



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119242587 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 03

(21) 申请号 202410997643.1

(22) 申请日 2018.02.17

(30) 优先权数据

62/460,420 2017.02.17 US

(62) 分案原申请数据

201880026281.4 2018.02.17

(71) 申请人 隆萨有限公司

地址 瑞士菲斯普

申请人 弗埃塞股份有限公司

(72) 发明人 M·福瑞 R·J·杨 M·莫法特

G·F·卡斯帕森 H·L·琼斯

L·张

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

专利代理师 陶家蓉 钱文字

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书45页

序列表(电子公布) 附图14页

(54) 发明名称

难以表达的蛋白质的多位点特异性整合细胞

(57) 摘要

本公开涉及包含至少两种不同的重组靶位点(RTS)的位点特异性整合(SSI)哺乳动物细胞,其中两种RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内。该公开还涉及包含至少4种不同的RTS的SSI哺乳动物细胞,其中2种RTS在染色体上整合于NL1或NL2基因座内,而2种RTS在染色体上整合于单独的基因座内。该公开还涉及用于使用SSI哺乳动物细胞以产生可以表达难以表达的蛋白质的重组蛋白表达细胞系的方法。

1. 一种包含至少两种不同的重组靶位点的仓鼠细胞,其中两种重组靶位点在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内,其中NL1基因座对应于至灰仓鼠 (*Cricetulus griseus*) NW_003615899.1序列的133598位的10000个碱基对内,且NL2基因座对应于至灰仓鼠 (*Cricetulus griseus*) NW_003613834.1的序列的1313999位的10000个碱基对内。

2. 如权利要求1所述的细胞,其包含两种不同的重组靶位点。

3. 如权利要求2所述的细胞,所述两种不同的重组靶位点在染色体上整合于所述NL1基因座内。

4. 如权利要求1所述的细胞,所述两种不同的重组靶位点在染色体上整合于所述NL2基因座内。

5. 如权利要求1所述的细胞,其包含四种不同的重组靶位点。

6. 如权利要求5所述的细胞,其中,所述四种不同的重组靶位点在染色体上整合于相同的基因座。

7. 如权利要求5所述的细胞,其中,两种重组靶位点在染色体上整合于单独的基因座。

8. 如权利要求7所述的细胞,其中,所述单独的基因座是Fer1L4基因座。

9. 如权利要求5所述的细胞,其中,两种不同的重组靶位点在染色体上整合于所述NL1基因座内,而两种不同的重组靶位点在染色体上整合于所述NL2基因座内。

10. 如权利要求1所述的细胞,其包含六种不同的重组靶位点。

11. 如权利要求10所述的细胞,其中,至少四种不同的重组靶位点在染色体上整合于相同的基因座。

12. 如权利要求10所述的细胞,其中,至少两种重组靶位点在染色体上整合于单独的基因座。

13. 如权利要求12所述的细胞,其中,所述单独的基因座是Fer1L4基因座。

14. 如权利要求10所述的细胞,其中,至少两种不同的重组靶位点在染色体上整合于所述NL1基因座内,而至少两种不同的重组靶位点在染色体上整合于所述NL2基因座内。

15. 如权利要求1所述的细胞,其中,所述重组靶位点中的至少一种是frt位点,lox位点,rox位点或att位点。

16. 如权利要求1所述的细胞,其中,所述重组靶位点中的至少一种选自SEQ ID NO:1-30。

17. 如权利要求1所述的细胞,其中,所述仓鼠细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

18. 如权利要求17所述的细胞,其中,所述CHO细胞是CHO-K1细胞、CHO-DXB11细胞,CHO-DG44细胞,包括各种变体的CHOK1SVTM细胞,包括各种变体的CHOK1SV GS-K0TM(谷氨酰胺合成酶敲除)细胞。

19. 如权利要求1所述的细胞,还包含感兴趣的第一基因,其中,所述感兴趣的第一基因整合在染色体上。

20. 如权利要求19所述的细胞,其中,所述感兴趣的第一基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,或其组合。

21. 如权利要求20所述的细胞,其中,所述治疗意义的基因包含Fc融合蛋白,酶,膜受体或单克隆抗体。

22. 如权利要求21所述的细胞,其中,所述单克隆抗体是双特异性单克隆抗体或三特异

性单克隆抗体。

23. 如权利要求19所述的细胞,其中,所述感兴趣的第一基因位于两种重组靶位点之间。

24. 如权利要求19所述的细胞,其中,所述感兴趣的第一基因位于所述NL2基因座内。

25. 如权利要求1所述的细胞,还包含感兴趣的第二基因,其中,所述感兴趣的第二基因整合在染色体上。

26. 如权利要求25所述的细胞,其中,所述感兴趣的第二基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,或其组合。

27. 如权利要求26所述的细胞,其中,所述治疗意义的基因包含编码Fc融合蛋白,酶,膜受体或单克隆抗体的基因。

28. 如权利要求25所述的细胞,其中,所述感兴趣的第二基因位于两种重组靶位点之间。

29. 如权利要求25所述的细胞,其中,所述感兴趣的第二基因位于所述NL1基因座或所述NL2基因座内。

30. 如权利要求25所述的细胞,其中,所述感兴趣的第一基因位于所述NL1基因座内,而所述感兴趣的第二基因位于NL2基因座内。

31. 如权利要求1所述的细胞,还包含感兴趣的第三基因,其中,所述感兴趣的第三基因整合在染色体上。

32. 如权利要求31所述的细胞,其中,所述感兴趣的第三基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,或其组合。

33. 如权利要求31所述的细胞,其中,所述感兴趣的第三基因位于两种重组靶位点之间。

34. 如权利要求31所述的细胞,其中,所述感兴趣的第三基因位于所述NL1基因座或所述NL2基因座内。

35. 如权利要求31所述的细胞,其中,所述感兴趣的第三基因位于与所述NL1基因座和所述NL2基因座不同的基因座内。

36. 如权利要求31所述的细胞,其中,所述感兴趣的第一基因、所述感兴趣的第二基因和所述感兴趣的第三基因位于三个单独的基因座内。

37. 如权利要求31所述的细胞,其中,

a. 所述感兴趣的第一基因、所述感兴趣的第二基因和所述感兴趣的第三基因中的至少一种位于NL1基因座内,并且

b. 所述感兴趣的第一基因、所述感兴趣的第二基因和所述感兴趣的第三基因中的至少一种位于NL2基因座内。

38. 如权利要求1所述的细胞,还包含位点特异性重组酶基因。

39. 如权利要求38所述的细胞,其中,所述位点特异性重组酶基因整合在染色体上。

40. 一种包含至少四种不同的重组靶位点的仓鼠细胞,其中,所述细胞包含:

a. 至少两种不同的重组靶位点,其在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内,其中NL1基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)NW_003615899.1序列的133598位的10000个碱基对内,且NL2基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)NW_003613834.1的

序列的1313999位的10000个碱基对内；

b. 感兴趣的第一基因,其整合于(a)的至少两种重组靶位点之间,其中所述感兴趣的第一基因包含报告基因,编码难以表达的蛋白质的基因,或其组合;和

c. 感兴趣的第二基因,其整合于不同于(a)的基因座的第二染色体基因座内,其中所述感兴趣的第二基因包含报告基因,编码难以表达的蛋白质的基因,或其组合。

41. 一种包含至少四种不同的重组靶位点的仓鼠细胞,其中,所述细胞包含:

a. 至少两种不同的重组靶位点,其在染色体上整合于Fer1L4基因座内;

b. 至少两种不同的重组靶位点,其在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内,其中NL1基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)NW_003615899.1序列的133598位的10000个碱基对内,且NL2基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)NW_003613834.1的序列的1313999位的10000个碱基对内;

c. 感兴趣的第一基因,其在染色体上整合于Fer1L4基因座内,其中所述感兴趣的第一基因包含报告基因,编码难以表达的蛋白质的基因,或其组合;和

d. 感兴趣的第二基因,其在染色体上整合于(b)的所述NL1基因座或NL2基因座内,其中所述感兴趣的第二基因包含报告基因,编码难以表达的蛋白质的基因,或其组合。

42. 一种包含至少六种不同的重组靶位点的仓鼠细胞,其中,所述细胞包含:

a. 至少两种不同的重组靶位点和感兴趣的第一基因,其在染色体上整合于Fer1L4基因座内;

b. 至少两种不同的重组靶位点和感兴趣的第二基因,其在染色体上整合于NL1基因座内,其中NL1基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)NW_003615899.1序列的133598位的10000个碱基对内;和

c. 至少两种重组靶位点和感兴趣的第三基因,其在染色体上整合于NL2基因座内,且NL2基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)NW_003613834.1的序列的1313999位的10000个碱基对内。

43. 一种用于生产重组蛋白质生产者细胞的方法,其包括:

a. 提供包含至少四种不同的重组靶位点和编码位点特异性重组酶的基因的仓鼠细胞,其中至少两种不同的重组靶位点在染色体上整合于NL1基因座内而至少两种不同的重组靶位点在染色体上整合于NL2基因座内,其中NL1基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)NW_003615899.1序列的133598位的10000个碱基对内,且NL2基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)NW_003613834.1的序列的1313999位的10000个碱基对内;

b. 用第一载体和第二载体转染(a)的所述细胞,所述第一载体包含编码感兴趣的第一基因的可交换盒,而所述第二载体包含编码感兴趣的第二基因的可交换盒;

c. 将第一可交换盒整合于所述NL1基因座内并将第二可交换盒整合于所述NL2基因座内;和

d. 选择包含整合到染色体中的所述第一可交换盒和所述第二可交换盒的重组蛋白质生产者细胞。

44. 如权利要求43所述的方法,其中,所述感兴趣的第一基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,或其组合。

45. 如权利要求44所述的方法,其中,所述治疗意义的基因包含编码Fc融合蛋白,酶,膜

受体或单克隆抗体的基因。

46. 如权利要求45所述的方法,其中,所述单克隆抗体是双特异性单克隆抗体或三特异性单克隆抗体。

47. 如权利要求43所述的方法,其中,所述感兴趣的第一基因位于两种重组靶位点之间。

48. 如权利要求43所述的方法,其中,所述感兴趣的第二基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,或其组合。

49. 如权利要求43所述的方法,其中,所述感兴趣的第二基因位于两种重组靶位点之间。

50. 一种用于生产重组蛋白质生产者细胞的方法,其包括:

a. 提供包含至少四种不同的重组靶位点和编码位点特异性重组酶的基因的仓鼠细胞,其中至少两种不同的重组靶位点在染色体上整合于Fer1L4基因座内而至少两种不同的重组靶位点在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内,其中NL1基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)NW_003615899.1序列的133598位的10000个碱基对内,且NL2基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)NW_003613834.1的序列的1313999位的10000个碱基对内;

b. 用第一载体和第二载体转染(a)的所述细胞,所述第一载体包含编码感兴趣的第一基因的可交换盒,而所述第二载体包含编码感兴趣的第二基因的可交换盒;

c. 将第一可交换盒整合于所述Fer1L4基因座内并将第二可交换盒整合于所述NL1基因座或NL2基因座内;和

d. 选择包含整合到染色体中的所述第一可交换盒和所述第二可交换盒的重组蛋白质生产者细胞。

51. 如权利要求50所述的方法,其中,所述感兴趣的第一基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,或其组合。

52. 如权利要求51所述的方法,其中,所述治疗意义的基因包含编码Fc融合蛋白,酶,膜受体或单克隆抗体的基因。

53. 如权利要求52所述的方法,其中,所述单克隆抗体是双特异性单克隆抗体或三特异性单克隆抗体。

54. 如权利要求51所述的方法,其中,所述感兴趣的第一基因位于两种重组靶位点之间。

55. 如权利要求51所述的方法,其中,所述感兴趣的第二基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,或其组合。

56. 如权利要求51所述的方法,其中,所述感兴趣的第二基因位于两种重组靶位点之间。

57. 一种用于生产重组蛋白质生产者细胞的方法,其包括:

a. 提供包含至少六种不同的重组靶位点和编码位点特异性重组酶的基因的仓鼠细胞,其中至少两种不同的重组靶位点在染色体上整合于Fer1L4基因座内,至少两种不同的重组靶位点在染色体上整合于NL1基因座内,并且至少两种不同的重组靶位点在染色体上整合于NL2基因座内,其中NL1基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)NW_003615899.1序

列的133598位的10000个碱基对内,且NL2基因座对应于至灰仓鼠(*Cricetulus griseus*) NW_003613834.1的序列的1313999位的10000个碱基对内;

b.用第一载体、第二载体和第三载体转染(a)的所述细胞,所述第一载体包含编码感兴趣的第一基因的可交换盒,所述第二载体包含编码感兴趣的第二基因的可交换盒,并且所述第三载体包含编码感兴趣的第三基因的可交换盒;

c.将第一可交换盒整合于所述Fer1L4基因座内,将第二可交换盒整合于所述NL1基因座内,并且将第三可交换盒整合于NL2基因座内;和

选择包含整合到染色体中的所述第一可交换盒、所述第二可交换盒和所述第三可交换盒的重组蛋白质生产者细胞。

难以表达的蛋白质的多位点特异性整合细胞

发明领域

[0001] 本公开涉及包含至少两种不同的重组靶位点 (RTS) 的位点特异性整合 (SSI) 哺乳动物细胞, 其中两种 RTS 在染色体上整合于 NL1 基因座或 NL2 基因座内。该公开还涉及包含至少 4 种不同的 RTS 的 SSI 哺乳动物细胞, 其中 2 种 RTS 在染色体上整合于 NL1 或 NL2 基因座内, 而 2 种 RTS 在染色体上整合于单独的基因座内。该公开还涉及用于使用 SSI 哺乳动物宿主细胞系以产生可以额外表达难以表达的蛋白质的重组蛋白表达细胞系的方法。

背景技术

[0002] 新型和生物仿制药生物制药持续可见高需求以及增加的销售收入。普遍性增强的新型形式、非单克隆抗体 (mAb), 重组蛋白 (rP) 中许多可被归类为难以表达 (DtE), 这可能会对生物制药工业中治疗剂的递送提出挑战。DtE 蛋白可以与低于预期的效价或与多链, 辅助蛋白, 产品回收或纯化的问题相关 (Pybus 等 *Biotechnol. Bioeng.* 111:372-85 (2014))。DtE 蛋白的示例包括但不限于, Fc-融合蛋白, 双特异性或三特异性 mAb, 酶, 膜受体, 和双特异性 T 细胞接合物 BITE[®] (Micromet AG 公司, 德国慕尼黑) 分子和选定的 mAb。

[0003] 用于将重组蛋白 (rP) 表达盒整合到宿主细胞基因组的一种报道的方法基于随机整合 (RI), 所述 RI 是通过将 DNA 导入细胞并合并于基因组中存在的双链断裂 (DSB) 的方法。因此, 当使用这样的方法时, 整合的基因拷贝数和整合位点处的表达特征 (位置上色效果 (position variegation effect)) 可以高度可变。出于许多原因, 这对 DtE 蛋白来说可能会有问题。例如, 对于一些多链蛋白, 这将难以控制整合的编码单独链或辅助基因的基因拷贝数量, 载体大小限制将阻碍多链蛋白的表达, 转染多个载体将导致低整合效率和可能导致毒性的一些 DtE 的高表达。

[0004] 用于整合 rP 表达盒的另一方法是通过使用位点特异性整合 (SSI)。位于 SSI 细胞系基因组中的“着陆坪 (Landing pad)”可以利用源自位点特异性重组酶系统, 如源自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 FLP-FRT 系统或源自噬菌体 P1 的 Cre-loxP 系统的重组靶位点 (RTS)。在这些系统中, 重组的酶或重组酶负责供体和包含相容重组位点 (分别为 Frt 或 loxP) 的靶 DNA 之间的重组事件 (参见例如, Wirth 等 *Curr. Opin. Biotech.* 18:411-9 (2007))。通过使用位于待交换的盒 (在供体和靶 DNA 中) 5' 和 3' 端的不同重组位点, 有可能保证重组以定向的方式发生并且只有优选的盒区域被交换。因此, SSI 可以比随机整合方法有利。将盒整合到 SSI 细胞系的过程被称之为重组酶介导的盒交换 (EMCE)。实际上, 用于使用 EMCE 产生重组蛋白的细胞系构建涉及共转染编码重组酶的表达载体以及靶向表达载体, 所述靶向表达载体包含感兴趣的基因 (编码 rP) 和侧接重组酶靶向序列的选择标志物。

[0005] 使用单一着陆坪的产生 SSI 的细胞系也有局限性。例如, 这样的方法通常, 由于设计, 导致可以间接限制 rP 产生重组蛋白表达效价的经整合的基因拷贝数量较少。如果对于 rP 产生需要在包含单一着陆坪的 SSI 宿主细胞系中产生多种蛋白质, 那么所有需要的基因将需要包括在单一载体中。增加整合的重组基因拷贝的一种方法是累积 SSI (有时候称为堆叠或多重, 参见例如, Kameyama 等 *Biotechnol. Bioeng.* 105:1106-14 (2010), Kawabe 等

Cytotechnology 64:267-79(2012)和Turan等J.Mol.Biol.402:52-69(2010))。藉由这样的方法,重复轮的RMCE可以用于加载单个位点,然后是rP表达盒拷贝的多个拷贝。这类SSI宿主细胞系中的着陆坪不能独立寻址,并且需要重复轮的RMCE,对于各循环将花费额外的时间。

[0006] 本文引用各种公开文献,其公开内容通过引用其全部内容纳入本文。

发明概述

[0008] 存在生成这样的SSI宿主细胞系的需求,所述SSI宿主细胞系克服了SSI宿主仅有单一基因组插入位点的限制。该发明通过使用串联的SSI着陆坪实现了该需求,其中两个或更多个着陆坪被整合于相同的基因座,可能克服了累积位点特异性整合的限制。在这样的一个系统中,着陆坪是独立地可寻址的(由于重组位点和选择标志物选择)。

[0009] 在一些实施方式中,本公开提供了包含至少两种不同RTS的哺乳动物细胞,其中两种RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内。在一些实施方式中,细胞包含两种不同的RTS。在一些实施方式中,两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座内。在一些实施方式中,两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内。在一些实施方式中,细胞包含四种不同的RTS。在一些实施方式中,四种不同的RTS在染色体上整合于相同的基因座。在一些实施方式中,两种不同的RTS在染色体上整合于单独的基因座。在一些实施方式中,单独的基因座是Fer1L4基因座。在一些实施方式中,两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座内,而两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内。在一些实施方式中,细胞包含六种不同的RTS。在一些实施方式中,至少四种不同的RTS在染色体上整合于相同的基因座。在一些实施方式中,至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内,而至少两种不同的RTS在染色体上整合于单独的基因座。在一些实施方式中,单独的基因座是Fer1L4基因座。在一些实施方式中,至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座内,而至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内。在一些实施方式中,RTS中的至少一种是Frt位点,lox位点,rox位点或att位点。在一些实施方式中,RTS中的至少一种选自SEQ ID No:1-30中。在一些实施方式中,细胞是小鼠细胞,人细胞,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,CHO-K1细胞,CHO-DXB11细胞,CHO-DG44细胞,包括各种变体的CHOK1SVTM细胞,包括各种变体的CHOK1SVGS-KOTM(谷氨酰胺合成酶敲除)细胞,HEK细胞,包括粘附和悬浮适应型变体的HEK293细胞,HeLa细胞,或HT1080细胞。在一些实施方式中,细胞是HEK细胞。

[0010] 在一些实施方式中,细胞包含感兴趣的第一基因,其中,感兴趣的第一基因整合在染色体上。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,DtE蛋白选自:Fc融合蛋白,酶,膜受体,双特异性T细胞接合物(BITE[®] Micromet AG公司,德国慕尼黑)或单克隆抗体。在一些实施方式中,单克隆抗体是双特异性单克隆抗体或三特异性单克隆抗体。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因位于两种RTS之间。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因位于NL1基因座内。在一些实施方式中,细胞包含感兴趣的第二基因,其中,感兴趣的第二基因整合在染色体上。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,DtE蛋白选自:Fc融合

蛋白,酶,膜受体,双特异性T细胞接合物(BITE[®])或单克隆抗体。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因位于两种RTS之间。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因位于NL1基因座或NL2基因座内。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因位于NL1基因座内,而感兴趣的第二基因位于NL2基因座内。在一些实施方式中,细胞包含感兴趣的第三基因,其中,感兴趣的第三基因整合在染色体上。在一些实施方式中,感兴趣的第三基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,感兴趣的第三基因位于两种RTS之间。在一些实施方式中,感兴趣的第三基因位于NL1基因座或NL2基因座内。在一些实施方式中,感兴趣的第三基因位于不同于NL1基因座或NL2基因座的基因座内。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因、感兴趣的第二基因和感兴趣的第三基因位于三个单独的基因座内。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因、感兴趣的第二基因和感兴趣的第三基因中的至少一种位于NL1基因座内,而第一基因、感兴趣的第二基因和感兴趣的第三基因中的至少一种位于NL2基因座内。在一些实施方式中,细胞包含位点特异性重组酶基因。在一些实施方式中,位点特异性重组酶基因整合在染色体上。

[0011] 在一些实施方式中,本公开提供了包含至少四种不同的RTS的哺乳动物细胞,其中该细胞包含 (a) 至少两种不同的RTS,其在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座中; (b) 感兴趣的第一基因,其整合于 (a) 的至少两种RTS之间,其中感兴趣的第一基因包含报告基因,编码DtE蛋白的基因,辅助基因或其组合; (c) 和感兴趣的第二基因,其整合于不同于 (a) 的基因座的第二染色体基因座内,其中感兴趣的第二基因包含报告基因,编码DtE蛋白的基因,辅助基因或其组合。

[0012] 在一些实施方式中,本公开提供了包含至少四种不同的RTS的哺乳动物细胞,其中该细胞包含 (a) 至少两种不同的RTS,其在染色体上整合于Fer1L4基因座内; (b) 至少两种不同的RTS,其在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内; (c) 感兴趣的第一基因,其在染色体上整合于Fer1L4基因座内,其中感兴趣的第一基因包含报告基因,编码DtE蛋白的基因,辅助基因或其组合; 和 (d) 感兴趣的第二基因,其在染色体上整合于 (b) 的NL1基因座或NL2基因座内,其中感兴趣的第二基因包含报告基因,编码DtE蛋白的基因,辅助基因或其组合。

[0013] 在一些实施方式中,本公开提供了包含至少六种RTS的哺乳动物细胞,其中该细胞包含 (a) 至少两种不同的RTS和感兴趣的第一基因,其在染色体上整合于Fer1L4基因座内; (b) 至少两种不同的RTS和感兴趣的第二基因,其在染色体上整合于NL1基因座内; 和 (c) 至少两种不同的RTS和感兴趣的第三基因,其在染色体上整合于NL2基因座内。

[0014] 在一些实施方式中,本公开提供了用于生产重组蛋白质生产者细胞的方法,其包括 (a) 提供包含至少四种不同的RTS和编码位点特异性重组酶的基因的细胞,其中至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座内而至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内; (b) 用第一载体和第二载体转染 (a) 的细胞,所述第一载体包含编码感兴趣的第一基因的可交换盒(exchangeable cassette),而所述第二载体包含编码感兴趣的第二基因的可交换盒; (c) 将第一可交换盒整合于NL1基因座内并将第二可交换盒整合于NL2基因座内; 和 (d) 选择包含整合到染色体中的第一可交换盒和第二可交换盒的重组蛋白质生产者细胞。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实

施方式中,DtE蛋白包括Fc融合蛋白,酶,膜受体,双特异性T细胞接合物(BITE[®])或单克隆抗体。在一些实施方式中,单克隆抗体是双特异性单克隆抗体或三特异性单克隆抗体。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因位于两种RTS之间。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因位于两种RTS之间。

[0015] 在一些实施方式中,本公开提供了用于生产重组蛋白质生产者细胞的方法,其包括(a)提供包含至少四种不同的RTS和编码位点特异性重组酶的基因的细胞,其中至少两种不同的RTS在染色体上整合于Fer1L4基因座内而至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内;(b)用第一载体和第二载体转染(a)的细胞,所述第一载体包含编码感兴趣的第一基因的可交换盒,而所述第二载体包含编码感兴趣的第二基因的可交换盒;(c)将第一可交换盒整合于Fer1L4基因座内并将第二可交换盒整合于NL1基因座或NL2基因座内;和(d)选择包含整合到染色体中的第一可交换盒和第二可交换盒的重组蛋白质生产者细胞。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,DtE蛋白由Fc融合蛋白,酶,膜受体,双特异性T细胞接合物(BITE[®])或单克隆抗体组成。在一些实施方式中,单克隆抗体是双特异性单克隆抗体或三特异性单克隆抗体。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因位于两种RTS之间。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因位于两种RTS之间。

[0016] 在一些实施方式中,本公开提供了用于生产重组蛋白质生产者细胞的方法,其包括(a)提供包含至少六种不同的RTS和编码位点特异性重组酶的基因的细胞,其中至少两种不同的RTS在染色体上整合于Fer1L4基因座内,而至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座内,至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内;(b)用第一载体、第二载体和第三载体转染(a)的细胞,所述第一载体包含编码感兴趣的第一基因的可交换盒,所述第二载体包含编码感兴趣的第二基因的可交换盒,且所述第三载体包含编码感兴趣的第三基因的可交换盒;(c)将第一可交换盒整合于Fer1L4基因座内,第二可交换盒整合于NL1基因座内,且第三可交换盒整合于NL2基因座内;和(d)选择包含整合到染色体中的第一可交换盒、第二可交换盒和第三可交换盒的重组蛋白质生产者细胞。

附图说明

[0017] 图1是使用具有2个独立可寻址着陆坪的多位点位点特异性整合 (SSI) 宿主细胞系的重组酶介导的盒交换 (RMCE) 方法的示意图。着陆坪的数量受限于合适基因座,不相容Frt重组酶位点(例如,野生型Frt (F)、Frt F5 (F5)、Frt F14 (F14) 和Frt F15 (F15)) 和与这类多重方法相容的选择标志物(例如,绿色荧光蛋白 (GFP) 或红色荧光蛋白 (RFP)) 的可及性。

