



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102985437 B

(45) 授权公告日 2016.05.25

(21) 申请号 201180026517.2

(22) 申请日 2011.05.26

(30) 优先权数据

61/349,727 2010.05.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.11.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/038191 2011.05.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/150241 EN 2011.12.01

(73) 专利权人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 M·周 B·R·斯奈德克尔

C·K·D·恩格 A·沈

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07H 21/04(2006.01)

(56) 对比文件

W0 2006042062 A2, 2006.04.20,

W0 2009152413 A1, 2009.12.17,

Chun-Wun Lu,等. Induction of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-3 by Hypoxia-inducible Factor-1 Promotes Metabolic Switch and Drug Resistance. 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2008, 第 283 卷 (第 42 期), 第

28106-28114 页.

Sung Hyun Kim,等. Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. 《Appl. Microbiol. Biotechnol.》. 2007, 第 74 卷 (第 1 期), 第 152-159 页.

SM Wigfield,等. PDK-1 regulates lactate production in hypoxia and is associated with poor prognosis in head and neck squamous cancer. 《British Journal of Cancer》. 2008, 第 98 卷第 1975-1984 页.

Saroj P. Mathupala,等. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy. 《Seminars in Cancer Biology》. 2009, 第 19 卷 (第 1 期), 第 17-24 页.

Meixia Zhou,等. Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. 《Journal of Biotechnology》. 2011, 第 153 卷 (第 1-2 期), 第 27-34 页.

审查员 臧乐芸

权利要求书3页 说明书29页

序列表4页 附图12页

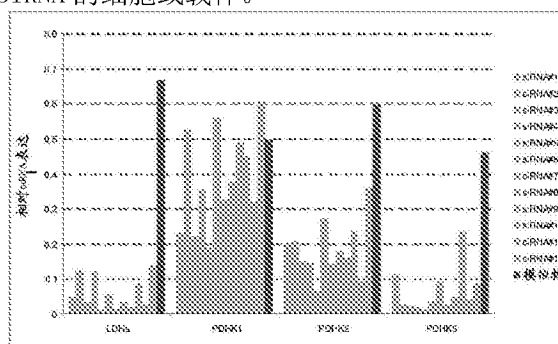
(54) 发明名称

通过下调 LDH 和 PDHK 表达降低乳酸水平和增加多肽生产

(57) 摘要

本发明提供了用于降低培养的细胞中乳酸生产和增加多肽生产的方法和组合物。在一个方面,本发明提供了这样的方法,所述方法包括培养表达 a) 乳酸脱氢酶 (LDH) 特异性的小干扰 RNA (siRNA) 和 b) 丙酮酸脱氢酶激酶 (PDHK) 特异性的 siRNA 的细胞。在另一个方面,本发明提供了

培养包含 LDH 特异性的 siRNA 和 PDHK 特异性的 siRNA 的细胞或载体。



1. 用于降低培养的细胞中乳酸生产的方法,所述方法包括培养细胞,所述细胞表达编码乳酸脱氢酶特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,并且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接,其中所述siRNA沉默或下调乳酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶激酶的基因转录。

2. 权利要求1的方法,其中乳酸脱氢酶是LDHa。

3. 权利要求1的方法,其中培养的细胞进一步表达编码第二种丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,且其中第三种异源核酸序列与第三个启动子有效连接。

4. 权利要求3的方法,其中培养的细胞进一步表达编码第三种丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,且其中第四种异源核酸序列与第四个启动子有效连接。

5. 权利要求4的方法,其中培养的细胞进一步表达编码第四种丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA的第五种异源核酸序列,且其中第五种异源核酸序列与第五个启动子有效连接。

6. 权利要求1、3、4和5中任一项的方法,其中丙酮酸脱氢酶激酶选自PDHK1、PDHK2、PDHK3和PDHK4。

7. 权利要求1、3和4中任一项的方法,其中丙酮酸脱氢酶激酶选自PDHK1、PDHK2和PDHK3。

8. 权利要求1或3的方法,其中丙酮酸脱氢酶激酶选自PDHK1和PDHK2。

9. 权利要求1或3的方法,其中丙酮酸脱氢酶激酶选自PDHK1和PDHK3。

10. 权利要求1或3的方法,其中丙酮酸脱氢酶激酶选自PDHK2和PDHK3。

11. 权利要求4的方法,其中乳酸脱氢酶是LDHa,其中第一种丙酮酸脱氢酶激酶是PDHK1,其中第二种丙酮酸脱氢酶激酶是PDHK2,且其中第三种丙酮酸脱氢酶激酶是PDHK3。

12. 权利要求1、3、4和5中任一项的方法,其中培养的细胞生产异源多肽。

13. 权利要求12的方法,其中异源多肽是抗体。

14. 权利要求4的方法,其中培养的细胞的平均乳酸生产速率少于负0.02mg/10⁶细胞/天。

15. 权利要求4的方法,其中培养的细胞较之没有编码丙酮酸脱氢酶激酶特异性siRNA的异源核酸序列和没有编码乳酸脱氢酶特异性siRNA的异源核酸序列的培养的细胞具有高至少75%的比生产力,其中比生产力为按pg/细胞/天的比蛋白质生产速率。

16. 权利要求4的方法,其中培养的细胞具有少于300mOsm的重量摩尔渗透压浓度。

17. 权利要求4的方法,其中培养的细胞较之没有编码丙酮酸脱氢酶激酶特异性siRNA的异源核酸序列和没有编码乳酸脱氢酶特异性siRNA的异源核酸序列的培养的细胞具有高至少68%的多肽生产力。

18. 权利要求12的方法,其中培养的细胞是哺乳动物细胞。

19. 权利要求13的方法,其中培养的细胞是哺乳动物细胞。

20. 沉默或下调培养的细胞中的乳酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶激酶转录的方法,所述方法包括:

向细胞中导入载体,所述载体包含编码乳酸脱氢酶特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接,

其中表达siRNA,从而沉默或下调乳酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶激酶的基因转录。

21.制备在培养中表现出减少的乳酸生产的细胞的方法,所述方法包括向细胞中导入载体,所述载体包含编码乳酸脱氢酶特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接,其中在所述细胞中,siRNA被表达并且因而沉默或下调乳酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶激酶的基因转录。

22.培养中的细胞,所述细胞表达编码乳酸脱氢酶特异性的第一种siRNA的第一种异源核酸序列和编码丙酮酸脱氢酶激酶特异性的第二种siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接,其中所述siRNA沉默或下调乳酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶激酶的基因转录。

23.权利要求22的细胞,其中细胞进一步表达编码第二种丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,且其中第三种异源核酸序列与第三个启动子有效连接。

24.权利要求23的细胞,其中细胞进一步表达编码第三种丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,且其中第四种异源核酸序列与第四个启动子有效连接。

25.权利要求24的细胞,其中细胞进一步表达编码第四种丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA的第五种异源核酸序列,且其中第五种异源核酸序列与第五个启动子有效连接。

26.权利要求22、23、24和25中任一项的细胞,其中丙酮酸脱氢酶激酶选自PDHK1、PDHK2、PDHK3和PDHK4。

27.权利要求22、23和24中任一项的细胞,其中丙酮酸脱氢酶激酶选自PDHK1、PDHK2和PDHK3。

28.权利要求22或23的细胞,其中丙酮酸脱氢酶激酶选自PDHK1和PDHK2。

29.权利要求22或23的细胞,其中丙酮酸脱氢酶激酶选自PDHK1和PDHK3。

30.权利要求22或23的细胞,其中丙酮酸脱氢酶激酶选自PDHK2和PDHK3。

31.权利要求24的细胞,其中乳酸脱氢酶是LDHa,其中第一种丙酮酸脱氢酶激酶是PDHK1,其中第二种丙酮酸脱氢酶激酶是PDHK2,且其中第三种丙酮酸脱氢酶激酶是PDHK3。

32.权利要求22的细胞,其中细胞生产异源多肽。

33.权利要求32的细胞,其中异源多肽是抗体。

34.权利要求24的细胞,其中细胞具有少于负0.02mg/10⁶细胞/天的平均乳酸生产速率。

35.权利要求24的细胞,其中细胞较之没有编码乳酸脱氢酶特异性siRNA的异源核酸序列和没有编码丙酮酸脱氢酶激酶特异性siRNA的异源核酸序列的细胞具有高至少75%的比生产力,其中比生产力为按pg/细胞/天的比蛋白质生产速率。

36.权利要求24的细胞,其中细胞具有少于300mOsm的重量摩尔渗透压浓度。

37.权利要求24的细胞,其中细胞较之没有编码乳酸脱氢酶特异性siRNA的异源核酸序列和没有编码丙酮酸脱氢酶激酶特异性siRNA的异源核酸序列的细胞具有高至少68%的多肽生产力。

38.权利要求32或33的细胞,其中细胞是哺乳动物细胞。

39.表达编码乳酸脱氢酶特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA的第二种异源核酸序列的载体,其中在所述载体中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接。

40. 在培养的细胞中降低乳酸生产的方法,所述方法包括培养细胞,所述细胞表达a)乳酸脱氢酶特异性的siRNA和b)丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA。

41. 权利要求40的方法,其中培养的细胞进一步表达第二种丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA。

42. 权利要求41的方法,其中培养的细胞进一步表达第三种丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA。

43. 权利要求41的方法,其中培养的细胞进一步表达第四种丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA。

44. 权利要求42的方法,其中培养的细胞较之没有乳酸脱氢酶特异性的siRNA和没有丙酮酸脱氢酶激酶特异性的siRNA的培养的细胞具有高至少68%的多肽生产力。

通过下调LDH和PDHK表达降低乳酸水平和增加多肽生产

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2010年5月28日提交的美国临时专利申请号61/349,727的优先权，其内容通过引用全文整合到本文中。

发明领域

[0003] 本发明的领域一般地涉及用于在培养细胞中降低乳酸生产和增加多肽生产的方法和组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 生物制药市场迅速增长，截止2010年该产业已飙升至700亿美元。参见Genetic Engineering in Livestock: New Applications and Interdisciplinary Perspectives (Engelhard等人, 2009) Springer Berlin Heidelberg。考虑到对治疗性蛋白质的需求增加，和公司之间对市场份额的竞争增加，需要改善技术以实现治疗性蛋白质的更高生产力。针对这一目标，开发了不同的方法，例如宿主细胞改造。参见Kuystermans等人，Cytotechnology 53(1-3):3-22(2007)；和O' Callaghan和James, Brief Funct. Genomic Proteomic 7(2):95-110(2008)。培养的细胞，如中华仓鼠卵巢(CHO)细胞，广泛用于生产治疗性蛋白质。例如，广泛使用pH受控的补料-分批式生物反应器培养来生产重组的单克隆抗体。Langheinrich和Nienow, Biotechnol. Bioeng. 66(3):171-9(1999)。乳酸是在补料-分批式培养中积累的主要废物中的一种，并且表现出抑制细胞生长和蛋白质生产。参见Glacken等人, Biotechnol. Bioeng. 32:491-506(1988)；和Lao和Toth, Biotechnol. Prog. 13:688-691(1997)。这反过来导致为了控制pH，需要向培养基中加入的碱的量增加。Dietl等人，J. Immunol. 184(3):1200-9(2010)；Langheinrich和Nienow, Biotechnol. Bioeng. 66(3):171-9(1999)。为了维持pH而增加向细胞培养基中加入的碱可以导致重量摩尔渗透压浓度增加，并且此增加可以导致细胞生长抑制和减少抗体生产力。Cruz等人，Enzyme Microb. Technol. 27(1-2):43-52(2000)；Iran等人, Biotechnol. Bioeng. 66:238-246(1999)。因此，对于开发多肽或更高效价的抗体生产工艺而言，降低乳酸水平是理想的。

[0006] 有许多可以影响细胞培养物中的乳酸生产的因素，例如控制丙酮酸水平。参见Liu等人，J. Biol. Chem., 284(5):2811-22(2009)；和Samuvel等人，J. of Immunol. 182(4):2476-84(2009)。丙酮酸是丙酮酸脱氢酶(PDH)和乳酸脱氢酶(LDH)的底物。

[0007] PDH复合体是由三种催化酶E1、E2和E3组成的多酶单位。Patel和Korotchkina, Exp. Mol. Med. 33(4):191-7(2001)。该复合体催化从丙酮酸转化为乙酰-CoA的限速转化反应，该反应是三羧酸(TCA)循环的切入点。PDH的活性受丙酮酸脱氢酶激酶(PDHK)和丙酮酸脱氢酶磷酸酶(PDHP)的调控。PDHK将PDH磷酸化以抑制它的酶促活性，而PDHP去磷酸化并因此活化PDH。参见Patel和Korotchkina, Exp. Mol. Med. 33(4):191-7(2001)；Roche和Hiromasa, Cell Mol. Life Sci. 64(7-8):830-49(2007)；Holness和Sugden, Biochemical Society Transactions, 31:1143-1151(2003)。哺乳动物细胞中有四种具有组织特异性分布的PDHK同种型(PDHK1、PDHK2、PDHK3和PDHK4)。参见Harris等人, Adv. Enzyme Regul. 42:

249-59(2002);和Bowker-Kinley等人,Biochem.J.329(1):191-6(1998)。

[0008] LDH直接催化丙酮酸和乳酸的相互转化,以及与此同时的NADH和NAD⁺的相互转化。在哺乳动物细胞中,LDH表现为大部分由LDHa和LDHb基因编码的A和B亚基(或分别由H和M亚基)组成的同源四聚体或异源四聚体,有时是由LDHc基因编码的C亚基组成的同源四聚体。参见Baumgart等人,J.Biol.Chem.271(7):3846-55(1996);Li等人,J.Biol.Chem.258(11):7029-32(1983);Skory C.D.,Appl.Environ.Microbiol.66(6):2343-8(2000);和Read等人,Proteins 43(2):175-185(2001)。例如,在CHO细胞中,已经显示了LDH同种型为A3B和A2B2四聚体的中间物。Jeong等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.289(5):1141-9(2001)。之前的研究已经显示,通过同源重组(Chen等人,Biotechnol.Bioeng.72(1):55-61(2001))、反义技术(Jeong等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.289(5):1141-9(2001))或小干扰或短干扰RNA(siRNA)(Kim和Lee,Appl.Microbiol.Biotechnol.74(1):152-9(2007))破坏基因来下调CHO细胞中的LDHa,可以降低乳酸水平,但未实现蛋白质生产力的可观改善。例如,在LDHa特异性siRNA的情况下,尽管报道乳酸水平降低45-79%,比生产力(Qp)和产品(抗体)效价没有显著的改善,提示在CHO细胞中只敲低LDHa不足以有效改善Qp和产品产量。因此,需要更有效的降低乳酸生产的方法来实现更佳的治疗性多肽生产。

[0009] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请出于全部目的都通过引用全文整合到本文中,其与具体和分别指明每个出版物、专利和专利申请都通过引用整合的程度相同。

[0010] 发明简介

[0011] 本发明提供了用于在培养细胞中降低乳酸生产和增加多肽生产的方法和组合物。本发明人发现在表达多肽(例如,抗体)的培养细胞中,通过siRNA同时下调LDH和PDHK,减少了乳酸水平、乳酸生产速率和重量摩尔渗透压浓度,并增加了比多肽生产力(例如,比生产力)和多肽生产(例如,生产能力)。此外,这些具有下调的LDH和PDHK的培养细胞没有表现出对细胞生长、细胞活力和生产的多肽的品质的负面影响。

[0012] 在一个方面,本发明提供了在培养细胞中降低乳酸生产的方法,方法包括培养表达a)乳酸脱氢酶(LDH)特异性的小干扰RNA(siRNA)和b)丙酮酸脱氢酶激酶(PDHK)特异性的siRNA的细胞。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了培养的细胞,其包含a)LDH特异性的siRNA和PDHK特异性的siRNA。

[0014] 在一些实施方案中,培养的细胞进一步表达对第二种PDHK特异性的siRNA。在一些实施方案中,培养的细胞进一步表达对第三种PDHK特异性的siRNA。在一些实施方案中,其中培养的细胞进一步表达对第四种PDHK特异性的siRNA。

