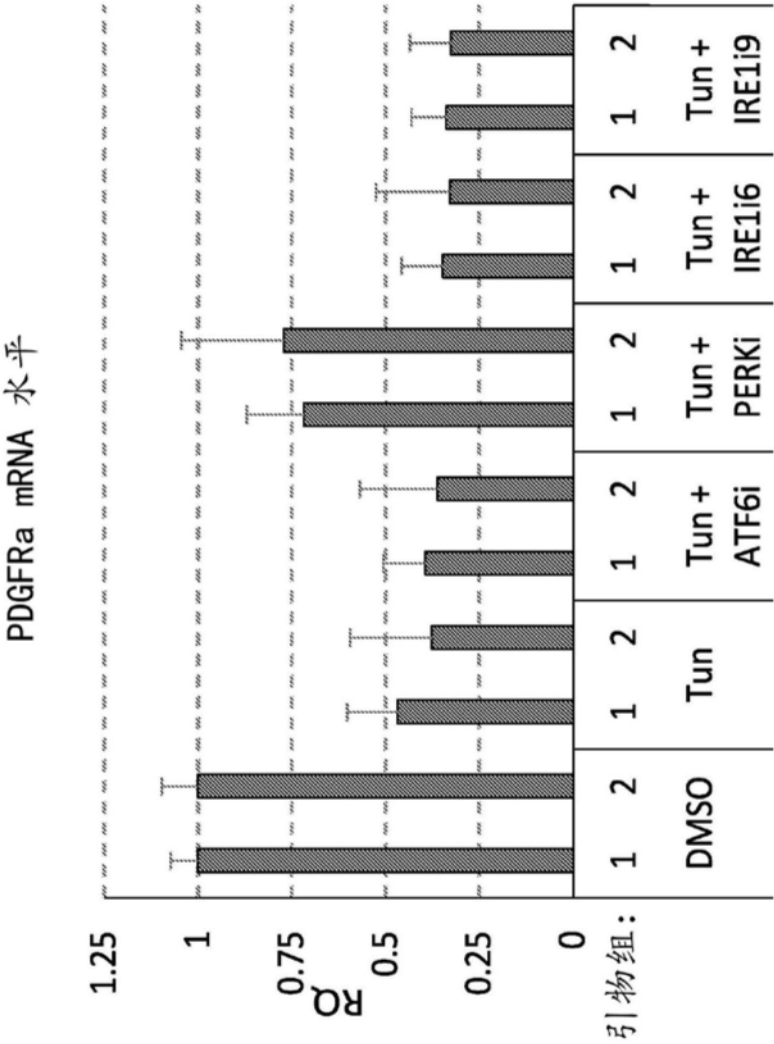


图1F

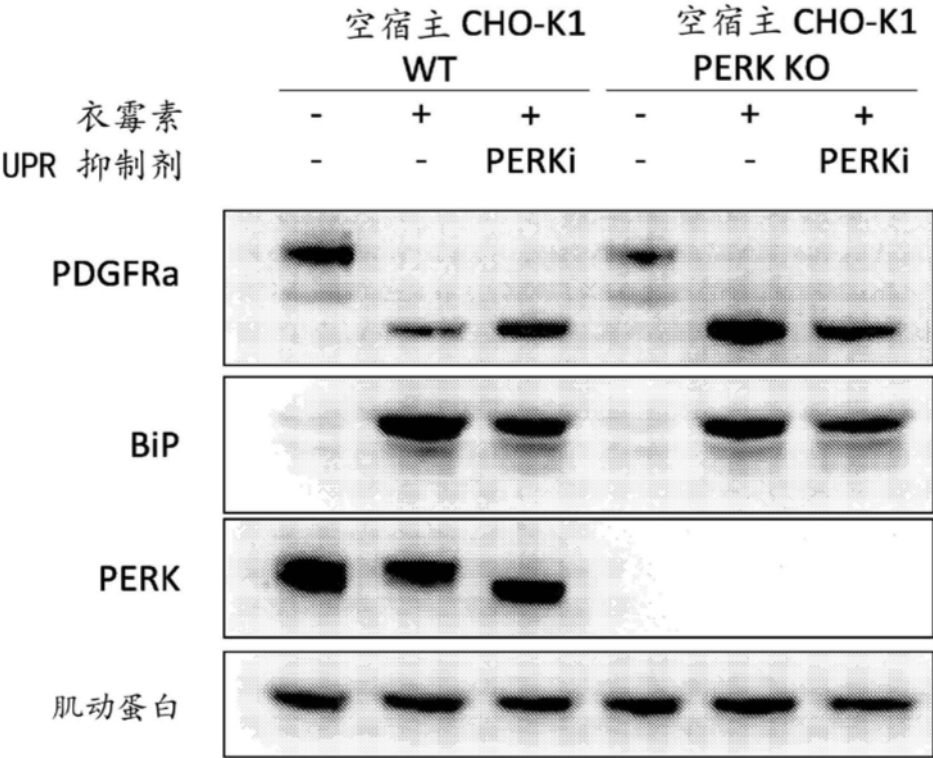


图1G

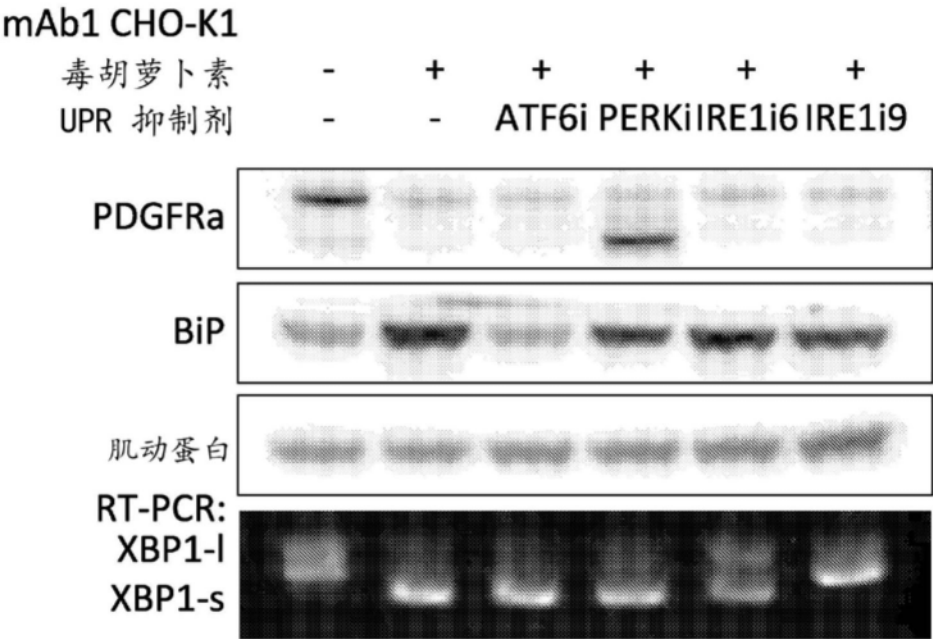


图2A

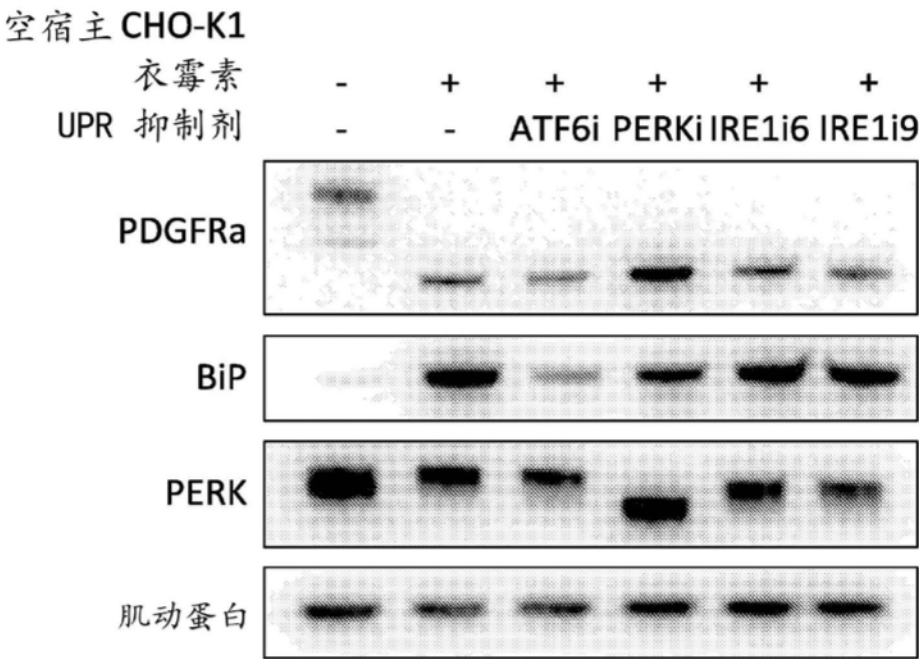


图2B