[0018] 图2A显示了表示CHOK1SV GS-KOTM (谷氨酰胺合成酶敲除) 多位点SSI宿主中着陆坪设置的原理图,所述CHOK1SV GS-KOTM (谷氨酰胺合成酶敲除) 多位点SSI宿主中包含两种不同的示例性着陆坪(着陆坪A和着陆坪B)。表10中示出单一和多位点GS-CHOK1SVTMSSI宿主中

关于这些着陆坪染色体整合的更多细节。着陆坪A包含潮霉素磷酸转移酶(Hpt)增强的绿色荧光蛋白(eGFP)融合基因(Hpt-eGFP)。Hpt-eGFP融合基因表达受到SV40早期启动子的控制并且具有SV40多聚A序列。不同的和相区别的Fr_t位点位于SV40启动子和Hpt-eGFP基因(F5)之间和RMCE的SV40多聚A序列(F)的5'。着陆坪B包含受SV40启动子控制的嘌呤霉素N-乙酰基转移酶-DsRed(PAC-DsRed)融合基因并且包含SV40多聚A序列。不同于着陆坪A中Fr_t位点的不同的Fr_t位点对位于SV40早期启动子和PAC-DsRed基因(F14)之间和SV40多聚A序列(F15)的5'。SV40E启动子和选择标志物之间Fr_t位点的位置将用于后续轮的RMCE。针对SSI单一或多位点宿主中RMCE设计的靶向载体包含邻近与目标着陆坪相容的Fr_t位点3'设置的阳性选择标志物(例如,GS)(图2B)。载体的剩余部分包含GOI的转录单元(例如,mAb),其后是与着陆坪中第二Fr_t位点相容的Fr_t位点。靶向载体DNA与表达FlpE重组酶的载体共转染(图3A和图5)(Takata等,Genes to Cells 16:7(2011))(图3B)。转染的细胞经24小时孵育,然后施加选择压力(例如,由培养基去除谷氨酰胺)。成功的RMCE的标志是Hpt-eGFP的丢失并被阳性选择标志物基因替换(图2C)。细胞在荧光显微镜下或用流式细胞术分析显示为深色。在阳性选择中恢复的未交换的细胞容易被荧光辅助的细胞分选去除。

[0019] 图3显示了pMF25靶向载体(图3A)和pMF4重组酶表达载体(图3B),用于在CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主中生成产生DsRed的细胞系。pMF25(图3A)包含纳入DsRed基因的转录单元,侧接突变(F5)和野生型(F)Fr_t位点。DsRed单体的转录通过hCMV主要中间体早期基因1(hCMV)的启动子和其第一内含子(内含子A(hCMV内含子))驱动,并且编码5'UTR的侧翼外显子表示为Ex1和Ex2。谷氨酰胺合成酶cDNA(GS)和SV40内含子A(SV40内含子)设置在邻近Fr_tF5的3',并且成功的RMCE转录由位于着陆坪中的SV40E启动子驱动。pMF4(图3B)包含转录单元,所述转录单元纳入FlpE基因(Takata等,Genes to Cells 16:7(2011)),其由主要中间体早期基因1(hCMV)的启动子和其第一内含子(内含子A(hCMV内含子))驱动,并且编码5'UTR的侧翼外显子表示为Ex1和Ex2。在两种载体中,聚腺苷酸化序列和 β -内酰胺酶分别表示为pA和bla。

[0020] 图4显示了在用pMF25和FlpE重组酶编码载体共转染之前和之后来自CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主克隆(7878、8086、8096、9113、9116和9115)流式细胞术分析的数据。使用密理博(Millipore)Guava流式细胞仪测量RMCE之前和之后(无谷氨酰胺培养基中选择11天)7878和8086(单位点,Fer1L4着陆坪A)、8086和9113(单位点,NL1着陆坪A)和9116和9115(单位点,NL2着陆坪Pad A)的绿色和黄色荧光。在绿色通道检测eGFP荧光并在黄色通道检测DsRed。

[0021] 图5显示了靶向载体,用于在源自CHOK1SV GS-KOTM的SSI宿主中生成产生mAb的细胞系。载体pMF26(A)、pMF27(B)和pMF28(C)包含转录单元,其纳入了利妥昔单抗(rituximab)、cB72.3和H31K5抗体基因(分别地),侧接突变(F5)和野生(F)Fr_t位点。重链(HC)和轻链(LC)基因的转录通过hCMV主要中间体早期基因1(hCMV)的启动子和其第一内含子(内含子A(hCMV内含子))驱动,并且编码5'UTR的侧翼外显子表示为Ex1和Ex2。谷氨酰胺合成酶cDNA(GS)和SV40内含子-多聚A(在图5中表示为pA)序列设置在邻近Fr_tF5的3',以在RMCE后选择中靶整合。 β -内酰胺酶分别表示为bla。

[0022] 图6显示了分批培养中生长的分泌的利妥昔单抗,cB72.3和H31K5 mAb浓度CHOK1SV GS-KOTMSSI库。用pMF26(利妥昔单抗)、pMF27(cB72.3)或pMF28(H31K5)转染

CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主克隆11434(单位点,Fer1L4着陆坪A)。在8天的分批培养中培养重复($n \geq 3$)CHOK1SV GS-KOTMSSI库。分泌的利妥昔单抗(A)、cB72.3(B)和H31K5(C)mAb(mg/L)通过蛋白A HPLC确定。

[0023] 图7显示了来自RMCE之前多位点SSI宿主流式细胞术分析的数据。使用密理博Guava流式细胞仪测量CHOK1SV GS-KOTM宿主(宿主)、11434(单位点,Fer1L4着陆坪A)、DsRed随机整合对照和6个CHOK1SV GS-KOTM多位点宿主克隆(12151、12152、12606、12607、12608和12609)(在Fer1L4基因座中具有着陆坪A并在NL1基因座中具有着陆坪B的多位点姐妹克隆)的绿色和黄色荧光。在绿色通道检测eGFP荧光,并在黄色通道检测DsRed。

[0024] 图8是靶向CHOK1SV GS-KO SSI宿主中Fer1L4和NL1着陆坪的载体pCM9和pCM11的示意图。载体如下:图8A:pCM9(靶向Fer1L4基因座的E2深红表达载体);图8B:pCM11(靶向NL1基因座的E2深红表达载体)。

[0025] 图9显示了用pCM9和pCM11靶向的源自CHOK1SV GS-KO SSI细胞的流式细胞术分析。用pCM9(靶向Fer1L4基因座的E2深红表达载体)和pCM11(靶向NL1基因座的E2深红表达载体)转染多个CHOK1SV GS-KO SSI克隆12151(在Fer1L4基因座中包含着陆坪A(图2A)并在NL1基因座中包含着陆坪B(图2A))。

[0026] 图10是靶向Fer1L4(图2,着陆坪A)、NL1(图2,着陆坪B)或两者的利妥昔单抗表达载体pMF26、pCM38、pCM22和pAR5的示意图。载体如下:pMF26(图10A:利妥昔单抗1x LC,1x HC表达载体,其靶向Fer1L4基因座),pCM38(图10B:利妥昔单抗2x LC,2x HC表达载体,其靶向Fer1L4基因座),pCM22(图10C:空表达载体,其靶向NL1基因座)和pAR5(图10D:利妥昔单抗1x LC,1x HC表达载体,其靶向NL1基因座)。

[0027] 图11显示了8天的分批培养后用pMF26、pCM38、pCM22和pAR5靶向的RMCE库的细胞特异性利妥昔单抗生产率(qmAb)。

[0028] 图12是靶向Fer1L4(图2,着陆坪A)、NL1(图2,着陆坪B)或两者的色古土珠单抗阿木纳白细胞素(Cergutuzumab amunaleukin)(CEA-IL2v)表达载体pAB2、pAB5、pCM46和pAR2的示意图。载体如下:pAB2(CEA-IL2v LC、HC和HC-IL2表达载体,其靶向Fer1L4基因座),pAB5(CEA-IL2v LC和HC-IL2表达载体,其靶向Fer1L4基因座),pCM46(空表达载体,其靶向NL1基因座)和pAR2(CEA-IL2v HC表达载体,其靶向NL1基因座)。

[0029] 图13是用pAB2、pAB5、pCM46和pAR2转染后表达RMCE库的色古土珠单抗阿木纳白细胞素(CEA-IL2v)的RMCE库的SDS-page分析的示意图(图12)。A:在非还原条件下生产的10% Bis-Tris蛋白质凝胶的图像,泳道1-9经标签标记。泳道1:Seeblue Plus2预染色的蛋白质标准品。泳道2:通过转染pAB2空载体形成的分析模拟(空)库。泳道2-5:用仅表达生成用于分配折叠中间体的CEA-IL2v所需3条链中2条的载体生成的对照库。泳道6:分析Fer1L4基因座中有CEA-IL2v LC、HC和HC-IL2(pAB2)的库。泳道7:分析Fer1L4基因座中有CEA-IL2v LC和HC-IL2以及NL1中空载体(pCM46)的库。泳道8和9: Fer1L4基因座中的CEA-IL2v LC和HC-IL2和NL1基因座中的CEA-IL2v HC(pAR2)。B:总结假设代表了轻链(LC),轻链二聚体(2LC),半抗体(1LC,1HC-IL2)和部分组装的色古土珠单抗阿木纳白细胞素(2LC,2HC-IL2和2LC,2HC)的条带光密度测定的柱状图。

[0030] 图14是靶向Fer1L4(图2,着陆坪A)、NL1(图2,着陆坪B)或两者的依那西普(Entanercept)、辅助或非稳定GFP(在3' UTR中具有miR靶序列的dsGFP)基因载体的示意图。

载体如下:pTC1(图14A、B和C:靶向Fer1L4基因座的依那西普表达载体),pCM22(图14A:靶向NL1的空载体),pCM39(图14B:靶向NL1的小家鼠(*Mus musculus*)SCD1(mSCD1)表达载体),pCM40(图14B:靶向NL1的针对灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)优化的小家鼠(*Mus musculus*)SCD1密码子(ccmSCD1)表达载体),pCM41(图14B:智人(*Homo sapiens*)SCD1(hSCD1),pCM42(图14B:靶向NL1的灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)SREBF1(ccSREBF1)表达载体),pCM43(图14C:靶向NL1的dsGFP_6n CPEB2A表达载体),pCM44(图14C:靶向NL1的dsGFP_6n CPEB2B表达载体)和pCM45(图14C:靶向NL1的dsGFP_6n SRP α 表达载体)。参见表11和表12关于辅助基因和海绵序列(sponge sequence)的详细内容。

[0031] 图15总结了来自有或没有辅助基因表达的依那西普的RMCE库8天培养的生长和生产率测定(见图14)。数据是均值($n=2$) $\pm$ 标准偏差。A:细胞特异性产生速率(qP)。B:活细胞浓度的积分(IVCC)。C:分泌的依那西普浓度。

发明详述

[0033] 术语“一种”或“一个”当与“包含”在权利要求和/或说明书中联用时,可表示“一个”,但也与“一个或多个”,“至少一个”和“一个或多个”的意思一致。

[0034] 在整篇申请中,术语“约”用于表示包含用于测定数值的装置/方法的误差的固有差异或存在于研究对象中的差异的值。通常,该术语视情况而定表示包括大约或少于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%可变性。

[0035] 在权利要求中使用术语“或”表示“和/或”,除非特别指出仅指替代方式,或替代方式互相排除,但公开内容支持仅指替代方式和“和/或”的定义。

[0036] 如本说明书和权利要求中所使用的,术语“包含”(和任何形式的包含,例如“含有”和“含”),“具有”(以及任何形式的具有,例如“有”和“拥有”),“包括”(以及任何形式的包括,例如“囊括”和“括入”)或“含有”(以及任何形式的含有,例如“含入”和“包含”)都是纳入性或开放性的,并不排除额外的未提到的元素或方法步骤。考虑本说明书中所讨论的任何实施方式可以用任何本发明的方法、系统、宿主细胞、表达载体和/或组合物实现。此外,本发明的组合物、系统、细胞和/或载体可用于实现本文所述的任何方法。

[0037] 术语“例如”及其相应缩写“如”(无论是否用斜体)的使用意味着所引用的特定术语是本公开的代表性示例和实施方式,并不旨在限于所引用或援引的特定示例,除非另有明确说明。

[0038] 在一些实施方式中,本公开提供了包含至少两种不同RTS的哺乳动物细胞,其中RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内。

[0039] 本文所用术语“哺乳动物细胞”包括来自哺乳动物纲任何成员的细胞,例如,人细胞,小鼠细胞,大鼠细胞,猴细胞,仓鼠细胞等等。在一些实施方式中,哺乳动物细胞是小鼠细胞,人细胞,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,CHO-K1细胞,CHO-DXB11细胞,CHO-DG44细胞,包括各种变体的CHOK1SVTM细胞(例如,CHOK1SVTMPOTELLIGENT[®],英国斯劳的隆萨公司(Lonza)),包括各种变体的CHOK1SV GS-KOTM(谷氨酰胺合成酶敲除)细胞,包括粘附和悬浮适应型变体的HEK293细胞,HeLa细胞,或HT1080细胞。

[0040] “核酸”、“核酸分子”或“寡核苷酸”表示包含共价连接的核苷酸的聚合化合物。术

语“核酸”包括多核糖核酸(RNA)和多脱氧核糖核酸(DNA),它们都可以是单链或双链的。DNA包括但不限于互补DNA(cDNA)、基因组DNA、质粒或载体DNA和合成DNA。RNA包括但不限于mRNA、tRNA、rRNA、snRNA、microRNA、miRNA或MIRNA。

[0041] 本文所用“氨基酸”指包含羧基(-COOH)和氨基(-NH₂)基团的化合物。“氨基酸”指天然的和非天然的(即,合成的)氨基酸。天然氨基酸包括(以其三字母和单字母缩写):丙氨酸(Ala;A);精氨酸(Arg;R);天冬酰胺(Asn;N);天冬氨酸(Asp;D);半胱氨酸(Cys;C);谷氨酰胺(Gln;Q);谷氨酸(Glu;E);甘氨酸(Gly;G);组氨酸(His;H);异亮氨酸(Ile;I);亮氨酸(Leu;L);赖氨酸(Lys;K);蛋氨酸(Met;M);苯丙氨酸(Phe;F);脯氨酸(Pro;P);丝氨酸(Ser;S);苏氨酸(Thr;T);色氨酸(Trp;W);酪氨酸(Tyr;Y)和缬氨酸(Val;V)。

[0042] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文可互换使用,并且指任何长度的氨基酸的聚合形式,其可以包括编码的或非编码的氨基酸,化学或生物化学修饰的或衍生的氨基酸,和具有修饰的肽主链的多肽。术语“链”和多肽“链”在本文中可互换使用,并且指单一肽主链的氨基酸的聚合形式。

[0043] 当术语“重组”用于提及核酸分子、肽、多肽或蛋白质时表示或来源于不知其存在于自然界中的一种新的遗传物质组合。重组分子可以通过重组技术领域内可用的任何熟知的技术产生,包括但不限于,聚合酶链反应(PCR),基因切割(例如,使用限制性内切核酸酶)和固态合成核酸分子、肽或蛋白质。在一些实施方式中,“重组体”指不知其存在于自然界中的病毒载体或病毒,例如,在病毒载体或病毒中具有一种或多种突变、核酸插入、或异源性基因的病毒载体或病毒。在一些实施方式中,“重组体”指不知其存在于自然界中的细胞或宿主细胞,例如,在细胞或宿主细胞中具有一种或多种突变、核酸插入、或异源性基因的细胞或宿主细胞。

[0044] “分离的”多肽、蛋白质、肽或核酸是已经从其自然环节中移出的分子。还应当理解的是,“分离的”多肽、蛋白质、肽或核酸可以与赋形剂如稀释剂或佐剂一起配制,并且仍将其认为是分离的。

[0045] 在核酸序列或氨基酸序列的情况中,术语“序列相同性”或“%相同性”是指当序列在指定的比较窗对齐时,比较的序列中相同的残基的百分比。比较窗可以是至少10个残基至超过1000个残基的区段,其中序列可以被对齐并比较。用于确定序列相同性的对齐方法为本领域所熟知,可以使用公众可及的数据库诸如BLAST(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进行。

[0046] 在一些实施方式中,多肽或核酸分子分别与参照多肽或核酸分子(或参照多肽或核酸分子的片段)具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的序列相同性。在本公开的某些实施方式中,多肽或核酸分子分别与参照多肽或核酸分子(或参照多肽或核酸分子的片段)具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%或100%的序列相同性。在一些实施方式中,多肽或核酸分子分别与参照多肽或核酸分子具有约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%的序列相同性。

[0047] “基因”是指编码多肽的核苷酸的组合,并且包括cDNA和基因组DNA核酸分子。“基因”也指可以作为编码序列之前(5'非编码序列)和之后(3'非编码序列)调节序列的核酸片

段。在一些实施方式中,基因以多个拷贝整合到宿主细胞基因组中。在一些实施方式中,基因以预定义拷贝数量整合在宿主细胞基因组中。

[0048] 本文所述术语“调节元件”指控制核酸序列表达的一些方面的遗传元件。本文所用“启动子”,“启动子序列”或“启动子区域”指能够结合RNA聚合酶并涉及启动下游编码或非编码序列的转录的DNA调控区域/序列。在本公开的一些示例中,启动子序列包括转录起始位点并向上游延伸以包括以高于背景可检测到的水平启动转录所需的最少数量的碱基或元件。在一些实施方式中,启动子序列包含转录起始位点,以及负责RNA聚合酶结合的蛋白质结合结构域。真核启动子通常但并不总是包含“TATA”盒和“CAT”盒。各种启动子,包括诱导型启动子,可以用于驱动基因表达,例如,在本公开的宿主细胞或载体中。在一些实施方式中,启动子不是渗漏(leaky)启动子,即启动子并不组成性表达本文所述基因产物中的任何一种。

[0049] 本文所用术语“异源性启动子”指这样的调节元件,其与与其可操作地连接的基因源自不同的物种。在一些实施方式中,异源性启动子源自原核系统。在一些实施方式中,异源性启动子源自真核系统。在一些实施方式中,本公开提供了这样的细胞,其中一种或多种异源性启动子在染色体上整合于宿主细胞基因组中。

[0050] 本文所用术语“可操作组合”、“可操作的顺序”和“可操作地连接”表示核酸序列的连接,以此方式核酸分子能够指导给定基因的转录和/或生成所需蛋白质分子的合成。该术语还表示以生成功能性蛋白的方式存在的氨基酸序列的连接。在一些实施方式中,感兴趣的基因可操作地连接启动子,其中感兴趣的基因在染色体上整合于宿主细胞中。在一些实施方式中,感兴趣的基因可操作地连接异源性启动子,其中感兴趣的基因在染色体上整合于宿主细胞中。在一些实施方式中,辅助基因可操作地连接启动子,其中辅助基因在染色体上整合于宿主细胞基因组中。在一些实施方式中,辅助基因可操作地连接异源性启动子,其中辅助基因在染色体上整合于宿主细胞基因组中。在一些实施方式中,编码D₁E蛋白的基因可操作地连接启动子,其中编码D₁E蛋白的基因在染色体上整合于宿主细胞基因组中。在一些实施方式中,编码D₁E蛋白的基因可操作地连接异源性启动子,其中编码D₁E蛋白的基因在染色体上整合于宿主细胞基因组中。在一些实施方式中,重组酶基因可操作地连接启动子,其中重组酶基因在染色体上整合于宿主细胞中。在一些实施方式中,重组酶基因可操作地连接启动子,其中重组酶基因不在染色体上整合于宿主细胞基因组中。在一些实施方式中,重组酶基因可操作地连接异源性启动子,其中重组酶基因不在染色体上整合于宿主细胞基因组中。在一些实施方式中,重组酶基因可操作地连接异源性启动子,其中重组酶基因不在染色体上整合于宿主细胞基因组中。

[0051] 在一些实施方式中,调节元件可操作地连接基因表达与外源性提供的配体的存在。在一些实施方式中,感兴趣的基因可操作地连接启动子,其中启动子可操作地连接基因表达与外源性提供的配体的存在,并且其中感兴趣的基因在染色体上整合于宿主细胞基因组中。在一些实施方式中,辅助基因可操作地连接启动子,其中启动子可操作地连接基因表达与外源性提供的配体的存在,并且其中辅助基因在染色体上整合于宿主细胞中。在一些实施方式中,编码D₁E蛋白的基因可操作地连接启动子,其中启动子可操作地连接基因表达与外源性提供的配体的存在,并且其中编码D₁E蛋白的基因在染色体上整合于宿主细胞基因组中。在一些实施方式中,重组酶基因可操作地连接启动子,其中启动子可操作地连接基

因表达与外源性提供的配体的存在,并且其中重组酶因在染色体上整合于宿主细胞基因组中。在一些实施方式中,重组酶基因可操作地连接启动子,其中启动子可操作地连接基因表达与外源性提供的配体的存在,并且其中重组酶基因不在染色体上整合于宿主细胞基因组中。

[0052] 本文所用术语“染色体整合的”或“染色体整合”指将核酸序列稳定的纳入宿主细胞,例如,哺乳动物细胞的染色体中,即,核酸序列在染色体上整合于宿主细胞(例如,哺乳动物细胞)的基因组DNA(gDNA)中。在一些实施方式中,染色体整合的核酸序列是稳定的。在一些实施方式中,染色体整合的核酸序列不位于质粒或载体。在一些实施方式中,染色体整合的核酸序列没有被剪切。在一些实施方式中,染色体整合通过成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)和CRISPR-结合(Cas)蛋白基因编辑系统(CRISPR/CAS)介导。

[0053] 本文所用术语“染色体基因座”表示可以包含至少一个基因的细胞染色体上核酸的限定位置。在一些实施方式中,染色体基因座包含约500个碱基对至约100,000个碱基对,约5,000个碱基对至约75,000个碱基对,约5,000个碱基对至约60,000个碱基对,约20,000个碱基对至约50,000个碱基对,约30,000个碱基对至约50,000个碱基对或约45,000个碱基对至约49,000个碱基对。在一些实施方式中,染色体基因座延伸多达约100个碱基对,约250个碱基对,约500个碱基对,约750个碱基对或约1000个碱基对至限定的核酸序列的5'或3'端。在一些实施方式中,染色体基因座包含内源性核酸序列。在一些实施方式中,染色体基因座包含已经使用分子生物学领域技术人员已知方法纳入染色体的外源性核苷酸序列。在一些实施方式中,染色体基因座包含宿主细胞基因组中的核苷酸序列,其提供了由整合在染色体基因座内的感兴趣的基因编码的异源性蛋白的强烈且稳定产生。在一些实施方式中,染色体基因座包含宿主细胞基因组中的核苷酸序列,其提供了强烈且稳定的病毒基因表达。在一些实施方式中,染色体基因座包含宿主细胞基因组中的核苷酸序列,其提供了高效的位点特异性整合。在一些实施方式中,染色体基因座包含表1所述的NL1基因座、NL2基因座、NL3基因座、NL4基因座、NL5基因座或NL6基因座。在一些实施方式中,本公开涉及包含至少两种不同RTS的哺乳动物细胞,其中两种RTS在染色体上整合于表1所述的NL1基因座、NL2基因座、NL3基因座、NL4基因座、NL5基因座或NL6基因座内。在一些实施方式中,本公开涉及包含至少两种不同RTS的哺乳动物细胞,其中两种RTS在染色体上整合于

[0054] 表1所述的NL1基因座或NL2基因座内。

[0055]

表 1

新基因座	基因座基因注释			灰仓鼠 (<i>Cricetulus griseus</i>) 中的基因座位置			智人 (<i>Homo sapien</i>) 中的基因座位置		
	5'基因	基因内	3'基因	NCBI 参照序列 ⁽¹⁾ 仓鼠(<i>Cricetulus griseus</i>) 序列号	载体位置	着陆坪位置	染色体	载体位置	着陆坪位置
Fer1	Ergic3	Fer1L4	Spag4	gi 351517716 ref NW_003613833 支架 1492 SEQ ID NO: 31	N/A	24894-26755	Chr 20	33613757-33614117	33630003-33629572
NL1	Col5a2 (假)	未注释的基因	Col5a2	gi 351515650 ref NW_003615899.1 支架 2552 SEQ ID NO: 32	143287	133598	Chr 2	189725696-189726735	189725180-189727852
NL2	LOC103162114	Naa15 (外显子 5 和 6 之间的内含子)	Rab33b	gi 351517715 ref NW_003613834.1 支架 2422 SEQ ID NO: 33	1303708 - 1308873	1313999	Chr 4	140474660-140474867	140483934-140483457
NL3	CJO004127.1	未注释的基因	Mthfd2	gi 351516540 ref NW_003615009.1 支架 3924 SEQ ID NO: 34	279558	N/A	Chr 2	74277198-74297932	N/A
NL4	MORF4L1	未注释的基因	未注释的基因	gi 351516248 ref NW_003615301.1 支架 502	173850	N/A	Chr 15	76952458	N/A

到术语“整合于NL1基因座内”或“整合于NL2基因座内”将还包括对应的生物体中对应的基因座。因此,在一些实施方式中,术语“整合于NL1基因座内”或“整合于NL2基因座内”将包括整合于指定基因组坐标约50,000bp内,约40,000bp内,约30,000bp内,20,000bp内或10,000bp内。

[0058] 在一些实施方式中,本公开涉及包含至少两种不同RTS的哺乳动物细胞,其中两种RTS在染色体上整合于选自Fer1L4(参见例如美国专利申请号14/409,283)、ROSA26、HGPRT、DHFR、COSMC、LDHA或MGAT1的基因座内。在一些实施方式中,染色体基因座包含X染色体上MID1的第一内含子。在一些实施方式中,染色体基因座包含增强的表达和稳定区(EESYR参见例如,美国专利号7,771,997)。在一些实施方式中,缺失天然染色体基因座中基因的至少一部分。

[0059] “载体”或“表达载体”是可以连接另一个DNA区段从而引起所连接的DNA区段在细胞中复制和/或表达的复制子,如质粒、噬菌体、病毒或粘粒。“载体”包含附加型(例如,质粒)和非附加型载体。在本公开内容的一些实施方式中,载体是附加型载体,其在多个细胞世代之后(例如通过不对称分配)从细胞群中去除/丢失。术语“载体”包含体外、体内或离体引入核酸分子到细胞的病毒和非病毒手段。术语载体可以包含合成载体。载体可以通过熟知的方法引入所需的宿主细胞,包括但不限于,转染、转导、细胞融合和脂质转染。载体可以包含各种调节元件,包括启动子。