[0015] 在另一个方面,本发明提供了在培养细胞中降低乳酸生产的方法,方法包括培养这样的细胞,所述细胞包含编码乳酸脱氢酶(LDH)特异性的小干扰RNA(siRNA)的第一种异源核酸序列和编码丙酮酸脱氢酶激酶(PDHK)特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接。

[0016] 在另一个方面,本发明提供了培养的细胞,其包含编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接。

[0017] 在一些实施方案中,细胞还包含编码第二种PDHK特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,且其中第三种异源核酸序列与第三个启动子有效连接。在一些实施方案中,细胞还包含编码第三种PDHK特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,且其中第四种异源核酸序列与第四个启动子有效连接。在一些实施方案中,其中细胞还包含包括编码第四种PDHK特异性的siRNA的第五种异源核酸序列,且其中第五种异源核酸序列与第五个启动子有效连接。

[0018] 在一些实施方案中,LDH是LDHa、LDHb或LDHc。

[0019] 在一些实施方案中,PDHK选自PDHK1、PDHK2、PDHK3和PDHK4。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK1、PDHK2和PDHK3。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK1和PDHK2。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK1和PDHK3。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK2和PDHK3。

[0020] 在一些实施方案中,在培养的细胞中降低乳酸生产的方法包括培养这样的细胞,所述细胞包含编码乳酸脱氢酶(LDH)特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码三种对于第一、第二和第三种PDHK特异性的不同siRNA的第二、第三和第四种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二、第三和第四种异源核酸序列分别与第二个、第三个和第四个启动子有效连接。在一些实施方案中,LDH是LDHa,其中第一种PDHK是PDHK1,其中第二种PDHK是PDHK2,且第三种PDHK是PDHK3。

[0021] 在一些实施方案中,培养的细胞包含编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码三种对于第一、第二和第三种PDHK特异性的不同siRNA的第二、第三和第四种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二、第三和第四种异源核酸序列分别与第二、第三和第四个启动子有效连接。在一些实施方案中,LDH是LDHa,其中第一种PDHK是PDHK1,其中第二种PDHK是PDHK2,且其中第三种PDHK是PDHK3。

[0022] 在一些实施方案中,培养的细胞生产异源多肽。在一些实施方案中,异源多肽是抗体。

[0023] 在一些实施方案中,培养的细胞的乳酸合成速率低于乳酸消耗速率。在一些实施方案中,平均乳酸生产速率少于约负0.02mg/106细胞/天。

[0024] 在一些实施方案中,含有LDH和PDHK特异性的siRNA的培养细胞具有少于约300mOsm的重量摩尔渗透压浓度。

[0025] 在一些实施方案中,培养的细胞较之没有包含PDHK和LDH的异源核酸序列的培养的细胞具有高至少约75%的比生产力。

[0026] 在一些实施方案中,培养的细胞较之没有LDH和PDHK特异性的siRNA的培养的细胞具有高至少约75%的比生产力(Q_p)。

[0027] 在一些实施方案中,培养的细胞较之没有包含PDHK和LDH的异源核酸序列的培养的细胞具有高约10%至约800%的多肽生产力(例如,g/L的抗体生产力或效价)。在一些实施方案中,培养的细胞较之没有包含PDHK和LDH的异源核酸序列的培养的细胞具有高约55%的多肽生产力。在一些实施方案中培养的细胞较之没有包含PDHK和LDH的异源核酸序列的培养的细胞具有高至少约68%的多肽生产力。

[0028] 在一些实施方案中,培养的细胞较之没有PDHK和LDH特异性的siRNA的培养的细胞具有高约10%至约800%的多肽生产力。在一些实施方案中,培养的细胞较之没有PDHK和LDH特异性的siRNA的培养的细胞具有高约55%的多肽生产力。在一些实施方案中,培养的细胞较之没有PDHK和LDH特异性的siRNA的培养的细胞具有高至少约68%的多肽生产力。

[0029] 在一些实施方案中,培养的细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,培养的细胞是非哺乳动物细胞。

[0030] 在另一个方面,本发明提供了沉默或下调培养细胞中的LDH和PDHK转录的方法,所述方法包括:向细胞中导入载体,所述载体包含编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接,其中表达siRNA,从而沉默或下调LDH和PDHK的基因转录。

[0031] 在另一个方面,本发明提供了制备在培养中表现出减少的乳酸生产的细胞的方法,所述方法包括向细胞中导入载体,所述载体包含编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接。

[0032] 在另一个方面,本发明提供了载体,所述载体包含编码乳酸脱氢酶(LDH)特异性的小干扰RNA(siRNA)的第一种异源核酸序列和编码丙酮酸脱氢酶激酶(PDHK)特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二启动子有效连接。

附图简介

[0033] 图1显示了靶向LDHa/PDHK1、2、3的siRNA构建体。将靶向LDHa、PDHK1、PDHK2和PDHK3的siRNA克隆到单个pSilencer3.1潮霉素载体中。LDHa的靶向序列处于U6启动子调控下,而PDHK1、2和3的siRNA则处于H1启动子调控下。

[0034] 图2显示了选定的12个siRNA克隆中的LDHa、PDHK1、2和3的mRNA相对表达水平(显示为浅灰色)。将LDHa和PDHK的表达水平归一化至持家基因b-微球蛋白。来自12个模拟克隆的平均mRNA表达水平则显示为深灰色。

[0035] 图3显示了在补料-分批摇瓶评价中的乳酸谱、平均乳酸生产速率和第14天的pH值。在14天的摇瓶评价过程中,使用Nova分析仪测量第3、7、10和14天的乳酸浓度。3A)模拟物(深灰色)和siRNA(浅灰色)克隆的乳酸谱;3B)在第3和14天之间的平均乳酸生产速率($\text{mg}/10^6$ 细胞/天);和3C)第14天的pH值。实施3次补料-分批摇瓶实验,显示来自实验1的数据。

[0036] 图4显示了在补料-分批摇瓶评价中的效价、比生产力(Q_p)和细胞生长谱。4A)g/L第14天的效价(生产力);4B)pg/细胞/天的比生产力;和4C)通过活细胞计数积分(IVCC)测量细胞生长,按1亿个细胞/天/升。模拟克隆是深灰色,siRNA克隆是浅灰色。

[0037] 图5显示了在2L生物反应器评价中的乳酸曲谱、平均乳酸生产速率和重量摩尔渗透压浓度谱。5A)乳酸谱;5B)平均乳酸生产速率;和5C)重量摩尔渗透压浓度谱。

[0038] 图6显示了含有siRNA的培养的细胞、模拟物或亲代克隆在2L生物反应器评测中的生产力谱。

[0039] 发明详述

[0040] 本发明提供了用于在培养的细胞中降低乳酸生产和增加多肽生产的方法和组合物。本发明人发现在表达多肽(例如,抗体)的培养的细胞中,通过被称为RNA干扰(RNAi)的过程,经过siRNA同时下调LDH和PDHK,减少了乳酸水平、乳酸生产速率和细胞重量摩尔渗透

压浓度,并增加了比多肽生产力(例如,比生产力)和多肽生产(例如,生产力)。此外,这些具有下调的LDH和PDHK的培养的细胞没有表现出对细胞生长、细胞活力和生产的多肽的负面影响。因此,在不受理论约束的条件下,通过敲低LDH的表达减少丙酮酸-乳酸转化,并通过敲低一种或多种PDHK的表达促进丙酮酸进入三羧酸循环(TCA或Krebs循环),可对乳酸降低并为细胞提供更多的能量和代谢中间物产生协同效应。这些效应反过来导致在培养的细胞中增加的多肽(例如,抗体)生产。

[0041] 因此,在本发明的一个方面,提供了在培养的细胞中降低乳酸生产的方法,所述方法包括培养表达a)LDH特异性的siRNA和b)PDHK特异性的siRNA的细胞。

[0042] 在另一个方面,提供了培养的细胞,包含a)LDH特异性的siRNA和b)PDHK特异性的siRNA。

[0043] 在另一个方面,本发明提供了降低培养的细胞中乳酸生产的方法,所述方法包括培养这样的细胞,所述细胞包含编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,而第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接。

[0044] 在另一个方面,本发明提供了培养的细胞,其包含编码LDH特异性的第一种siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的第二种siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,而第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接。

[0045] 除非另外指出,否则本发明的实践使用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,上述技术都在本领域技术内。文献中已充分解释了此类技术,例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual,第2版(Sambrook等人,1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编著,1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编著,1998) Academic Press; Animal Cell Culture(R.I.Freshney编著,1987); Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures(A.Doyle, J.B.Griffiths和D.G.Newell编著,1993-1998) J.Wiley和Sons; Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编著); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编著,1987); Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编著,1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编著,1994); Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编著,1991); Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons,1999); Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997); Antibodies(P.Finch,1997); Antibodies: a practical approach(D.Catty.编著, IRL Press,1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach(P.Shepherd和C.Dean编著, Oxford University Press,2000); Using antibodies: a laboratory manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999); The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编著,Harwood Academic Publishers,1995)。

[0046] 定义

[0047] 如本文中使用的,术语“培养中的细胞”或“培养的细胞”指在溶液(例如,细胞培养基)中的两个或多个细胞,允许所述细胞进行一次或多次细胞分裂。

[0048] 术语“多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换的使用,指任何长度的核苷酸聚合物,并包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基,和/或其类似物,或者任何可以通过DNA或RNA聚合酶整合到聚合物中的底物。多核苷酸可包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸及其类似物。如果存在,可以在聚合物装配之前或之后进行对核苷酸结构的修饰。可以通过非核苷酸组分中断核苷酸序列。可以在聚合后进一步修饰多核苷酸,例如通过与标记组分缀合。其他类型的修饰包括例如,“帽”,用类似物替换一个或多个天然存在的核苷酸;核苷酸间修饰,例如,具有不带电荷的连接(例如,甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酸胺、氨基甲酸酯,等)和带电荷的连接(例如,磷硫酰、二硫代磷酸酯等)的修饰;含有悬垂的部分的修饰,例如蛋白质(例如,核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等);具有插入剂的(例如,吡啶、补骨脂素等)修饰;含有螯合剂的(例如,金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)修饰;含有烷化剂的修饰;具有修饰的连接(例如, α -异头核酸等)修饰;以及未修饰形式的多核苷酸。此外,糖中通常存在的羟基可以被例如磷酸基、磷酸基取代;被标准保护基团保护;或被活化以制备与额外的核苷酸的额外的连接,或者可与固体支持物缀合。5'和3'端OH可以被磷酸化,或者被氨基或从1至20个碳原子的有机加帽基团部分取代。其他羟基也可以衍生为标准保护基团。多核苷酸还可以含有本领域普遍已知的核糖或脱氧核糖的类似物形式,包括例如,2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基、2'-氟-或2'-叠氮-核糖、碳环糖类似物、 α -异头糖、差向异构糖如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、非环类似物和非碱基核苷酸类似物如甲基核糖核苷。一个或多个磷酸二酯键可以被备选的连接基团取代。这些备选的连接基团包括但不限于磷酸被P(O)S(“硫代(thioate)”)、P(S)S(“二硫代(dithioate)”)、(O)NR₂(“酰胺”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“formacetal”)取代的实施方案,其中每个R或R'独立地是H或取代或未取代的烷基(1-20C),任选地含有醚(-O-)键、芳基、链烯基、环烷基、环烯基或araldyl。多核苷酸中所有的连接不必都相同。上述描述用于本文提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0049] 术语“RNA干扰(RNAi)”指通过siRNA介导或起始的序列特异性、转录性基因沉默(例如,转录后基因沉默)的方法。在不受理论约束的情况下,在RNAi的过程中,在实践本发明的方法时,siRNA可以诱导靶mRNA的降解和伴随的序列特异性的LDH和一种或多种PDHK的基因表达抑制。

[0050] 术语“异源核酸”或“异源多肽”指其序列与在相同宿主细胞中天然发现的另一种核酸或多肽的序列不同的核酸或多肽。

[0051] 术语“小干扰RNA”、“短干扰RNA”或“siRNA”指核苷酸的RNA二聚体,或在一些备选的方面,靶向目标核酸(例如LDH或PDHK)的RNA单分子。siRNA包含通过标准Watson-Crick碱基配对相互作用复性的在一起的有义RNA链和互补的反义RNA链。siRNA可以直接转染或在培养的细胞内生产。

[0052] 在一种变化中,有义RNA链和互补的反义RNA链通过间隔子连接,导致名为短发夹RNA(shRNA)的茎环或发夹结构的表达。然后,发夹被内切核酸酶(例如,切酶)切割,生成siRNA。在另一种变化中,shRNA是由两个茎环结构构成的双功能shRNA,一个茎环结构包括指导RNA二聚体通过切割依赖性RISC(RNA诱导的沉默复合体)装载进行mRNA降解的完全匹

配的序列,第二个茎环结构包括通过经由切割非依赖性RISC装载的mRNA整合来抑制mRNA翻译的不匹配链。

[0053] 如本文中使用的,LDH或PDHK“特异性”的siRNA指靶向目标核酸(例如,LDH或PDHK)且siRNA的二聚体部分的核苷酸序列与被靶向的基因(例如,LDH或PDHK)的核苷酸序列互补的siRNA。

[0054] 如本文中使用的,“有效连接的”在本文中指在两个或多个核酸(例如DNA)区段之间的功能关系。通常地,其指转录调控序列与转录序列的功能关系。例如,如果启动子在恰当的宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列转录,则启动子与编码序列(例如本发明的核酸)有效连接。一般而言,与转录序列有效连接的启动子转录调控序列是与转录序列物理连续的,即,是顺式作用的。然而,一些转录调控序列(例如,增强子)不需要与其增强转录的编码序列是物理连续的或位于其紧密相邻处。

[0055] 如本文中所用,术语“启动子”包括能够在培养的细胞(例如,哺乳动物细胞)中驱动编码序列转录的所有序列。因此,用于本发明的构建体中的启动子包括参与调控或调节基因(例如,LDH或PDHK)转录定时和/或速率的顺式作用的转录控制元件和调控序列。例如,启动子可以是顺式作用的转录控制元件,包括参与转录调控的增强子、启动子、转录终止子、复制起点、染色体整合序列、5'和3'非翻译区或内含子序列。这些顺式作用序列通常与蛋白质或其他生物分子相互作用来进行(开/关、调控、调节等)转录。“组成型”启动子是在大部分环境条件和发育或细胞分化的状态下持续驱动表达的启动子。“可诱导型”或“可调控型”启动子在环境条件或发育条件的影响下指导本发明核酸的表达。可通过可诱导型启动子影响转录的环境条件的实例包括厌氧条件、升高的温度、干旱或光的存在。

[0056] 如本文中使用的,“载体”意指能够在宿主细胞在递送,优选地表达一种或多种目标基因或序列(例如,LDH或PDHK)的构建体。载体的实例包括但不限于病毒载体、裸露的DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子凝聚剂缔合的DNA或RNA表达载体、包裹在脂质体中的DNA或RNA表达载体,和某些真核细胞,例如生产细胞。合适的载体是与所使用的宿主细胞相容的载体。合适的载体可以源自例如细菌、病毒(例如噬菌体T7或M-13来源的噬菌体)、粘粒、酵母或植物。获得和使用此类载体的流程是本领域技术人员已知的(参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,ColdSpring Harbor,1989)。

[0057] 如本文中使用的,以mg/细胞/天将平均乳酸生产速率计算为乳酸合成速率减去乳酸消耗速率。

[0058] 如本文中使用的,“比生产力”或“Qp”指按pg/细胞/天的比蛋白质(例如抗体)生产速率。比生产力计算为蛋白质效价(pg/细胞/天)/IVCC(计算活细胞计数积分;细胞/天)。

[0059] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换的使用,指任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可以是线性的或分支的,可以包含修饰的氨基酸,并可以被非氨基酸中断。术语还涵盖了被天然修饰的或干涉的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他的操作或修饰,例如与标记组分缀合。定义还包括例如含有一个或多个氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸等)的多肽,以及本领域已知的其他修饰。