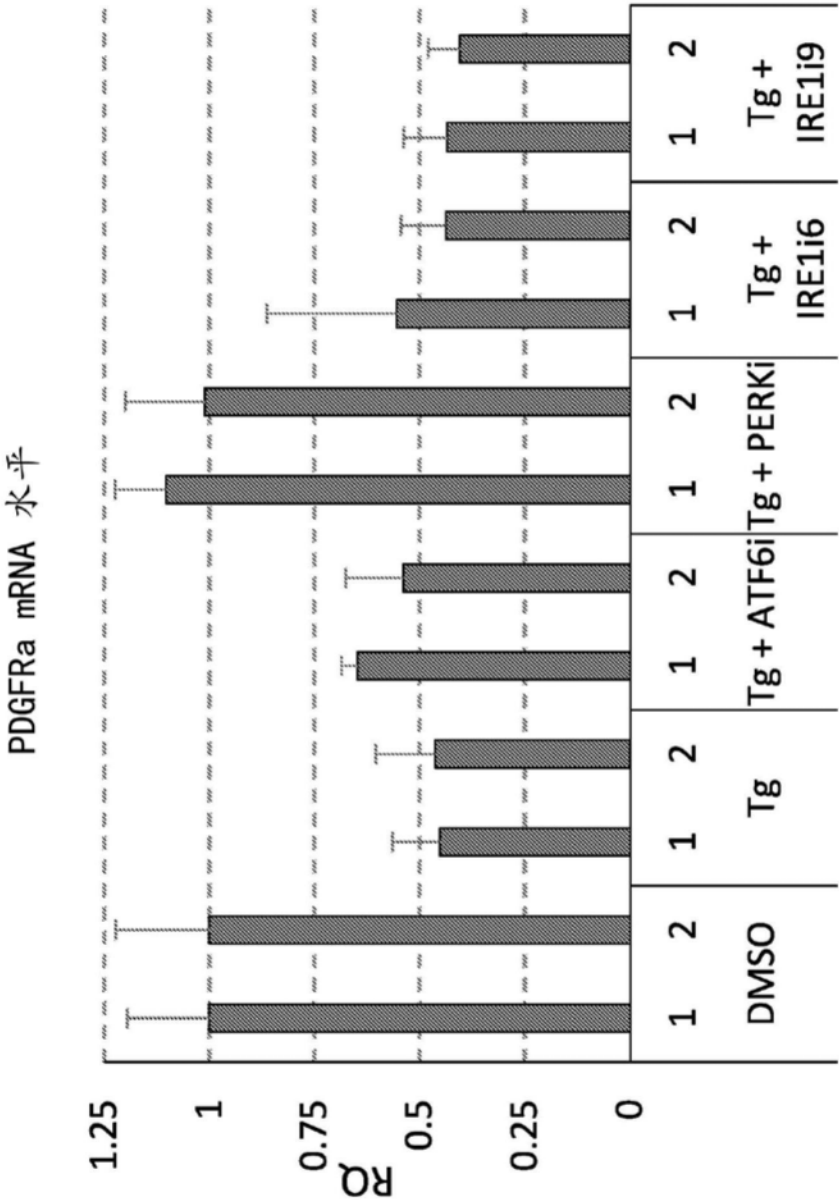


图2C

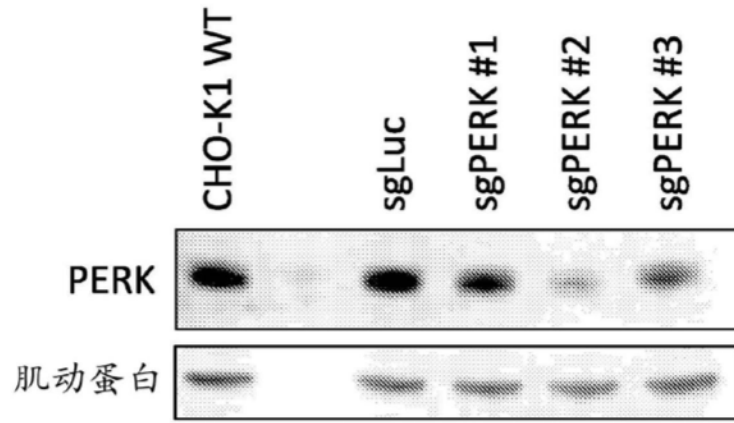


图2D

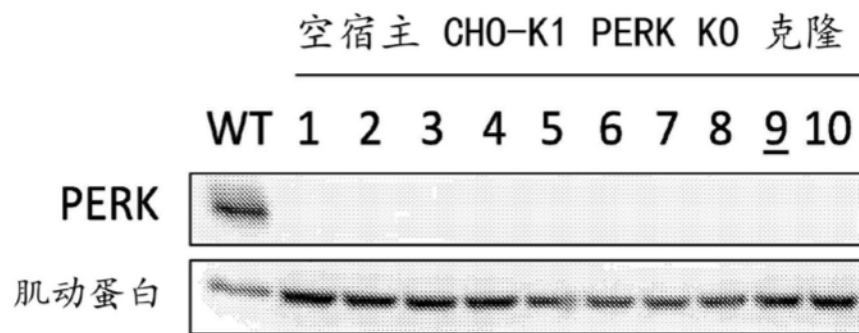


图2E

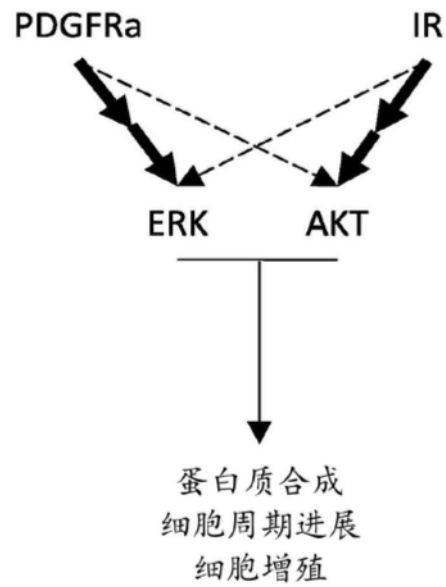


图3A

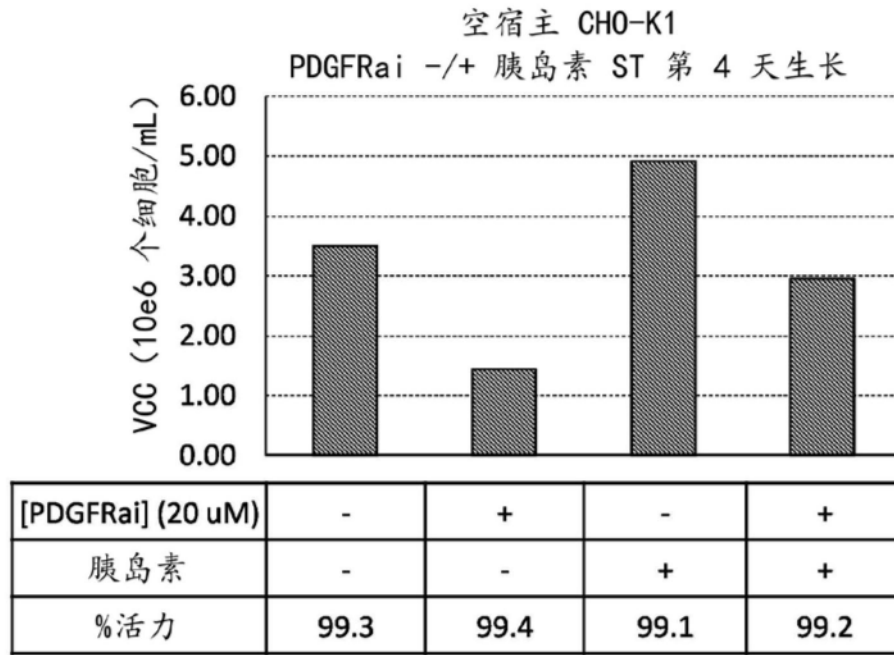