[0060] 本文所用术语“可交换盒”或“盒”是这样的一类移动遗传元件,其包含基因和重组位点。在一些实施方式中,可交换盒包含至少两种RTS。在一些实施方式中,可交换盒包含报告基因或选择基因。在一些实施方式中,盒通过重组酶介导的盒交换(RMCE)交换。

[0061] 在一些实施方式中,位点特异性整合被用于将一种或多种基因导入宿主细胞染色体。参见例如,Bode等,Biol.Chem.381:801-813(2000),Kolb,Cloning and Stem Cells 4:381-392(2002)和Coates等,Trends in Biotech.23:407-419(2005),其各自通过引用纳入。在一些实施方式中,“位点特异性整合”指将核酸序列在特定位点整合到染色体中。在一些实施方式中,位点特异性整合还可以表示“位点特异性重组”。在一些实施方式中,“位点特异性重组”指通过在其靶位点或序列的同源对进行重组的特异性酶重排两种DNA伴侣分子。与同源性重组相反,位点特异性重组不需要亲本DNA分子之间的DNA同源性,是RecA独立的,并且不涉及任何阶段的DNA复制。在一些实施方式中,位点特异性重组使用位点特异性重组酶系统,以实现宿主细胞,例如,哺乳动物细胞中核酸的位点特异性整合。重组酶系统通常包括三种元件:两种特异性DNA序列(重组靶位点)和特异性酶(重组酶)。重组酶催化特定重组位点之间的重组反应。

[0062] 重组酶系统或重组酶是催化位点特异性重组中重组的酶。在本公开的一些实施方式中,用于位点特异性重组的重组酶源自非哺乳动物系统。在一些实施方式中,重组酶源自细菌、噬菌体或酵母。

[0063] 在一些实施方式中,编码重组酶的核酸序列被整合到宿主细胞中,例如,哺乳动物细胞。在一些实施方式中,编码重组酶的核酸序列通过分子生物学已知的方法递送到宿主细胞。在一些实施方式中,可以直接递送重组酶多肽序列至细胞。在一些实施方式中,重组酶是Cre重组酶,FLP重组酶,Dre重组酶,KD重组酶,B2B3重组酶,Hin重组酶,Tre重组酶, λ 重组酶,HK022整合酶,HP1整合酶, γ δ 解离酶/转化酶,ParA解离酶/转化酶,Tn3解离酶/转化

酶,Gin解离酶/转化酶, ϕ C31整合酶,BxB1整合酶,R4整合酶或其他功能性重组酶。参见例如,Thorpe和Smith,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 95:5505-5510(1998);Kuhstoss和Rao,J.Mol.Biol.222:897-890(1991);美国专利号5,190,871;Ow和Ausubel,J.Bacteriol.155:704-713(1983);Matsuura等,J.Bacteriol.178:3374-3376(1996);Sato和,J.Bacteriol.172:1092-1098(1990);Stragier等,Science 243:507-512(1989);Carrasco等,Genes Dev.8:74-83(1994);Bannam等,Mol.Microbiol.16:535-551(1995);Crelin和Rood,J.Bacteriol.179:5148-5156(1997)。

[0064] 在一些实施方式中,本文所述的重组酶是FLP重组酶。FLP重组酶是催化位点特异性重组反应的蛋白质,所述位点特异性重组反应涉及在DNA复制期间扩增酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的2 μ 质粒的拷贝数量。在一些实施方式中,本公开的FLP重组酶源自酵母属的物种。在一些实施方式中,FLP重组酶源自酿酒酵母。在一些实施方式中,FLP重组酶源自酿酒酵母的菌株。在一些实施方式中,FLP重组酶是热稳定的、突变的FLP重组酶。在一些实施方式中,FLP重组酶是FLP1或FLPe。在一些实施方式中,编码FLP重组酶的核酸序列包含人优化的密码子。

[0065] 在一些实施方式中,重组酶是Cre重组酶。Cre(导致重组)是Int家族重组酶的一员(Argos等(1986)EMBO J.5:433)并且已经证明其不但在细菌中还在真核细胞中进行lox位点(X交叉(X-ing over)的基因座)的高效重组(Sauer(1987)Mol.Cell.Biol.7:2087;Sauer和Henderson(1988)Proc.Natl Acad.Sci.85:5166)。在一些实施方式中,本文所述并使用的Cre重组酶源自噬菌体。在一些实施方式中,Cre重组酶源自P1噬菌体。

[0066] 本文所用术语“位点特异性整合位点”、“重组靶位点”、“RTS”和“位点特异性重组酶靶位点”指被位点特异性重组酶识别的短(例如,小于约60个碱基对)核酸位点或序列,并且其在位点特异性重组事件期间变成交叉区(crossover region)。在一些实施方式中,重组靶位点小于约60个碱基对,小于约55个碱基对,小于约50个碱基对,小于约45个碱基对,小于约40个碱基对,小于约35个碱基对或小于约30个碱基对。在一些实施方式中,重组靶位点是约30-约60个碱基对,约30-约55个碱基对,约32-约52个碱基对,约34-约44个碱基对,约32个碱基对,约34个碱基对或约52个碱基对。位点特异性重组酶靶位点的示例包括但不限于,lox位点,rox位点,frt位点,att位点和dif位点。在一些实施方式中,重组靶位点是具有与SEQ ID NO:1-30中所示基本上相同的序列的核酸。

[0067] 在一些实施方式中,RTS是选自表2的lox位点。本文所用术语“lox位点”指Cre重组酶可以催化位点特异性重组的核苷酸序列。本领域已知各种不同的lox位点。各种lox位点的序列在这方面是相似的,它们都包含相同的13个碱基对的反向重复,其侧接在其中发生重组的8个碱基对的不对称核心区。这是负责位点的方向性和不同lox位点之间变异的不对称核心区。它们的示例性(非限制性的)实例包括天然产生的loxP(P1基因组中存在的序列),loxB,loxL和loxR(它们存在于大肠杆菌染色体中)以及多种突变体或变体lox位点,如loxP 511、lox Δ 86、lox Δ 117、loxC 2、loxP 2、loxP 3和loxP 23。在一些实施方式中,lox重组靶位点是与表2中存在的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性的核酸。

[0068] 表2

[0069]

名称	标识符	序列
lox P	SEQ ID NO.: 1	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
loxP 511	SEQ ID NO.: 2	ATAACTTCGTATAATGTATACTATACGAAGTTAT
loxP 2272	SEQ ID NO.: 3	ATAACTTCGTATAAAGTATCCTATACGAAGTTAT
loxP 5171	SEQ ID NO.: 4	ATAACTTCGTATAATGTGTACTATACGAAGTTAT
loxP 2272(V)	SEQ ID NO.: 5	ATAACTTCGTATAGGATACTTTATACGAAGTTAT
pLox2+	SEQ ID NO.: 6	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
loxC 2	SEQ ID NO.: 28	ACAACCTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
loxP 3	SEQ ID NO.: 29	TACCGTTCGTATAGTATAGTATATACGAAGTTAT
loxP 23	SEQ ID NO.: 30	TACCGTTCGTATAGTATAGTATATACGAACGGT
		A

[0070] 在一些实施方式中,RTS是选自lox Δ 86、lox Δ 117、loxC2、loxP 2、loxP 3和loxP 23的lox位点。

[0071] 在一些实施方式中,RTS是选自表3的Frt位点。本文所用术语“Frt位点”指酵母2μm质粒的FLP基因产物——FLP重组酶可以催化位点特异性重组的位置处的核苷酸序列。本领域已知各种不同的Frt位点。各种Frt位点的序列在这方面是相似的,它们都包含相同的13个碱基对的反向重复,其侧接在其中发生重组的8个碱基对的不对称核心区。这是负责位点的方向性和不同Frt位点之间变异的不对称核心区。它们的示例性(非限制性的)实例包括天然产生的Frt (F),和多种突变体或变体Frt位点,诸如Frt F1和Frt F2。在一些实施方式中,Frt重组靶位点是与表3中存在的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性的核酸。

[0072] 表3

[0073]

名称	标识符	序列
F	SEQ ID NO.: 7	GAAGTTACTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAG TATAGGAACTTC
F1	SEQ ID NO.: 8	GAAGTTACTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGATAG TATAGGAACTTC
F2	SEQ ID NO.: 9	GAAGTTACTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTACTTAG TATAGGAACTTC
F3	SEQ ID NO.: 10	GAAGTTACTATTCCGAAGTTCCTATTCTTCAAATAG TATAGGAACTTC
F4	SEQ ID NO.: 11	GAAGTTACTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAGG TATAGGAACTTC
F5	SEQ ID NO.: 12	GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTTCAAAAGG TATAGGAACTTC
F6	SEQ ID NO.: 13	GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTTCAAAAAG TATAGGAACTTC
F7	SEQ ID NO.: 14	GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTTCAATAAG TATAGGAACTTC
F14	SEQ ID NO.: 15	GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTATCAGAAG TATAGGAACTTC
F15	SEQ ID NO.: 16	GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTTATAGGAG TATAGGAACTTC
Ff61	SEQ ID NO.: 17	GAAGTTACTATTCCGAAGTTCCTATACTTTCTGGAG AATAGGAACTTC
F2151	SEQ ID NO.: 18	GAAGTTACTATTCCGAAGTTCCTATACTCTCCAGAG AATAGGAACTTC
Fw2	SEQ ID NO.: 19	GAAGTTACTATTCCGAAGTTCCTATACTATCTACAG AATAGGAACTTC
F2161	SEQ ID NO.: 20	GAAGTTACTATTCCGAAGTTCCTATACTCTCTGGAG AATAGGAACTTC
F2262	SEQ ID NO.: 21	GAAGTTACTATTCCGAAGTTCCTATACTATCTTGAG AATAGGAACTTC

[0074] 在一些实施方式中,RTS是选自表4的rox位点。本文所用术语“rox位点”指Dre重组酶可以催化位点特异性重组的位置处的核苷酸序列。本领域已知各种不同的rox位点。它们的示例性(非限制性的)实例包括roxR和roxF。在一些实施方式中,rox重组靶位点是与表4中存在的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性的核酸。

[0075] 表4

[0076]

名称	标识符	序列
roxF	SEQ ID NO.: 22	TAACTTTAAATAATGCCAATTATTTAAAGTTA
roxR	SEQ ID NO.: 23	TAACTTTAAATAATTGGCATTATTTAAAGTTA

[0077] 在一些实施方式中,RTS是选自表5的att位点。本文所用术语“att位点”指 λ 整合酶或 ϕ C31整合酶可以催化位点特异性重组的位置处的核苷酸序列。本领域已知各种不同的aat位点。它们的示例性(非限制性的)实例包括attP、attB、proB、trpC、galT、thrA和rrnB。在一些实施方式中,att重组靶位点是与表5中存在的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列相同性的核酸。

[0078] 表5

[0079]	名称	标识符	序列
	attB	SEQ ID NO.: 24	CATCAGGGCGGTCAGGCCGTAGATGTGGAAGAACGGCAGCAC GGCGAGGACG
	attP	SEQ ID NO.: 25	ATGTGGTCCTTTAGATCCACTGACGTGGGTCAGTGTCTCTAAA GGACTCGCG
	attL	SEQ ID NO.: 26	CATCAGGGCGGTCAGGCCGTAGATGTGGGTCAGTGTCTCTAA AGGACTCGCG
	attR	SEQ ID NO.: 27	ATGTGGTCCTTTAGATCCACTGACGTGGAAGAACGGCAGCAC GGCGAGGACG

[0080] 本文所述术语“不同的重组靶位点”指不相同或异种特异性的重组靶位点。例如，存在多种变体Frt位点，但是重组通常仅可以在两种相同的Frt位点之间发生。在一些实施方式中，不同的重组靶位点指来自相同重组系统的不相同的重组靶位点（例如，LoxP和LoxR）。在一些实施方式中，不同的重组靶位点指来自不同重组系统的不相同的重组靶位点（例如，LoxP和Frt）。在一些实施方式中，不同的重组靶位点指来自相同重组系统的重组靶位点和来自不同重组系统的重组靶位点的组合（例如，LoxP、LoxR、Frt和Frt1）。

[0081] 可以使用RTS的各种组合。在一些实施方式中，细胞包含两种RTS。在一些实施方式中，细胞包含四种RTS。在一些实施方式中，细胞包含六种RTS。在一些实施方式中，至少一种RTS选自SEQ ID No:1-30中。在一些实施方式中，细胞包含六种RTS。在一些实施方式中，至少一种RTS选自SEQ ID No:1-6中。在一些实施方式中，细胞包含六种RTS。在一些实施方式中，至少一种RTS选自SEQ ID No:7-21中。在一些实施方式中，细胞包含六种RTS。在一些实施方式中，至少一种RTS选自SEQ ID No:22-23中。在一些实施方式中，至少一种RTS选自SEQ ID No:28-30中。在一些实施方式中，细胞包含六种RTS。在一些实施方式中，至少一种RTS选自SEQ ID No:24-27中。在一些实施方式中，包含至少四种不同RTS的细胞包括下述RTS：LoxP 511、Frt F5、Frt和LoxP。在一些实施方式中，包含至少四种不同RTS的细胞包括下述RTS：Frt F14和Frt F15。在一些实施方式中，包含至少四种不同RTS的细胞包括下述RTS：LoxP 511、Frt F5、Frt、LoxP、Frt F14和Frt F15。在一些实施方式中，包含至少四种不同RTS的细胞可以包括下述RTS：Frt 1、Frt 2、Frt 3、Frt 4。在一些实施方式中，包含至少四种不同RTS的细胞包括下述RTS：Frt m5、Frt wt、Frt m14、Frt m15、Frt m7和Frt m6。在一些实施方式中，包含六种不同RTS的细胞可以包括下述RTS：Frt 1、Frt 2、Frt 3、Frt 4、Frt 5、Frt 6。在一些实施方式中，包含至少四种不同RTS的细胞包括下述RTS：Frt m5、Frt、Frt m14、Frt m15。

[0082] 本文所用术语“着陆坪(landing pad)”指包含在染色体上整合于宿主细胞中的第一重组靶位点的核酸序列。在一些实施方式中，着陆坪包含在染色体上整合于宿主细胞中的两种或更多种重组靶位点。在一些实施方式中，细胞包含1、2、3、4、5、6、7或8个着陆坪。在一些实施方式中，细胞包含1、2或3个着陆坪。在一些实施方式中，细胞包含4个着陆坪。在一些实施方式中，着陆坪整合于多达1、2、3、4、5、6、7或8个不同的染色体基因座。在一些实施方式中，着陆坪整合于多达1、2或3个不同的染色体基因座。在一些实施方式中，着陆坪整合于4个不同的染色体基因座。

[0083] 在一些实施方式中，本公开描述了如何通过不同基因座表达各种蛋白质例如DtE蛋白，有可能实现所需的蛋白质表达。在一些实施方式中，DtE蛋白表达自NL1基座，例如，位于CHO染色体上。在一些实施方式中，DtE蛋白表达自NL2基座，例如，位于CHO染色体上。

[0084] 在一些实施方式中，细胞包含两种不同的RTS。在一些实施方式中，两种不同的RTS

在染色体上整合于NL1基因座内。在一些实施方式中,两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内。在一些实施方式中,细胞包含四种不同的RTS。在一些实施方式中,四种不同的RTS在染色体上整合于相同的基因座。在一些实施方式中,两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内,而两种不同的RTS在染色体上整合于单独的基因座。在一些实施方式中,单独的基因座是Fer1L4基因座。在一些实施方式中,两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座内,而两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内。在一些实施方式中,细胞包含六种不同的RTS。在一些实施方式中,至少四种不同的RTS在染色体上整合于相同的基因座。在一些实施方式中,至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内,而至少两种不同的RTS在染色体上整合于单独的基因座。在一些实施方式中,单独的基因座是Fer1L4基因座。在一些实施方式中,至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座内,而至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内。在一些实施方式中,RTS中的至少一种是frt位点,lox位点,rox位点或att位点。在一些实施方式中,RTS中的至少一种选自SEQ ID No:1-30中。

[0085] 根据本公开可以使用任何各种细胞。在一些实施方式中,细胞是小鼠细胞,人细胞,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,CHO-K1细胞,CHO-DXB11细胞,CHO-DG44细胞,包括各种变体的CHOK1SVTM细胞(例如,CHOK1SVTMPOTELLIGENT[®],英国斯劳的隆萨公司(Lonza)),包括各种变体的CHOK1SV GS-KOTM(谷氨酰胺合成酶敲除)细胞,包括粘附和悬浮适应型变体的HEK293细胞,HeLa细胞,或HT1080细胞。在一些实施方式中,哺乳动物细胞包含至少两种不同的RTS,其中RTS在染色体上整合于NL1基因座、NL2基因座或Fer1L4基因座内。在一些实施方式中,哺乳动物细胞包含至少四种不同的RTS,其中两种RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内,并且其中两种不同的RTS在染色体上整合于单独的基因座内。在一些实施方式中,单独的基因座是Fer1L4基因座。在一些实施方式中,哺乳动物细胞包含至少四种不同的RTS,其中两种RTS在染色体上整合于NL1基因座内,而两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内。在一些实施方式中,哺乳动物细胞包含至少四种不同的RTS,其中四种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内。在一些实施方式中,哺乳动物细胞包含至少六种不同的RTS,其中两种RTS在染色体上整合于NL1基因座内,两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内,并且两种不同的RTS在染色体上整合于单独的基因座内。在一些实施方式中,单独的基因座是Fer1L4基因座。在一些实施方式中,哺乳动物细胞包含至少六种不同的RTS,其中六种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内。在一些实施方式中,哺乳动物细胞包含至少六种不同的RTS,其中四种RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内,并且其中两种不同的RTS在染色体上整合于单独的基因座内。在一些实施方式中,第二基因座是Fer1L4基因座。

[0086] 在一些实施方式中,细胞包含感兴趣的第一基因,其中,感兴趣的第一基因整合在染色体上。

[0087] 本文所用术语“感兴趣的基因”或“GOI”用于描述异源性基因。本文所用术语“异源性基因”或“HG”当其涉及核酸序列诸如编码序列或对照序列时,表示通常不接合在一起和/或通常不与特定细胞相关联的核酸序列,例如,基因。在一些实施方式中,异源性基因是这样的构建体,其中编码序列自身在自然中不存在(例如,具有不同于天然基因中的密码子的合成序列)。等位变异或自然产生的突变事件不产生异源性DNA,如本文所用。

[0088] 在一些实施方式中,感兴趣的基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。

[0089] 本文所述“报告基因”是这样一种基因,其表达赋予细胞可以被容易地鉴定和测量的表型。在一些实施方式中,报告基因包含荧光蛋白基因。在一些实施方式中,报告基因包含选择基因。

[0090] 本文所用术语“选择基因”指使用编码酶活性的基因,其赋予在缺乏原本将是必需营养素的培养基中生长的能力;此外,选择基因赋予其中选择基因表达的细胞对抗生素或药物的抗性。选择基因可以用于赋予宿主细胞特定表型。当宿主细胞必需表达选择基因以在选择性培养基中生长时,可称该基因为阳性选择基因。选择基因可以用于选择包含特定基因的宿主细胞;以此方式使用的选择基因被称为阴性选择基因。

[0091] 本文所用术语“治疗意义的基因”指任何功能相关的核苷酸序列。因此,本公开的治疗意义的基因可以包含编码这样蛋白质的任何基因,制备治疗性重组蛋白需要所述蛋白质的表达。合适的治疗意义的基因的代表性(非限制的)实例包括单克隆抗体,双特异性单克隆抗体或抗体药物偶联物[包括凝血因子、表达良好的mAb,其中蛋白质表达受限于转录、激素如EPO、免疫融合蛋白(Fc融合体)、三特异性mAb]。

[0092] 本文所用术语“辅助基因(ancillary gene)”或“助手基因(helper gene)”可以互换使用以指代这样的第一基因,所述第一基因协助第二基因表达或者协助第二基因产物稳定化、折叠或转录后修饰或产生促进第二基因产物产生的细胞环境。在一些实施方式中,第二基因是编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,辅助基因编码RNA。在一些实施方式中,辅助基因编码mRNA、tRNA或miRNA。在一些实施方式中,辅助基因编码转录因子,分子伴侣,伴侣蛋白,合成酶,氧化酶,还原酶,糖转移酶,蛋白酶,激酶,磷酸酶,乙酰转移酶,脂肪酶或烷基化酶。

[0093] 在一些实施方式中,感兴趣的第一基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码以所需拷贝数良好表达的治疗性蛋白质的基因。在一些实施方式中,编码良好表达的治疗性蛋白质的基因处于2拷贝、3拷贝、4拷贝、5拷贝、6拷贝、7拷贝、8拷贝、9拷贝或10拷贝的拷贝数。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。

[0094] 本文所用术语“难以表达的蛋白质”指其产生困难的蛋白质。在一些实施方式中,DtE蛋白的产物可以是困难的,因为蛋白质表达必需被高度调控。在一些实施方式中,DtE蛋白难以从宿主细胞回收。在一些实施方式中,DtE蛋白是易于错误折叠的蛋白质。在一些实施方式中,DtE蛋白是易于剪切的蛋白质。在一些实施方式中,DtE蛋白是易于降解的蛋白质。在一些实施方式中,DtE蛋白是易于聚集的蛋白质。在一些实施方式中,DtE蛋白是溶解性差的蛋白质。在一些实施方式中,DtE蛋白是膜结合蛋白。在一些实施方式中,DtE蛋白难以纯化。在一些实施方式中,DtE蛋白是细胞毒性的。在一些实施方式中,DtE蛋白包含多条多肽链,例如,2、3或4条多肽链。在一些实施方式中,DtE蛋白的多条多肽链形成同源寡聚物以产生DtE蛋白。在一些实施方式中,DtE蛋白的多条多肽链形成异源寡聚物以产生DtE蛋白。在一些实施方式中,同源寡聚物或异源寡聚物通过共价相互作用、非共价相互作用或其组合形成。在一些实施方式中,DtE蛋白包含需要辅助基因表达以产生DtE蛋白的蛋白质。在一些实施方式中,DtE蛋白是需要转录后修饰以产生DtE蛋白的蛋白质。在一些实施方式中,

DtE蛋白这样的蛋白质,其使用分子生物学技术领域普通技术人员已知的标准技术表达,导致产物蛋白具有各种特征。在一些实施方式中,DtE蛋白是融合蛋白。

[0095] 例如,在一些实施方式中,本公开描述了如何由NL1和/或NL2基因座表达DtE蛋白,即DtE蛋白可以超过2g/L的蛋白质生产效价获得。在一些实施方式中,NL1基因座处DtE蛋白的表达产生超过2g/L的DtE蛋白。在一些实施方式中,NL2基因座处DtE蛋白的表达产生超过2g/L的DtE蛋白。在一些实施方式中,DtE蛋白是这样的蛋白质,其使用分子生物学技术领域普通技术人员已知的标准技术表达,导致小于2g/L的产物蛋白质效价。

[0096] 在一些实施方式中,DtE蛋白是单克隆抗体。在一些实施方式中,DtE蛋白是双特异性单克隆抗体。在一些实施方式中,DtE蛋白是三特异性单克隆抗体。在一些实施方式中,DtE蛋白是Fc融合蛋白。本文所述术语“Fc融合蛋白”指这样的融合蛋白,其中免疫球蛋白Fc结构域可操作地连接第二肽。在一些实施方式中,DtE蛋白是酶。在一些实施方式中,DtE蛋白是膜受体。在一些实施方式中,DtE蛋白是双特异性T细胞接合物(BITE[®] Micromet AG公司,德国慕尼黑)。

[0097] 在一些实施方式中,DtE蛋白选自:Fc融合蛋白,酶,膜受体或单克隆抗体。在一些实施方式中,单克隆抗体是双特异性单克隆抗体或三特异性单克隆抗体。

[0098] 在一些实施方式中,DtE蛋白编码于感兴趣的一种或多种基因。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因位于两种RTS之间。

[0099] 本文所述术语“位于两种RTS之间”指位于两种RTS之间的基因,即,一种RTS位于基因的5'而不同的RTS位于基因的3'。在某些实施方式中,RTS直接位于处于它们之间的基因附近。在某些实施方式中,RTS位于与处于它们之间的基因限定的距离。在一些实施方式中,RTS是定向序列。在一些实施方式中,位于它们之间的基因的RTS 5'和3'是直接定向的(即,它们朝向相同的方向)。在一些实施方式中,位于它们之间的基因的RTS 5'和3'是反向定向的(即,它们朝向相反的方向)。

[0100] 在一些实施方式中,感兴趣的第一基因位于NL1基因座内。在一些实施方式中,细胞包含感兴趣的第二基因,其中,感兴趣的第二基因整合在染色体上。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,DtE蛋白选自:Fc融合蛋白,酶,膜受体,双特异性T细胞接合物(BiTE[®])或单克隆抗体。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因位于两种RTS之间。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因位于NL1基因座或NL2基因座内。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因位于NL1基因座内,而感兴趣的第二基因位于NL2基因座内。在一些实施方式中,细胞包含感兴趣的第三基因,其中,感兴趣的第三基因整合在染色体上。在一些实施方式中,感兴趣的第三基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,感兴趣的第三基因位于两种RTS之间。在一些实施方式中,感兴趣的第三基因位于NL1基因座或NL2基因座内。在一些实施方式中,感兴趣的第三基因位于不同于NL1基因座和NL2基因座的基因座。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因、感兴趣的第二基因和感兴趣的第三基因位于三个单独的基因座内。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因、感兴趣的第二基因和感兴趣的第三基因中的至少一种位于NL1基因座内,而第一基因、感兴趣的第二基因和感兴趣的第三基因中的至少一种位于NL2基因座内。

[0101] 在一些实施方式中,细胞包含位点特异性重组酶基因。在一些实施方式中,位点特异性重组酶基因整合在染色体上。

[0102] 在一些实施方式中,本公开提供了包含以下的哺乳动物细胞:(a)至少四种不同的RTS,其中该细胞包含至少两种不同的RTS,其在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座中;(b)感兴趣的第一基因,其整合于(a)的至少两种RTS之间,其中感兴趣的第一基因包含报告基因,编码DtE蛋白的基因,辅助基因或其组合;和(c)和感兴趣的第二基因,其整合于不同于(a)的基因座的第二染色体基因座内,其中感兴趣的第二基因包含报告基因,编码DtE蛋白的基因,辅助基因或其组合。