[0060] 术语“抗体”使用最广泛的含义,具体覆盖了单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段。

[0061] “抗体片段”包含全长抗体的部分，一般是其抗原结合部分或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab’、F(ab’)₂和Fv片段；单链抗体分子；双抗体；线性抗体；和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0062] 术语“单克隆抗体”在本文中指从基本均质的抗体群体获得的抗体，即，除了可能以少量存在的天然发生的突变外，包含群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的，针对单个抗原位点。此外，与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制品相反，每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰语“单克隆”表示从基本均质的抗体群体获得的抗体的特征，而不视为需要通过任何特定方法生产抗体。例如，可通过Kohler等人，Nature 256:495(1975)首次描述的杂交瘤方法，或者通过重组DNA方法(参见例如美国专利号4,816,567)制备根据本发明使用的单克隆抗体。还可以使用例如Clackson等人，Nature 352:624-628(1991)和Marks等人，J.Mol.Biol. 222:581-597(1991)中描述的技术，从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

[0063] 本文的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)，其中重链和/或轻链的部分与源自特别物种或属于特别抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的其余部分与源自另一种物种或属于另一种抗体类或亚类的抗体以及此类抗体的片段中的相应序列相同或同源，只要它们表现出所需的生物学活性(美国专利号4,816,567；和Morrison等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。

[0064] 术语“高变区”在本文中指负责抗原结合抗体的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(即，轻链可变结构域的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)，和重链可变结构域的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)；Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991))和/或来自“高变环”的残基(即，轻链可变结构域的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)，和重链可变结构域的残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)；Chothia和Lesk J.Mol.Biol. 196:901-917(1987))。“框架区”或“FR”残基是除本文定义的高变区残基外的可变结构域残基。

[0065] 非人(例如，鼠)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。人源化抗体的绝大部分是人免疫球蛋白(受体抗体)，其中受体的高变区残基被具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人物种(例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类)(供体抗体)的高变区残基取代。在一些情况下，人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被相应的非人残基取代。此外，人源化的抗体可包含未见于受体抗体和供体抗体中的残基。进行这些修饰以进一步精制抗体性能。一般而言，人源化抗体基本包含全部的至少一个，通常两个可变结构域，其中所有的或基本所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环，而所有的或基本所有的FR区是人免疫球蛋白的序列。人源化抗体任选地还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)，通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。其他细节参见Jones等人，Nature 321:522-525(1986)；Riechmann等人，Nature 332:323-329(1988)；和Presta, Curr.Op.Struct.Biol. 2: 593-596(1992)。

[0066] 如本文中使用的，术语“免疫粘附素”指结合异源“粘附素”蛋白(例如，受体、配体或酶)的“结合结构域”的抗体样分子，具有免疫球蛋白恒定结构域的效应子功能。在结构上，免疫粘附素包含除抗体的抗原识别和结合位点(抗原结合位点)以外的(即，异源的)、具

有理想结合特异性的粘附素氨基酸序列和免疫球蛋白恒定结构域序列的融合体。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定结构域序列优选地源自 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链,因为,包含这些区域的免疫粘附素可以被蛋白A层析纯化(Lindmark等人,J.Immunol.Meth.62:1-13(1983))。

[0067] 术语“配体结合结构域”在本文中指任何天然的细胞表面受体,或其至少保留了相应天然受体的定性配体结合的任何区域或衍生物。在特定的实施方案中,受体来自具有胞外结构域的细胞表面多肽,所述受体与免疫球蛋白超家族的成员是同源的。其他不是免疫球蛋白超家族成员,但仍涵盖在该定义内的受体是细胞因子受体,特别是具有酪氨酸激酶活性的受体(受体酪氨酸激酶)、血细胞生成素和神经生长因子受体超家族的成员,和细胞粘附素分子,例如,(E-、L-和P-)选择素。

[0068] 术语“受体结合结构域”用于指受体的任何天然配体,包括细胞粘附素分子,或至少保留了相应天然配体的定性受体结合能力的此类天然配体的任何区域或衍生物。其中,该定义具体包括来自上述受体的配体的结合序列。

[0069] “抗体-免疫粘附素嵌合物”包含这样的分子,所述分子结合至少抗体的至少一个结合结构域(如本文定义的)和至少一个免疫粘附素(如本申请中定义的)。示例性的抗体-免疫粘附素嵌合物是双特异性的CD4-IgG嵌合物,描述在Berg等人,PNAS(USA)88:4723-4727(1991)和Chamow等人,J.Immunol.153:4268(1994)中。

[0070] 术语“重量摩尔渗透压浓度”指溶解在1升溶液中的溶质颗粒的数量。可以添加到培养基中从而增加其重量摩尔渗透压浓度的溶质包括蛋白质、肽、氨基酸、非代谢的聚合物、维生素、离子、盐(例如钠盐或钾盐)、糖、代谢物、有机酸、脂类等。当用于本文中时,缩写“mOsm”意指“毫摩尔渗透压/升H₂O”。

[0071] 如本文中使用的,“宿主细胞”包括单个细胞、培养的细胞或细胞培养物,其可以是或者已经是用于掺入多核苷酸插入物来生产多肽的载体或siRNA的受体。宿主细胞包括单个培养的细胞的后代,并且由于天然的、偶然的或人为的突变,后代不必与原始的亲代细胞完全相同(形态学或基因组DNA互补)。

[0072] 除非另外明确指出,则本文中使用的术语单数形式“a”、“a”等指一个或多个。

[0073] 在本文中,提及“约”某值或参数包括(和描述了)针对所述值或参数的实施方案。例如,提及“约X”的描述包括描述了“X”。数值范围包括了定义范围的数。

[0074] 应理解,当本文使用词语“包含”描述实施方式时,也提供了以“由……组成”和/或“基本由……组成”描述的其他类似的实施方式。

[0075] 当本发明的方面或实施方式以Markush组或其他备选组进行描述时,本发明不仅涵盖了作为整体列举的整个组,也涵盖了单个组和主要组的所有可能亚组的每个成员,以及缺少一个或多个组成员的主要组。本发明在要求保护的发明中还设想了明确排除一个或多个任意组成员。

[0076] 降低乳酸生产的方法

[0077] 本文中的方法涉及培养表达LDH和至少一种或多种PDHK特异性的siRNA的细胞以经由RNA干扰(RNAi)降低乳酸生产。在一个方面,方法包括培养表达a)LDH特异性的siRNA和b)PDHK特异性的siRNA的细胞。

[0078] 在一些实施方案中,培养的细胞进一步表达对第二种PDHK特异性的siRNA。在一些实施方案中,培养的细胞进一步表达对第三种PDHK特异性的siRNA。在一些实施方案中,培

养的细胞进一步表达对第四种PDHK特异性的siRNA。

[0079] 在另一个方面,方法包含编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接。

[0080] 在另一个方面,提供了沉默或下调培养的细胞中的LDH和PDHK转录的方法,所述方法包括:向细胞中导入载体,所述载体包含编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接,其中表达siRNA,从而沉默或下调LDH和PDHK的基因转录。

[0081] 在一些实施方案中,培养的细胞进一步包含编码第二种PDHK特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,且其中第三种异源核酸序列与第三个启动子有效连接。在一些实施方案中,培养的细胞进一步包含编码第三种PDHK特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,且其中第四种异源核酸序列与第四个启动子有效连接。在一些实施方案中,培养的细胞进一步包括编码第四种PDHK特异性的siRNA的第五种异源核酸序列,且其中第五种异源核酸序列与第五个启动子有效连接。

[0082] 在一些实施方案中,LDH是LDHa、LDHb或LDHc。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK1、PDHK2、PDHK3和PDHK4。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK1、PDHK2和PDHK3。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK2、PDHK3和PDHK4。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK1、PDHK3和PDHK4。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK1和PDHK2。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK1和PDHK3。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK2和PDHK3。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK2和PDHK4。在一些实施方案中,PDHK选自PDHK3和PDHK4。

[0083] 在一些实施方案中,方法包括培养表达a)LDHa特异性的siRNA和b)分别对PDHK1、PDHK2和PDHK3特异性的siRNA的细胞。在一些实施方案中,方法包括培养表达a)LDHb特异性的siRNA和b)分别对PDHK1、PDHK2和PDHK3特异性的siRNA的细胞。在一些实施方案中,方法包括培养表达a)LDHc特异性的siRNA和b)分别对PDHK1、PDHK2和PDHK3特异性的siRNA的细胞。

[0084] 在一些实施方案中,方法包括培养表达a)对LDHa、LDHb或LDHc特异性的siRNA和b)对两种PDHK特异性的siRNA的细胞,其中PDHK选自PDHK1、PDHK2、PDHK3和PDHK4。例如,方法包括培养表达a)LDHa特异性的siRNA和b)分别对PDHK1和PDHK2特异性的siRNA的细胞。

[0085] 在一些实施方案中,较之没有LDH和PDHK特异性的siRNA的培养的细胞,在表达a)LDH特异性的siRNA和b)PDHK特异性的siRNA的培养的细胞中,LDH的mRNA表达水平降低至少约75%,而PDHK的mRNA表达水平降低至少约25%。在一些实施方案中,LDH是LDHa、LDHb或LDHc,并且LDH的mRNA表达水平降低至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%。在一些实施方案中,PDHK是PDHK1、PDHK2或PDHK3,而PDHK的mRNA表达水平降低至少约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%或至少约95%。

[0086] 在一些实施方案中,较之没有LDHa、PDHK1、PDHK2和PDHK3特异性的siRNA的培养的细胞,在表达a)LDHa特异性的siRNA和b)PDHK1、PDHK2和PDHK3特异性的siRNA的培养的细胞

中,LDHa的mRNA表达水平降低至少约90%,而PDHK1、PDHK2和PDHK3的mRNA表达水平分别降低至少约32%、83%和70%。

[0087] 在一些实施方案中,方法包含编码LDHa、LDHb或LDHc特异性的siRNA的第一种异源核酸序列,编码PDHK1特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,编码对PDHK2特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,编码对PDHK3特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二、第三和第四异源核酸序列与第二个启动子有效连接。

[0088] 在一些实施方案中,方法包含编码LDHa、LDHb或LDHc特异性的siRNA的第一种异源核酸序列,编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,和编码对PDHK特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,其中第二和第三种异源核酸序列与第二个启动子有效连接,且其中PDHK选自PDHK1、PDHK2、PDHK3和PDHK4。

[0089] 在一些实施方案中,较之没有包含LDH和PDHK的异源核酸序列的培养的细胞,在包含编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列的培养细胞中,LDH的mRNA表达水平降低至少约75%,而PDHK的mRNA表达水平降低至少约25%,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,而其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接。在一些实施方案中,LDH是LDHa、LDHb或LDHc,并且LDH的mRNA表达水平降低至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%。在一些实施方案中,PDHK是PDHK1、PDHK2或PDHK3,并且PDHK的mRNA表达水平降低至少约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%或至少约95%。

[0090] 在一些实施方案中,较之没有LDHa、PDHK1、PDHK2和PDHK3特异性的siRNA的培养的细胞,在包含编码LDHa特异性的siRNA的第一种异源核酸序列,编码PDHK1特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,编码PDHK2特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,和编码PDHK3特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,而其中第二、第三和第四种异源核酸序列与第二个启动子有效连接的培养的细胞中,LDHa的mRNA表达水平降低至少约90%,而PDHK1、PDHK2和PDHK3的mRNA表达水平分别降低至少约32%、83%和70%。

[0091] 本文描述的本发明中使用的siRNA可以从多种来源获得或制备,例如,在体外、离体或体内生产,如本文所述。在一些实施方案中,siRNA可以含有从约1至约200个核苷酸,从约5至约100个核苷酸,从约10至约50个核苷酸,从约15至约30个核苷酸,或从约19至约25个核苷酸。在一些实施方案中,siRNA的长度少于30个核苷酸。在一些实施方案中,siRNA的长度多于30个核苷酸。在一些实施方案中,siRNA长度可以是40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9或更少的核苷酸。

[0092] 在一些实施方案中,可以通过化学合成,通过使用聚合酶体外转录,或通过内切核酸酶(例如,切酶)消化长双链RNA(dsRNA)生成siRNA。在一些实施方案中,siRNA可以完全或部分的包含合成核苷酸、天然碱基或修饰的碱基。

[0093] 在一些实施方案中,siRNA可以在胞外表达。siRNA可以由核酸序列编码,而核酸序

列还可以包括一个或多个启动子。核酸序列还可以包括多聚腺苷酸信号。在一些实施方案中, RNA二聚体和有义链和反义链可以由两个独立的启动子生产, 并由培养的细胞复性。在一些实施方案中, 还可以通过碱基对间隔子(例如, 碱基对间隔子可包含单个或多个碱基对)或茎环连接RNA二聚体的有义链和反义链以形成shRNA, 并由单个启动子表达。在一些实施方案中, shRNA可以是双功能shRNA。可以通过内切核酸酶(例如, 切酶)切割发夹, 以生成有效的siRNA分子。间隔子或茎环位于形成二聚体的有义链和反义链之间。茎环结构的长度可以变化。在一些实施方案中, 茎环的长度是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15或更多个核苷酸。发夹结构还可以含有3'或5'突出端部分。在一些实施方案中, 突出端是3'或5'突出端1、2、3、4或5个核苷酸长。通过siRNA、shRNA或双功能shRNA进行RNA介导的基因调控的组合物和方法描述在例如美国申请号20090215860, Rutz和Scheffold, Arthritis Research & Therapy, 6(2):78-85(2004)和Rao等人, Advanced Drug Delivery Reviews 61:746-759(2009)中。

[0094] 在一些实施方案中, 用于本发明中的siRNA可以与靶序列具有完美的同源性, 以生产靶特异性应答。在一些实施方案中, 用于本发明中的siRNA与靶序列具有约99%、98%、97%、96%、95%、94%、92%、91%、90%、88%、86%、84%、82%、80%、78%、76%、74%、72%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%同源性的任一项。在一个变化中, 用于本发明中的siRNA可以在生理条件下与核酸靶序列杂交, 例如, 可以在细胞内(例如, 在体内)与靶序列特异性杂交。在另一个变化中, siRNA靶向多于一个的靶序列、靶标志物或报告基因。

[0095] 可以在常规筛选条件下, 例如细胞培养等, 测试siRNA在体内靶向靶核酸(例如, 在生理条件下, 在细胞内siRNA与靶序列特异性结合)所必需的序列同一性(同源性)的程度。

[0096] 在一些实施方案中, PDHK1的靶序列是GCAGTTCCTGGACTTCGGA(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中, PDHK2的靶序列是CATTCAGTACTTCTTGAC(SEQ ID NO:3)。在一些实施方案中, PDHK3的靶序列是TGTAGCTGATGTCGTGAAA(SEQ ID NO:4)。

[0097] 乳酸脱氢酶(LDH)将丙酮酸转化为乳酸。示例性的LDH(例如, LDHa、LDHb或LDHc)多肽和核酸的检录号包括但不限于DQ912661(CHO细胞中的LDHa)、BC067223(人LDHa)、BC084698(大鼠LDHa)、BC094428(小鼠LDHa)、BC002362(人LDHb)、NM_012595(大鼠LDHb)、NM_008492(小鼠LDHb)、BC090043(人LDHc)、NM_017266(大鼠LDHc)和NM_013580(小鼠LDHc)。通过测量在体外、在细胞提取物中或在体内多肽将丙酮酸转化为乳酸的能力, 本领域技术人员已知的标准方法可用于确定LDH多肽是否具有LDH活性。

[0098] 丙酮酸脱氢酶激酶(PDHK)抑制丙酮酸转化为乙酰-CoA。示例性的PDHK1多肽和核酸的检录号包括但不限于L42450(人)、BC089783(大鼠)和NM_172665(小鼠)。示例性的PDHK2多肽和核酸的检录号包括但不限于NM_002611(人)、NM_030872(大鼠)和NM_133667(小鼠)。示例性的PDHK3多肽和核酸的检录号包括但不限于L42452(人)、BC169078(大鼠)和NM_145630(小鼠)。示例性的PDHK4多肽和核酸的检录号包括但不限于NM_002612(人)、NM_053551(大鼠)和NM_013743(小鼠)。通过在体外、在细胞提取物中或在体内测量多肽将丙酮酸转化为乙酰-CoA的能力, 本领域技术人员已知的标准方法可用于确定PDHK多肽是否具有PDHK活性。