图3B

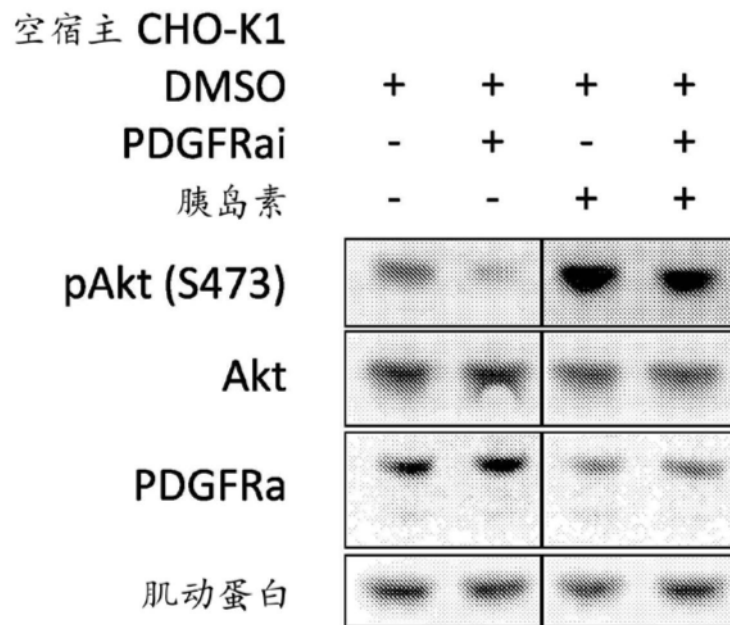


图3C

PDGFRa 对 mAb2 CHO-K1 生产的抑制					
第 12 天 参数	相对 IVCC	%活力	相对滴度	相对 Qp	
对照	1.00	96.40	1.00	1.00	
+PDGFRai	0.62	94.13	0.75	1.20	
+PDGFRai +胰岛素	0.77	93.50	0.81	1.05	