[0103] 在一些实施方式中,本公开提供了包含以下的哺乳动物细胞:(a)至少四种不同的RTS,其中该细胞包含至少两种不同的RTS,其在染色体上整合于Fer1L4基因座内;(b)至少两种不同的RTS,其在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内;(c)感兴趣的第一基因,其在染色体上整合于Fer1L4基因座内,其中感兴趣的第一基因包含报告基因,编码DtE蛋白的基因,辅助基因或其组合;和(d)感兴趣的第二基因,其在染色体上整合于(b)的NL1基因座或NL2基因座内,其中感兴趣的第二基因包含报告基因,编码DtE蛋白的基因,辅助基因或其组合。

[0104] 在一些实施方式中,本公开提供了包含至少六种不同的RTS的哺乳动物细胞,其中该细胞包含(a)至少两种不同的RTS和感兴趣的第一基因,其在染色体上整合于Fer1L4基因座内;(b)至少两种不同的RTS和感兴趣的第二基因,其在染色体上整合于NL1基因座内;和(c)至少两种不同的RTS和感兴趣的第三基因,其在染色体上整合于NL2基因座内。

[0105] 在一些实施方式中,本公开提供了用于生产重组蛋白质生产者细胞的方法,其包括(a)提供包含至少四种不同的RTS和编码位点特异性重组酶的基因的细胞,其中至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座内而至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内;(b)用第一载体和第二载体转染(a)的细胞,所述第一载体包含编码感兴趣的第一基因的可交换盒(exchangeable cassette),而所述第二载体包含编码感兴趣的第二基因的可交换盒;(c)将第一可交换盒整合于NL1基因座内并将第二可交换盒整合于NL2基因座内;和(d)选择包含整合到染色体中的第一可交换盒和第二可交换盒的重组蛋白质生产者细胞。

[0106] 本文所用“转染”表示导入外源性核酸分子,包括载体到细胞中。“转染的”细胞在细胞内包含外源性核酸分子并且“转染的”细胞是其中细胞内的外源性核酸分子诱导细胞中的表型改变的细胞。转染的核酸分子可以被整合到宿主细胞的基因组DNA中和/或可以在染色体外由细胞临时维持或维持很长一段时间。表达外源性核酸分子或片段的宿主细胞或生物体被称为“重组”、“转化”或“转基因”生物体。许多转染技术在本领域是公知。参见例如,Graham等,Virology,52:456(1973);Sambrook等,《分子克隆,实验室手册》(Molecular Cloning,A Laboratory Manual),纽约州冷泉港实验室(1989);Davis等,《分子生物学基本方法》(Basic Methods in Molecular Biology),Elsevier(1986);和Chu等,Gene 13:197(1981)。这类技术可用于将一个或多个外源DNA部分引入合适的宿主细胞。

[0107] 术语“匹配”就两条RTS序列而言指具有被重组酶结合并且影响两条序列之间位点特异性重组的能力的两条序列。在一些实施方式中,匹配细胞RTS的可交换盒RTS指具有与细胞RTS基本相同的序列的盒RTS。在一些实施方式中,可交换盒包含与在染色体上整合于

宿主细胞基因组中的一种或两种RTS基本相同的序列。

[0108] 在一些实施方式中,术语整合指将可交换盒整合(例如,插入)染色体中。在一些实施方式中,整合通过位点特异性重组酶介导。在一些实施方式中,发明人发现使用SSI消除了从那些转染的细胞克隆细胞的需求,因为细胞在其遗传组成上是同源的。

[0109] 在一些实施方式中,术语“选择”指鉴定包含染色体整合的标志物的细胞。在一些实施方式中,选择是通过使用本领域技术人员已知道方法检测标志物的存在。在一些实施方式中,选择是通过使用本领域技术人员已知道方法检测标志物的缺失。

[0110] 在一些实施方式中,感兴趣的第一基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,DtE蛋白由Fc融合蛋白,酶,膜受体,双特异性T细胞接合物(BITE[®])或单克隆抗体组成。在一些实施方式中,单克隆抗体是双特异性单克隆抗体或三特异性单克隆抗体。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因位于两种RTS之间。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因位于两种RTS之间。

[0111] 在一些实施方式中,本公开提供了用于生产重组蛋白质生产者细胞的方法,其包括(a)提供包含至少四种不同的RTS和编码位点特异性重组酶的基因的细胞,其中至少两种不同的RTS在染色体上整合于Fer1L4基因座内,而至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座或NL2基因座内;(b)用第一载体和第二载体转染(a)的细胞,所述第一载体包含编码感兴趣的第一基因的可交换盒,而所述第二载体包含编码感兴趣的第二基因的可交换盒;(c)将第一可交换盒整合于Fer1L4基因座内并将第二可交换盒整合于NL1基因座或NL2基因座内;和(d)选择包含整合到染色体中的第一可交换盒和第二可交换盒的重组蛋白质生产者细胞。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因包含报告基因,选择基因,治疗感兴趣的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,DtE蛋白由Fc融合蛋白,酶,膜受体,双特异性T细胞接合物(BITE[®])或单克隆抗体组成。在一些实施方式中,单克隆抗体是双特异性单克隆抗体或三特异性单克隆抗体。在一些实施方式中,感兴趣的第一基因位于两种RTS之间。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因包含报告基因,选择基因,治疗意义的基因,辅助基因或其组合。在一些实施方式中,治疗意义的基因包含编码DtE蛋白的基因。在一些实施方式中,感兴趣的第二基因位于两种RTS之间。

[0112] 在一些实施方式中,本公开提供了用于生产重组蛋白质生产者细胞的方法,其包括(a)提供包含至少六种不同的RTS和编码位点特异性重组酶的基因的细胞,其中至少两种不同的RTS在染色体上整合于Fer1L4基因座内,而至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL1基因座内,至少两种不同的RTS在染色体上整合于NL2基因座内;(b)用第一载体、第二载体和第三载体转染(a)的细胞,所述第一载体包含编码感兴趣的第一基因的可交换盒,所述第二载体包含编码感兴趣的第二基因的可交换盒,且所述第三载体包含编码感兴趣的第三基因的可交换盒;(c)将第一可交换盒整合于Fer1L4基因座内,第二可交换盒整合于NL1基因座内,且第三可交换盒整合于NL2基因座内;和(d)选择包含整合到染色体中的第一可交换盒、第二可交换盒和第三可交换盒的重组蛋白质生产者细胞。

[0113] 在一些实施方式中,发明人已经发现使用SSI制备rP表达细胞保证rP表达细胞的库在其遗传组成上是同源的。在一些实施方式中,发明人已经发现使用SSI制备rP表达细胞保证rP表达细胞的库在其效率上是均一的。在一些实施方式中,发明人已经发现使用SSI制备rP表达细胞保证了生产者细胞的库在第一辅助基因与第二辅助基因的比例上是均一的。在一些实施方式中,发明人已经发现使用SSI制备rP表达细胞保证了生产者细胞的库在辅助基因与治疗意义的基因的比例上是均一的。在一些实施方式中,发明人已经发现使用SSI制备rP表达细胞保证更一致的rP产物质量。

[0114] 包括原核和/或真核细胞系的本文所述细胞系可以使用任何本文所述合适的装置、设备和方法培养。此外,一些实施方式中,装置、设备和方法适合于培养悬浮细胞或锚着依赖性(贴壁)细胞并且适合设置成产生药学或生物药学产物诸如多肽产物、核酸产物(例如,DNA或RNA)或哺乳动物或微生物细胞和/或病毒诸如细胞和/或病毒和微生物治疗中使用的那些的生产作业。

[0115] 在一些实施方式中,细胞表达或产生产物,诸如重组治疗或诊断产物。如下更加详细的描述,细胞产生的产物的实例包括但不限于抗体分子(例如,单克隆抗体,双特异性抗体),抗体模拟物(特异性结合抗原的多肽分子,但是与抗体诸如DARP素、亲和体、阿迪连接素(adnectin)或IgNAR结构上不相关的抗原),融合蛋白(例如,Fc融合蛋白,嵌合细胞因子),或其他重组蛋白(例如,糖基化蛋白,酶,激素),病毒治疗(例如,基因疗法和病毒免疫疗法的病毒载体,抗癌溶瘤细胞),细胞治疗(例如,多能干细胞,间充质干细胞和成体干细胞),疫苗或脂质包封的颗粒(例如,外来体,病毒样颗粒),RNA(例如,siRNA)或DNA(例如,质粒DNA),抗生素或氨基酸。在实施方式中,装置、设备和方法可以用于产生生物仿制药。

[0116] 如所述,在实施方式中,装置、设备和方法允许产生真核细胞,例如,哺乳动物细胞或低等真核细胞,例如酵母细胞或丝状真菌细胞,或原核细胞,如革兰氏阳性或革兰氏阴性细胞和/或真核或原核细胞的产物,例如,蛋白质,肽,抗生素,氨基酸,核酸(如DNA或RNA),由真核细胞以大规模方式合成。在一些实施方式中,还公开了微生物治疗中应用的微生物生物体及其孢子的用途。除非在本文中另外说明,装置、设备和方法可以包括任何体积或生产能力,包括但不限于,实验室规模,中试规模和全面生产规模能力。

[0117] 此外,除非在本文中另外说明,装置、设备和方法可以包括任何合适的反应器或生物反应器,包括但不限于,搅拌槽,空运,纤维,微纤维,中空纤维,陶瓷基质,流化床,固定床和/或喷射床生物反应器。本文所用“反应器”或“生物反应器”可以包括发酵罐或发酵单元,或任何其他反应容器,并且术语“反应器”与“发酵罐”可以互换使用。术语发酵罐或发酵指微生物和哺乳动物培养物。例如,在一些方面中,示例性的生物反应器单元可以进行下述内容的一种或多种或所有:营养物和/或碳源的进料,注入合适的气体(例如氧气),发酵或细胞培养基的入口和出口流动,气相和液相的分离,维持温度,维持氧气和CO₂水平,维持pH水平,搅拌(例如,混合)和/或清洁/消毒。示例性反应器单元,诸如发酵单元,在单元内可以包含多个反应器,例如,单元在各单元中可以具有1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90或100或更多个生物反应器,和/或设备可以包含在设备内具有单个或多个反应器的多个单元。在各种实施方式中,生物反应器可以适用于批次,半批次、分批补料、灌注和/或连续发酵过程。可采用任何合适的反应器。在实施方式中,生物反应器可以具有约100mL至约50,000L的体积。非限制性的实例包括100mL、250mL、500mL、750mL、1升、2升、3升、

4升、5升、6升、7升、8升、9升、10升、15升、20升、25升、30升、40升、50升、60升、70升、80升、90升、100升、150升、200升、250升、300升、350升、400升、450升、500升、550升、600升、650升、700升、750升、800升、850升、900升、950升、1000升、1500升、2000升、2500升、3000升、3500升、4000升、4500升、5000升、6000升、7000升、8000升、9000升、10,000升、15,000升、20,000升和/或50,000升的体积。此外,合适的反应器可以是多次使用,单次使用,一次性或非一次性的,并且可以由任何合适的材料形成,包括金属合金,如不锈钢(例如,316L或任何其它合适的不锈钢)和铬镍铁合金,塑料和/或玻璃。

[0118] 在实施方式中并且除非本文另外说明,本文所述的装置、设备和方法还可以包括并未另外提及的任何合适的单元操作和/或器材,如用于分离、纯化和/或分离这些产物的操作和/或器材。可以使用任何合适的设备和环境,如传统的粘贴建立设备,模块化,流动和临时设备,或任何其他合适的结构,设备和/或布局。例如,在一些实施方式中,可使用模块化的清洁室。此外,并且除非另外说明,本文所述的装置、系统和方法可以封装于单一位置或设备和/或在其中进行,或者,可以封装于分开的或多个位置和/或设备中和/或在其中进行。

[0119] 作为非限制实例且不构成任何限制,美国专利公开号2013/0280797;2012/0077429;2011/0280797;2009/0305626;和美国专利号8,298,054;7,629,167;和5,656,491描述了可能合适的示例性设备、装置和/或系统,其通过引用其全文纳入本文。

[0120] 在实施方式中,细胞是真核细胞,例如,哺乳动物细胞。哺乳动物细胞可以是例如人或啮齿动物或牛细胞系或细胞株。这类细胞、细胞系或细胞株的实例是例如,小鼠骨髓瘤(例如,NS0或SP2/0细胞系),中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系,HT1080,H9,HepG2,MCF7,MDBK Jurkat,NIH3T3,PC12,BHK(幼仓鼠肾细胞),VERO,YB2/0,Y0,C127,L细胞,COS,例如,COS1和COS7,QC1-3,HEK-293,VERO,PER.C6,HeLa,EB1,EB2,EB3,溶瘤细胞或杂交瘤细胞系。优选地,哺乳动物细胞是CHO细胞系。在一实施方式中,细胞是CHO细胞。在一实施方式中,细胞是CHO-K1细胞,CHO-K1 SV细胞,DG44 CHO细胞,DUXB11 CHO细胞,CHOS,CHO GS敲除细胞,CHO FUT8GS敲除细胞,CHOZN或源自CHO的细胞。CHO GS敲除细胞(例如,GSKO细胞)是例如CHOK1SVTMGS敲除细胞(CHOK1SV GS-KOTM)。CHO FUT8敲除细胞是例如CHOK1SVTM Potelligent®(隆萨生物有限公司(Lonza Biologics,Inc.))。真核细胞可能还是鸟细胞、细胞系或细胞株,例如,EBx®细胞,EB14、EB24、EB26、EB66或EBv13。

[0121] 在一些实施方式中,真核细胞是干细胞。例如,干细胞可以是多潜能干细胞,包括胚胎干细胞(ESC),成体干细胞,诱导多潜能干细胞(iPSC),组织特异性干细胞(例如,造血干细胞)和间充质干细胞(MSC)。

[0122] 在一实施方式中,细胞是本文所述任何细胞的分化形式。在一实施方式中,细胞是源自培养中的任何原代细胞的细胞。在一些实施方式中,细胞并不源自干细胞。例如,一些实施方式中,用于免疫疗法的细胞(例如,淋巴细胞)提取或分离自个体患者或来自建立的细胞库。在一些实施方式中,细胞可以包括遗传操纵的细胞(即,CAR-T等)。

[0123] 在实施方式中,细胞是肝细胞,如人肝细胞、动物肝细胞或非薄壁组织细胞。例如,细胞可以是可铺板(plateable)的代谢合格的人肝细胞,可铺板的诱导合格的人肝细胞,可铺板的Qualyst Transporter CertifiedTM人肝细胞,悬浮合格的人肝细胞(包括10供体和20供体汇集的肝细胞),人肝枯氏细胞(Kupffer cell),人肝星状细胞,狗肝细胞(包括单一

和汇集的比格尔(Beagle)肝细胞),小鼠肝细胞(包括CD-1和C57BI/6肝细胞),大鼠肝细胞(包括Sprague-Dawley、Wistar Han和Wistar肝细胞),猴肝细胞(包括食蟹猴(Cynomolgus)或恒河猴(Rhesus monkey)肝细胞),猫肝细胞(包括短毛家猫肝细胞)和兔肝细胞(包括新西兰白兔肝细胞)。示例性的肝细胞可商购自三角科技实验室有限公司(Triangle Research Labs, LLC),北卡罗纳州Davis Drive研究三角科技园6,美国27709。

[0124] 在一实施方式中,真核细胞是低等真核细胞,例如,酵母细胞(例如,毕赤酵母(*Pichia*)属(例如,巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*),甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*),克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*),和安格斯毕赤酵母(*Pichia angusta*)),孔玛氏酵母(*Komagataella*)属(例如,巴斯德孔玛氏酵母(*Komagataella pastoris*),假巴斯德孔玛氏酵母(*Komagataella pseudopastoris*)或菲氏孔玛氏酵母(*Komagataella phaffii*)),酵母

[0125] (*Saccharomyces*)属(例如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),克氏酵母(*Saccharomyces kluyveri*),葡萄汁酵母(*Saccharomyces uvarum*)),克鲁维酵母(*Kluyveromyces*)属(例如,乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)),马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)),假丝酵母(*Candida*)属(例如,产朊假丝酵母(*Candida utilis*),卡卡假丝酵母(*Candida cacaoi*),博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)),地丝菌(*Geotrichum*)属(例如,发酵地丝菌(*Geotrichum fermentans*)),多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*),解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)或粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)。优选的是巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)种。巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)菌株的示例是X33、GS115、KM71、KM71H;和CBS7435。

[0126] 在一实施方式中,真核细胞是真菌细胞(例如,曲霉菌(*Aspergillus*) (如黑曲霉菌(*A.niger*),烟曲霉菌(*A.fumigatus*),欧氏曲霉菌(*A.oryzae*),尼杜拉曲霉菌(*A.nidula*)),支顶孢菌(*Acremonium*) (如嗜热支顶菌(*A.thermophilum*)),毛壳菌(*Chaetomium*) (如嗜热毛壳菌(*C.thermophilum*)),金孢子菌(*Chrysosporium*) (如嗜热金孢子菌(*C.thermophile*)),虫草菌(*Cordyceps*) (如蛹虫草(*C.militaris*)),棒囊壳菌(*Corynascus*),栉霉菌(*Ctenomyces*),镰刀菌(*Fusarium*) (如尖孢镰刀菌(*F.oxysporum*)),小丛壳菌(*Glomerella*) (如禾生小丛壳菌(*G.graminicola*)),肉座菌(*Hypocrea*) (如红褐肉座菌(*H.jecorina*)),稻瘟菌(*Magnaporthe*) (如欧氏稻瘟菌(*M.oryzae*)),毁丝霉(*Myceliophthora*) (如嗜热毁丝霉(*M.thermophile*)),丛赤壳菌(*Nectria*) (如红球丛赤壳菌(*N.heamatococca*)),脉孢菌(*Neurospora*) (如粗糙脉孢菌(*N.crassa*)),青霉菌(*Penicillium*),孢子丝菌(*Sporotrichum*) (如嗜热孢子丝菌(*S.thermophile*)),梭孢壳菌(*Thielavia*) (如泰瑞斯梭孢壳菌(*T.terrestris*),异梭孢壳菌(*T.heterothallica*)),木霉菌(*Trichoderma*) (如里氏木霉(*T.reesei*))或黄萎病菌(*Verticillium*) (如大丽花黄萎病菌(*V.dahlia*))。

[0127] 在一实施方式中,真核细胞是昆虫细胞(例如,Sf9,Mimic™Sf9,Sf21,High Five™(BT1-TN-5B1-4),或BT1-Ea88细胞),藻类细胞(例如,双眉藻属(*Amphora*),硅藻属(*Bacillariophyceae*),杜氏藻属(*Dunaliella*),小球藻属(*Chlorella*),衣藻属(*Chlamydomonas*),蓝绿藻属(*Cyanophyta*) (蓝藻细菌),微拟球藻属(*Nannochloropsis*),螺旋藻属(*Spirulina*)或棕鞭藻属(*Ochromonas*))或植物细胞(例如,来自单子叶植物(例如,

玉米、水稻、小麦或狗尾草 (*Setaria*)), 或来自双子叶植物 (例如, 木薯, 土豆, 大豆, 番茄, 烟草, 紫花苜蓿, 小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) 或拟南芥 (*Arabidopsis*))。

[0128] 在一实施方式中, 细胞是细菌或原核细胞。在一些实施方式中, 原核细胞是革兰氏阳性细胞, 如芽孢杆菌 (*Bacillus*)、链球菌 (*Streptomyces Streptococcus*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 或乳酸菌 (*Lactobacillus*)。可以使用的芽孢杆菌是枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*), 解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*), 地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*), 纳豆芽孢杆菌 (*B. natto*) 或巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)。在实施方式中, 细胞是枯草芽孢杆菌, 如枯草芽孢杆菌 3NA 和枯草芽孢杆菌 168。芽孢杆菌可获自例如, 枯草芽孢杆菌遗传储存中心 (*Bacillus Genetic Stock Center*), 生物科学 556, 484 西第 12 大道, 哥伦布市, 俄亥俄州 43210-1214。

[0129] 在一实施方式中, 原核细胞是革兰氏阴性细胞, 如沙门氏菌属 (*Salmonella spp.*) 或大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 诸如例如, TG1、TG2、W3110、DH1、DHB4、DH5a、HMS174、HMS174 (DE3)、NM533、C600、HB101、JM109、MC4100、XL1-Blue 和 Origami, 以及衍生自大肠杆菌 B 菌株的那些, 例如 BL-21 或 BL21 (DE3), 它们所有都是市售可及的。合适的宿主细胞是市售可及的, 例如, 来自培养物收藏单位诸如 DSMZ (德意志微生物和细胞培养物保藏中心有限公司 (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH*)), 德国布伦瑞克) 或美国典型培养物保藏中心 (*American Type Culture Collection*)

[0130] (ATCC)。在一些实施方式中, 细胞包括以治疗剂利用的其他微生物群。它们包括存在于人微生物组中的属于厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、疣微菌门 (*Verrumicrobia*)、放线菌门 (*actinobacteria*)、梭菌门 (*fusobacteria*) 和蓝菌门 (*fusobacteria*) 的微生物群。微生物群可包括需氧, 严格厌氧或兼性厌氧, 包括细胞或孢子。治疗性微生物群还可以包括利用其修饰的遗传修饰的生物体和载体。其他微生物组相关治疗性生物体可以包括: 古细菌, 真菌和病毒。参见例如, 人类微生物群落项目联盟 (*The Human Microbiome Project Consortium*). *Nature* 486, 207-214 (2012 年 6 月 14 日); Weinstock, *Nature*, 489 (7415): 250-256 (2012); Lloyd-Price, *Genome Medicine* 8:51 (2016)。

[0131] 在一些实施方式中, 培养的细胞被用于产生蛋白, 例如, 抗体, 例如单克隆抗体, 和/或重组蛋白, 用于治疗性用途。在实施方式中, 培养的细胞产生肽、氨基酸、脂肪酸或其他有用的生化中间体或代谢物。例如, 在实施方式中, 可以产生具有约 4000 道尔顿至大于约 140,000 道尔顿分子量的分子。在实施方式中, 这些分子可以具有一系列的复杂性并且可以包括翻译后修饰, 包括糖基化。

[0132] 在实施方式中, 蛋白质是, 例如, BOTOX, 肉毒杆菌, 肉毒毒素制剂 (*Neurobloc*), 丽舒妥 (*Dysport*) (或其他肉毒菌神经毒素血清型), 阿糖苷酶 α (*alglucosidase alpha*), 达托霉素, YH-16, 绒毛膜促性腺激素 α , 非格司亭 (*filgrastim*), 西曲瑞克 (*cetorelix*), 白细胞介素-2, 阿地白介素 (*aldesleukin*), 替西白介素 (*teceleulin*), 地尼白介素 (*denileukin diftitox*), 干扰素 α -n3 (注射), 干扰素 α -n1, DL-8234, 干扰素, 桑托里 (*Suntory*) (γ -1a), 干扰素 γ , 胸腺素 α 1, 他索纳明 (*tasonermin*), DigiFab, ViperaTAb, EchiTAb, CroFab, 奈西立肽 (*nesiritide*), 阿巴西普 (*abatacept*), 阿来塞普 (*alefacept*), 利比 (*Rebif*), 阿法艾托特明 (*eptoterminalfa*), 特立帕肽 (骨质疏松症), 降钙素可注射 (骨病), 降钙素 (鼻腔注射,

骨质疏松症),依那西普(etanercept),血红蛋白谷氨酸250(牛),多确克津 α (drotrecogin alpha),胶原酶,卡培立肽(carperitide),重组人表皮生长因子(局部凝胶,伤口愈合),DWP401,达贝泊汀 α (darbepoetin alpha),促红细胞生成素 Ω (epoetin omega),促红细胞生成素(epoetin) β ,促红细胞生成素 α ,地西卢定(desirudin),重组水蛭素(lepirudin),比伐卢定(bivalirudin),诺纳革 α (nonacog alpha),霉诺耐(Mononine),依他凝血素(eptacog alpha)(激活),重组因子VIII+VWF,重组体(Recombinate),重组因子VIII,因子VIII(重组),阿法美特(Alphnmate),奥特革 α (octocog alpha),因子VIII,帕利夫明(palifermin),英迪激酶(Indikinase),替奈普酶(tenecteplase),阿替普酶(alteplase),派替普酶(pamiteplase),瑞替普酶(reteplase),那替普酶(nateplase),孟替普酶(montepase),促卵泡素 α (follitropin alpha),rFSH,hpFSH,米卡芬净(micafungin),培非格司亭(pegfilgrastim),来格司亭(lenograstim),那托芬净(nartograstim),舍莫瑞林(sermorelin),胰高血糖素,艾塞那肽(exenatide),普兰林肽(pramlintide),阿糖脑苷酶(iniglucerase),加硫酶(galsulfase),乐克托品(Leucotropin),莫革斯汀(molgramostirn),醋酸曲普瑞林(triptorelin acetate),组氨瑞林(Histrelin)(皮下植入Hydron),地洛瑞林(deslorelin),组氨瑞林(histrelin),那法瑞林(nafarelin),亮丙瑞林缓释储库(ATRIGEL),亮丙瑞林植入物(DUROS),戈舍瑞林(goserelin),欧托品(Eutropin),KP-102计划,生长激素,美卡舍明(mecasermin)(成长失败),恩法韦肽(enlfavirtide),ORG-33408,甘精胰岛素,谷氨酸胰岛素,胰岛素(吸入),赖脯胰岛素,德特尼胰岛素(insulin deternir),胰岛素(口腔,RapidMist),美卡舍明林菲培(mecasermin rinfabate),阿那白滞素,西莫白介素(celmoleukin), ^{99m}Tc -阿普西肽注射液,麦乐贝齐(myelopid),倍泰龙(Betaseron),醋酸格拉替雷(glatiramer acetate),格旁(Gepon),沙格司亭(sargramostim),奥普瑞白介素(oprelvekin),人白细胞衍生的 α 干扰素,倍尔来福(Bilive),胰岛素(重组),重组人胰岛素,门冬胰岛素(insulin aspart),美卡色宁(mecasenin),罗扰素-A(Roferon-A),干扰素- $\alpha 2$,阿尔法扰素(Alfaferone),复合 α 干扰素-1,干扰素 α ,阿温耐克斯(Avonex)重组人黄体生成素,阿法链道酶(dornase alpha),曲弗明(trafermin),齐考诺肽(ziconotide),他替瑞林(taltirelin),阿法地博特明(diboterminalfa),阿托西班(atosiban),贝卡普勒明(becaplermin),依替巴肽(becaplermin),扎马拉(Zemaira),CTC-111,夏伐克(Shanvac)-B,HPV疫苗(四价),奥曲肽,兰瑞肽,安克斯丁(ancestirn),阿加西酶 β (agalsidase beta),阿加糖酶 α ,拉罗尼酶(laronidase),醋肽铜(prezatide copper acetate)(局部凝胶),拉布立酶(rasburicase),兰尼单抗(ranibizumab),阿提姆尼(Actimmune),PEG-内含子,确可宁(Tricomin),重组屋尘螨过敏脱敏注射液,重组人甲状旁腺激素(PTH)1-84(sc,骨质疏松症),红细胞生成素 δ (epoetin delta),转基因抗凝血酶III,格兰迪托品(Granditropin),透明质酸酶(Vitrage),重组胰岛素,干扰素- α (口服含片),GEM-21S,伐普肽(vapreotide),艾度硫酸酯酶(idursulfase),奥纳帕确特(omnapatrilat),重组血清白蛋白,赛妥珠单抗佩革(certolizumab pegol),羧肽酶(glucarpidase),人重组C1酯酶抑制剂(血管神经性水肿),拉诺普酶(lanoteplase),重组人生长激素,恩夫韦肽(enfuvirtide)(无针注射,Biojector 2000),VGV-1,干扰素(α),卢辛坦特(lucinactant),艾帕它迪(aviptadil)(吸入,肺病),艾替班特(icatibant),艾卡拉肽(ecallantide),欧米甘安(omiganan),奥革比