[0099] 启动子是本领域普遍已知的。可以使用在宿主细胞中有功能的任何启动子, 用于

在宿主细胞中表达LDH和一种或多种PDHK特异性的siRNA。实际上,能够驱动这些siRNA的任何启动子都适合本发明,包括但不限于U6、H1、CYC1、HIS3、GAL1、GAL4、GAL10、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、T7、CMV、SV40和EF1a。例如,在一些实施方案中,方法包含编码LDHa特异性的siRNA的第一种异源核酸序列,编码PDHK1特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,编码PDHK2特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,编码PDHK3特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子U6有效连接,且其中第二、第三和第四种异源核酸序列与第二个启动子H1有效连接。在一个变化中,编码siRNA的第一种异源核酸序列是LDHb特异性的。在另一个变化中,编码siRNA的第一种异源核酸序列是LDHc特异性的。

[0100] 在另一个方面,提供了制备在培养中表现出减少的乳酸生产的细胞的方法,所述方法包括向细胞中导入载体,所述载体包含编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接。

[0101] 可以通过多种程序将编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列插入到载体中。例如,在用恰当的限制性内切酶(例如,KasI、BamHI、HindIII或BhIII)消化插入片段和载体后,将LDH和PDHK siRNA序列连接到载体中的理想的位置。在一些实施方案中,通过将LDHa siRNA序列插入到载体(例如,pSilencer 3.1-H1 hygro载体)的KasI位点中并在其紧邻(immediate)5'端加入U6启动子,分别将PDHK1和PDHK2 siRNA序列插入到BamHI/HindIII和HindIII位点中,并将PDHK3 siRNA序列插入到BgIII中并在PDHK1、PDHK2和PDHK3的紧邻5'端加入H1启动子,构建含有LDHa和PDHK1、PDHK2和PDHK3特异性的siRNA序列的载体。然后,可以通过转染含有LDHa和PDHK1、PDHK2和PDHK3 siRNA的载体,来生成表达减少的乳酸生产的培养的细胞。

[0102] 组合物

[0103] 本发明还提供了通过本文描述的方法生产的培养的细胞。可以在体内、离体或体外实践本发明的组合物。在一个方面,提供了表达a)LDH特异性的siRNA和b)PDHK特异性的siRNA的培养中的细胞。在一些实施方案中,培养的细胞进一步表达第二种PDHK特异性的siRNA。在一些实施方案中,培养的细胞进一步表达第三种PDHK特异性的siRNA。在一些实施方案中,培养的细胞进一步表达第四种PDHK特异性的siRNA。

[0104] 在一些实施方案中,培养中的细胞表达a)LDHa特异性的siRNA和b)分别对PDHK1、PDHK2和PDHK3特异性的siRNA。在一些实施方案中,培养中的细胞表达a)LDHb特异性的siRNA和b)分别对PDHK1、PDHK2和PDHK3特异性的siRNA。在一些实施方案中,培养中的细胞表达a)LDHc特异性的siRNA和b)分别对PDHK1、PDHK2和PDHK3特异性的siRNA。

[0105] 在一些实施方案中,培养中的细胞表达a)LDHa特异性的siRNA和b)对两种PDHK特异性的siRNA,其中PDHK选自PDHK1、PDHK2、PDHK3和PDHK4。在一些实施方案中,培养中的细胞表达a)LDHb特异性的siRNA和b)对两种PDHK特异性的siRNA,其中PDHK选自PDHK1、PDHK2、PDHK3和PDHK4。在一些实施方案中,培养中的细胞表达a)LDHc特异性的siRNA和b)对两种PDHK特异性的siRNA,其中PDHK选自PDHK1、PDHK2、PDHK3和PDHK4。

[0106] 在另一个方面,提供了培养中的细胞,其包含编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接。在一些

实施方案中,细胞进一步包含编码第二种PDHK特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,且其中第三在异源核酸序列与第三个启动子有效连接。在一些实施方案中,细胞进一步包含编码第三种PDHK特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,且其中第四种异源核酸序列与第四个启动子有效连接。在一些实施方案中,细胞进一步包含编码第四种PDHK特异性的siRNA的第五种异源核酸序列,且其中第五异源核酸序列与第五个启动子有效连接。

[0107] 在一些实施方案中,培养中的细胞包含编码LDHa特异性的siRNA的第一种异源核酸序列,编码PDHK1特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,编码PDHK2特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,和编码PDHK3特异性的siRNA的第四异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子(例如,U6)有效连接,而其中第二、第三和第四种异源核酸序列与第二个启动子(例如,H1)有效连接。在一个变化中,编码siRNA的第一种异源核酸序列是LDHb特异性的。在一个变化中,编码siRNA的第一种异源核酸序列是LDHb特异性的。

[0108] 在一些实施方案中,培养中的细胞包含编码LDHa特异性的siRNA的第一种异源核酸序列,编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,编码PDHK特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,其中PDHK选自PDHK1、PDHK2、PDHK3和PDHK4,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子(例如,U6)有效连接,而其中第二和第三种异源核酸序列与第二个启动子(例如,H1)有效连接。在一个变化中,编码siRNA的第一种异源核酸序列是LDHb特异性的。在一个变化中,编码siRNA的第一种异源核酸序列是LDHc特异性的。

[0109] 在一些实施方案中,细胞培养物包括至少约5、10、15、20、50、75、100、200、500、750、1,000、5,000、7,500、10,000、15,000或更多个细胞。

[0110] 在另一个方面,提供了具有低于乳酸消耗速率的乳酸合成速率的培养物中的细胞。在一些实施方案中,培养中的细胞具有少于约负0.2mg/10⁶细胞/天、负0.1mg/10⁶细胞/天、负0.08mg/10⁶细胞/天、负0.06mg/10⁶细胞/天、负0.04mg/10⁶细胞/天、负0.02mg/10⁶细胞/天、负0.01mg/10⁶细胞/天、负0.008mg/10⁶细胞/天、负0.006mg/10⁶细胞/天、负0.004mg/10⁶细胞/天或负0.002mg/10⁶细胞/天的平均乳酸生产速率。

[0111] 在一些实施方案中,培养中的细胞包含编码LDHa特异性的siRNA的第一种异源核酸序列,编码PDHK1特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,编码PDHK2特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,和编码PDHK3特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子(例如,U6)有效连接,而其中第二、第三和第四种异源核酸序列与第二个启动子(例如,H1)有效连接,且其中培养中的细胞具有约负0.02mg/10⁶细胞/天的平均乳酸生产速率。

[0112] 在另一个方面,提供了含有LDH和PDHK特异性的siRNA的培养中的细胞,所述细胞具有减少的重量摩尔渗透压浓度。在一些实施方案中,含有LDH和PDHK特异性的siRNA的培养中的细胞具有少于约500mOsm、450mOsm、400mOsm、350mOsm、300mOsm、250mOsm、200mOsm或150mOsm中任一项的重量摩尔渗透压浓度。

[0113] 在一些实施方案中,培养中的细胞包含编码LDHa特异性的siRNA的第一种异源核酸序列,编码PDHK1特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,编码PDHK2特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,和编码PDHK3特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子(例如,U6)有效连接,而其中第二、第三和第四种异源核酸序列与第二个启动子(例如,H1)有效连接,且其中培养中的细胞具有约300mOsm的重量摩尔渗透压

浓度。

[0114] 在另一个方面,提供了具有增加的比生产力(Q_p)的培养中的细胞。在一些实施方案中,培养的细胞具有较之没有包含PDHK和LDH的异源核酸序列的培养的细胞高至少约60%、高至少约65%、高至少约70%、高至少约75%、高至少约80%、高至少约85%、高至少约90%或高至少约95%的比生产力。在一些实施方案中,培养的细胞具有较之没有包含PDHK和LDH的异源核酸序列的培养的细胞高约67%、高约69%、高约71%、高约72%、高约73%、高约74%、高约75%、高约76%、高约77%、高约78%、高约79%、高约81%、高约83%、高约85%、高约87%、高约89%、高约91%、高约93%、高约95%、高约97%或高约99%的比生产力。

[0115] 在一些实施方案中,培养中的细胞包含编码LDHa特异性的siRNA的第一种异源核酸序列,编码PDHK1特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,编码PDHK2特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,和编码PDHK3特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子(例如,U6)有效连接,而其中第二、第三和第四种异源核酸序列与第二个启动子(例如,H1)有效连接,且其中培养中的细胞具有约75%更高的比生产力。

[0116] 在另一个方面,提供了通过本文中的方法生产的培养的细胞,所述细胞具有增加的多肽生产力(例如,抗体生产力或效价,按g/L)。在一些实施方案中,培养的细胞具有较之没有包含PDHK和LDH的异源核酸序列的培养细胞高至少约10%至约800%的多肽生产力。在一些实施方案中,培养的细胞具有较之没有包含PDHK和LDH的异源核酸序列的培养细胞高约10%、高约15%、高约20%、高约25%、高约30%、高约35%、高约40%、高约45%、高约50%、高约55%、高约58%、高约60%、高约65%、高约70%、高约71%、高约75%、高约80%、高约85%、高约90%、高约95%、高约100%、高约125%、高约150%、高约200%、高约250%、高约300%、高约350%、高约400%、高约450%、高约500%、高约550%、高约600%、高约650%、高约700%、高约750%或高约800%的多肽生产力。在一些实施方案中,培养的细胞具有较之没有包含PDHK和LDH的异源核酸序列的培养的细胞高至少约55%、高至少约60%、高至少约65%、高至少约68%、高至少约70%、高至少约80%、高至少约85%或高至少约90%的多肽生产力。

[0117] 在一些实施方案中,培养中的细胞包含编码LDHa特异性的siRNA的第一种异源核酸序列,编码PDHK1特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,编码PDHK2特异性的siRNA的第三种异源核酸序列,和编码PDHK3特异性的siRNA的第四种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子(例如,U6)有效连接,其中第二、第三和第四种异源核酸序列与第二个启动子(例如,H1)有效连接,且其中培养的细胞具有较之没有包含PDHK1、PDHK2、PDHK3和LDHa的异源核酸序列的培养的细胞高至少约68%的抗体生产力(例如,按g/L)。

[0118] 在一些实施方案中,培养的细胞具有较之没有PDHK和LDH特异性的siRNA的培养细胞高至少约10%至约800%的多肽(在一些实施方案中,是抗体)生产力。在一些实施方案中,培养的细胞具有较之没有PDHK和LDH特异性的siRNA的培养的细胞高约10%、高约15%、高约20%、高约25%、高约30%、高约35%、高约40%、高约45%、高约50%、高约55%、高约60%、高约65%、高约70%、高约75%、高约80%、高约85%、高约90%、高约95%、高约100%、高约125%、高约150%、高约200%、高约250%、高约300%、高约350%、高约400%、高约450%、高约500%、高约550%、高约600%、高约650%、高约700%、高约750%或高约

800%的多肽生产力。在一些实施方案中,培养的细胞具有较之没有PDHK和LDH特异性的siRNA的培养的细胞高至少约65%、高至少约68%、高至少约70%、高至少约80%、高至少约85%或高至少约90%的多肽生产力。在一些实施方案中,抗体生产力较之没有对DHK和LDH特异性的siRNA的培养的细胞高至少约68%。

[0119] 在另一个方面,提供了载体,所述载体包含编码LDH特异性的siRNA的第一种异源核酸序列和编码PDHK特异性的siRNA的第二种异源核酸序列,其中第一种异源核酸序列与第一个启动子有效连接,且其中第二种异源核酸序列与第二个启动子有效连接。

[0120] 在一些实施方案中,载体含有处于表达控制序列控制下的核酸。如本文中使用的,“表达控制序列”意指指导目标核酸转录的核酸序列。表达控制序列可以是启动子,例如组成型或可诱导型启动子,或增强子。“可诱导型启动子”是在环境或发育调控下有活性的启动子。表达控制序列与待转录的核酸区段有效连接。

[0121] 在一些实施方案中,载体还包括终止序列。终止控制区还可以源自宿主细胞的各种天然的基因。在一些实施方案中,终止序列和启动子序列源自相同的来源。在另一个实施方案中,终止序列是宿主细胞内源的。任选地,可包括终止位点。为了有效表达多肽,编码多肽的DNA通过起始密码子与选定的表达控制区有效连接,使表达导致恰当的信使RNA形成。

[0122] 在一些实施方案中,载体含有选择性标志物。术语“选择性标志物”指能够在宿主细胞中表达的核酸,从而允许容易地选择含有导入的核酸或载体的那些宿主细胞。可选择标志物的实例包括但不限于抗生素抗性核酸(例如,卡那霉素、氨苄青霉素、羧苄青霉素、庆大霉素、潮霉素、腐草霉素、博来霉素、新霉素或氯霉素)和/或赋予代谢优势的核酸,例如宿主细胞上营养优势。在一些实施方案中,选择性标志物是潮霉素核酸。

[0123] 多肽

[0124] 使用本文描述的方法和培养的细胞生产的多肽或蛋白质包括但不限于抗体或免疫粘附素。生成此类分子的技术描述如下

[0125] 抗体

[0126] 落入本发明范围内的抗体包括但不限于:抗CD20抗体,例如嵌合的抗CD20“C2B8”,如美国专利号5,736,137(**RITUXAN**[®]);抗VEGF抗体,包括人源化和/或亲和力成熟的抗VEGF抗体,例如人源化抗VEGF抗体huA4.6.1**AVASTIN**[®](Kim等人,Growth Factors,7:53-64(1992),国际公开号W0 96/30046和W0 98/45331,公开于1998年10月15日)和V3LA;抗MUC16抗体;抗CD4抗体,例如cM-7412抗体(Choy等人,Arthritis Rheum.39(1):52-56(1996)) and Ibalizumab(TNX355)抗体;抗MET抗体,例如单臂5D5抗C-Met抗体;抗HER2抗体曲妥珠单抗(**HERCEPTIN**[®])(Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285-4289(1992),美国专利号5,725,856)和人源化2C4(W001/00245,Adams等人);2H7抗体的嵌合或人源化变体,如美国专利号5,721,108B1或托西莫单抗(**BEXXAR**[®]);抗IL-8抗体(St John等人,Chest,103:932(1993),和国际公开号W0 95/23865);抗前列腺干细胞抗原(PSCA)抗体(W001/40309);抗CD40抗体,包括S2C6及其人源化变体(W000/75348);抗CD1抗体(美国专利号5,622,700,W0 98/23761,Steppe等人,Transplant Intl.4:3-7(1991),和Hourmant等人,Transplantation 58:377-380(1994));抗CD18(美国专利号5,622,700,公开于1997年4月22日,或如W0 97/26912,公开于1997年7月31日);抗IgE抗体(包括E25、E26