图3D

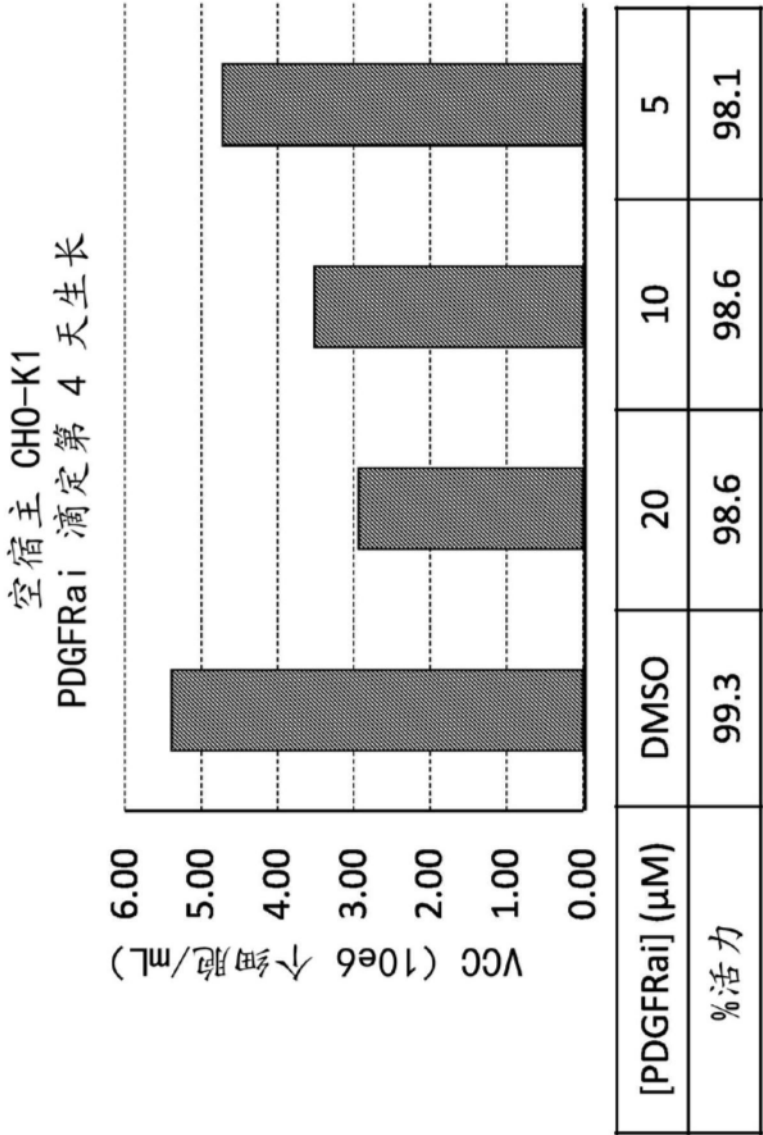


图4A

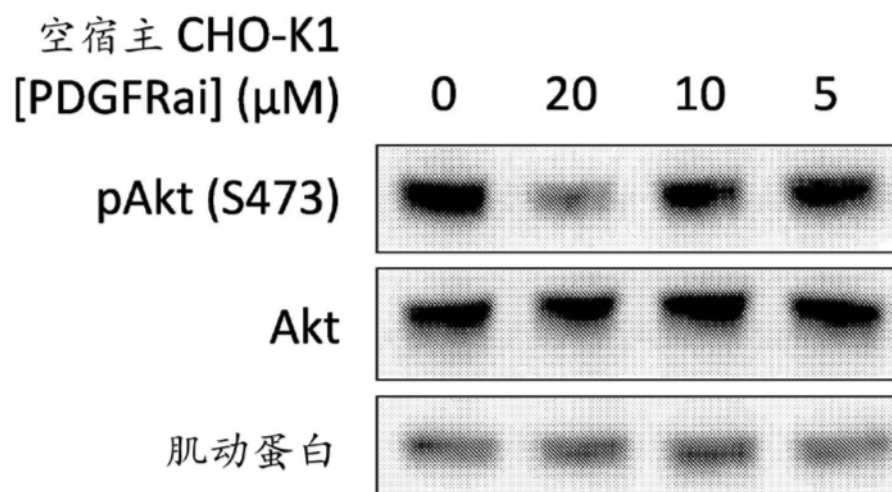


图4B

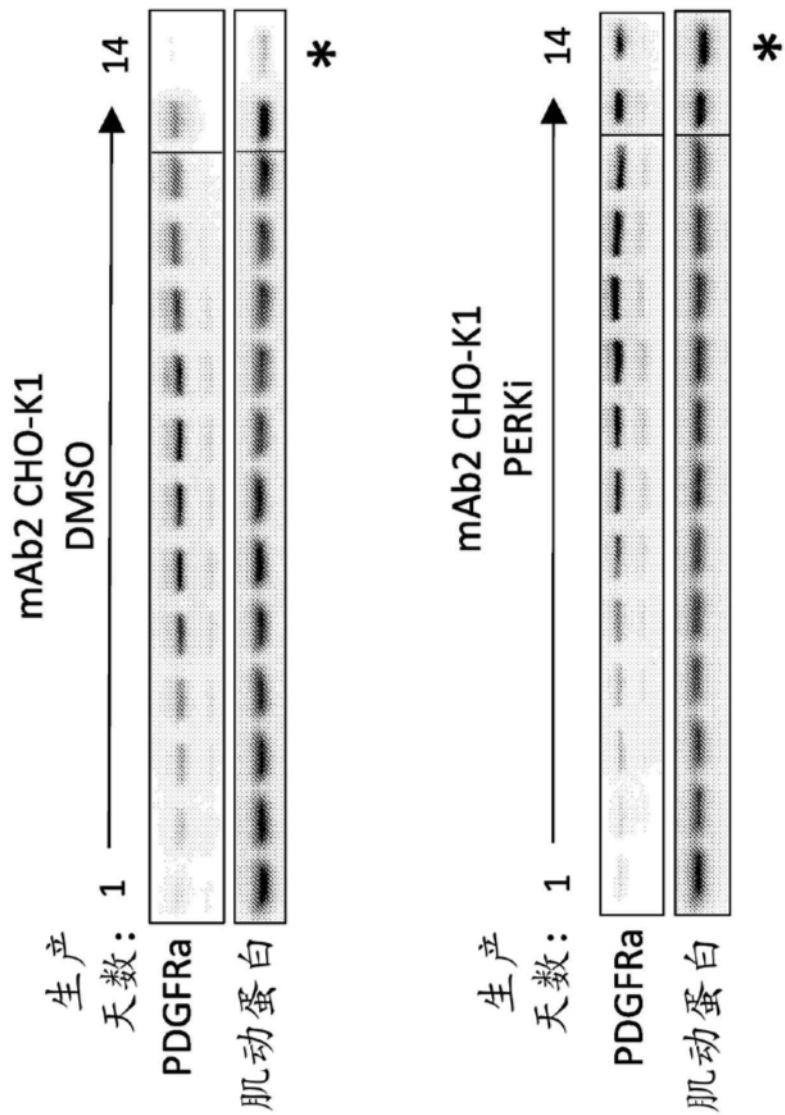


图4C

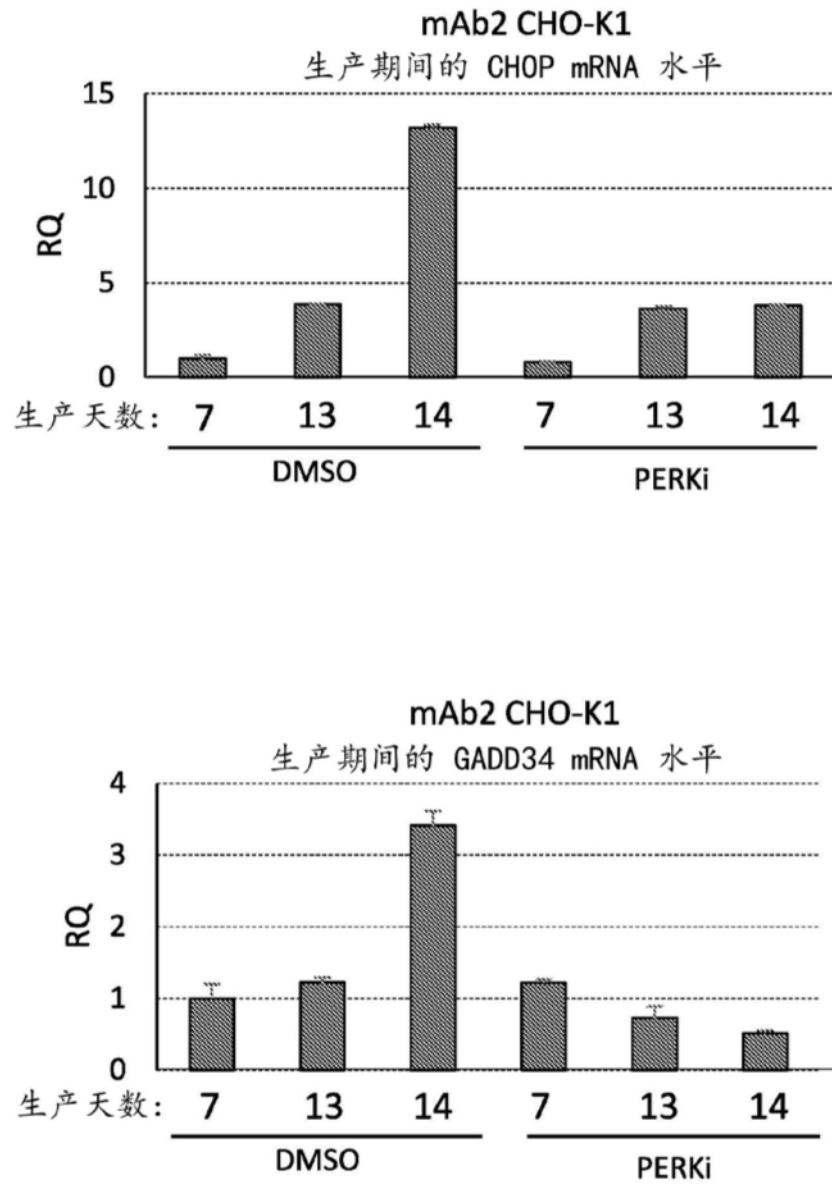


图4D

PDGFR α 水平在 PERK KO 的生产期间是稳定的

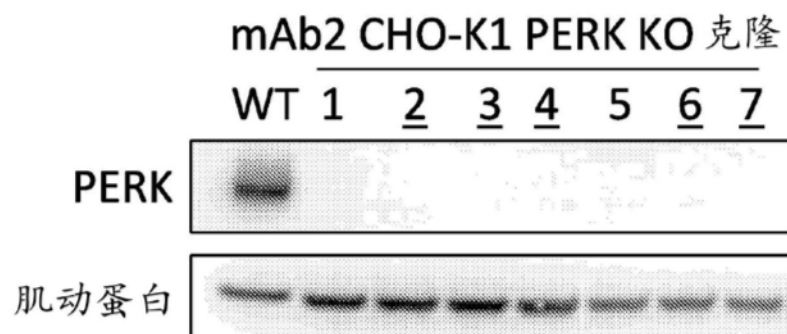


图5A

PERK KO 对 mAb2 CHO-K1 生产的影响				
第 14 天 参数	相对 IVCC	%活力	相对滴度	相对 Qp
WT	1.00	95.9	1.00	1.00
PERK KO 2	0.55	51.5	0.97	1.78
PERK KO 3	0.83	64.9	1.07	1.29
PERK KO 4	0.88	77.9	1.15	1.30
PERK KO 6	0.85	60.3	1.18	1.40
PERK KO 7	0.80	71.4	0.96	1.20