(Aurograb), 醋酸培西加南 (pexiganan acetate), ADI-PEG-20, LDI-200, 加瑞克 (degarelix), 白介假单胞菌外毒素 (cintredelinbesudotox), Favld, MDX-1379, ISAtx-247, 利拉鲁肽 (liraglutide), 特立帕肽 (teriparatide) (骨质疏松症), 组织因子通路抑制剂 (tifacogin), AA4500, T4N5 脂质体乳液, 卡妥索单抗 (catumaxomab), DWP413, ART-123, 魁萨琳 (Chrysalin), 去氨普酶, 安地普酶 (amediplase), 绒促卵泡素 α (corifollitropinalpha), TH-9507, 替度鲁肽 (teduglutide), 戴麦德 (Diamyd), DWP-412, 生长激素 (持续释放注射), 重组 G-CSF, 胰岛素 (吸入, 空气), 胰岛素 (吸入, 技术领域), 胰岛素 (吸入, AERx), RGN-303, DIAPEP277, 干扰素 β (丙型肝炎病毒感染 (HCV)), 干扰素 α -n3 (口服), 贝拉西普 (belatacept), 透皮胰岛素贴片, AMG-531, MBP-8298, 西雷西普 (Xerecept), 奥培巴康 (opebacan), AIDS VAX, GV-1001, LymphoScan, 瑞皮核糖核酸酶 (ranpirnase), 利普散 (Lipoxysan), 鲁丝普利肽 (lusupultide), MP52 (β -三磷酸盐载体, 骨再生), 黑色素瘤疫苗, 西普勒塞尔-T (sipuleucel-T), CTP-37, 英色革 (Insegia), 维特斯朋 (vitespen), 人凝血酶 (冷冻, 手术出血), 凝血酶, TransMID, 蛇毒纤溶酶 (alfimeprase), 普瑞凯希 (Puricase), 特利加压素 (静脉注射, 肝肾综合征), EUR-1008M, 重组 FGF-I (可注射, 血管疾病), BDM-E, 罗替盖普肽 (rotigaptide), ETC-216, P-113, MBI-594AN, 耐力霉素 (duramycin) (吸入, 囊性纤维化), SCV-07, OPI-45, 内皮抑素 (Endostatin), 血管抑素 (Angiostatin), ABT-510, 包曼比瑞克 (Bowman Birk) 抑制剂浓缩液, XMP-629, ^{99m}Tc -Hynic-膜联蛋白 V, 卡海拉利肽 F (kahalalide F), CTCE-9908, 替维瑞克 (teverelix) (延释), 奥扎瑞克 (ozarelix), 罗咪酯肽 (rornidepsin), BAY-504798, 白介素 4, PRX-321, 佩斯坎 (Pepscan), 依波介素 (iboctadekin), rh 乳铁蛋白 (rh lactoferrin), TRU-015, IL-21, ATN-161, 西仑吉肽 (cilengitide), 阿布富伦 (Albuferon), 比费西克斯 (Biphasix), IRX-2, Ω 干扰素, PCK-3145, CAP-232, 帕瑞肽, huN901-DMI, 卵巢癌免疫治疗疫苗, SB-249553, Oncovax-CL, OncoVax-P, BLP-25, CerVax-16, 多表位肽黑色素瘤疫苗 (MART-1, GP100, 酪氨酸酶), 奈米非肽 (nemifitide), rAAT (吸入), rAAT (皮肤科), CGRP (吸入, 哮喘), 培那西普 (pegsunercept), 胸腺素 β 4, 普厉肽平辛 (plitidepsin), GTP-200, 雷莫拉宁 (ramoplanin), GRASPA, OBI-1, AC-100, 鲑鱼降钙素 (口服, 埃利根 (eligen)), 降钙素 (口服, 骨质疏松症), 艾沙瑞林 (examorelin), 卡莫瑞林 (capromorelin), Cardeva, 韦拉繁明 (velafermin), 131I-TM-601, KK-220, T-10, 乌拉立肽 (ularitide), 地来司他 (depelestat), 海明肽 (hematide), 克瑞沙林 (Chrysalin) (局部), rNAPc2, 重组因子 V111 (聚乙二醇化脂质体), bFGF, 聚乙二醇化的重组葡萄球菌激酶变体, V-10153, 超声波降解尿激酶原 (SonoLysis Prolyse), NeuroVax, CZEN-002, 胰岛细胞新生疗法, rGLP-1, BIM-51077, LY-548806, 艾塞那肽 (控释, Medisorb), AVE-0010, GA-GCB, 阿伏瑞林 (avorelin), ACM-9604, 乙酸利那洛肽 (linaclotide acetate), CETI-1, 赫莫斯盘 (Hemospan), VAL (可注射), 速效胰岛素 (注射用, Viadel), 鼻内胰岛素, 胰岛素 (吸入), 胰岛素 (口服, 埃利根), 重组甲硫氨酰人瘦素, 皮创克纳 (pitrakinra) 皮下注射, 湿疹, 皮创克纳 (吸入干粉, 哮喘), 多白介素 (Multikine), RG-1068, MM-093, NBI-6024, AT-001, PI-0824, ORG-39141, Cpn10 (自身免疫性疾病/炎症), 塔拉特弗利 (talactoferrin) (局部), rEV-131 (眼科), rEV-131 (呼吸系统疾病), 口服重组人胰岛素 (糖尿病), RPI-78M, 奥普瑞白介素 (oprelvekin) (口服), CYT-99007CTLA4-Ig, DTY-001, 伐拉司特 (valategrast), 干扰素 α -n3 (局部), IRX-3, RDP-58, 塔弗隆 (Tauferon),

胆盐刺激脂肪酶,美瑞帕酶(Merispase),丙氨酸磷酸酶,EP-2104R,美拉诺坦-II,布美诺肽(bremelanotide),ATL-104,重组人微纤溶酶,AX-200,SEMAX,ACV-1,Xen-2174,CJC-1008,强啡肽A,SI-6603,LAB GHRH,AER-002,BGC-728,疟疾疫苗(病毒体,PeviPRO),ALTU-135,细小病毒B19疫苗,流感疫苗(重组神经氨酸酶),疟疾/HBV疫苗,炭疽疫苗,VACC-5Q,VACC-4X,HIV疫苗(口服),HPV疫苗,Tat类毒素,YSPSL,CHS-13340,PTH(1-34)脂质体乳膏(Novasome),奥斯塔柏林-C(Ostabolin-C),PTH类似物(局部用药,银屑病),MBRI-93.02,MTB72F疫苗(结核病),MVA-Ag85A疫苗(结核病),FARA04,BA-210,重组痘疫FIV疫苗,AG-702,0xS0Drol,rBetV1,Der-p1/Der-p2/Der-p7过敏原靶向疫苗(尘螨过敏),PR1肽抗原(白血病),突变ras疫苗,HPV-16E7脂肽疫苗,迷路(labyrinthin)疫苗(腺癌),CML疫苗,WT1-肽疫苗(癌症),IDD-5,CDX-110,朋曲斯(Pentrys),诺雷林(Norelin),CytoFab,P-9808,VT-111,伊克卡品肽(icrucaptide),替柏明(telbermin)(皮肤病学,糖尿病足溃疡),芦平曲韦(rupintrivir),瑞替克鲁(reticulose),rGRF,HA, α -半乳糖苷酶A.,ACE-011,ALTU-140,CGX-1160,血管紧张素治疗性疫苗,d-4F,ETC-642,APP-018,rhMBL,SCV-07(口头,结核),DRF-7295,ABT-828,ErbB2特异性免疫毒素(抗癌),DT3SSIL-3,TST-10088,PRO-1762,Combotox,胆囊收缩素-B/胃泌素受体结合肽,111In-hEGF,AE-37,曲妥珠单抗(trastuzumab)-DM1,拮抗剂G,IL-12(重组),PM-02734,IMP-321,rhIGF-BP3,BLX-883,CUV-1647(局部),基于L-19的放射免疫治疗药(癌症),Re-188-P-2045,AMG-386,DC/1540/KLH疫苗(癌症),VX-001,AVE-9633,AC-9301,NY-ESO-1疫苗(多肽),NA17.A2肽,黑色素瘤疫苗(脉冲抗原治疗),前列腺癌疫苗,CBP-501,重组人乳铁蛋白(干眼症),FX-06,AP-214,WAP-8294A(可注射),ACP-HIP,SUN-11031,肽YY[3-36](肥胖,鼻内),FGLL,阿塞西普(atacicept),BR3-Fc,BN-003,BA-058,人甲状旁腺激素1-34(鼻腔,骨质疏松症),F-18-CCR1,AT-1100(乳糜泻/糖尿病),JPD-003,PTH(7-34)脂质体乳膏(Novasome),耐力霉素(眼科,干眼),CAB-2,CTCE-0214,GlycoPEG化促红细胞生成素,EPO-Fc,CNT0-528,AMG-114,JR-013,因子XIII,氨基康定(aminocandin),PN-951,716155,SUN-E7001,TH-0318,BAY-73-7977,teverelix(速释),EP-51216,hGH(控释,生物圈),OGP-I,西夫韦肽(sifuvirtide),TV4710,ALG-889,ORG-41259,rhCC10,F-991,胸腺五肽(肺病),r(m)CRP,肝选择性胰岛素,苏靶林(subalin),L19-IL-2融合蛋白,弹力素(elafin),NMK-150,ALTU-139,EN-122004,生成素,血小板生成素受体激动剂(血小板减少症),AL-108,AL-208,神经生长因子拮抗剂(疼痛),SLV-317,CGX-1007,INN0-105,口服特立帕肽(艾力更(eligen)),GEM-0S1,AC-162352,PRX-302,LFn-p24融合疫苗(Therapore),EP-1043,肺炎球菌儿科疫苗,疟疾疫苗,脑膜炎奈瑟氏菌B组疫苗,新生儿B组链球菌疫苗,炭疽疫苗,HCV疫苗(gpE1+gpE2+MF-59),中耳炎治疗,HCV疫苗(核心抗原+ISCOMATRIX),hPTH(1-34)(透皮,ViaDerm),768974,SYN-101,PGN-0052,阿维库明(aviscumnine),BIM-23190,结核疫苗,多表位酪氨酸酶肽,癌症疫苗,恩卡斯替母(enkastim),APC-8024,GI-5005,ACC-001,TTS-CD3,血管靶向TNF(实体瘤),去氨加压素(口腔控释),奥那西普,和TP-9201。

[0133] 在一些实施方式中,多肽是阿达木单抗(adalimumab)(HUMIRA),英利昔单抗(infliximab)(REMICADETM),利妥昔单抗(rituximab)(RITUXANTM/MABTHERATM)依那西普(etanercept)(ENBRELTM),贝伐单抗(bevacizumab)(AVASTINTM),曲妥珠单抗(trastuzumab)(HERCEPTINTM),派革利革斯丁(pegrilgrastim)(NEULASTATM),或任何其他

合适的多肽,包括生物类似物和生物改良剂。

[0134] 其他合适的多肽在如下表6中以及US2016/0097074的表1中列出。本领域技术人员可以理解的是,本发明的公开内容还包括如本文所述的产物和/或偶联物的组合[(即多蛋白质,修饰的蛋白质(与PEG、毒素、其他活性成分偶联)]。

[0135] 表6

[0136]

蛋白质产品	参考上市药品
干扰素 γ -1b	Actimmune [®]
阿替普酶 (alteplase) ; 组织型纤维蛋白溶酶原	Activase [®] /Cathflo [®]
重组抗血友病因子	Advate
人白蛋白	Albutein [®]
拉罗尼酶 (Laronidase)	Aldurazyme [®]
干扰素 α -N3, 人白细胞来源	Alferon N [®]
人类抗血友病因子	Alphanate [®]
病毒过滤的人凝血因子 IX	AlphaNine [®] SD
阿法赛特 (Alefcept) ; 重组, 二聚体融合蛋白 LFA3-Ig	Amevive [®]
比伐卢定 (Bivalirudin)	Angiomax [®]
达贝泊汀 α (darbepoetin alfa)	Aranesp [™]
贝伐单抗 (Bevacizumab)	Avastin [™]
干扰素 β -1a; 重组	Avonex [®]
凝血因子 IX	BeneFix [™]
干扰素 β -1b	Betaseron [®]
托西莫单抗 (Tositumomab)	BEXXAR [®]
抗血友病因子	Bioclone [™]
人生长激素	BioTropin [™]
A 型肉毒杆菌毒素	BOTOX [®]
阿仑单抗	Campath [®]
阿克土莫单抗 (Acritumomab) ; 镓-99 标记	CEA-Scan [®]
阿糖苷酶 (alglucerase) ; β -葡萄糖脑苷脂酶的修饰形式	Ceredase [®]
伊米苷酶 (imiglucerase) ; β -葡萄糖脑苷脂酶的重组形式	Cerezyme [®]
蝰蛇科 (crotalidae) 多价免疫 Fab, 绵羊	CroFab [™]
地高辛免疫 fab [绵羊]	DigiFab [™]
拉布立酶 (Rasburicase)	Elitek [®]

[0137]

依那西普 (Etanercept)	ENBREL [®]
艾泊汀 α (Epoietin alfa)	Epogen [®]
西妥昔单抗 (Cetuximab)	Erbitux [™]
阿革达喜 β (Algasidase beta)	Fabrazyme [®]
尿促卵泡素 (Urofollitropin)	Ferinex [™]
促卵泡素 β (Follitropin beta)	Follistim [™]
特立帕肽 (Teriparatide)	FORTEO [®]
人生长激素	GenoTropin [®]
胰高血糖素	GlucaGen [®]
促卵泡素 α (Follitropin alfa)	Gonal-F [®]
抗血友病因子	Helixate [®]
抗血友病因子; 因子 XIII	HEMOFIL
阿德福韦酯 (Adefovir dipivoxil)	Hepsera [™]
曲妥珠单抗 (trastuzumab)	Herceptin [®]
胰岛素	Humalog [®]
抗血友病因子/冯维勒布兰德因子复合物-人	Humate-P [®]
生长激素	Humatrope [®]
阿达木单抗 (Adalimumab)	HUMIRA [™]
人体胰岛素	Humulin [®]
重组人透明质酸酶	Hylanex [™]
复合 α 干扰素-1	Infergen [®]
依替巴肽 (Eptifibatide)	Integrillin [™]
α -干扰素	Intron A [®]
帕利夫明 (Palifermin)	Kepivance
阿那白滞素 (Anakinra)	Kineret [™]
抗血友病因子	Kogenate [®] FS
甘精胰岛素	Lantus [®]
粒细胞巨噬细胞集落模拟因子	Leukine [®] /Leukine [®] 液
注射用 促黄体素 α	Luveris
OspA 脂蛋白	LYMERix [™]
雷珠单抗 (Ranibizumab)	LUCENTIS [®]
吉妥单抗 (Gemtuzumab ozogamicin)	Mylotarg [™]
加硫酶 (Galsulfase)	Naglazyme [™]
奈西立肽 (Nesiritide)	Natreacor [®]
培非司亭 (Pegfilgrastim)	Neulasta [™]
奥普瑞白介素 (Oprelvekin)	Neumega [®]
非格司亭 (Filgrastim)	Neupogen [®]
法内乐单抗 (Fanolesomab)	NeuroSpec [™] (先前 LeuTech [®])
生长激素[rDNA]	Norditropin [®] /Norditropin Nordiflex [®]
米托蒽醌 (Mitoxantrone)	Novantrone [®]
胰岛素; 锌悬浮液	Novolin L [®]
胰岛素; 低精蛋白 (isophane) 悬浮液	Novolin N [®]
胰岛素, 定期	Novolin R [®]
胰岛素	Novolin [®]
凝血因子 VIIa	NovoSeven [®]
生长激素	Nutropin [®]

[0138]

免疫球蛋白静脉注射	Octagam [®]
PEG-L-门冬酰胺酶	Oncaspar [®]
阿巴西普 (Abatacept), 完全人类可溶性融合蛋白	Orencia [™]
莫罗单抗 CD3	Orthoclone OKT3 [®]
高分子量透明质酸	Orthovisc [®]
人绒毛膜促性腺激素	Ovidrel [®]
活减毒卡介苗	Pacis [®]
聚乙二醇干扰素 α -2a	Pegasys [®]
干扰素 α -2b 的聚乙二醇化形式	PEG-Intron [™]
阿巴瑞克 (Abarelix) (注射悬浮液); 促性腺激素释放激素拮抗剂	Plenaxis [™]
艾泊汀 α (Epoietin alfa)	Procrit [®]
阿地白介素 (aldesleukin)	Proleukin, IL-2 [®]
人蛋氨酸生长素 (Somatrem)	Protropin [®]
链道酶 α (Dornase alfa)	Pulmozyme [®]
依法利珠单抗 (Efalizumab); 选择性, 可逆的 T 细胞阻滞剂	RAPTIVA [™]
利巴韦林 (ribavirin) 和 α 干扰素的组合	Rebetron [™]
干扰素 β 1a	Rebif [®]
抗血友病因子	Recombinant [®] rAHF
抗血友病因子	ReFacto [®]
重组水蛭素 (Lepirudin)	Refludan [®]
英夫利昔单抗 (Infliximab)	Remicade [®]
阿昔单抗 (Abciximab)	ReoPro [™]
瑞替普酶 (Reteplase)	Retavase [™]
利妥昔单抗 (Rituxima)	Rituxan [™]
干扰素 α -2a	Roferon-A [®]
生长激素	Saizen [®]
合成猪分泌素	SecreFlo [™]
巴利昔单抗 (Basiliximab)	Simulect [®]
依库珠单抗 (Eculizumab)	SOLIRIS [®]
培维索孟 (Pegvisomant)	SOMAVERT [®]
帕利珠单抗 (Palivizumab); 重组产生的人源化 mAb	Synagis [™]
促甲状腺激素 α	Thyrogen [®]
替奈普酶	TNKase [™]
那他珠单抗 (Natalizumab)	TYSABRI [®]
人免疫球蛋白静脉注射 5% 和 10% 的溶液	Venoglobulin-S [®]
干扰素 α -n1, 淋巴母细胞样	Wellferon [®]
多确克金 A (Drotrecogin alfa)	Xigris [™]
欧玛鲁珠单抗 (Omaluzumab); 靶向免疫球蛋白-E 的重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体	Xolair [®]
达克珠单抗 (Daclizumab)	Zenapax [®]
替坦异贝莫单抗 (Iibritumomab tiuxetan)	Zevalin [™]
生长激素	Zorbtive [™] (Serostim [®])

[0139] 在实施方式中, 多肽是如表7所示的激素、血液凝固/凝结因子、细胞因子/生长因子、抗体分子、融合蛋白、蛋白疫苗或肽。

[0140] 表7. 示例性产物

[0141]

治疗性产物类型	产品	商品名
激素	促红细胞生成素, Eprex- α 达贝泊汀- α 生长激素 (GH), 生长素 人卵泡刺激激素 (FSH) 人绒毛膜促性腺激素 促黄体素- α 胰高血糖素 生长激素释放激素 (GHRH) 分泌素 甲状腺刺激激素 (TSH), 促甲状腺激素	Epogen、Procrit Aranesp Genotropin、Humatrope、Norditropin、 NovoVotropin、Nutropin、Omnitrope、 Protropin、Siazon、Serostim、Valtropin Gonal-F、Follistim Ovidrel、Luveris GlcaGen Geref ChiRhoStim (人肽)、SecreFlo (猪肽) Thyrogen
血液凝固/凝结因子	因子 VIIa 因子 VIII 因子 IX 抗凝血酶 III (AT-III) 蛋白质 C 浓缩物	NovoSeven Bioclone、Helixate、Kogenate、 Recombinant、ReFacto Benefix Thrombate III Ceprotin
细胞因子/生长因子	I 型 α -干扰素 干扰素- α n3 (IFN α n3) 干扰素- β 1a (rIFN- β) 干扰素- β 1b (rIFN- β) 干扰素- γ 1b (IFN γ) 阿地白介素 (白介素 2 (IL2)), 表皮 细胞活化因子; ETAF 帕利夫明 (角质形成细胞生长因子; KGF) 贝卡派明 (Becaplemin) (血小板衍生 生长因子; PDGF) 阿那白滞素 (Anakinra) (重组 IL1 拮 抗剂)	Infergen Alferon N Avonex、Rebif Betaseron Actimmune Proleukin Kepivance Regranex Anril、Kineret
抗体分子	贝伐单抗 (VEGFA mAb) 西妥昔单抗 (EGFR mAb) 帕尼单抗 (EGFR mAb) 阿仑单抗 (CD52 mAb) 利妥昔单抗 (CD20 嵌合抗体) 曲妥珠单抗 (HER2/Neu mAb) 阿巴西普 (CTLA Ab/Fc 融合体) 阿达木单抗 (TNF α mAb) 依那西普 (TNF 受体/Fc 融合体) 英夫利昔单抗 (TNF α 嵌合 mAb)	Avastin、Erbix Vectibix Campath Rituxan Herceptin、Orencia Humira、Enbrel Remicade Amevive Raptiva、Tysabri Soliris、Orthoclone、OKT3

[0142]		阿法赛特 (Alefcept) (CD2 融合蛋白) 依法利珠单抗 (CD11a mAb) 那他珠单抗 (整合素 $\alpha 4$ 亚单位 mAb) 依库珠单抗 (C5mAb) 莫罗单抗-CD3	
	其他: 融合蛋白/蛋白 疫苗/肽	胰岛素 乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) HPV 疫苗 OspA 抗-恒河猴 (Rh) 免疫球蛋白 G 恩夫韦肽 蜘蛛丝, 例如, 纤维	Humulin, Novolin Engerix, Recombivax HB Gardasil LYMERix Rhophylac Fuzeon QMONOS

[0143] 在实施方式中, 蛋白质是多特异性蛋白, 例如, 双特异性抗体, 如表8所示。

[0144] 表8: 双特异性形式

[0145]

名称(别名, 赞助机构)	BsAb 形式	靶标	建议的作用机制	研发阶段	疾病(或健康供体)
卡妥索单抗 (Catumaxomab) (Removab [®] , 费森尤斯生物技术公司 (Fresenius Biotech), Trion 制药公司 (Trion Pharma), Neopharm 公司 (Neopharm))	BsIgG: 曲马单抗 (Triomab)	CD3, EpCAM	使 T 细胞再次 靶向肿瘤, Fc 介导的效应物 功能	在欧盟批准	EpCAM 阳性肿瘤中的恶性腹水
艾途玛单抗 (Ertumaxomab) (Neovii 生物技术公司 (Neovii Biotech)、费森尤斯生物技术公司)	BsIgG: 曲马单抗	CD3, HER2	使 T 细胞再次 靶向肿瘤	I/II 期	晚期实体瘤
博纳吐单抗 (Blinatumomab) (Blinecto [®] , AMG 103, MT 103, MEDI 538,	BiTE	CD3, CD19	使 T 细胞再次 靶向肿瘤	在美国批准 II 和 III 期 II 期 I 期	前体 B 细胞 ALL ALL DLBCL NHL

[0146]

名称(别名, 赞助机构)	BsAb 形式	靶标	建议的作用机制	研发阶段	疾病(或健康供体)
安进公司 (Amgen))					
REGN1979 (再生元公司 (Regeneron))	BsAb	CD3, CD20			
速力途单抗 (Solitomab) (AMG 110, MT110, 安进公司)	BiTE	CD3, EpCAM	使 T 细胞再次 靶向肿瘤	I 期	实体瘤
MEDI 565 (AMG 211, 米迪缪尼公司 (MedImmune), 安进公司)	BiTE	CD3, CEA	使 T 细胞再次 靶向肿瘤	I 期	胃肠道腺癌 (Gastrointestinal adenocarcinoma)
RO6958688 (罗氏公司 (Roche))	BsAb	CD3, CEA			
BAY2010112 (AMG 212, 拜耳公司 (Bayer); 安进公司)	BiTE	CD3, PSMA	使 T 细胞再次 靶向肿瘤	I 期	前列腺癌
MGD006 (Macrogenics 公司 (Macrogenics))	DART	CD3, CD123	使 T 细胞再次 靶向肿瘤	I 期	AML
MGD007 (Macrogenics 公司)	DART	CD3, gpA33	使 T 细胞再次 靶向肿瘤	I 期	结直肠癌
MGD011 (Macrogenics 公司)	DART	CD19, CD3			
SCORPION (Emergent Biosolutions 公司 (Emergent Biosolutions), Trubion 公司 (Trubion))	BsAb	CD3, CD19	使 T 细胞再次 靶向肿瘤		
AFM11 (Affimed Therapeutics 公司 (Affimed	TandAb	CD3, CD19	使 T 细胞再次 靶向肿瘤	I 期	NHL 和 ALL