和E27;美国专利号5,714,338,公开于1998年2月3日,或美国专利号5,091,313,公开于1992年2月25日,W093/04173,公开于1993年3月4日,或国际申请号PCT/US98/13410,提交于1998年6月30日,美国专利号5,714,338,Presta等人,J. Immunol. 151:2623-2632(1993),和国际公开号W0 95/19181);抗Apo-2受体抗体(W0 98/51793,公开于1998年11月19日);抗TNF- α 抗体,包括cA2(**REMICADE**[®]),CDP571和MAK-195(参见美国专利号5,672,347,公开于1997年9月30日;Lorenz等人,J. Immunol. 156(4):1646-1653(1996);和Dhainaut等人,Crit. Care Med. 23(9):1461-1469(1995));抗组织因子(TF)抗体(欧洲专利号0 420 937B1,于1994年11月9日授权);抗人 α 4 β 7整联蛋白抗体(W0 98/06248,公开于1998年2月19日);抗表皮生长因子受体(EGFR)抗体(例如,嵌合的或人源化225抗体,如W0 96/40210,公开于1996年12月19日);抗CD3抗体,例如OKT3(美国专利号4,515,893,公开于1985年5月7日);抗CD25或抗Tac抗体,例如CHI-621(**SIMULECT**[®]和**ZENAPAX**[®](参见美国专利号5,693,762,公开于1997年12月2日);抗CD52抗体,例如CAMPATH-1H(Riechmann等人,Nature 332:323-337(1988));抗Fc受体抗体,例如针对Fc γ RI的M22抗体,如Graziano等人,J. Immunol. 155(10):4996-5002(1995);抗癌胚抗原(CEA)抗体,例如hMN-14(Sharkey等人,Cancer Res. 55(23Suppl):5935s-5945s(1995);针对乳腺表皮细胞的抗体,包括huBrE-3、hu-Mc 3和CHL6(Ceriani等人,Cancer Res. 55(23):5852s-5856s(1995);和Richman等人,Cancer Res. 55(23Suppl):5916s-5920s(1995));结合结肠癌细胞的抗体,例如C242(Litton等人,Eur J Immunol. 26(1):1-9(1996));抗CD38抗体,例如AT 13/5(Ellis等人,J. Immunol. 155(2):925-937(1995));抗CD33抗体,例如Hu M195(Jurcic等人,Cancer Res 55(23Suppl):5908s-5910s(1995)和CMA-676或CDP771;抗CD22抗体,例如LL2或LymphoCide(Juweid等人,Cancer Res 55(23Suppl):5899s-5907s(1995));抗EpCAM抗体,例如17-1A(**PANOREX**[®]);抗GpIIb/IIIa抗体,例如阿昔单抗或c7E3 Fab(**REOPRO**[®]);抗RSV抗体,例如MEDI-493(**SYNAGIS**[®]);抗CMV抗体,例如**PROTOVIR**[®];抗HIV抗体,例如PR0542;抗肝炎抗体,例如抗Hep B抗体**OSTAVIR**[®];抗CA 125抗体,例如OvaRex;抗独特型GD3表位抗体BEC2;抗 α v β 3抗体,包括**VITAXIN**[®];抗人肾细胞癌抗体,例如ch-G250;ING-1;抗人17-1A抗体(3622W94);抗人结肠直肠癌肿瘤抗体(A33);针对GD3神经节苷脂的抗人黑素瘤抗体R24;抗人鳞状细胞癌(SF-25);和抗人白细胞抗原(HLA)抗体,例如Smart ID10和抗HLA DR抗体Oncolym(Lym-1)。

[0127] 除上述具体指出的抗体外,熟练的技术人员可以例如,使用下述技术生成针对目标抗原的抗体。

[0128] (i) 抗原选择和制备

[0129] 本文中的抗体是针对目标抗原的。优选地,抗原是生物学重要的多肽,并且向患疾病或病症的哺乳动物施用抗体可以在所述哺乳动物中导致治疗益处。然而,还考虑针对非多肽抗原的抗体(例如,肿瘤相关性糖脂抗原;参见美国专利号5,091,178)。当抗原是多肽时,其可以是跨膜分子(例如,受体)或配体,例如生长因子。示例性的抗原包括在下文章节(3)中描述的蛋白质。本发明涵盖的抗体的示例性的分子靶包括CD蛋白,例如CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD22和CD34;ErbB受体家族的成员,例如EGFR、HER2、HER3或HER4受体;细胞粘附分子,例如LFA-1、Mac1、p150,95、VLA-4、ICAM-1、VCAM和 α v/ β 3整联蛋白,包括其 α 或 β 亚基

(例如,抗CD11a、抗CD18或抗CD11b抗体);生长因子,例如VEGF;IgE;血型抗原;flk2/flt3受体;肥胖(OB)受体;mpl受体;CTLA-4;蛋白C或本文提及的任何其他抗原。

[0130] 可以使用可溶性抗原或其片段,任选地与其他分子缀合的,作为生成抗体的免疫原。对于跨膜分子,例如受体,其片段(例如,受体的胞外结构域)可以用作免疫原。备选地,可以使用表达跨膜分子的细胞作为免疫原。此类细胞可以源自天然来源(例如,癌细胞系)或可以是通过重组技术转化以表达跨膜分子的细胞。

[0131] 可用于制备抗体的其他抗原及其形式对本领域技术人员是显而易见的

[0132] (ii)多克隆抗体

[0133] 优选通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂,在动物中培养多克隆抗体。可以使用双功能剂或衍生剂(例如,马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl₂或R¹N=C=NR,其中R和R¹是不同的烷基)将抗原与在待免疫物种中免疫原性的蛋白质缀合,例如钥孔虫血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0134] 通过例如组合100μg或5μg蛋白质或缀合物(分别对于兔或小鼠)与3体积的弗氏完全佐剂,并在多个位点皮内注射溶,用抗原、免疫源性缀合物或衍生物免疫动物。一个月后,用弗氏完全佐剂中的1/5至{级分(1/10)}原始抗原或缀合物的量通过多个位点皮下注射来强化动物。7至14天后,给动物放血,测定血清的抗体效价。强化动物直到效价平台。优选地,用相同抗原的缀合物,但是缀合于不同蛋白质和/或通过不同交联剂强化动物。还可以在重组细胞培养物中制备缀合物作为蛋白质融合体。此外,还适合使用凝聚剂(例如明矾)来增强免疫应答。

[0135] (iii)单克隆抗体

[0136] 可以使用Kohler等人,Nature,256:495(1975)中首次描述的杂交瘤方法或者可通过重组DNA方法(美国专利号4,816,567)制备单克隆抗体。

[0137] 在杂交瘤方法中,如上所述免疫小鼠或其他恰当的宿主动物,例如仓鼠或猕猴,以触发生产或能够生产特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。备选地,可以在体外免疫淋巴细胞。然后,使用合适的融合剂(例如,聚乙二醇)将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103页(Academic Press, 1986))。

[0138] 在合适的培养基中接种并生长如此制备的杂交瘤细胞,所述培养基优选地含有一种或多种抑制未融合的、亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤的培养基通常包括次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷(HAT培养基),所述物质阻止HGPRT-缺陷细胞的生长。

[0139] 优选的骨髓瘤细胞是可有效融合、支持所选择的抗体生产细胞稳定的高水平的抗体生产,并对培养基(例如HAT培养基)敏感的细胞。其中,优选的骨髓瘤细胞系是小鼠骨髓瘤系,例如源自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的细胞系,可获得自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, 和SP-2或X63-Ag8-653细胞,可获得自美国典型培养物收藏中心(American Type Culture Collection, Rockville, Md. 美国)。还已经描述了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系用于生产人单克隆抗体(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))。

[0140] 测定生长了杂交瘤细胞的培养基中针对抗原的单克隆抗体生产。优选地,通过免疫沉淀或体外结合测定,例如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA),确定由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性。

[0141] 在鉴别了生产具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释方法亚克隆并通过标准方法生长克隆(Goding,Monoclonal Antibodies: Principles and Practice,第59-103页(Academic Press,1986))。用于该目的合适的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,可以在体内作为动物内的腹水肿瘤来生长杂交瘤细胞。

[0142] 通过常规的免疫球蛋白纯化方法(例如,蛋白A-琼脂糖、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析),从培养基、腹水液或血清中恰当地分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。优选使用本文所述的使用pH梯度的蛋白A亲和层析方法。

[0143] 使用常规方法(例如,通过使用能够特异性结合编码单克隆抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序编码单克隆抗体的DNA。杂交瘤细胞作为此类DNA的优选来源。一旦分离,则可以将DNA置于表达载体中,然后将所述载体转染到不生产免疫球蛋白的宿主细胞中,例如E.coli细胞、猿猴COS细胞、中华仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。

[0144] 还可以修饰DNA,通过例如用人重链和轻链恒定结构域的编码序列替换同源的小鼠序列(美国专利号4,816,567;Morrison,等人,Proc.Natl Acad.Sci.USA,81:6851(1984)),或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价连接。

[0145] 通常用此类非免疫球蛋白多肽替换抗体的恒定结构域,或者替换抗体的一个抗原结合位点的可变结构域,以创造嵌合的二价抗体,所述二价抗体包含对抗原具有特异性的一个抗原结合位点,和对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

[0146] 可以从使用McCafferty等人,Nature,348:552-554(1990)所述技术生成的抗体噬菌体文库中分离单克隆抗体。Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)分别描述了使用噬菌体文库分离鼠和人抗体。之后的出版物描述了通过链改组(Marks等人,Bio/Technology,10:779-783(1992))生产高亲和力(nM范围)人抗体,以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse等人,Nuc.Acids.Res.,21:2265-2266(1993))。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统杂交瘤技术的可行备选方案。

[0147] (iv)人源化抗体和人抗体

[0148] 人源化抗体具有一个或多个导入其中的来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其通常来自“输入”可变结构域。可以基本按Winter及其同事(Jones等人,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature,332:323-327(1988);Verhoeven等人,Science,239:1534-1536(1988))的方法,通过用啮齿动物CDR或CDR序列替换相应的人抗体序列实施人源化。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567),其中基本上少于完整的人可变结构域被来自非人物种的相应序列替换。在实践中,人源化抗体通常是人的抗体,其中一些CDR残基和可能一些FR残基被来自啮齿动

物抗体的类似位点的残基替换。

[0149] 对用于制备人源化抗体的人轻链和重链可变结构域的选择,对于降低抗原性是非常重要的。根据所谓的“最适”方法,针对已知的人可变结构域序列的完整文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域序列。然后,接受与啮齿动物的序列最接近的人序列作为人源化抗体的人FR(Sims等人,J.Immunol.,151:2296(1993))。另一种方法使用源自具有特别亚组的轻链或重链的所有人抗体的共有序列的特别框架。同一框架可用于若干不同的人源化抗体(Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);Presta等人,J.Immunol.,151:2623(1993))。

[0150] 更重要的是,被人源化的抗体保持对抗原的高亲和力和其他有利的生物学性质。为了达到此目的,根据优选的方法,通过使用亲代和人源化序列的三维模型来分析亲代序列和多种概念性的人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的并且为本领域技术人员所熟知。说明并且展示所选择的候选免疫球蛋白的序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可获得的。检查这些展示物允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方法,能够选择并且从受体和输入序列组合FR残基使得实现所需要的抗体特征,例如对靶抗原的增强的亲和力。通常而言,CDR残基直接并且最基本地涉及对抗原结合的影响。

[0151] 备选地,现在能够生产这样的转基因动物(例如,小鼠),在免疫后,所述转基因动物能够在缺少内源性免疫球蛋白生产的条件下,生产完全的人抗体库。例如,已描述了在嵌合的和种系突变型小鼠中纯合缺失抗体重链连接区(JH)基因,导致完全抑制内源性抗体生产。在此类种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致抗原攻击时的人抗体生产。参见例如,Jakobovits等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature,362:255-258(1993);Bruggermann等人,Year in Immuno.,7:33(1993);和Duchosal等人,Nature 355:258(1992)。人抗体还可以源自噬菌体展示文库(Hoogenboom等人,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991);Vaughan等人,Nature Biotech 14:309(1996))。

[0152] (v)抗体片段

[0153] 已开发了多种技术用于生产抗体片段。传统上,这些片段是通过完整抗体的蛋白水解消化衍生的(参见例如,Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992)和Brennan等人,Science,229:81(1985))。然而,可以通过重组宿主细胞直接生产这些片段。例如,可以从上述抗体噬菌体文库分离抗体片段。备选地,可以从E.coli中直接回收Fab'-SH片段,并化学偶联以形成F(ab')₂片段(Carter等人,Bio/Technology 10:163-167(1992))。根据另一种方法,可以从重组宿主细胞培养物中直接分离F(ab')₂片段。还可以分离单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185。用于生产抗体片段的其他技术对熟练的技术人员是显而易见的。

[0154] (vi)多特异性抗体

[0155] 多特异性抗体具有至少两种不同抗原的结合特异性。尽管此类分子通常仅结合两种抗原(即,双特异性抗体,BsAbs),当在本文中使用时,具有额外特异性的抗体(例如三特异性抗体)也涵盖在该表达方式中。

[0156] 用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产基

于两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条链具有不同的特异性(Millstein等人, *Nature*, 305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadromas))生产10种不同抗体分子的潜在混合物,其中仅一种具有正确的双特异性结构。纯化正确的分子(通常通过亲和层析步骤进行)是非常麻烦的,且产量低。类似的方法公开在WO 93/08829和Traunecker等人, *EMBO J.*, 10:3655-3659(1991)中。

[0157] 根据W096/27011描述的另一种方法,可以改造在抗体分子对之间的界面,以将从重组细胞培养物中回收的异二聚体百分比最大化。优选的界面至少包含抗体恒定结构域的C_H3结构域的一部分。在该方法中,来自第一个抗体分子的界面的一条或多条小氨基酸侧链被较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)取代。通过用较小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)取代大氨基酸侧链,在第二个抗体分子的界面上创造与大侧链相同或相似尺寸的补偿性“空腔”。这提供了增加异二聚体的产量超过其他不想要的终产物(例如同二聚体)的机制。

[0158] 双特异性抗体包括交联的或“异源缀合的”抗体。例如,异源缀合物中的一个抗体可以与抗生物素蛋白偶联,另一个与生物素偶联。已经建议此类抗体例如用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利号4,676,980)和用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373和EP03089)。可以使用任何方便的交联方法制备异源缀合抗体。合适的交联剂是本领域普遍已知的,并公开在美国专利号4,676,980中,同时还有多种交联技术。

[0159] 文献中还已描述了用于从抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可以使用化学连接制备双特异性抗体。Brennan等人, *Science*, 229:81(1985)描述了这样的方法,其中蛋白水解切割完整的抗体,以生成F(ab')₂片段。在存在二巯基化物络合剂亚砷酸钠的条件下,这些片段被还原以稳定临近的二巯基并阻止形成分子间二硫键。然后,将生成的Fab'片段转化为硫代亚硝基苯甲酸(thionitrobenzoate)(TNB)衍生物。之后,通过用巯基乙胺还原,将Fab'-TNB衍生物中的一种再转化为Fab'-巯基,并与等摩尔量的其他Fab'-TNB衍生物混合,以形成双特异性抗体。所生产的双特异性抗体可用作选择性固定酶的试剂。

[0160] 目前的进展协助了从E.coli中直接回收Fab'-SH片段,所述片段可以化学偶联形成双特异性抗体。Shalaby等人, *J. Exp. Med.*, 175:217-225(1992)描述了完全人源化的双特异性抗体F(ab')₂分子的生产。每个Fab'片段分别从E.coli分泌并在体外受定向的化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达ErbB2受体的细胞和正常的人T细胞,以及引发针对人乳腺肿瘤靶的人细胞毒性淋巴细胞的裂解活性。

[0161] 还已经描述了用于从重组细胞培养物中直接制备和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已使用亮氨酸拉链生产双特异性抗体。Kostelny等人, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553(1992)。来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两个不同抗体的Fab'部分连接。抗体同源二聚体在铰链区被还原以形成单体,然后被再氧化以形成抗体异源二聚体。该方法还可以用于生产抗体同源二聚体。由Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)描述的“双抗体”技术提供了用于制备双特异性抗体片段的备选机制。片段包含通过接头与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H),所述接头太短而不允许在同一条链的两个结构域之间配对。因此,一个片段的V_H和V_L结构域被迫与另一个片段的互补V_L和V_H结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链Fv(sFv)二聚体,制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等人,

J. Immunol., 152:5368(1994)。备选地,如Zapata等人,Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)中所述,抗体可以是“线性抗体”。简而言之,这些抗体包含形成抗原结合区对的串联Fd区段对(V_H - C_H1 - V_H 和 V_L)。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0162] 考虑具有多于二价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tutt等人,J. Immunol 147:60(1991)。