图5B

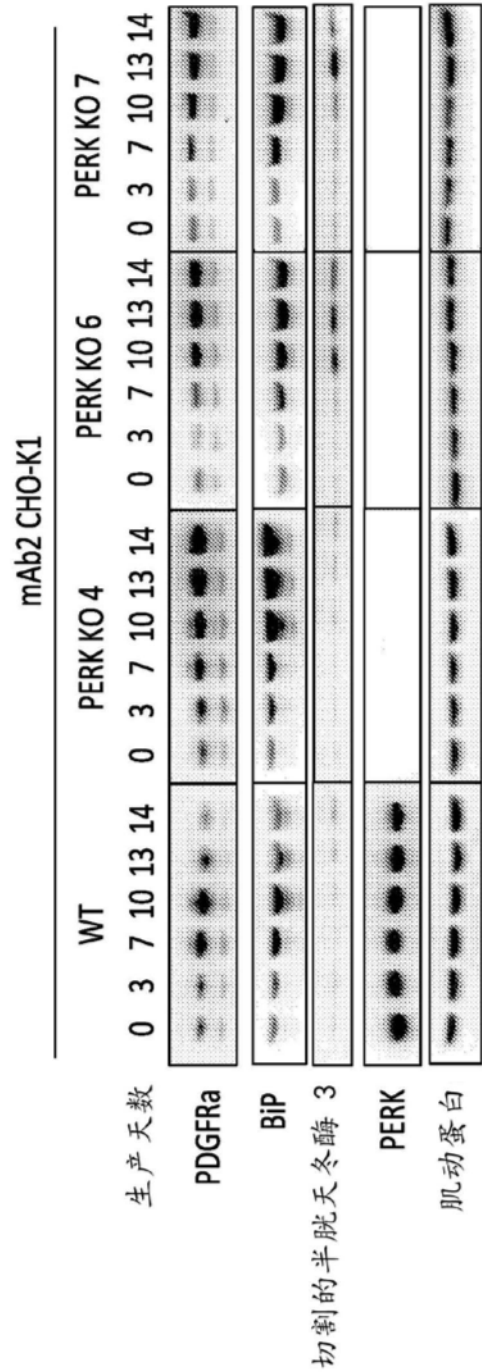


图5C

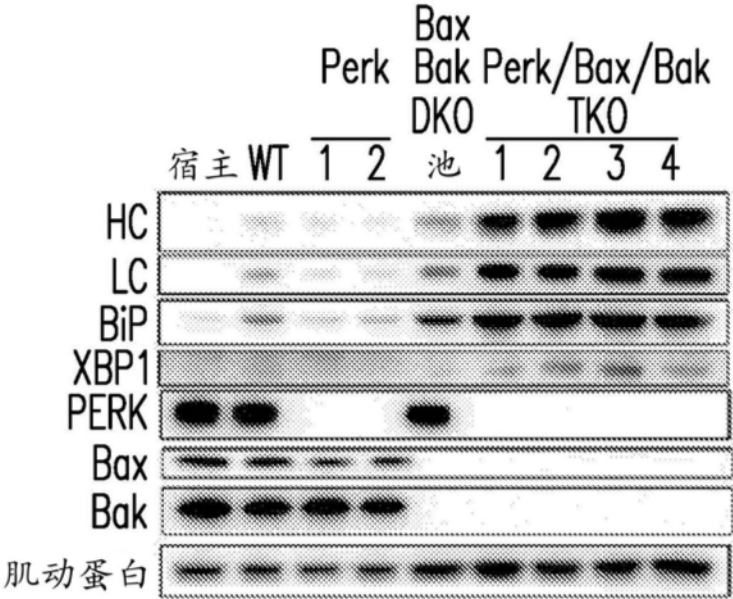


图6A

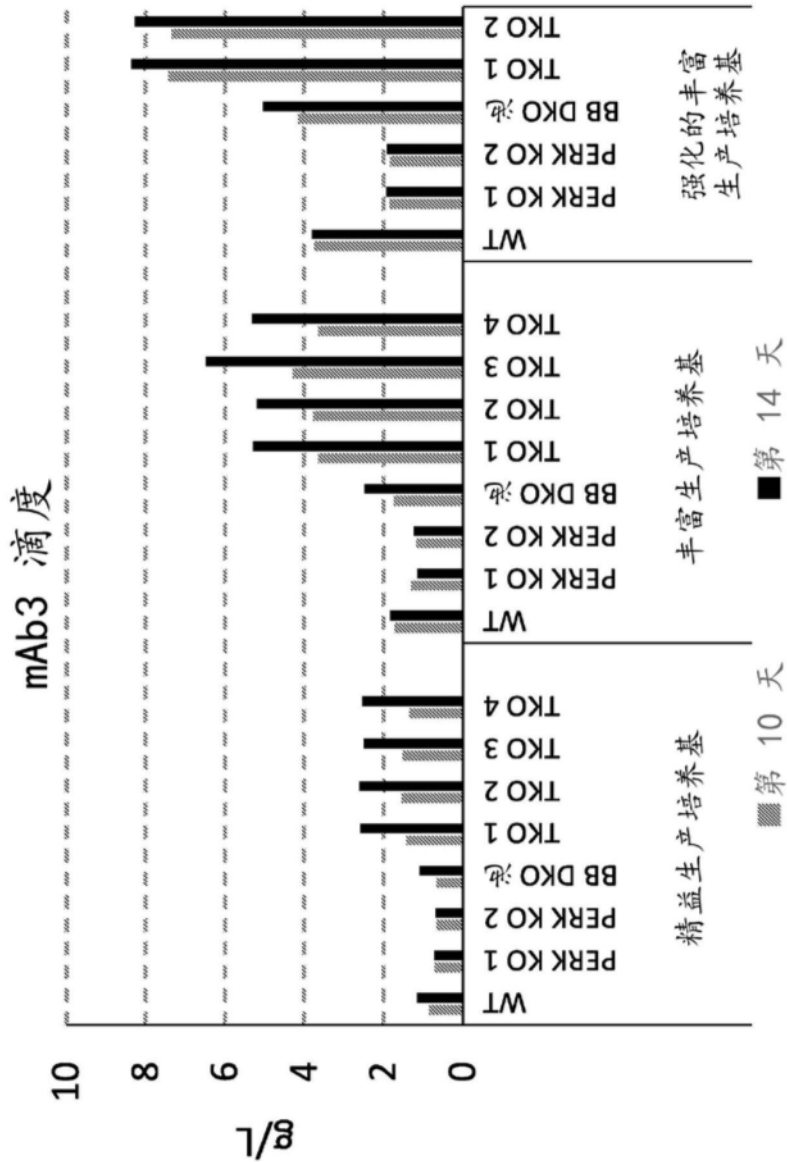


图6B