[0147]

名称(别名, 赞助机构)	BsAb 形式	靶标	建议的作用机制	研发阶段	疾病(或健康供体)
Therapeutics))					
AFM12 (Affimed Therapeutics 公司)	TandAb	CD19, CD16	使 NK 细胞再次靶向肿瘤细胞		
AFM13 (Affimed Therapeutics 公司)	TandAb	CD30, CD16A	使 NK 细胞再次靶向肿瘤细胞	II 期	霍奇金淋巴瘤
GD2(芭芭拉安卡尔马诺斯癌症中心(Barbara Ann Karmanos Cancer Institute))	预载 BsAb 的 T 细胞	CD3, GD2	使 T 细胞再次靶向肿瘤	I/II 期	神经母细胞瘤和骨肉瘤
pGD2(芭芭拉安卡尔马诺斯癌症中心)	预载 BsAb 的 T 细胞	CD3, Her2	使 T 细胞再次靶向肿瘤	II 期	转移性乳腺癌
EGFRBi 臂自体激活的 T 细胞(罗杰威廉姆斯医学中心(Roger Williams Medical Center))	预载 BsAb 的 T 细胞	CD3, EGFR	对 EGFR 阳性肿瘤的自体激活的 T 细胞	I 期	肺癌和其他实体瘤
抗-EGFR 臂激活的 T 细胞(芭芭拉安卡尔马诺斯癌症中心)	预载 BsAb 的 T 细胞	CD3, EGFR	对 EGFR 阳性肿瘤的自体激活的 T 细胞	I 期	结肠和胰腺癌
rM28(图宾根大学医院(University Hospital Tübingen))	串联 scFv	CD28, MAPG	使 T 细胞再次靶向肿瘤	II 期	转移性黑色素瘤
IMCgp100 (Immunocore 公司(Immunocore))	ImmTAC	CD3, 肽 MHC	使 T 细胞再次靶向肿瘤	I/II 期	转移性黑色素瘤
DT2219ARL (NCI, 明尼苏达大学(University of Minnesota))	连接白喉毒素的 2 scFv	CD19, CD22	使蛋白质毒素靶向肿瘤	I 期	B 细胞白血病或淋巴瘤

[0148]

名称(别名, 赞助机构)	BsAb 形式	靶标	建议的作用机制	研发阶段	疾病(或健康供体)
XmAb5871 (Xencor 公司 (Xencor))	BsAb	CD19, CD32b			
NI-1701 (NovImmune 公司 (NovImmune))	BsAb	CD47, CD19			
MM-111 (梅里 马克公司 (Merrimack))	BsAb	ErbB2, ErbB3			
MM-141 (梅里马 克公司)	BsAb	IGF-1R, ErbB3			
NA (Merus 公司 (Merus))	BsAb	HER2, HER3			
NA (Merus 公司)	BsAb	CD3, CLEC12A			
NA (Merus 公司)	BsAb	EGFR, HER3			
NA (Merus 公司)	BsAb	PD1, 未公开			
NA (Merus 公司)	BsAb	CD3, 未公 开			
多立谷途单抗 (Duligotuzumab) (MEHD7945A, 基因泰克公司 (Genentech), 罗氏公司)	DAF	EGFR, HER3	阻断 2 种受体, ADCC	I 和 II 期 II 期	头颈癌 结直肠癌
LY3164530 (礼来 公司 (Eli Lilly))	未公开	EGFR, MET	阻断 2 种受体	I 期	晚期或转移性 癌症
MM-111 (梅里马 克制药公司 (Merrimack Pharmaceuticals))	HSA 抗体 (HSA body)	HER2, HER3	阻断 2 种受体	II 期 I 期	胃癌和食道癌 乳腺癌
MM-141, (梅里 马克制药公司)	IgG-scFv	IGF-1R, HER3	阻断 2 种受体	I 期	晚期实体瘤
RG7221 (RO5520985, 罗 氏公司)	CrossMab	Ang2, VEGF A	阻断 2 种促血管 生成因子	I 期	实体瘤

[0149]

名称(别名, 赞助机构)	BsAb 形式	靶标	建议的作用机制	研发阶段	疾病(或健康供体)
氏公司)			(proangiogenic)		
RG7716 (罗氏公司)	CrossMab	Ang2, VEGF A	阻断 2 种促血管生成因子 (proangiogenic)	I 期	湿 AMD
OMP-305B83 (OncoMed 公司 (OncoMed))	BsAb	DLL4/VEGF			
TF2 (Immunomedics 公司 (Immunomedics))	码头 (dock) 和锁定 (lock)	CEA, HSG	预靶向肿瘤用于 PET 或放射成像	II 期	结直肠癌, 乳腺癌和肺癌
ABT-981 (AbbVie 公司 (AbbVie))	DVD-Ig	IL-1 α , IL-1 β	阻断 2 种促炎细胞因子	II 期	骨关节炎
ABT-122 (AbbVie 公司)	DVD-Ig	TNF, IL-17A	阻断 2 种促炎细胞因子	II 期	类风湿关节炎
COVA322	IgG-fynomer	TNF, IL17A	阻断 2 种促炎细胞因子	I/II 期	斑块状银屑病
SAR156597 (赛诺菲公司 (Sanofi))	四价双特异性串联 IgG	IL-13, IL-4	阻断 2 种促炎细胞因子	I 期	特发性肺纤维化
GSK2434735 (GSK 公司)	双靶向结构域	IL-13, IL-4	阻断 2 种促炎细胞因子	I 期	(健康供体)
欧卓瑞立珠单抗 (Ozoralizumab) (ATN103, Ablynx 公司 (Ablynx))	纳米抗体	TNF, HSA	阻断促炎细胞因子, 结合 HAS 以增加半衰期	II 期	类风湿关节炎
ALX-0761 (默克雪兰诺公司 (Merck Serono), Ablynx 公司)	纳米抗体	IL-17A/F, HSA	阻断 2 种促炎细胞因子, 结合 HAS 以增加半衰期	I 期	(健康供体)
ALX-0061 (AbbVie 公司, Ablynx 公司;	纳米抗体	IL-6R, HSA	阻断促炎细胞因子, 结合 HAS 以增加半衰期	I/II 期	类风湿关节炎
ALX-0141 (Ablynx 公司,	纳米抗体	RANKL, HSA	阻断骨吸收, 结合 HAS 以增加	I 期	绝经后骨质流失

[0150]	名称(别名, 赞助机构)	BsAb 形式	靶标	建议的作用机制	研发阶段	疾病(或健康供体)
	亿腾医药公司 (Eddingpharm))			半衰期		
	RG6013/ACE910 (Chugai 公司 (Chugai), 罗氏公司)	ART-Ig	因子 IXa, 因子 X	血浆凝固	II 期	血友病

实施例

[0151] 实施例1: 鉴定高表达和稳定的基因座

[0152] 筛选使用随机整合构建的产生单克隆抗体 (mAb) 的400个GS-CHOK1SV™克隆细胞系(瑞士巴塞隆萨公司(Lonza))中满足下述标准的克隆细胞系: 高qmAb (>1.25pg/细胞小时), 稳定的生产率(≥70世代) 和合适的生长 (IVCC>1500x 10⁶细胞/mL细胞, $\mu \sim 0.03$ 小时⁻¹)。这些细胞的大部分源自两个公开的隆萨公司项目 (Porter等, Cell Culture and Tissue Engineering 26:1455-1464 (2010) 和Povey等, J Biotechnol 184:84-93 (2014)) 并且用于构建GS-CHOK1SV™克隆细胞系的过程详述于Porter等, 2010中。简言之, 将编码mAb的PvuI线性化 (PvuI-linearized) Lonza谷氨酰胺合成酶 (GS) 表达载体使用标准电穿孔方法导入宿主细胞系CHOK1SV™。将转染混合物分布于80个96孔板。次日, 添加新鲜培养基至平板中的细胞悬浮液; 培养基中蛋氨酸亚砷亚胺 (MSX) 浓度使得各孔中的最终MSX浓度为50 μ M。随着集落生物量增加, 在静态24孔板中培养细胞系, 然后在静止25cm² T-烧瓶中培养细胞系。悬浮培养由混合25cm² T-烧瓶启动, 并扩增用于10L分批补料生物反应器培养和冷冻保存。

[0153] 将这20种细胞系的最低世代数安瓿培养至指数中期培养期, 使用qPCR (β 内酰胺酶基因的引物/探针组) 分析整合的载体拷贝数。将鉴定为满足拷贝数标准 (各基因组≤5个 β 内酰胺酶拷贝) 的五种细胞系 (964E7、952C8、2A6、E22和E14) 取样用于侧翼序列鉴定。

[0154] 用衍生自前述5种细胞系的细胞制备基因组DNA (gDNA) 提取物, 并进行序列捕获分析。NimbleGen SeqCap靶向富集 (Roche NimbleGen有限公司 (Roche NimbleGen, Inc.), 美国麦迪逊) 使用针对携带mAb基因的谷氨酰胺合成酶 (GS) 表达载体内的区域设计的诱饵在源自重组细胞系的片段化gDNA上完成。洗脱靶富集的汇集并通过Illumina MISEQ® (下一代基因测序 (Next Gen Sequencing), 亿明达公司 (Illumina), 美国加利福尼亚州圣地亚哥) 测序。通过全基因组重测序 (WGRS) (BGI公司, 中国香港大埔区) 分析相同的五种细胞系, 并使用靶向的基因座扩增 (TLA) (Cergentis BV公司, 荷兰) 分析两种选择的细胞系 (964E7和952C8), 以验证靶向测序和WGRS的结果。

[0155] 进行测序读数的生物信息学分析。将捕获测序数据映射到基因组和载体序列。分裂读数 (一半来自基因组, 一半来自载体) 用于鉴定潜在的整合位点和断裂点。此外, 还鉴定了表明载体插入的读数对 (一端位于基因组, 一端位于载体), 以提供整合位点的支持证据。由序列捕获数据鉴定潜在的整合位点的列表, 并且通过支持证据对位点进行排序。将WGRS数据映射到所有潜在的整合位点, 以提供额外的支持证据。将映射跨过断裂点的WGRS读数以及覆盖断裂点的读数对计为阳性支持。对于各整合位点, 左 (L) 和右 (R) 用于指基因组序列的位置 (根据灰仓鼠 (Cricetulus griseus) 支架和重叠群序列总是5'至3')。在左侧或右

侧,将载体以正向(F)或反向(R)插入。关于细胞系964E7和952C8的数据后是通过在Cergentis(荷兰乌特勒支)以邻近连接的靶向测序,参见,例如,de Vree等,Nat Biotechnol.32:1019-25(2014)。

[0156] 通过横跨所有5种细胞系中预测的基因组:载体边界的PCR扩增验证整合位点。表9总结了这些整合位点的发现,以及这些重组细胞系的 β -内酰胺酶基因拷贝数、生产力和生长数据。在5种细胞系中通过PCR确认了总共6个位点(新基因座1-6(NL1-6)),其中3个通过跨越两个基因组载体边界的PCR确认(NL1、NL2和NL4),而其中3个仅在其中一个边界确认(NL3、NL5和NL6)。

[0157] 表9

[0158]

细胞系	细胞系数据							基因组载体边界确认	支架编号
	β -内酰胺酶拷贝/基因组	mAb	qP (pg/细胞天)	宿主	效价 (g/L)	IVCC (10^6 细胞/小时 mL)	稳定性 (G)		
964E7	2.8	H31K5	48	CHOK1SV™	7.6	3764	81G	两侧	gI351515650
952C8	3.0	H31K5	47	CHOK1SV™	4.0	2039	69G	两侧	gI351517715
2A6	3.7	cB72.3	23	GSKO	6.0	6122	70G	一侧	gI351516540
E22	2.6	cB72.3	23	GSKO	6.0	5109	70G	两侧	gI351516248
E22								一侧	gI351517397
E14	2.8	cB72.3	19	GSKO	4.8	6015	70G	一侧	gI351516957

[0159] 因为衍生细胞系964E7和952C8与其他3种细胞系具有相似的整合 β -内酰胺酶拷贝,但实现了更高的特异性生产率(47-48pg/细胞天)(这表明这些区域支持更高的重组基因表达),基因座NL1和NL2发展成SSI着陆坪整合。从CHOK1SV™衍生物宿主中产生的重组细胞系中选择基因座并使用GS选择标志物(参见描述RMCE步骤的第2阶段)确保基因座与基于GS表达系统的系统相容。已经证明这些基因座支持稳定的重组基因表达(qP:23-48pg/细胞天),而不会负面影响对生长重要的过程(IVCC:2039-6015 $\times 10^6$ 细胞/小时mL)。

[0160] 实施例2:工程改造着陆坪至选择的基因座的组合。

[0161] 将适用于后续RMCE的着陆坪整合到CHOK1SV GS-KO™宿主细胞系中。

[0162] 首先将着陆坪(着陆坪A:图2)分别整合到Fer1L4(参见例如,W02013190032A1和EP2711428A1)(图4:克隆7878和8086,图7:克隆11434),NL1(图4:克隆8096和9113)和NL2(克隆9116和9115)基因座中。选择克隆11434(Fer1L4基因座中的着陆坪,着陆坪A:图2A)用于工程改造位于NL1的第二着陆坪(着陆坪B:图2A)。该决定是基于当使用GS选择时完成RMCE的能力,在重复亚培养期间库中RFP表达的稳定性以及在收获时分泌到分批补料培养的培养基中的mAb的浓度做出的。我们已经成功地证明了A或B型着陆垫可以进入表1中任何基因座的一般可能性。共生成了6个多位点SSI克隆(12151、12152、12606、12607、12608和12609)。这些2位点宿主在Fer1L4中具有着陆坪,包含侧接Frt F5和野生型Frt F RTS的Hpt-eGFP融合体,以及在位点2的第二着陆坪,其包含侧接Frt F14和Frt F15RTS的PAC-DsRed融合基因(NL1基因座中的着陆坪,着陆坪B:图2)。SV40E启动子和选择标志物之间Frt位点的位置将用于后续轮的RMCE。

[0163] 针对CHOK1SV GS-KO™单一和多着陆坪宿主中RMCE设计的靶向载体包含邻近与目标着陆坪相容的Frt位点3'设置的GS cDNA(图2B)。载体的剩余部分包含GOI(例如,mAb)的

转录单元,其后是与着陆坪中第二Frt位点相容的Frt位点。靶向载体DNA(图3A)与表达FlpE重组酶的载体(图3B)共转染(分别以1:9的质粒摩尔比率)。将转染的细胞在6mM谷氨酰胺存在下孵育24小时,以允许瞬时表达FlpE重组酶。然后洗涤该转染子库,并在缺乏谷氨酰胺的培养基中孵育。在整个选择过程中监测活细胞浓度和培养活力。成功的RMCE的标志是Hpt-eGFP基因的丢失并被靶向载体中的GS基因替换。所有的转染中包括no-FlpE对照(不含pMF4的靶向载体DNA的转染),以确认任何回收是瞬时FlpE重组酶表达(RMCE)的结果。在成功的RMCE后,细胞在荧光显微镜下或用流式细胞术分析显示为深色。由于CHOK1SV GS-KOTM宿主缺乏功能性内源性GS基因,具有GS中靶整合的那些细胞能够在不存在谷氨酰胺的情况下生长,并且转染后12-14天培养物活力高于95%。由于靶向载体中的GS cDNA缺乏启动子,因此GS基因的脱靶整合的可能性非常低,这将导致足够的GS蛋白质量能够在不存在谷氨酰胺的情况下生长。通过抑制内源性酶活性的选择可能具有脱靶作用(例如,MSX,参见Feary等, *Biotechnol. Prog.* (2016)),并且因此在不存在代谢物如谷氨酰胺的情况下的选择是有利的。该选择系统非常严格,转染后14天非交换细胞的百分比(通过存在GFP荧光标记)通常在约2-5%并且容易通过荧光辅助细胞分选除去。如果两个位点被一个载体靶向,那么可以将多个Frt位点设置为简化转染的多联体。

[0164] 实施例3:分别在CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主中评估Fer1L4、NL1和NL2基因座

[0165] 然后测试了Fer1L4、NL1和NL2基因座支持重组基因表达和完成RMCE的能力。将靶向载体pMF25(图3A)和重组酶载体pMF4(图3B)共转染至6个CHOK1SV GS-KOTM(图4: Fer1L4基因座:7878和8086, NL1:8096和9113, NL2:9116和9115)单一着陆坪SSI宿主并在无谷氨酰胺培养基中孵育以选择具有完成的RMCE的细胞。在RMCE之前和在无谷氨酰胺培养基中11天后通过流式细胞术分析这些CHOK1SV GS-KOTMSSI库(图4)。由于克隆中的着陆坪(着陆坪A,图2)包含Hpt-eGFP报告基因(在绿色通道中检测到)并且pMF25靶向载体包含DsRed报告基因(在黄色通道中检测到),因此通过从+GFP, -YFP变化到-GFP, +YFP荧光证明了RMCE的成功。

[0166] 然后测试SSI宿主克隆11434(Fer1L4基因座中的着陆坪,着陆坪A:图2)产生治疗性mAb的能力。产生含有利妥昔单抗、cB72.3和H31K5的转录单元的载体,其靶向克隆11434中的Fer1L4基因座(参见图5)。然后构建CHOK1SV GS-KOTM库并在分批悬浮培养中培养8天。收获时分泌的mAb的浓度通过收获时的蛋白A HPLC测定(参见图6)。这些数据显示了复制库之间和不同mAb(250-300mg/L)之间非常一致的表达。

[0167] 实施例4:在多位点CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主中评估Fer1L4和NL1

[0168] 通过流式细胞术分析实施例2中所述的6个多位点宿主以证实基因座支持重组基因表达的能力(图7)。整合在Fer1L4基因座处的着陆坪(图2:着陆坪A)包含Hpt-eGFP基因,而整合在NL1基因座处的着陆坪(图2:着陆坪B)包含PAC-DsRed基因。在绿色通道中检测eGFP荧光,在黄色通道中检测DsRed。CHOK1SV GS-KOTM宿主(宿主)用作阴性对照。克隆11434(着陆坪在Fer1L4基因座中,着陆坪A:图2)用作eGFP荧光的阳性对照。将通过随机整合(DsRed RI对照)产生的表达DsRed基因的CHOK1SV GS-KOTM库用作Dsred荧光的阳性对照。如预期,所有6个多位点CHOK1SV GS-KOTMSSI克隆(12151、12152、12606、12607、12608和12609)具有与11434和DsRed RI对照相似的eGFP和DsRed荧光强度(图7)。这表明了两个位点都能够支持外源基因的表达。接下来,确认了多位点宿主完成RMCE的能力。将靶向载体pCM9(图8A,包含E2深红色表达盒并靶向着陆坪A: Fer1L4)和pCM11(图8B,包含E2深红色表达盒并靶

向着陆坪A:NL1) 转染到多位点CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主12151中。在无谷氨酰胺培养基中孵育库以选择具有完成的RMCE的细胞。无FlpE对照并没有用RMCE库回收。在RMCE之前和在无谷氨酰胺培养基中14天后通过流式细胞术分析这些CHOK1SV GS-KOTMSSI库(图8)。由于CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主中的着陆坪A(着陆坪A,图2)包含Hpt-eGFP报告基因并且pCM9靶向载体包含E2深红色报告基因(在红色通道中检测到),因此通过从+GFP,-RFP变化到-GFP,+RFP荧光证明了RMCE的成功。CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主中的着陆坪B(着陆坪B,图2)包含PAC-DsRed报告基因,然而并未在流式细胞仪上检测到DsRed信号(图9)。pCM11靶向载体包含E2深红色报告基因并因此通过从+GFP,-RFP变化到+GFP,+RFP证明了在没有失去着陆坪A(含有Hpt-eGFP基因)的情况下RMCE的成功(图9)。

[0169] 为了理解治疗性蛋白质系统的益处,测试了CHOK1SVTMSSI多位点宿主(参见图2)对于表10中所概述的治疗性蛋白质的表达。实验分为三个阶段;阶段1:测试多位点SSI的应用以增加qP;阶段2:测试多位点SSI在两个着陆坪上表达三基因双特异性mAb的能力;阶段3:在一个位点表达辅助基因,以协助表达在另一个位点编码的DtE蛋白。

[0170] 表10

[0171]	阶段	原理	治疗性蛋白	辅助基因
	1	多个 SSIS 中的 mAb 基因以增加 qP	利妥昔单抗, cB72.3 和 H31K5 等	N/A
	2	由着陆坪表达的> 2 条链 DtE 基因和双特异性 mAb	色古土珠单抗阿木纳白细胞素等	N/A
	3	辅助基因表达以增加 DtE 的产物质量	英夫利昔单抗等	来自美国专利申请号 62/322,621 中鉴定的候选物的脂质基因,通过引用纳入本文,表 11 中的 miRNA 海绵载体和任何血液因子蛋白酶

[0172] 阶段1:一些单一位点SSI系统的限制是必需的转录单元的单个拷贝不足以产生用于临床制造的合适效价。因此,我们评估了使用多位点SSI以增加mAb基因的整合拷贝数的选项。测试了使用单克隆抗体利妥昔单抗增加整合的拷贝数的两种方法。在第一种方法中,产生靶向载体,其含有四个mAb表达盒(图10B:pCM38=2×HC和2LC)并且靶向在CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主中的着陆坪A(着陆坪A,图2A)。将该载体和两个mAb表达盒等同载体(图10A:pMF26)分开(一式两份)转染到GS-KO SSI宿主克隆12151中(图10A和B),并在无谷氨酰胺培养基中选择库(详细的转染方法参见实施例2)。在第二种方法中,生成了除了靶向着陆坪B(着陆坪B,图2A)的新霉素磷酸转移酶基因(NEO)之外还含有2个mAb表达盒的靶向载体(图10C和D:pAR5=1×HC和1×LC)。还产生了缺乏mAb基因的pAR5的形式,并称为pCM22(图10C)。CHOK1SV GS-KOTMSSI库用pMF26转染并在无谷氨酰胺培养基中选择,然后用pAR5(图10D)或pCM22(图10C)转染(一式两份)(详细的转染方法参见实施例2),在pMF4(图3B)存在的情况下孵育24小时,然后在400μg/mL遗传霉素(G418)中选择。与在无谷氨酰胺培养基中的选择一致,在G418存在的情况下培养时无-FlpE对照没有用RMCE库回收。从选择中回收后,将8个RMCE库进行传代培养,然后进行8天的分批培养。使用Vice11细胞计数器在第4、6和8天确定活细胞浓度,并且使用蛋白A传感器通过ForteBio Octet确定收获时分泌的mAb的浓度。计算利妥昔单抗的细胞特异性生产率(收获时的qmAb)(参见图11)。这些数据表明,

两种情况都是由CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主提高细胞特异性mAb生产率的可行选择。

[0173] 阶段2:对于大多数下一代抗体(例如,四价双特异性抗体),多个重链或轻链的组装是一个经常出现的问题。为了获得具有极少不需要的副产物的最佳产品质量,选择在稳定且可重复的情况下表达多达4种抗体链的合适CHO克隆是有益的。因此,通常需要在克隆选择期间利用ELISA、RP-HPLC或CD-SDS进行大量的产物分析。然而,在多位点SSI细胞系中,编码多链蛋白的基因由单独的启动子驱动,并在至少两个位点上空间分开。这确保了单个链的拷贝数和相对表达早在转染子库中就是一致的,并且能够通过编码转录单元的启动子强度或拷贝数操作实现各个多肽链的可用性的经验微调。这样做的好处是产品质量更加一致,减少了由SSI生成的库和细胞系产生的错误折叠的多链重组蛋白的比例,显著地回避了早期评估的需要。因此,我们评估了使用多位点SSI表达由下述三种基因编码的色古土珠单抗阿木纳白细胞素的机会:LC、HC和HC-IL2(Klein等, *Oncoimmunology* 6:3(2017))。我们测试了将这三种基因插入CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主基因组的两种方法。在该实验中(阶段2),使用了小鼠巨细胞病毒第一即可早期基因(IE1)(mCMV)启动子(EP 1525320)与人内含子A(Addison等, *Journal of General Virology*, 78(1997)),而不是hCMV启动子,以驱动重组蛋白质的表达。在第一种方法中,我们使用靶向载体pAB2将色古土珠单抗阿木纳白细胞素LC、HC和HC-IL2插入了着陆坪A(图12A)。如实施例2中所述,在不存在谷氨酰胺的情况下进行选择。在第二种方法中,用pAB5(图12B)转染CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主,所述pAB5包含靶向着陆坪A(图2)的色古土珠单抗阿木纳白细胞素LC和HC-IL2的表达单元。如实施例2中所述,在不存在谷氨酰胺的情况下进行选择。随后我们生成了这样的靶向载体,其包含单一色古土珠单抗阿木纳白细胞素HC表达盒(图12C:pAR2)以及靶向着陆坪B(着陆坪B,图2A)的新霉素磷酸转移酶选择标志物基因(NEO)。还产生了缺乏mAb基因的pAR2的形式,并称为pCM46(图12B:pCM46)。CHOK1SV GS-KOTMSSI库用pAB5转染并在无谷氨酰胺培养基中选择,然后用pCM46或pAR2转染(一式两份)(详细的转染方法参见实施例2),并在包含400μg/mL遗传霉素(G418)的培养基中选择。还构建了对照库:用空载形式的pAR2进行“模拟”转染,并将三个库用于鉴定CEA-IL2v抗体种类,所述三个库各自缺少编码色古土珠单抗阿木纳白细胞素的三种基因之一(LC+HC、LC+HC-IL2和HC+HC-IL2)。从选择中回收后,将RMCE库进行传代培养,然后进行8天的分批培养。使用Vice11细胞计数器在第4、6和8天确定活细胞浓度。通过在10% Bis-Tris SDS PAGE凝胶上非还原分析上清液(图13A)以及后续的光密度分析(ImageJ软件)(图13B)确定色古土珠单抗阿木纳白细胞素组装物种类。这些数据表明,当色古土珠单抗阿木纳白细胞素LC、HC和HC-IL2基因被插入到着陆坪A时,可以看到单个链的表达低以及仅有少量被认为是完全组装的产物。相反,当色古土珠单抗阿木纳白细胞素LC和HC-IL2靶向着陆坪A并且HC靶向着陆坪B时,单个链的表达增加并且检测到更完全组装的产物。该结果的再现性(在重复库中)支持使用多位点SSI方法调整各链的相对量以提高产品质量的机会。双特异性组装所需的基因已经在两个位点分开(并且没有在第二位点装满)并且表现出表达的改善。