[0163] 免疫粘附素

[0164] 最简单和最直接的免疫粘附素设计组合了粘附素的结合结构域(例如,受体的胞外结构域(ECD))和免疫球蛋白重链的铰链和Fc区。通常,当制备本发明的免疫粘附素时,编码粘附素的结合结构域的核酸可在C端与编码免疫球蛋白恒定结构域序列的N端的核酸融合,然而,N端融合体也是可行的。

[0165] 通常,在此类融合体中,编码的嵌合多肽将至少保留免疫球蛋白重链恒定区的功能活性的铰链、 C_H2 和 C_H3 结构域。还可以在恒定结构域Fc部分的C端或紧靠重链的 C_H1 的N端或轻链的相应区域制备融合体。制备融合体的精确位点不是关键的;特别的位点是普遍已知的并可选择,以优化免疫粘附素的生物学活性、分泌或结合特征。

[0166] 在一些实施方案中粘附素序列与免疫球蛋白 G_1 (Ig G_1)的Fc结构域N端融合。可以将整个重链恒定区与粘附素序列融合。然而,优选地,融合体中使用了在恰好化学定义了IgG Fc的木瓜蛋白酶切割位点(即,残基216,取重链恒定区的第一残基为114)上游的铰链区中开始的序列,或其他免疫球蛋白的类似位点。在一些实施方案中,粘附素氨基酸序列与IgG重链的(a)铰链区和/或 C_H2 和 C_H3 ,或(b) C_H1 、铰链、 C_H2 和 C_H3 结构域融合。

[0167] 对于双特异性免疫粘附素,免疫粘附素被装配为多聚体,特别是异源二聚体或异源四聚体。一般而言,这些装配的免疫球蛋白可具有已知的单位结构。基础的四条链结构单位是IgG、IgD和IgE存在的形式。四条链单位在较高分子量免疫球蛋白中重复;IgM一般作为由二硫键聚拢在一起的四个基本单位的五聚体存在。IgA球蛋白,以及偶尔的IgG球蛋白也可以多聚体形式存在于血清中。在多聚体的情况下,四个单位的每一个可以是相同或不同的。

[0168] 本文范围内的多种示例性装配的免疫粘附素如下图示意:

[0169] (a) AC_L-AC_L ;

[0170] (b) $AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HCH, \text{或} V_LCL-AC_H)$;

[0171] (c) $AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HCH, V_LCL-AC_H, \text{或} V_LCL-V_HCH)$

[0172] (d) $AC_L-V_HCH-(AC_H, \text{或} AC_L-V_HCH \text{或} V_LCL-AC_H)$;

[0173] (e) $V_LCL-AC_H-(AC_L-V_HCH, \text{或} V_LCL-AC_H)$; 和

[0174] (f) $(A-Y)_n-(V_LCL-V_HCH)_2$,

[0175] 其中,每个A代表相同或不同的粘附素氨基酸序列;

[0176] V_L 是免疫球蛋白轻链可变结构域;

[0177] V_H 是免疫球蛋白重链可变结构域;

[0178] C_L 是免疫球蛋白轻链恒定结构域;

[0179] C_H 是免疫球蛋白重链恒定结构域;

[0180] N是大于1的整数;

[0181] Y表示共价交联剂的残基。

[0182] 为了简洁,上述结构仅显示了关键的特征;未标示出免疫球蛋白的连接(J)或其他结构域,也没有显示二硫键。然而,当要求此类结构域的结合活性时,应该构建使其存在于免疫球蛋白中占据的常见位置上。

[0183] 备选地,粘附素序列可以插入到免疫球蛋白重链和轻链序列之间,从而获得包含嵌合重链的免疫球蛋白。在该实施方案中,粘附素序列与免疫球蛋白每条臂的免疫球蛋白重链的3'端融合,或者在铰链和C_H2结构域之间,或者在C_H2和C_H3结构域之间融合。Hoogenboom等人,Mol.Immunol.28:1027-1037(1991)报道了相似的构建体。

[0184] 虽然免疫球蛋白轻链不需要存在于本发明的免疫粘附素中,但可存在免疫球蛋白轻链,与粘附素-免疫球蛋白重链融合多肽共价缔合,或与粘附素直接融合。在前一种情况下,编码免疫球蛋白轻链的DNA通常与编码粘附素-免疫球蛋白重链融合蛋白的DNA共表达。分泌时,杂合的重链和轻链将共价缔合,以提供包含2个二硫键连接的免疫球蛋白重链-轻链对的免疫球蛋白样结构。适合制备此类结构的方法例如公开在1989年3月28日公布的美专利号4,816,567中。

[0185] 可以通过框内融合编码粘附素部分的cDNA序列与免疫球蛋白cDNA序列,最方便地构建免疫粘附素。然而,还可以采用与基因组免疫球蛋白片段的融合(参见例如,Aruffo等人,Cell 61:1303-1313(1990);和Stamenkovic等人,Cell 66:1133-1144(1991))。后一种类型的融合需要存在用于表达的Ig调控序列。可以基于源自脾或外周血淋巴细胞的cDNA文库的公开的序列,通过杂交或通过聚合酶链式反应(PCR)技术,分离编码IgG重链恒定区的cDNA。将编码“粘附素”和免疫粘附素的免疫球蛋白部分的cDNA串联插入到在选定的宿主细胞中指导有效表达的质粒载体中。

[0186] 多肽的表达

[0187] 使用本文描述的方法来生产的多肽(例如,抗体)一般是使用重组技术生产的。

[0188] 用于在本文中的载体中克隆或表达siRNA的合适宿主细胞是原核细胞、酵母或高等真核细胞。用于该目的的合适的原核细胞包括真细菌,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如,肠杆菌科(Enterobacteriaceae),如埃希氏菌属(*Escherichia*),例如大肠杆菌、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷白氏杆菌属(*Klebsiella*)、变形菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*),例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*),例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),和志贺氏菌属(*Shigella*),以及杆菌属(*Bacilli*),如枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)(例如,在1989年4月12日公开的DD 266,710中公开的地衣芽孢杆菌),假单胞菌属(*Pseudomonas*)如,绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和链霉菌属(*Streptomyces*)。这些实例是示例性的而非限制性的。

[0189] 除原核细胞外,真核微生物(例如丝状真菌或酵母)也是多肽编码载体的合适的克隆或表达宿主。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通的烘焙酵母,是最普遍使用的低等真核宿主微生物。然而,多种其他属、种和菌株也是通常可获得的并在本文中有用的,例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母(*Kluyveromyces*)宿主,例如乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*(ATCC12,424))、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*(ATCC 16,045))、威克克鲁维酵母(*K.wickerhamii*(ATCC 24,178))、瓦尔提克鲁维酵母(*K.waltii*(ATCC 56,500))、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilum*

(ATCC 36,906))、耐热克鲁维酵母(*K. thermotolerans*)和马克思克鲁维酵母(*K.marxianus*);耶氏酵母属(*Yarrowia*(EP 402,226));巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*(EP183,070));念珠菌属(*Candida*);里氏木霉(*Trichoderma reesia*(EP244,234));粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*);施旺氏酵母属(*Schwanniomyces*),例如西方施旺氏酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌,例如脉孢菌属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*)和曲霉属(*Aspergillus*)宿主,例如构巢曲霉(*A.nidulans*)和黑曲霉(*A.niger*)。

[0190] 用于表达糖基化多肽的合适的培养细胞源自多细胞生物。无脊椎生物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了多种杆状病毒株和变体和来自宿主(例如草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)(毛毛虫)、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*))的相应的容纳昆虫宿主细胞。多种用于转染的病毒株是可公开获得的,例如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5株,并且此类病毒可根据本发明用作本文中的病毒,特别是用于转染草地贪夜蛾细胞。还可以使用棉花、玉米、土豆、大豆、牵牛花、西红柿和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

[0191] 然而,对脊椎动物细胞具有最大的兴趣,在培养(组织培养)中增殖脊椎动物细胞已成为常规的方法。哺乳动物细胞系的实例包括但不限于用SV40转化的猴肾CV1细胞(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚肾细胞(293或在悬浮培养中生长的亚克隆293细胞,Graham等人,J.Gen.Virol.36:59(1977));幼年仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中华仓鼠卵巢细胞/DHFR(CHO,Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));小鼠支持细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC 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;和人肝细胞瘤细胞(Hep G2)。

[0192] 用上述用于多肽生产的表达或克隆载体转化宿主细胞,并在经过修饰适合诱导启动子的常规营养基质中培养,选择转化体或扩增编码所需序列的基因。

[0193] 可在多种培养基中培养用于生产本发明方法使用的多肽的宿主细胞。可商购的培养基,例如Ham's F10(Sigma)、最少必需培养基(Minimal Essential Medium)((MEM)、(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)和Dulbecco's Modified Eagle's Medium((DMEM)、(Sigma)或**GIBCO®**Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12(Invitrogen))适合培养宿主细胞。此外,可以使用Ham等人,Meth.Enz.58:44(1979);Barnes等人,Anal.Biochem.102:255(1980);美国专利号4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或5,122,469;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利号Re.30,985中描述的任何培养基作为宿主细胞的培养基。还可以使用其他定义的或合成的生长培养基,用于培养特定类型宿主细胞的恰当培养基是分子和细胞生物学领域技术人员已知的。需要时,任何这类培养基都可补充激素和/或其他生长因子(例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(例如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(例如HEPES)、核苷酸(例如腺苷酸和胸腺嘧啶)、抗生素(例如

GENTAMYCINTM、潮霉素)、微量元素(定义为通常以终浓度在微摩尔范围内存在的无机化合物),和葡萄糖或等价的能源。还可以包括恰当浓度的本领域技术人员已知的任何其他必需的添加剂。培养条件(例如温度、pH等)是之前选择的宿主细胞用于表达时使用的,对普通技术人员是显而易见的。

[0194] 可以使用标准的细胞培养条件培养细胞。在恰当的温度、气体混合物和pH(例如约20°C至约37°C,约6%至约84%CO₂和约5至约9之间的pH)生长维持细胞。在一些实施方案中,细胞在37°C下,在恰当的细胞培养基中生长第一个48小时,再转移到33°生长接下来的12天。基于宿主细胞的需求,可以在有氧或缺氧条件下实施反应。在一些实施方案中,使用任何已知的发酵模式生长细胞,包括但不限于分批、补料-分批或连续的方法。

[0195] 当使用重组技术时,可以在细胞内、周质空间中生产多肽,或直接分泌到培养基中。如果在细胞内生产多肽,第一步是例如通过离心或超滤去除微粒碎片,可以是宿主细胞或裂解的细胞(例如由均质化产生的)。当多肽分泌到培养基中时,一般首先使用可商购的蛋白质浓缩滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单位),浓缩来自此类表达系统的上清液。

[0196] 试剂盒

[0197] 本发明还提供了包含组合物和含有对本发明方法的说明的使用说明书的试剂盒。试剂盒可以包含培养的细胞、siRNA、靶序列、转染试剂、本发明方法的说明书或其任意的组合。

[0198] 提供下列实例供示例,而不是限制本发明。

实施例

[0199] 应理解,本文描述的实例和实施方案仅用于说明的目的,它的多种修饰和改变对本领域技术人员是提示性的,并包括在本申请的主旨和范围内。

[0200] 实施例1:敲低PDHK1、PDHK2、PDHK3和LDHa降低了乳酸生产并且增加抗体效价/生产力

[0201] 材料和方法

[0202] 构建靶向LDHa/PDHK1、2、3的载体

[0203] 如Kim和Lee等人,Appl.Microbiol.Biotechnol.74(1):152-159(2007)所述,选择LDHa的靶向序列,并且LDHa siRNA序列是CTCGATTCCGTTATCTGAT(SEQ ID NO:1)。为了设计PDHK的siRNA-靶向序列,通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR),用位于PDHK的高度保守区内的引物,克隆CHO PDHK1、2和3的部分cDNA序列。根据Elbashier等人(Methods 26:199-213(2002))描述的方法,使用部分克隆的序列用于siRNA序列设计。

[0204] PDHK1靶向(siRNA)序列:GCAGTTCCTGGACTTCGGA(SEQ ID NO:2)

[0205] PDHK2靶向(siRNA)序列:CATTCACTACTTCTTGGAC(SEQ ID NO:3)

[0206] PDHK3靶向(siRNA)序列:TGTAGCTGATGTCGTGAAA(SEQ ID NO:4)

[0207] 使用pSilencer 3.1-H1 hygro载体(Cat#.AM5766,Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX),构建含有LDHa和PDHK靶向序列的单构建体。将LDHa siRNA插入到pSilencer 3.1的KasI位点,在紧邻其5'端处添加pSilencer 2.1的U6启动子。将PDHK1和2 siRNA的siRNA序列分别插入到BamHI/HindIII和HindIII位点。向PDHK2 siRNA的3'侧导入BgIII位

点,并用于插入PDHK3 siRNA。阴性对照使用含有乱序的siRNA序列的pSilencer 3.1载体。

[0208] 细胞培养

[0209] 在37℃和5%CO₂,在专利所有的基于DMEM/F12培养基摇瓶中培养二氢叶酸还原酶(DHFR)缺陷型CHO细胞。每3至4天将细胞传代。

[0210] 培育稳定的siRNA细胞系(siRNA克隆)

[0211] 根据生产商(Invitrogen,Carlsbad,CA)的推荐,使用Lipofectamine 2000 CD (Cat#12566-014,Invitrogen,Carlsbad,CA),转染耐受25nM氨甲蝶呤(MTX)并表达重组单克隆抗体的CHO细胞系。离心转染的细胞,并接种到含有25nM MTX和400ug/ml潮霉素(Cat#10687010,Invitrogen,Carlsbad,CA)的基于DMEM/F-12的选择性(不含甘氨酸、次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷)培养基中。将重新悬浮的细胞种植到96孔板中以生成单个克隆。siRNA克隆源自含有LDHa和PDHK基因靶向序列的siRNA质粒转染,而模拟克隆源自含有由生产商设计的、与已知基因没有任何可察觉的同源性的打乱序列(scramble sequence)的模拟质粒(Cat#AM5766,Applied Biosystems/Ambion,Austin,TX)转染。

[0212] 定量实时PCR(qRT-PCR或Taqman)分析

[0213] 使用RNeasy 96试剂盒(Cat#74181,Qiagen)分离来自单个克隆的总RNA,并用DNase消化(Cat#79254,RNase free DNase set,Qiagen)处理,以去除可能存在于分离的RNA样品中的剩余DNA。根据生产商(Cat#4309169,Applied Biosystems)的说明,使用通用qRT-PCR预混合液(master mix)实施Taqman,并将PDHK和LDHa的表达水平对持家基因β-微球蛋白进行归一化。

[0214] 用于Taqman分析的引物和探针序列如下:

[0215] PDHK1正向引物:GCCCATCTCATCGAAAACA(SEQ ID NO:5)

[0216] PDHK1反向引物:AGCCATCTTTAATGACTTCGACTAC(SEQ IDNO:6)

[0217] PDHK1探针:TCGCAGTTTGGATTTATGCTTCCAATG(SEQ IDNO:7)

[0218] PDHK2正向引物:GATCTGTCCATCAAAATGAGTGA(SEQ IDNO:8)

[0219] PDHK2反向引物:TGTGGAGTACATGTAGCTGAAGAG(SEQ IDNO:9)

[0220] PDHK2探针:CTCTCAATCTTCCTCAAGGGGACACC(SEQ IDNO:10)

[0221] PDHK3正向引物:CAGCCTGGAGCCTACAAGA(SEQ ID NO:11)

[0222] PDHK3反向引物:GGCATAAGTCGAGAAATTGG(SEQ IDNO:12)

[0223] PDHK3探针:AAGCCATAACCAAATCCAGCCAAGG(SEQ IDNO:13)

[0224] LDHa正向引物:GCCGAGAGCATAATGAAGAA(SEQ ID NO:14)

[0225] LDHa反向引物:CCATAGAGACCCTTAATCATGGTA(SEQ IDNO:15)

[0226] LDHa探针:CTTAGGCGGGTGCATCCCATTT(SEQ ID NO:16)

[0227] β-微球蛋白正向引物:TCCTCTCAGTGGTCT GCT TGG(SEQ IDNO:17)