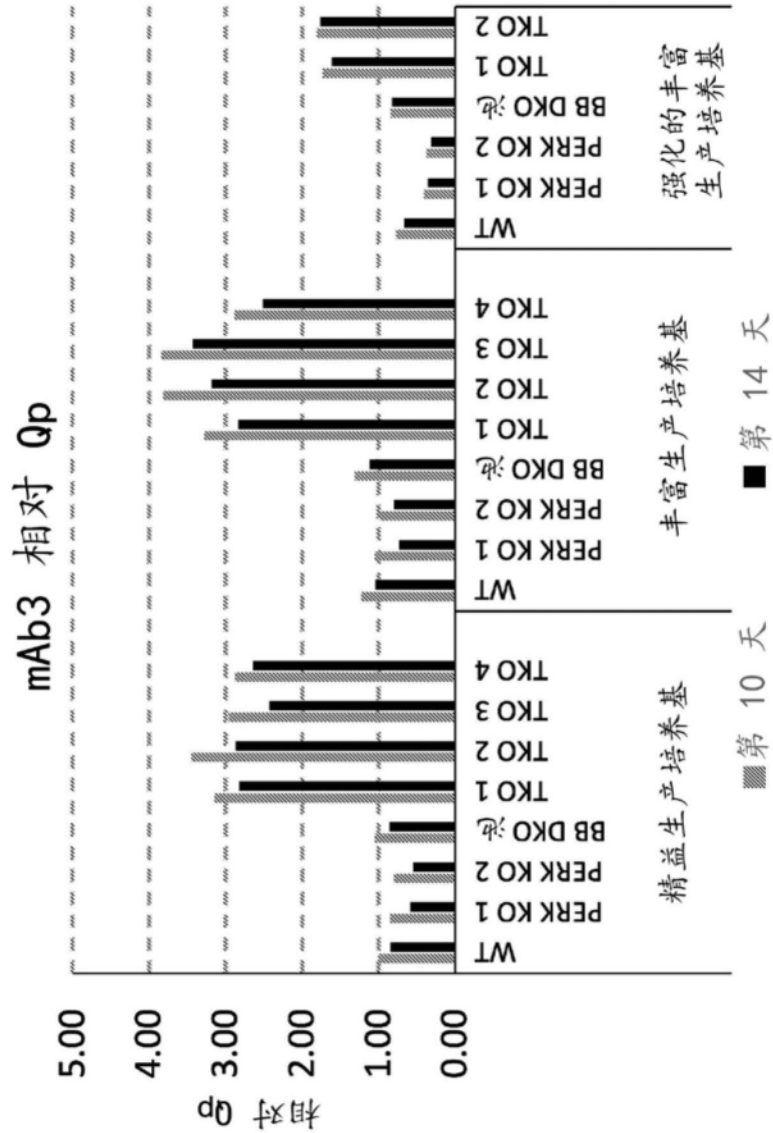


图6C

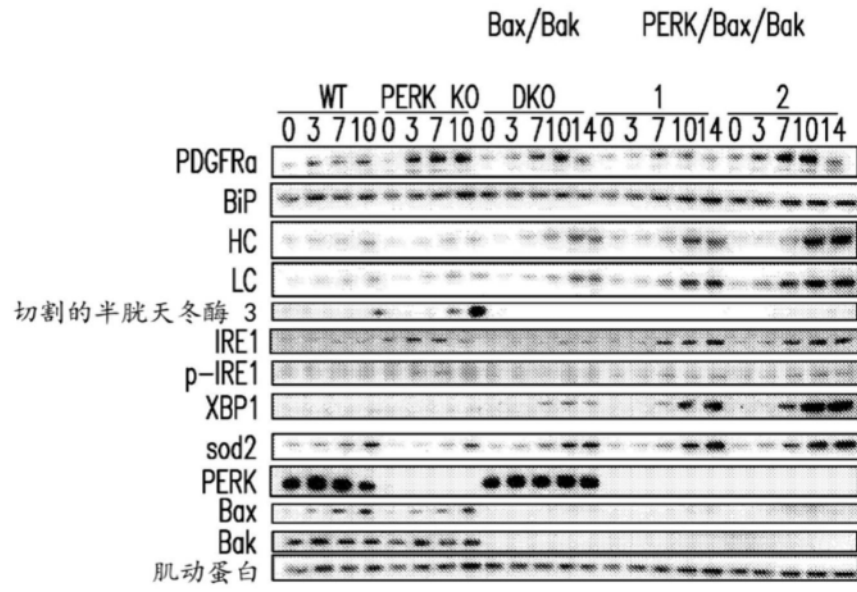


图6D

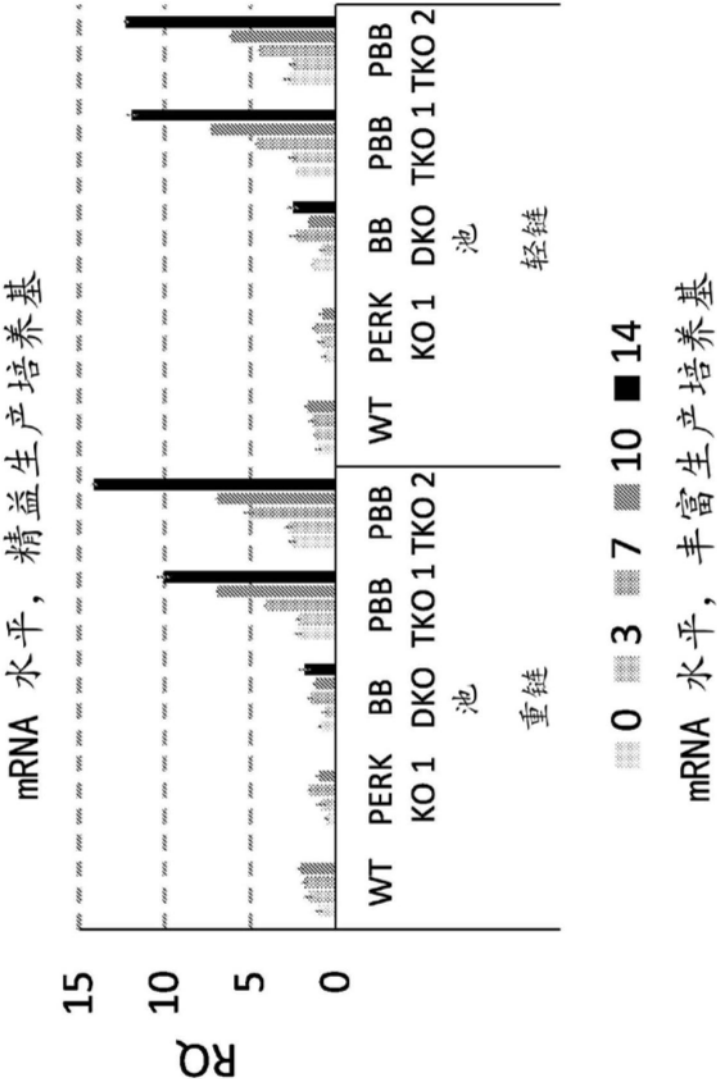


图6E

mRNA 水平，精益生产培养基