[0174] 阶段3:旨在增加CHOK1SV GS-KOTM细胞系分泌能力的内源蛋白的表达被证明是增加产物效价的可靠方法。在多位点SSI细胞系中评估PCT申请W02015018703A1中鉴定的候选物以及表10、11和12中那些。为了测试该概念,构建了表达靶向着陆坪A的依那西普的载体(图14A、B和C:pTC1)。将该载体分别(一式两份)转染到CHOK1SV GS-KOTMSSI宿主中(图14),

并在无谷氨酰胺培养基中选择库(详细的转染方法参见实施例2)。

[0175] pCM39-pCM45包含辅助基因的表达单元,其受控于人巨细胞病毒主要立即早期(hCMV)启动子(具有其第一内含子A)并靶向着陆坪B(图14)(表11和12)。在pCM39-42中,硬脂酰-辅酶A去饱和酶-1(Scd1)和固醇调节元件结合蛋白1(SREBF1)的变体靶向NL1基因座。在pCM43、44和45中,构建了具有来自序列gb:CQ871827的c-末端PEST序列(SEQ ID NO:38)的短寿命GFP(或dsGFP),并且将miR靶序列的6个拷贝插入CPEB2A(pCM43)、CEPB2B(pCM44)和SRP α (pCM45)的3'UTR中。这些靶向载体包含新霉素磷酸转移酶基因(NEO),并在转染(以pMF4)各载体到重复pTC01转染的库后24小时,使用补充有400 μ g/mL G418的培养基实现选择。在成功回收库和至少一次传代培养后,建立8批次培养物。使用Vice11细胞计数器在第4、6和8天确定活细胞浓度,并且使用蛋白A传感器通过ForteBio Octet确定收获时分泌的mAb的浓度。提供了活细胞浓度的积分(IVCC),细胞特异性生产率(收获时的qP)和分泌的依那西普浓度(参见图15)。这些数据证明表达在3'UTR具有CEPB2A(dsGFP_6n CPEB2A)、CPEB2B(dsGFP_6n CPEB2B)和SRP α (dsGFP_6n SRP α)miR结合位点的小鼠SCD1(mSCD1)和海绵载体升高了分泌的依那西普量。

[0176] 表11

[0177]

辅助基因	载体注释	物种	参考文献
硬脂酰-辅酶A去饱和酶-1(SCD1)	mSCD1	小家鼠(<i>Mus musculus</i>)	如美国专利申请号 62/322,621 所述
	ccmSCD1	针对灰仓鼠(<i>Cricetulus griseus</i>)优化的小家鼠(<i>Mus musculus</i>)密码子	如美国专利申请号 62/322,621 所述
	hSCD1	智人(<i>Homo sapiens</i>)	NM_005063.4
固醇调节元件结合蛋白1	SREBF1	灰仓鼠(<i>Cricetulus griseus</i>)	如美国专利申请号 62/322,621 所述

[0178] 表12

[0179]

miR	靶基因 (3'UTR 中的 miR 结合位点)	海棉序列 (基因 3'UTR 中的 miR 靶序 列)	3'UTR 靶位点的拷 贝
miR-15b 和 miR-16-1	CPEB2A	5'-aggggcaacacagctctgctgcta-3' (SEQ ID NO: 39)	1, 3, 6, 9 和 12
miR-15b 和 miR-16-1	CPEB2B	5'-aagctgtattagctttgctgcta-3' (SEQ ID NO: 40)	
miR-34c	SRPR α	5'-taatcatgttacaatcactgcc-3' (SEQ ID NO: 41)	
miR-708	CNTFR	5'-caccatcagattataagctcctg-3' (SEQ ID NO: 42)	
miR-186	EIF3A	5'-cagctctaaattgaattcttta-3' (SEQ ID NO: 43)	

[0180] 实施例5:CHOK1SV和HEK293细胞系之间的基因座转移

[0181] 为了生成HEK293 SSI宿主,使用加州大学圣克鲁兹分校(University of California Santa Cruz(UCSC))人基因组数据库的独立副本针对人基因组(版本:2006年3月(NCBI36/hg18))进行BLAT搜索CHOK1SV衍生的载体整合位点和着陆坪位置。这在CHOK1SV序列的至少25个碱基对中鉴定了95%(和更高)相似性的序列。在IGV查看器(博德研究所(Broad institute)版本2.4)中显示相似性区域。使用内部Crispr-Cas9设计工具设计Crispr-Cas9 gRNA。在表1中总结CHOK1SV和HEK293基因座。

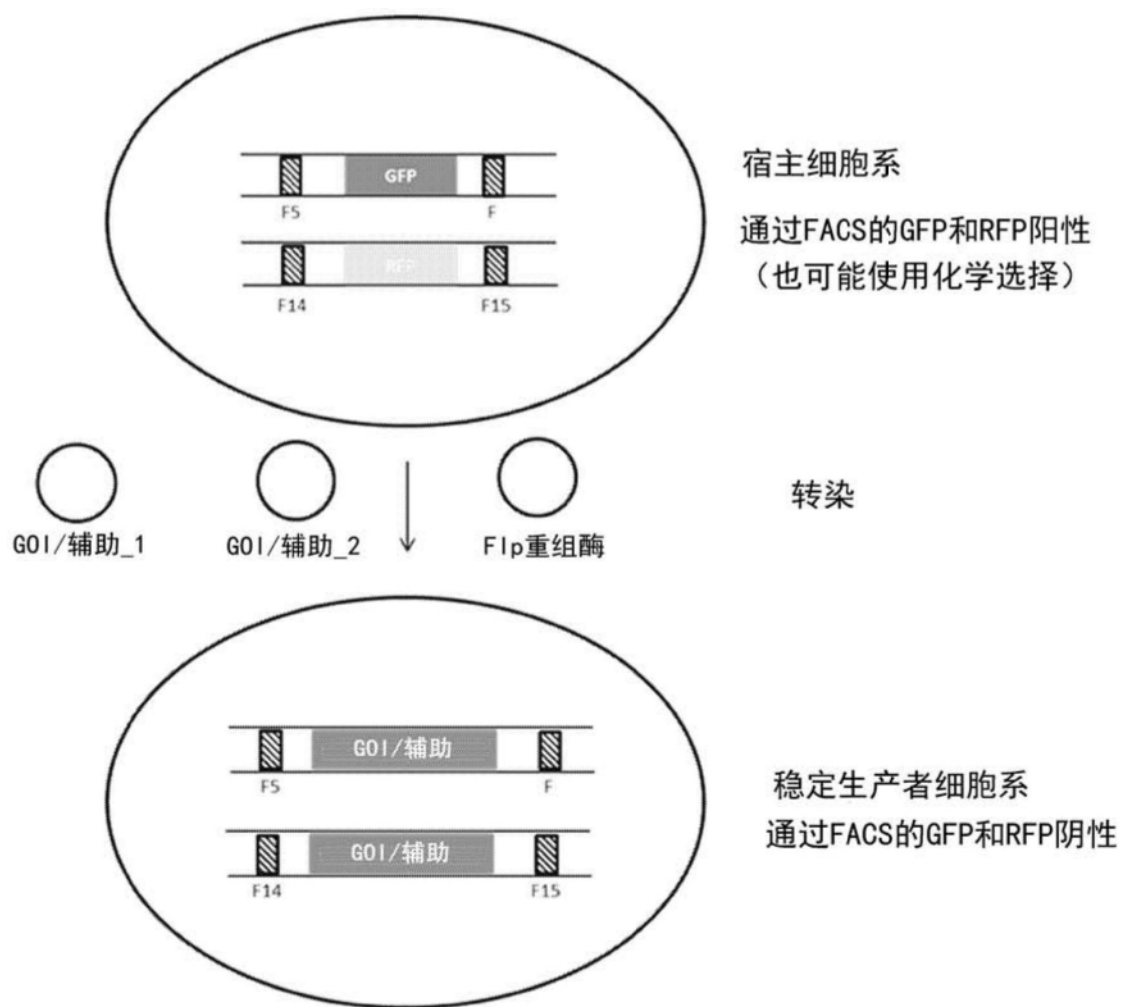


图1

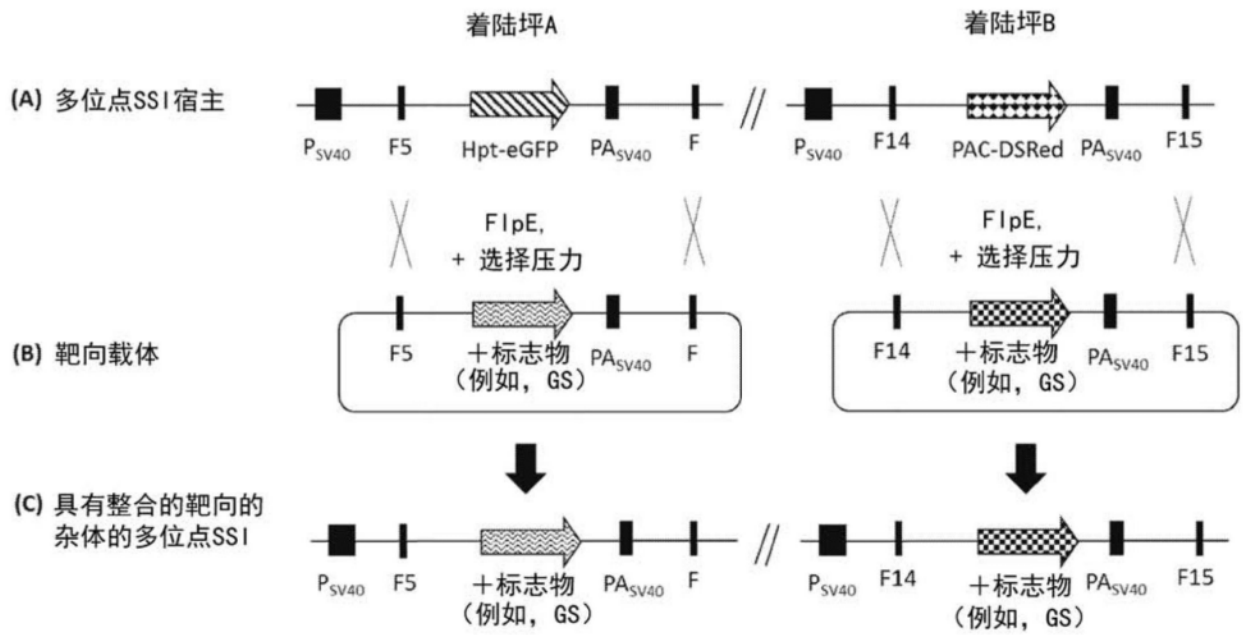


图2

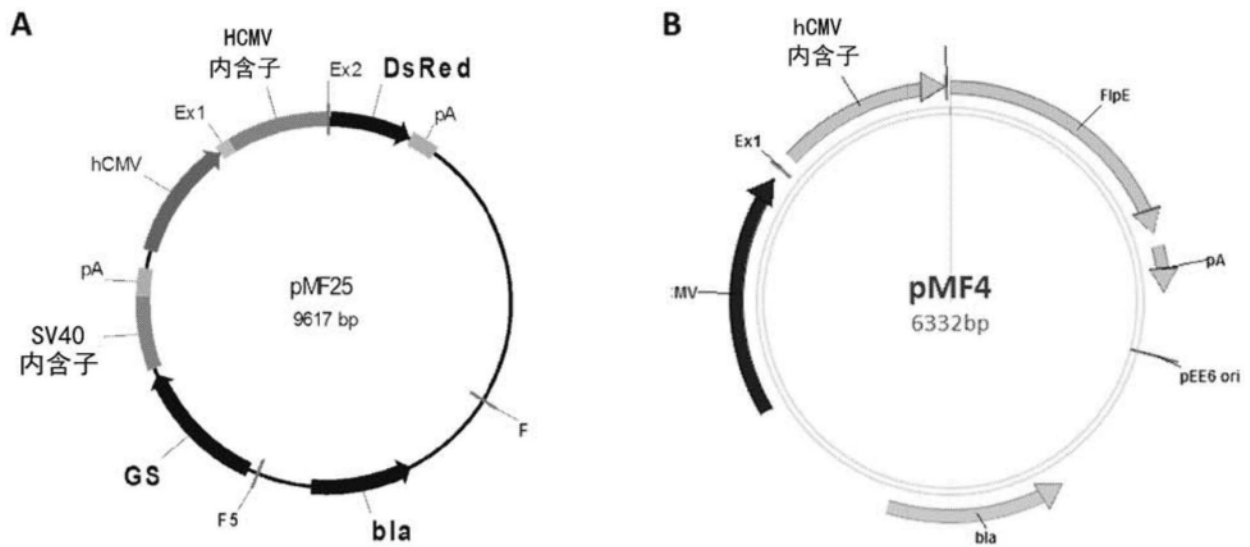


图3

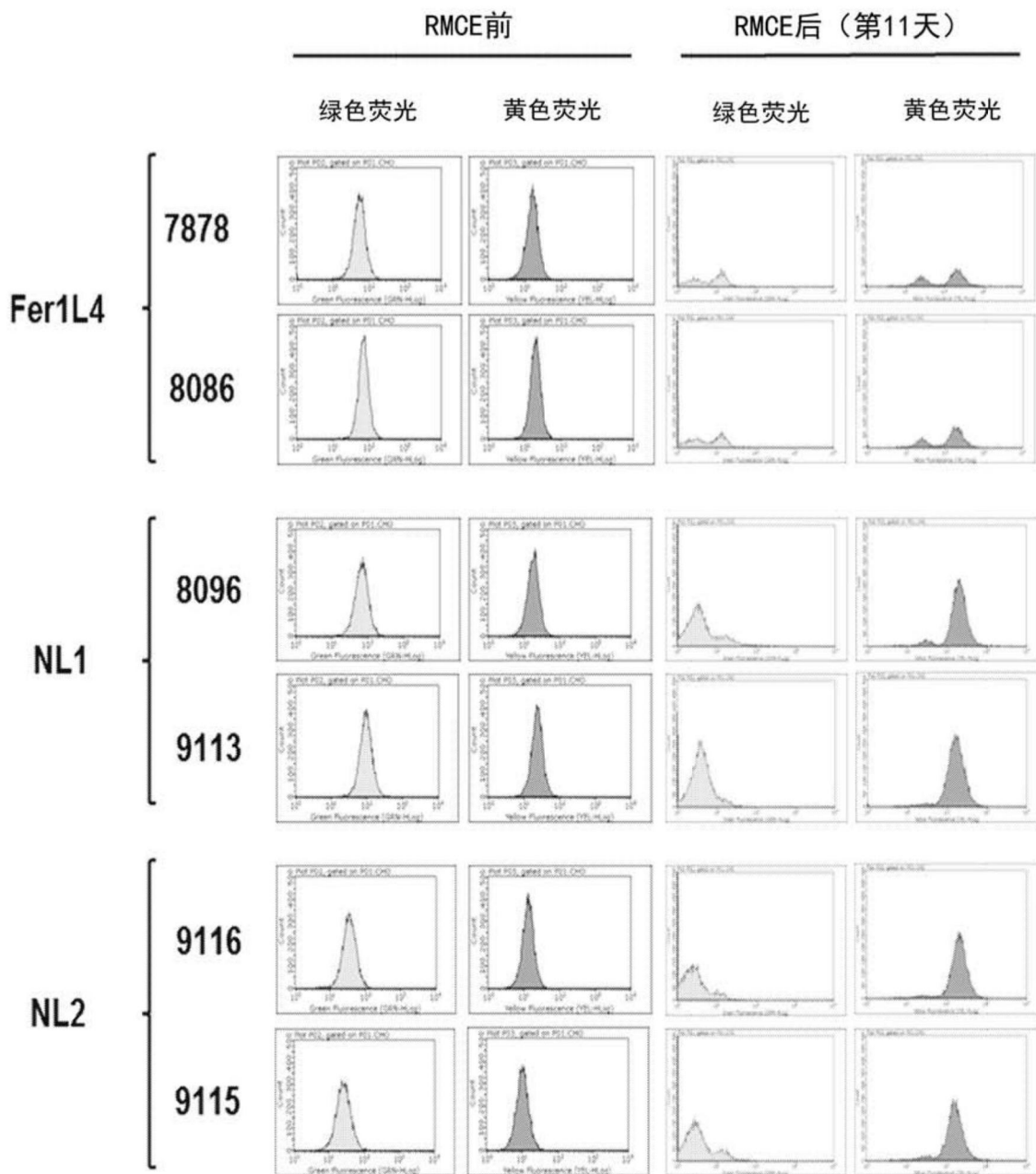


图4

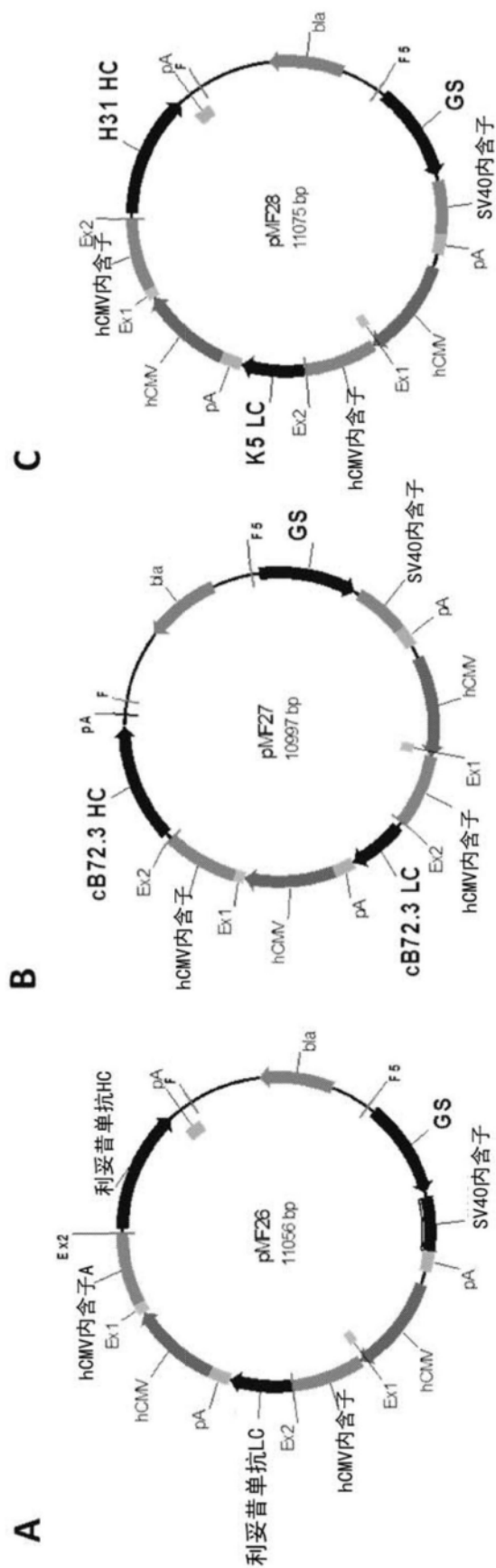


图5

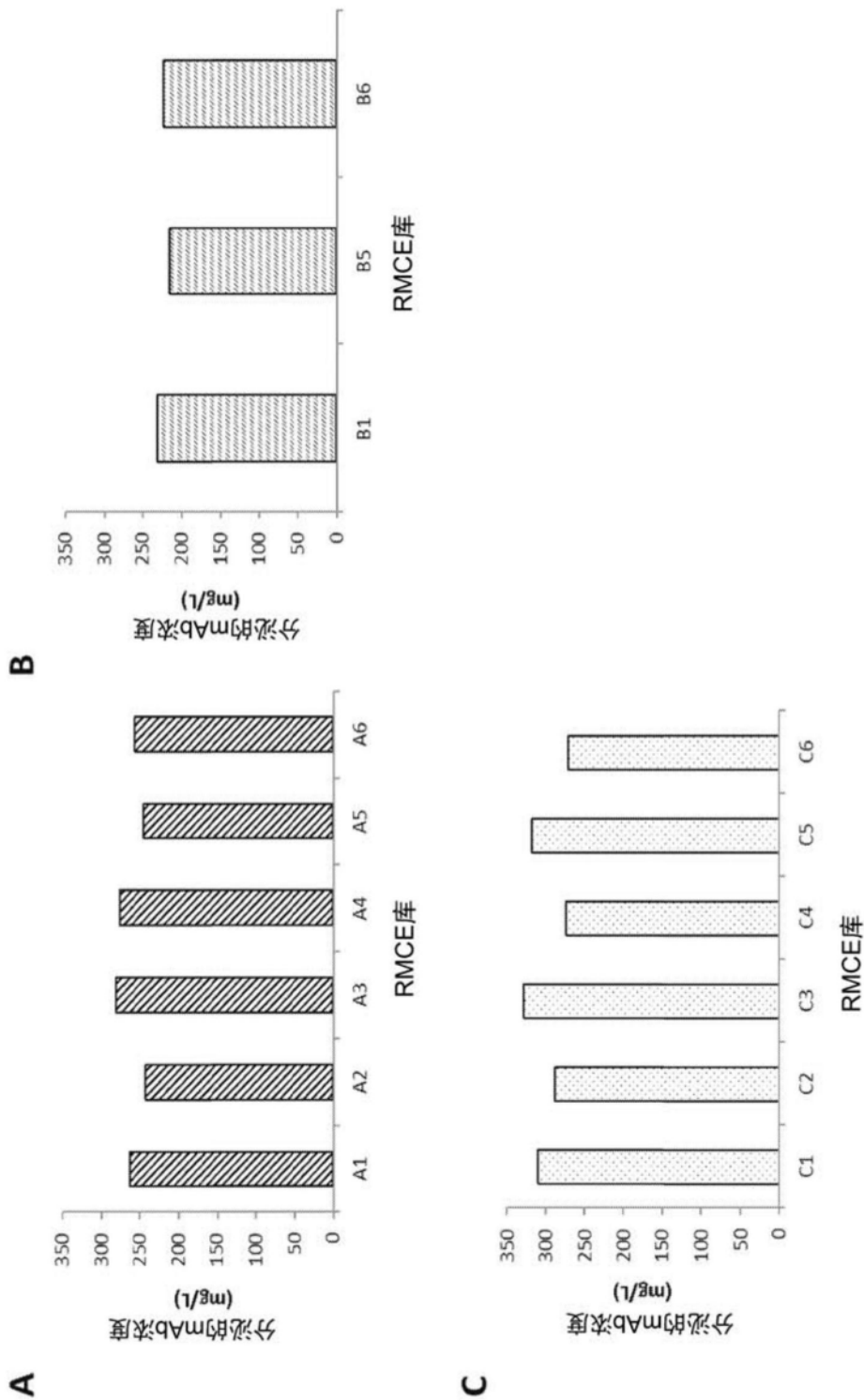


图6

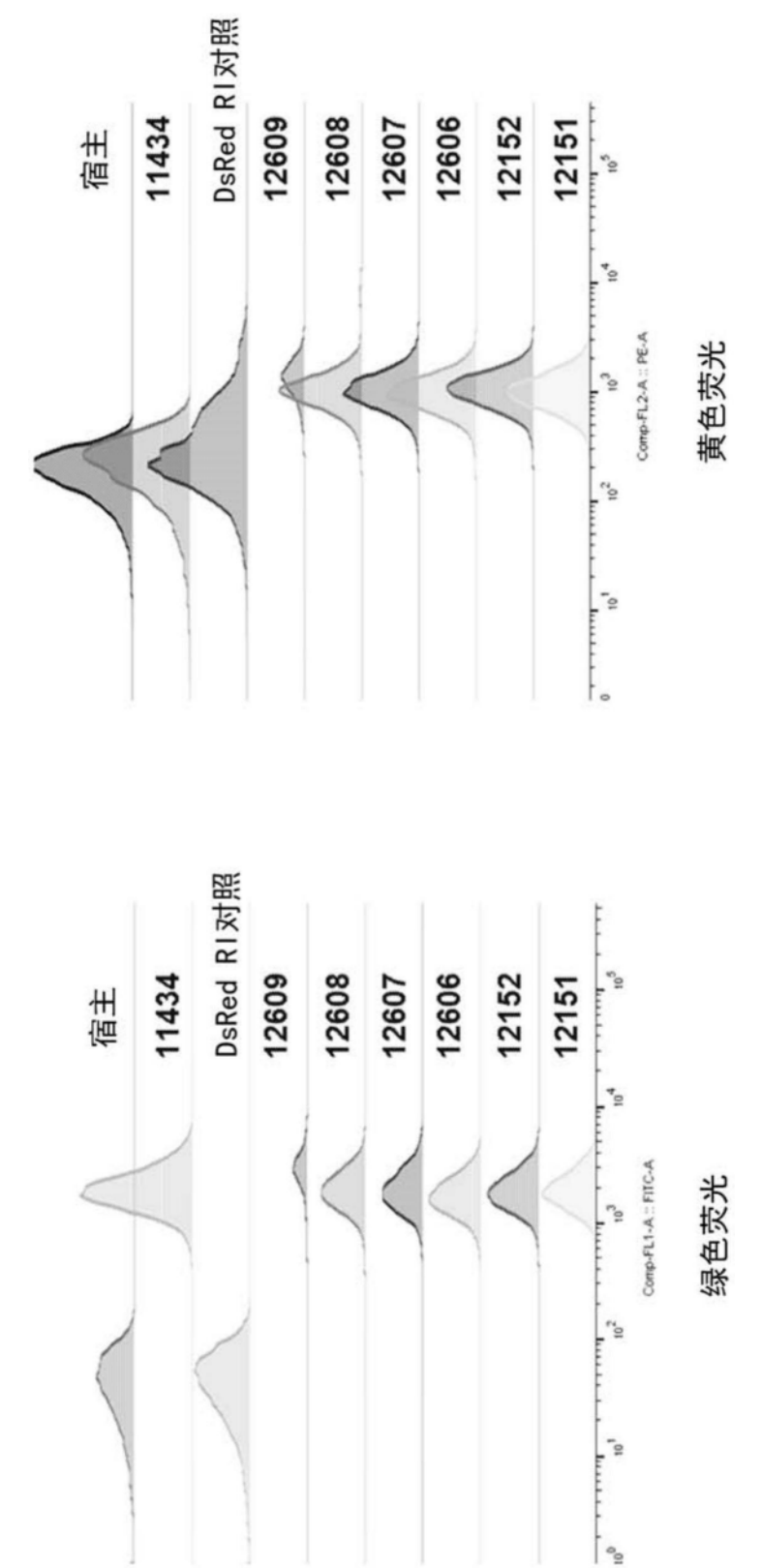


图7

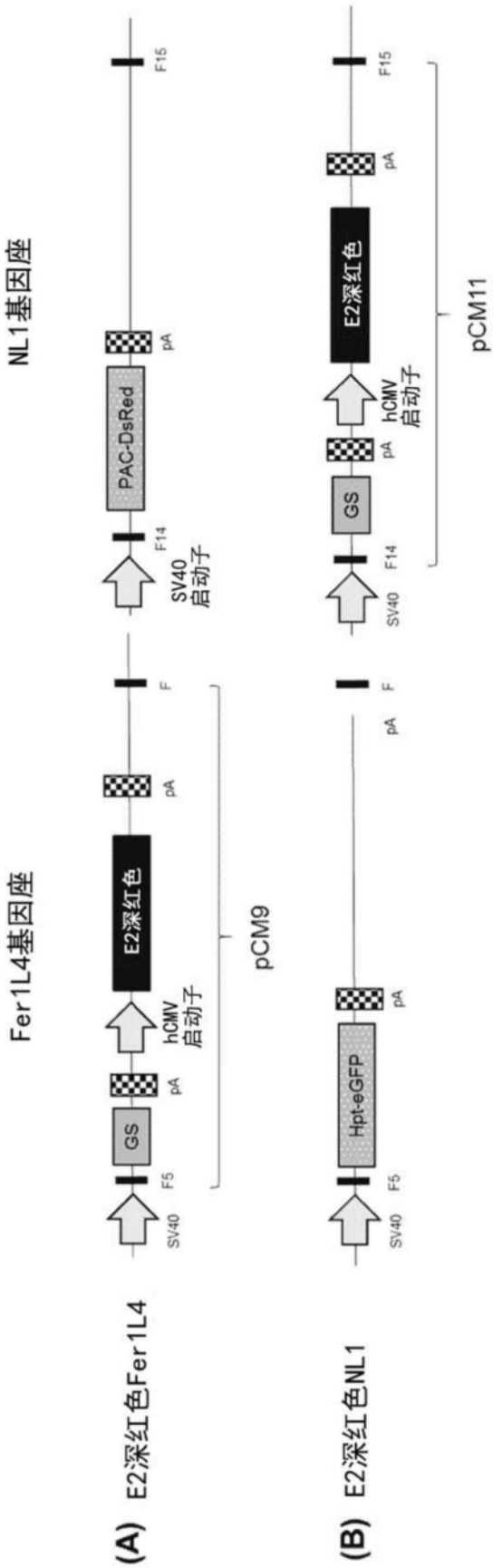


图8

RMCE后 (第14天)