[0228] β-微球蛋白反向引物:TGGCGTGTGTAGACTTGCACTT(SEQ IDNO:18)

[0229] β-微球蛋白探针:TGCCATCCAGCGTCCCCCA(SEQ ID NO:19)

[0230] 补料-分批摇瓶克隆评估

[0231] 将12个siRNA克隆和12个模拟克隆接种到专利所有的生产培养基中,在pH 7.15下,实施14天的补料-分批培养方法,在第3天进行一次大丸剂(bolus)补料,并在第2天将温度从37℃变为33℃。使用Viacell(Beckman Coulter),通过台盼蓝染料排除,监控细胞活力

和活细胞计数。使用Nova Bioprofiile分析仪(Nova biomedical),在第3、7、10和14天测量乳酸浓度。基于全培养物体积中构建的乳酸质量平衡等式:

$$[0232] \quad S_t - S_0 = q_s \int_0^t X dt$$

[0233] 平均细胞比乳酸生产速率 q_s 计算为积分的总细胞数,以及累积的生产的乳酸 $[S_t - S_0]$ 的曲线图斜率。其中 S_t 是时间 t 时,培养物体积中的乳酸总量(mg); S_0 是时间 $t=0$ 时,培养物体积中的乳酸总量(mg); X 是在任意给定的时间 t 时,培养物体积中的细胞总数;而 q_s 是乳酸的比生产速率,按mg/细胞/天。由于上述等式描写了在 $t=0$ 和 $t=t$ 之间的时间间隔, q_s 是该时间间隔中的平均乳酸生产速率。按照本研究中使用的习惯,如果生产的乳酸比细胞消耗的乳酸更多,则 q_s 的值是正的。

[0234] 生物反应器的补料-分批操作

[0235] 在2L搅拌的罐式生物反应器(Applikon,Foster City,CA)中实施生物反应器实验,在1.5L工作体积下进行操作。在接种72小时进行浓缩的营养物补料后,在14天的补料-分批培养过程中,根据需要添加葡萄糖。分别维持生物反应器培养物中的溶解氧和搅拌在30%空气饱和和275rpm的设定值。通过添加 CO_2 气体或1M Na_2CO_3 ,控制培养pH为7.0。在第一个48小时,维持培养温度为37℃,之后转换为33℃。使用B.Braun Biotech的Digital Control Unit(Allentown,PA),实现在每个生物反应器中的过程控制。

[0236] 样品分析

[0237] 用UV检测,使用常规的蛋白A亲和层析,确定抗体效价。参见Fahrner等人,Biotechnol.Appl.Biochem.30:121-128(1999)。通过Vi-Cell AS细胞计数器(Beckman Coulter,Fullerton,CA)),分析培养物样品的活细胞浓度和活力,通过Bioprofile 400生物分析器(NovaBiomedical,Waltham,MA),分析培养物样品的pH和乳酸,通过多样品渗透压仪(Advanced Instruments,Norwood,MA),分析培养物样品的重量摩尔渗透压浓度。

[0238] 统计学分析

[0239] 使用JMP软件进行双侧学生t检验。

[0240] 结果

[0241] 构建靶向PDHK和LDHa的siRNA载体

[0242] 据Harris等人(Adv.Enzyme Regul.42:249-59(2002))报道,在哺乳动物细胞中有4种PDHK基因。为了评估CHO细胞中是否存在所有4种PDHK基因,基于人和小鼠PDHK序列之间的保守区设计4组RT-PCR引物。PCR结果揭示了虽然可以在CHO细胞中检测到所有4种PDHK mRNA,在DHFR缺陷型(二氢叶酸还原酶缺陷型)CHO细胞中PDHK4 mRNA水平是最低的,且远低于其他3种PDHK。因此,仅敲低了PDHK1、2和3基因与LDHa基因的表达。对于LDHa和每种PDHK,设计3种siRNA序列,并在CHO细胞中测试,以选择表现出最佳下调靶基因的siRNA序列。基于Kim和Lee.Appl.Microbiol.Biotechnol.74(1):152-9(2007)的发现,选择LDHa的最佳siRNA序列。将LDHa和PDHK的siRNA序列构建在单个载体中,其中LDHa的siRNA处于U6启动子的控制下,而各个PDHK的siRNA由H1启动子驱动(图1)。

[0243] 生成具有降低的PDHK1、2、3和LDHa表达的稳定的克隆

[0244] 将靶向PDHK和LDHa的siRNA构建体转染到表达单克隆抗体的CHO细胞中,获得称为siRNA克隆的单个克隆。使用Taqman分析,测定单个siRNA克隆中四种基因,PDHK1、2、3和

LDHa的mRNA表达。鉴定了12个表现出上述四种基因表达降低最多的siRNA克隆(图2)用于进一步分析。还将含有混乱序列的模拟载体转染到相同的抗体表达细胞中,获得称为模拟克隆的单个克隆。随机选择12个模拟克隆作为对照,并也通过Taqman分析它们的LDHa和PDHK1、2和3基因的mRNA表达水平。平均地,相比模拟克隆,在选定的12个siRNA克隆中,LDHa和PDHK1、2和3的mRNA表达水平分别降低了90%、32%、83%和70%(图2)。

[0245] 补料-分批摇瓶评估siRNA和模拟克隆

[0246] (a)在siRNA克隆中观察到的培养基中降低的乳酸水平和更高的pH

[0247] 为了评估siRNA-介导的LDHa和PDHK下调对乳酸生产的效应,应用14天的补料-分批和温度转换过程,在我们的专利所有的培养基和摇瓶容器中评估12个siRNA和12个模拟克隆。重复实验3次,观察到相似的结果。图中显示了作为代表的来自一组实验的结果。结果显示相比模拟克隆,siRNA克隆普遍具有降低的乳酸水平(图3)。截至第14天,siRNA克隆表现出比模拟克隆平均少91%的乳酸($p < 0.0001$)(图3A)。与为期14天的生产期中siRNA克隆中的较低乳酸水平一致,siRNA克隆的平均乳酸生产速率是负 $0.02\text{mg}/10^6\text{细胞}/\text{天}$,提示乳酸合成速率低于消耗速率。相反,模拟克隆的平均乳酸生产速率是 $0.01\text{mg}/10^6\text{细胞}/\text{天}$,表示整体乳酸合成速率高于消耗速率。在siRNA和模拟克隆之间的乳酸生产速率差异是统计学显著的($p < 0.002$)(图3B)。由于培养基中的乳酸水平影响pH,截至第14天,模拟克隆的平均pH降低至6.54,而siRNA克隆的平均pH是7.04(图3C)。观察到的较低平均pH与模拟克隆中较高的平均乳酸水平是一致的。

[0248] b)在siRNA克隆中观察到增加的抗体效价和比生产力(Q_p)

[0249] 为了研究敲低PDHK和LDHa的基因表达是否影响抗体生产,从第3、7、10和14天的补料-分批摇瓶实验中收集样品,通过蛋白A层析测量抗体效价。数据显示平均而言siRNA克隆生产比模拟克隆多68%的抗体(图4A, $p < 0.022$),并且以 $\text{pg}/\text{细胞-d}$ 测量的平均细胞比生产力(Q_p)比模拟克隆的高75%(图4B, $p < 0.006$)。为了评估细胞生长,在第3、7、10和14天收集摇瓶样品,测量活细胞计数和活力,以计算活细胞计数积分(IVCC)。与抗体效价和 Q_p 相反,在两组之间没有观察到可察觉的细胞生长差异(图4C)。siRNA和模拟克隆之间,包括聚糖谱、电荷变体和凝聚物百分比的抗体产物品质属性,是相当的。

[0250] siRNA模拟克隆的生物反应器补料-分批培养评估

[0251] 由于pH受控式补料-分批生物反应器培养是大规模生产的标准缩小模型,因此,进一步研究了在2L生物反应器中一些siRNA和模拟克隆的性能。考虑到生物反应器的可利用度和实验的复杂性的限制,出于不可实践性而没有将12个siRNA和12个模拟克隆重复两次运行。选择代谢谱最佳代表了各组的平均性能的2个代表性的siRNA克隆和2个代表性的模拟克隆,以及用于2L生物反应器评估的siRNA和模拟质粒转染的亲代品系,以将选择偏倚最小化。每天收集细胞培养样品(除第6和13天以外)用于乳酸、葡萄糖、重量摩尔渗透压浓度和效价分析。siRNA克隆的乳酸水平一般保持水平,而模拟和亲代克隆的乳酸水平则在14天的生产过程中持续增加。在第14天,在培养基中,2个siRNA克隆具有比模拟克隆或亲代克隆平均低86%的乳酸水平(图5A),并且具有比模拟克隆和亲代品系低的比乳酸生产速率(图5B)。类似地,siRNA克隆的重量摩尔渗透压浓度保持在约 300mOsm ,而模拟克隆或亲代克隆的重量摩尔渗透压浓度则在为期14天的生产过程中持续增加。在第14天,2个siRNA克隆的平均重量摩尔渗透压浓度比模拟和亲代克隆的低60%(图5C)。重要的是,在第14天,siRNA

克隆比模拟克隆平均多生产125%的抗体(图6)。如补料-分批摇瓶评估中观察到的,在2L生物反应器中,siRNA和模拟克隆具有相当的活力和细胞生长。

[0252] 讨论

[0253] 之前的研究显示,只下调LDHa基因表达就能够降低乳酸生产。Kim和Lee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(1):152-9(2007)。然而,在他们的研究中,尽管乳酸水平降低45-79%,Qp和产物效价也仍然没有显著的改善,提示在CHO细胞中只敲低LDHa不足以有效改善Qp和产物产量。此外,在CHO细胞中同时下调PDHK1、2和3既不足以降低乳酸水平,也不足以增加抗体生产力。由于细胞生成乳酸的唯一方式是通过丙酮酸还原,而丙酮酸不能仅被LDH转化为乳酸,还被PDH转化为乙酰-CoA进入TCA循环待氧化,通过敲低LDHa表达减少乳酸生产并通过敲低PDHK促进丙酮酸进入TCA循环可协同降低乳酸水平,并为细胞提供更多能量和可能的代谢中间物,导致增加的抗体生产。

[0254] 在所有测试克隆中,LDHa、PDHK2和PDHK3的表达是显著降低的,而PDHK1的表达是中等降低的。PDHK1表达的中等降低可能是由于非最优的siRNA靶向序列,因为在所测试的3种PDHK1 siRNA序列中都观察到中等降低。在模拟克隆和siRNA克隆中观察到乳酸生产和抗体生产的变异,因为每个克隆都具有不同的LDHa和PDHK表达水平。然而,截至第14天,在补料-分批摇瓶培养中的siRNA组的平均乳酸水平低于模拟组的水平,导致模拟克隆的平均pH低于siRNA克隆的平均pH。更重要的是,较之模拟克隆,除较低的比乳酸生产速率外,siRNA克隆的平均效价和Qp分别增加了68%和75%,而siRNA和模拟克隆之间的细胞生长和产物品质无显著差异。令人感兴趣的是,对于第14天的效价和第14天的乳酸水平,在模拟克隆中效价和乳酸水平之间存在良好的反向关系,而在siRNA克隆中没有。在模拟克隆中所观察到的效价和乳酸水平的差异可能是亲代克隆的抗体生产力和细胞代谢的异质性,尽管细胞系是源自单个克隆的。在考虑克隆变异时评估了共计12个模拟克隆。数据表示敲低LDHa和PDHK同时降低了CHO细胞的乳酸水平并改善了抗体生产。因此,为了开发强效和高产的抗体生产方法,LDHa和PDHK的同时下调提供了有效的方法。

[0255] 进一步研究了2个模拟克隆和2个siRNA克隆在2L生物反应器中性能,并重复2次。基于补料-分批摇瓶评估,选择4个最佳代表了每组平均生产力的克隆。与摇瓶实验的观察结果相似,siRNA克隆在2L生物反应器评估中具有比模拟克隆低的乳酸水平和更高的效价。考虑到在补料-分批2L生物反应器中的pH是受控的,模拟培养物表现出比siRNA培养物增加的重量摩尔渗透压浓度,因为模拟克隆中更高的乳酸水平需要加入更多的碱来维持设定点pH。

[0256] 总而言之,来自补料-分批摇瓶和2L生物反应器评估的数据表明,在CHO细胞中同时敲低LDHa、PDHK1、2和3对降低乳酸水平和增加抗体效价是有效的,而不影响细胞生长和产物品质。

[0001]	<110> 基因泰克公司 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司 M·周 B·R·斯奈德克尔 C·K·D·恩格 A·沈	
	<120> 通过下调乳酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶激酶的表达降低乳酸水平和增加多肽生产	
	<130> 146392007840	
	<140> PCT/US2011/038191	
	<141> 2011-05-26	
	<150> US 61/349,727	
	<151> 2010-05-28	
	<160> 19	
	<170> FastSEQ for Windows 版本 4.0	
	<210> 1	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的构建体	
	<400> 1 ctcgattcgg ttatctgat	19
	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的构建体	
	<400> 2 gcagttcctg gacttcgga	19
	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的构建体	
	<400> 3 cattcagtae ttcttgga	19
	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的构建体	
	<400> 4 tgtagctgat gtcgtgaaa	19
	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

[0002]	<223> 合成的构建体	
	<400> 5	
	gccatctca tegaaaaca	19
	<210> 6	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的构建体	
	<400> 6	
	agccatcttt aatgacttcg actac	25
	<210> 7	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的构建体	
	<400> 7	
	tcgcagtttg gatttatgct tccaatg	27
	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的构建体	
	<400> 8	
	gatctgtcca tcaaaatgag tga	23
	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的构建体	
	<400> 9	
	tgtggagtac atgtagetga aga	23
	<210> 10	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的构建体	
	<400> 10	
	ctctcaatct tectcaaggg gacacc	26
	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的构建体	
	<400> 11	
	cagcctggag ectacaaga	19
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

[0003]	<220>		
	<223>	合成的构建体	
	<400>	12	
		ggcatacagt cgagaaattg g	21
	<210>	13	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的构建体	
	<400>	13	
		aagccataac caaatccagc caagg	25
	<210>	14	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的构建体	
	<400>	14	
		gccgagagca taatgaagaa	20
	<210>	15	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的构建体	
	<400>	15	
		ccatagagac ccttaatcat ggta	24
	<210>	16	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的构建体	
	<400>	16	
		cttaggcggg tgcateccat tt	22
	<210>	17	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的构建体	
	<400>	17	
		tcctctcagt ggtctgcttg g	21
	<210>	18	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的构建体	
	<400>	18	
		tggcgtgtgt agacttgcac tt	22
	<210>	19	
	<211>	19	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0004]	<220>	
	<223> 合成的构建体	
	<400> 19	
	tgccatccag cgtcccca	19