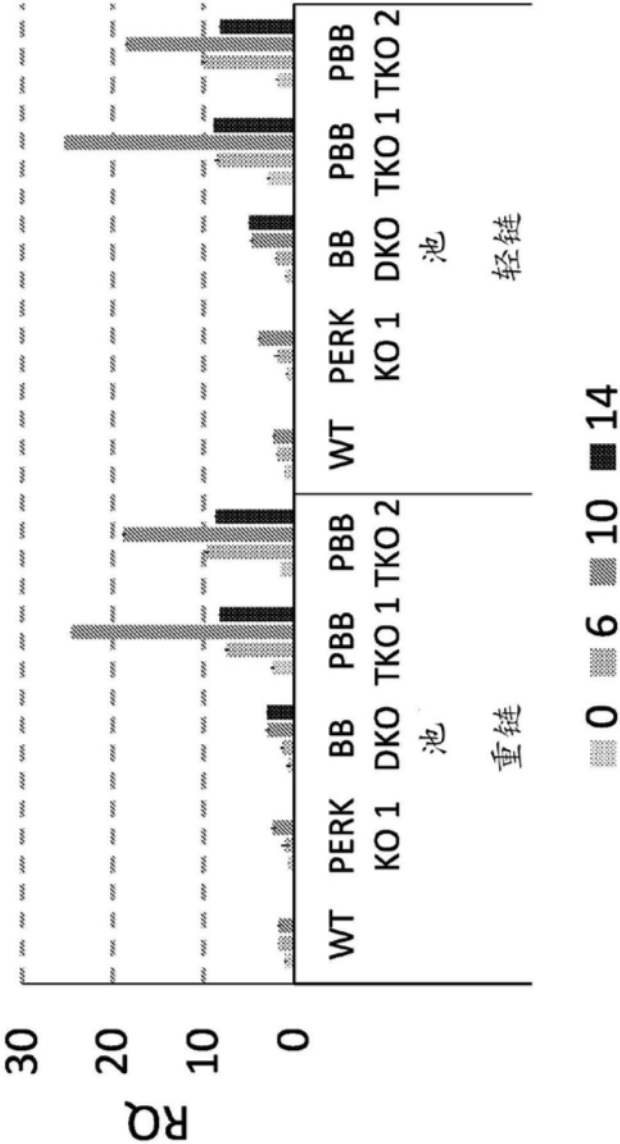


图6E续

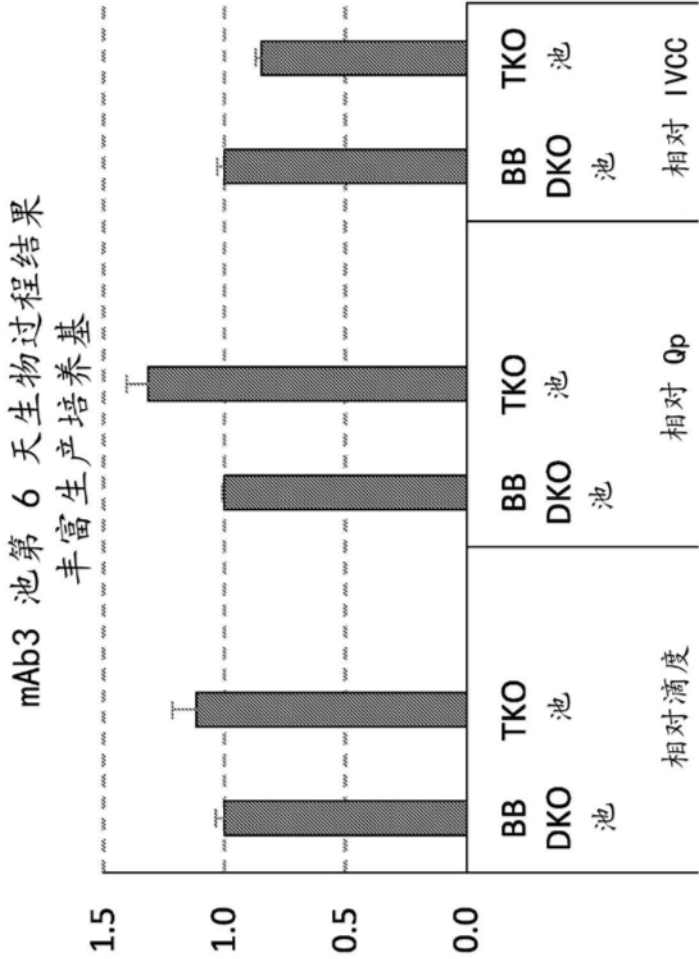


图7A

Fab1 第 14 天生物过程结果
丰富生产培养基

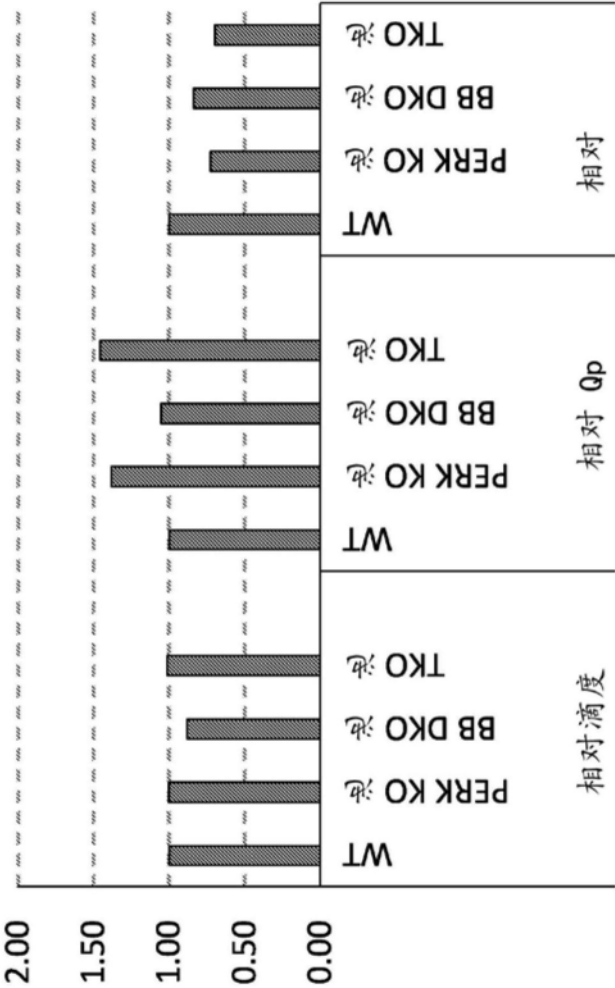


图7B