红色荧光

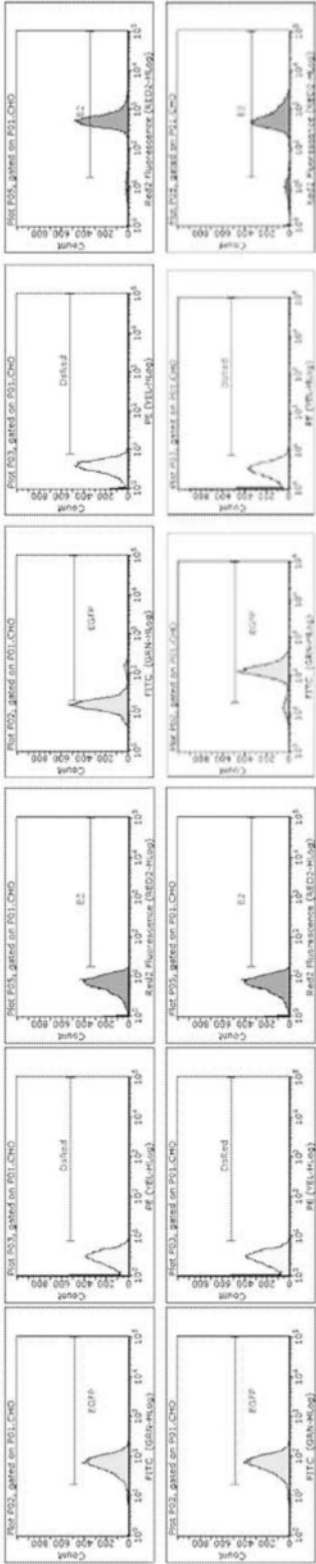
黄色荧光

绿色荧光

红色荧光

黄色荧光

绿色荧光



Fer1L4

NL1

图9

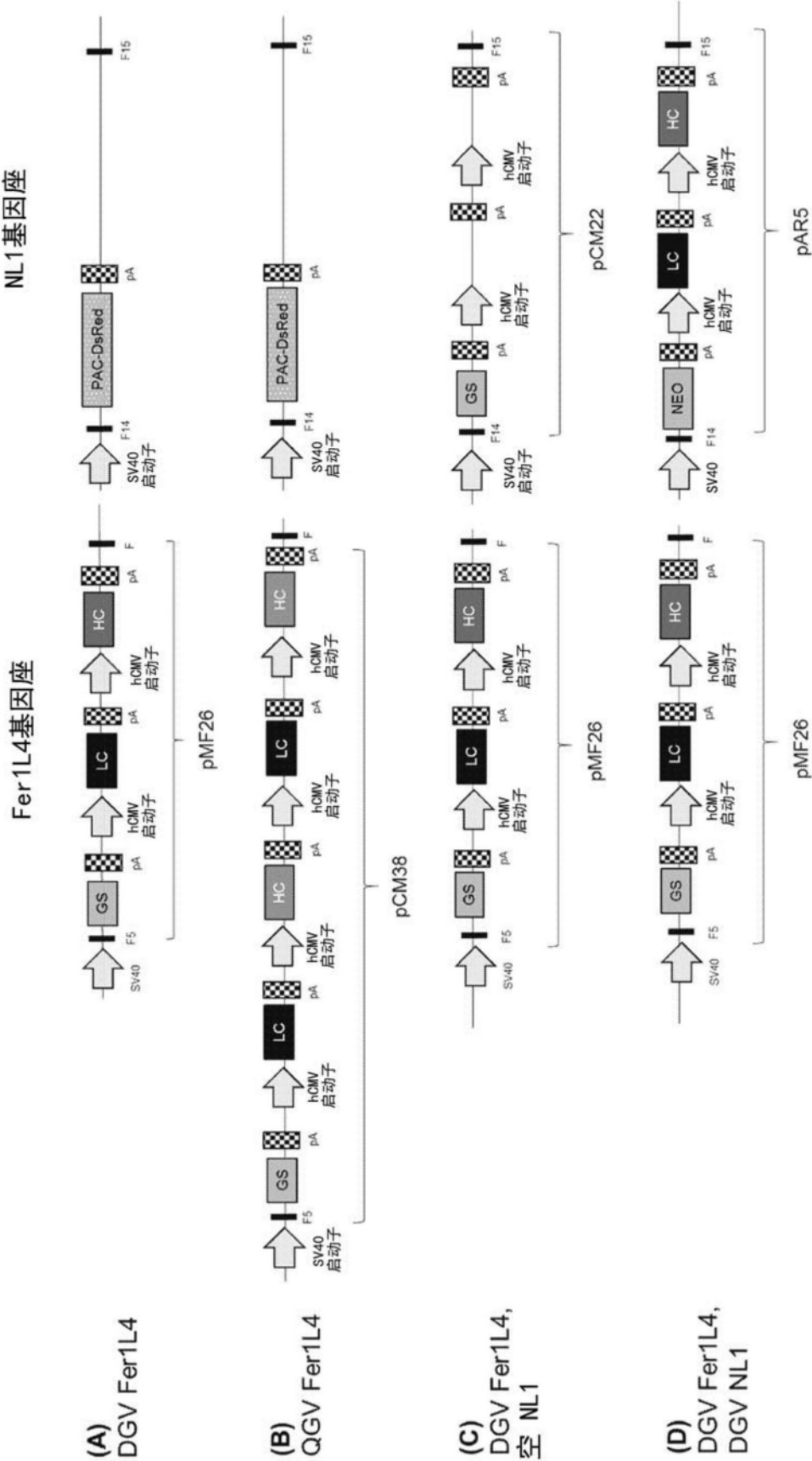


图10

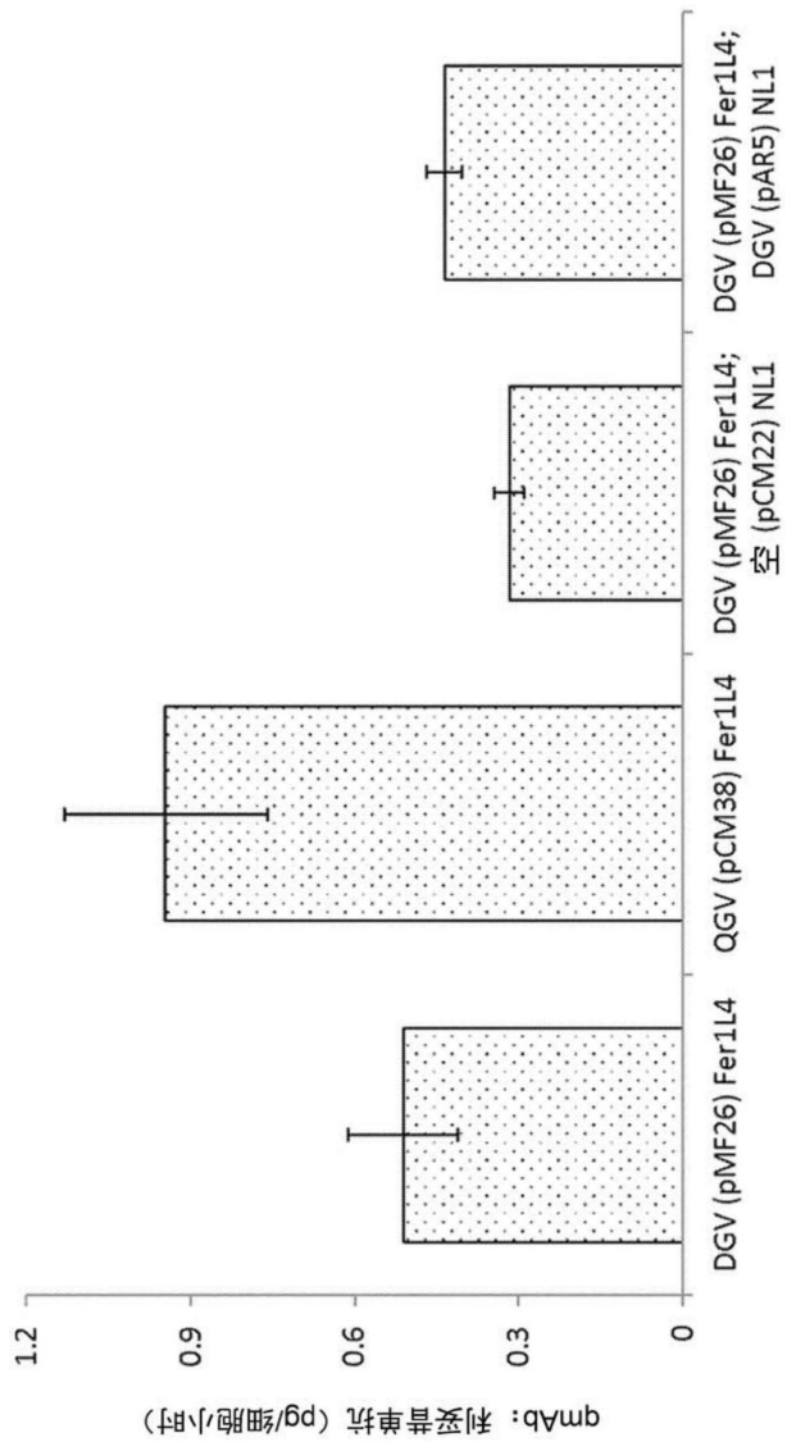


图11

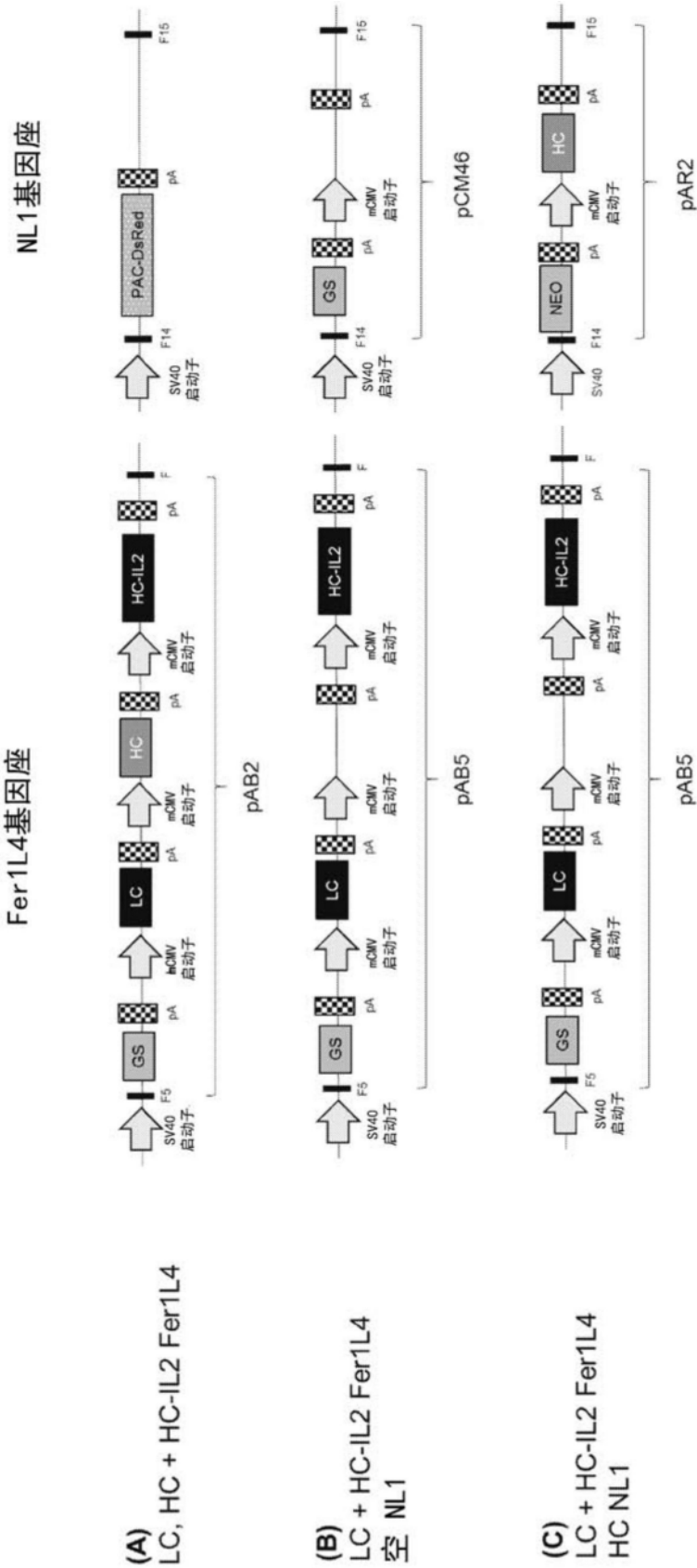


图12

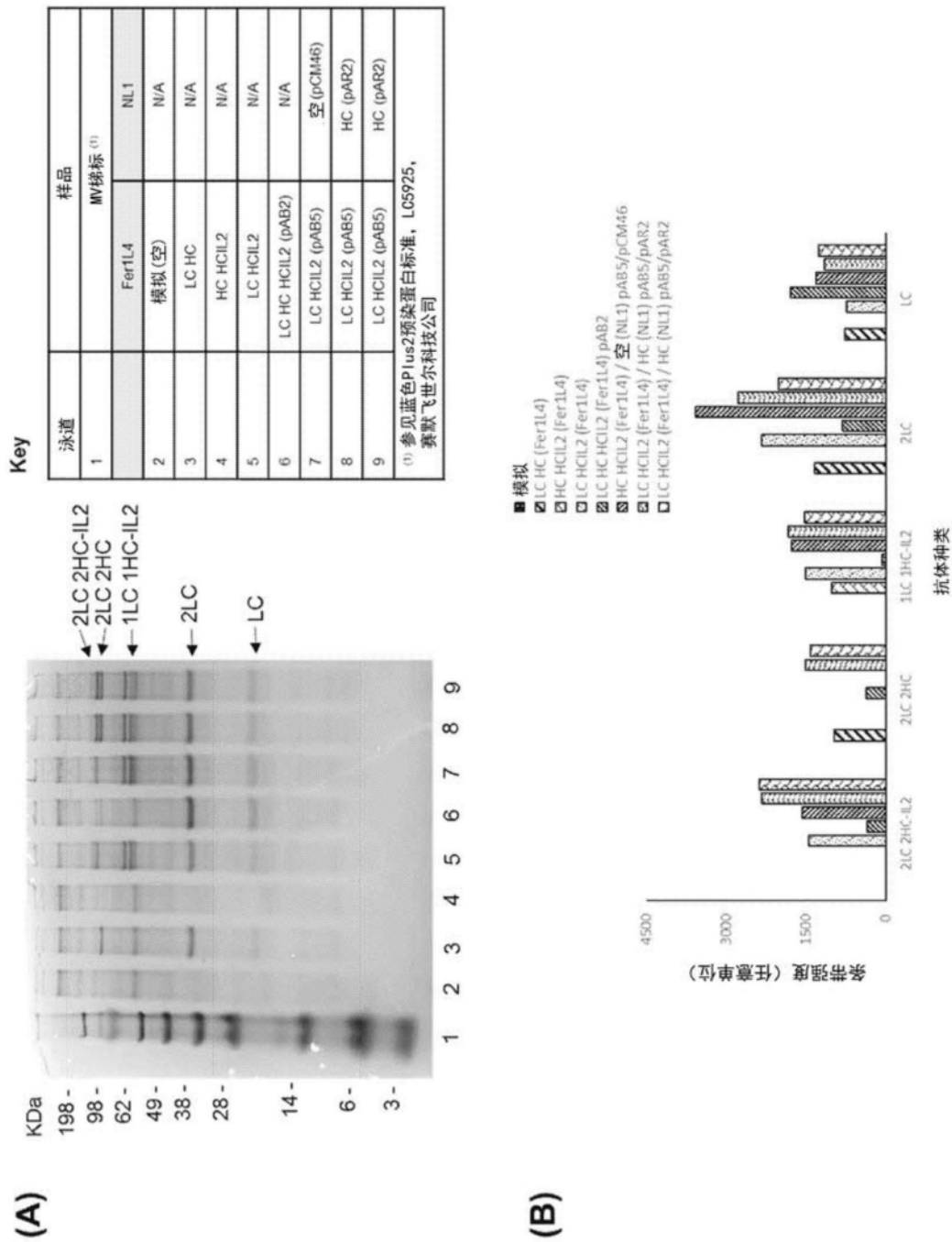


图13

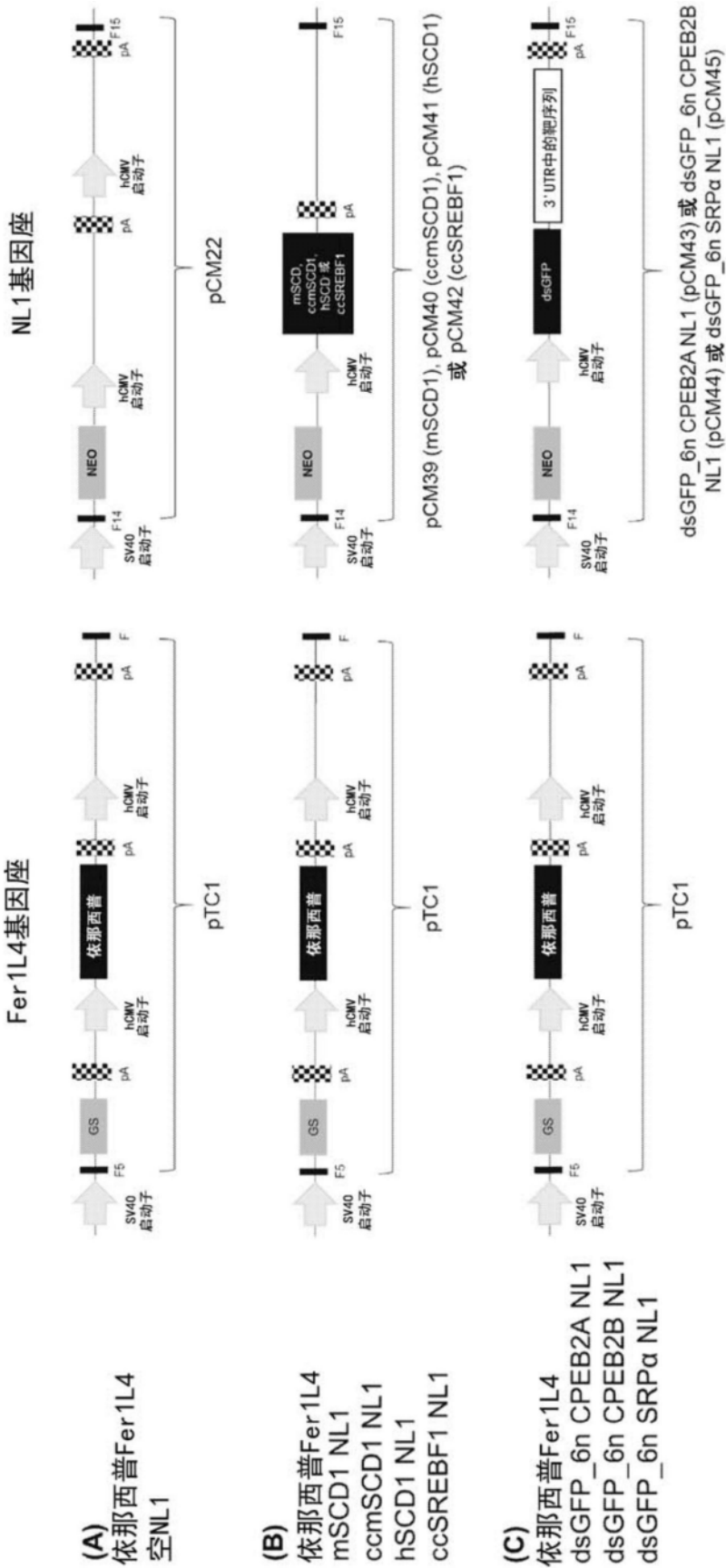


图14

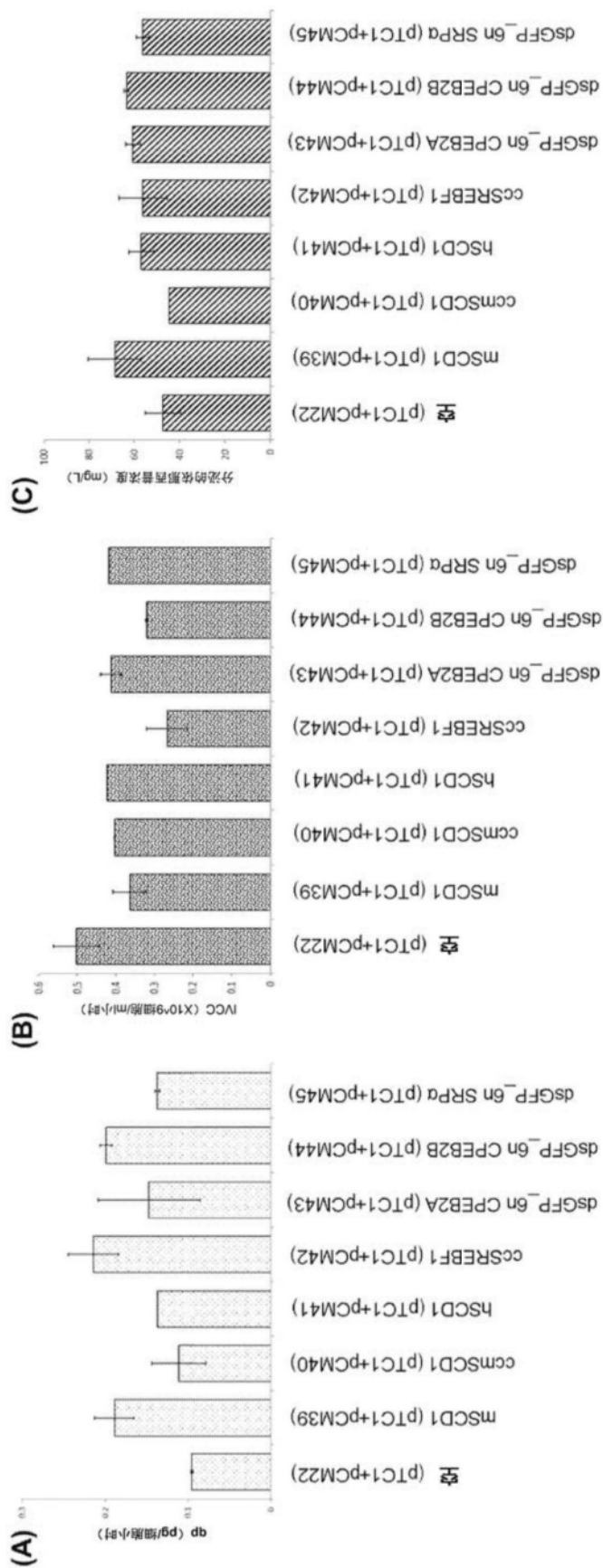


图15