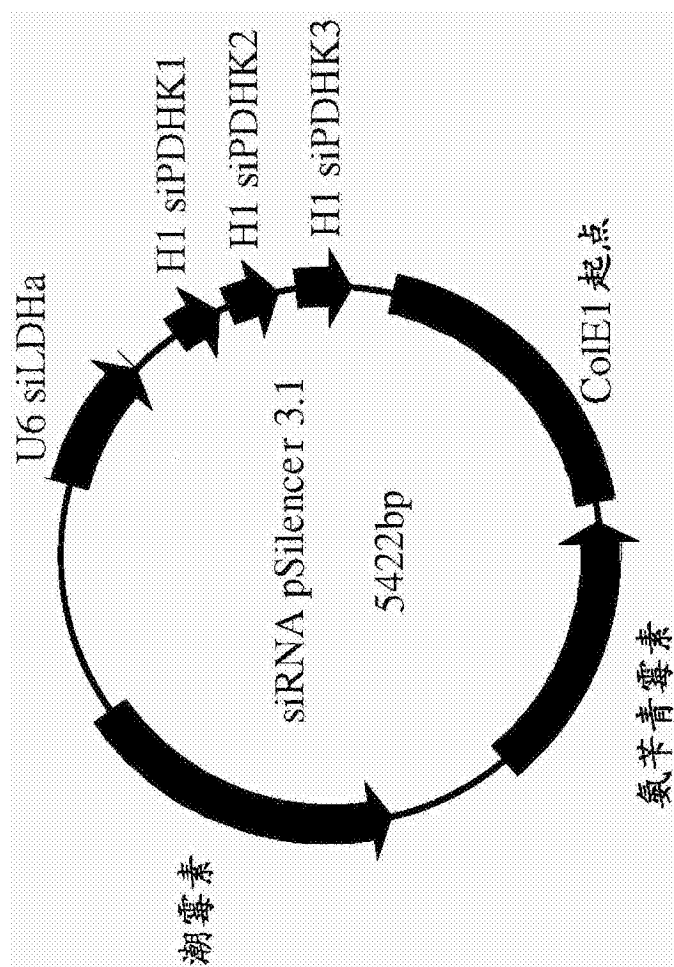


图1

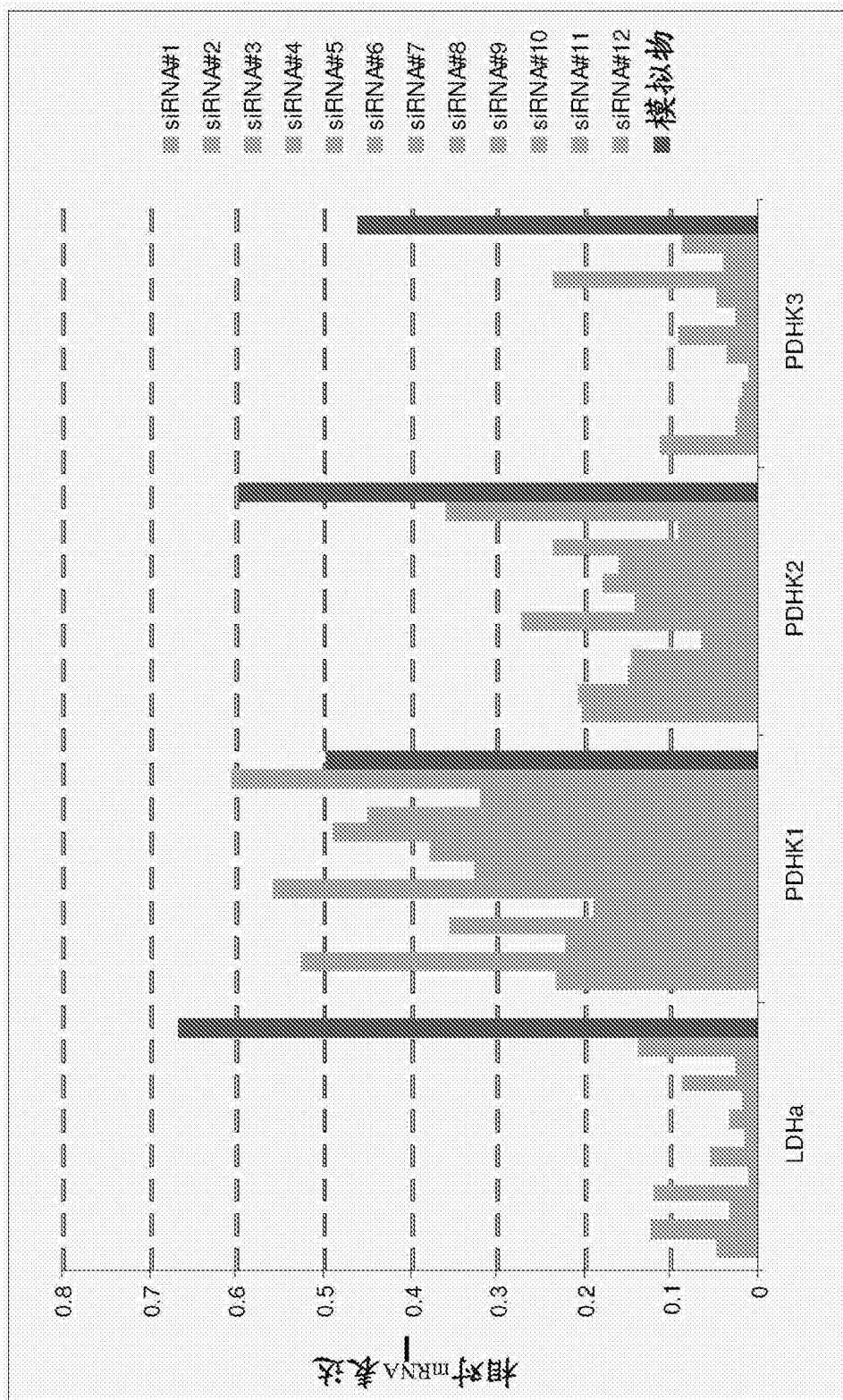


图2

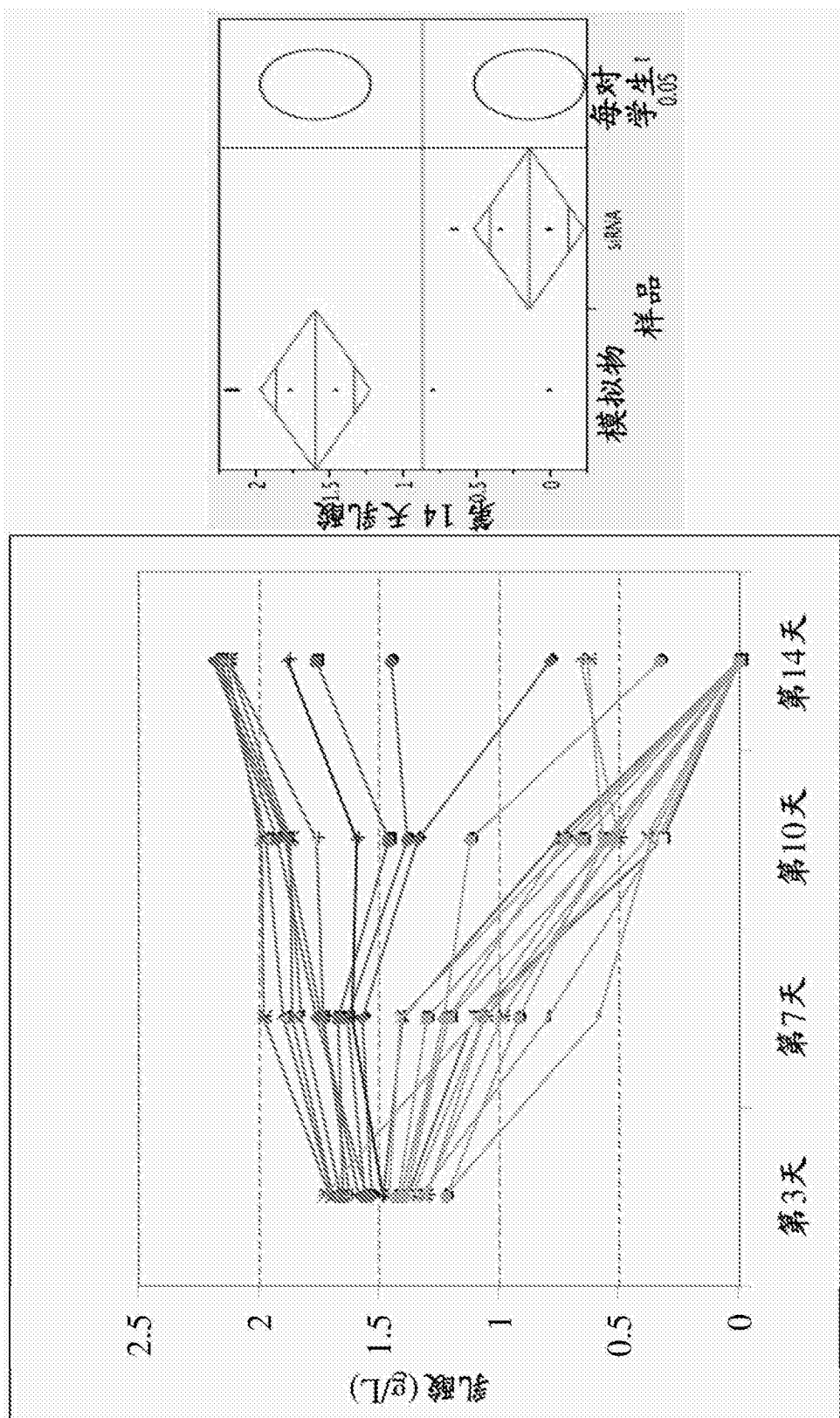


图3A

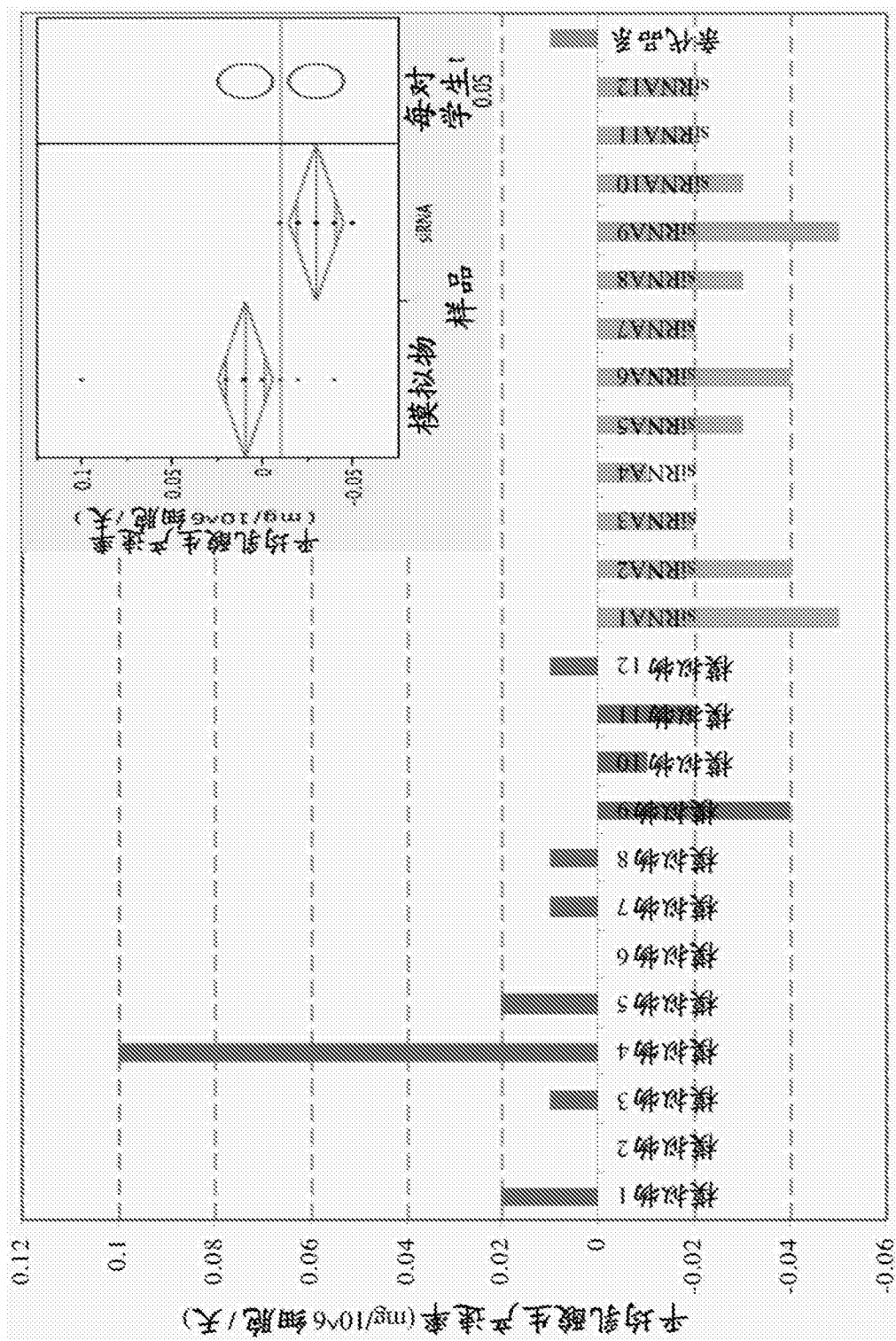


图3B

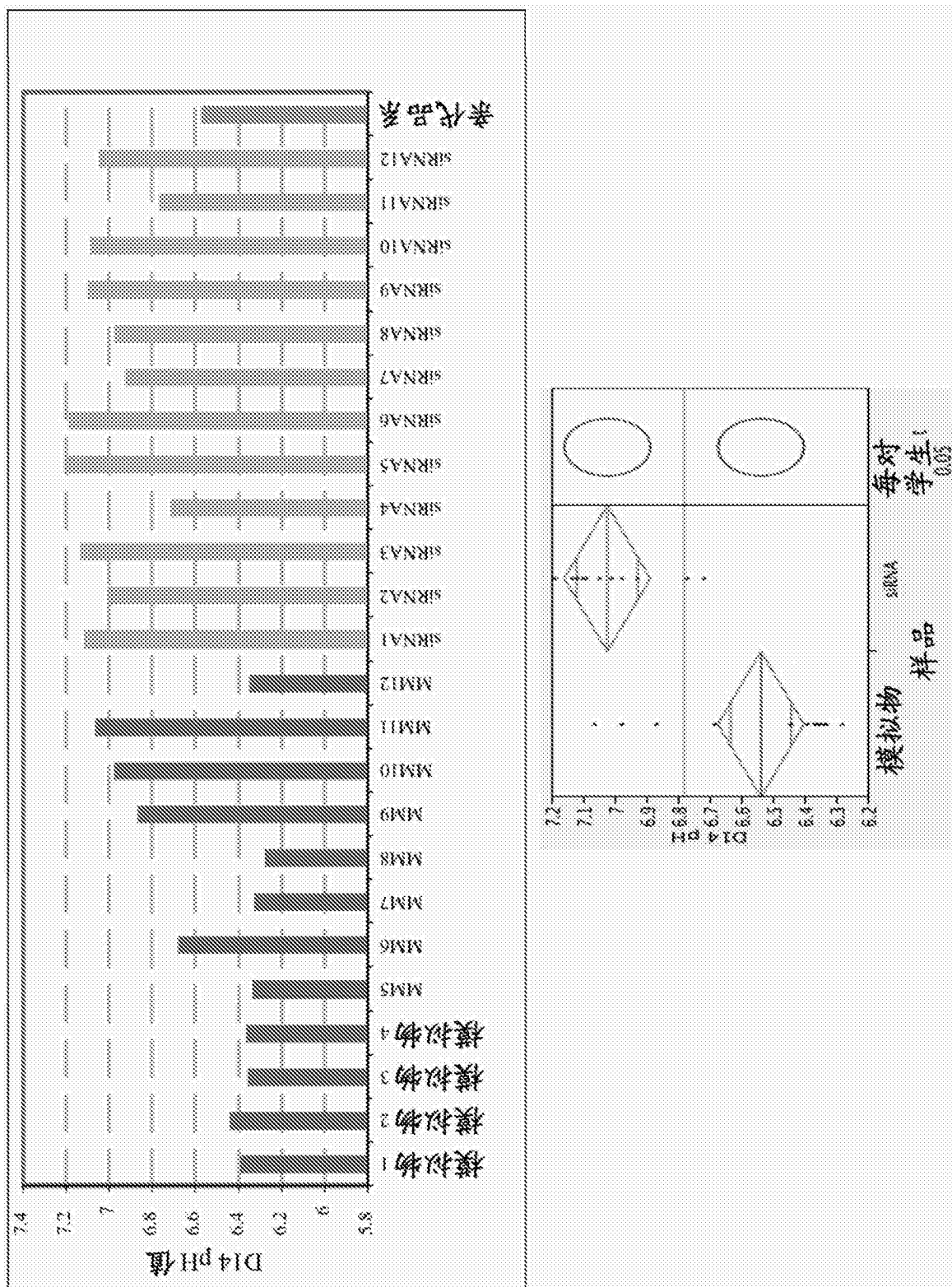


图3C

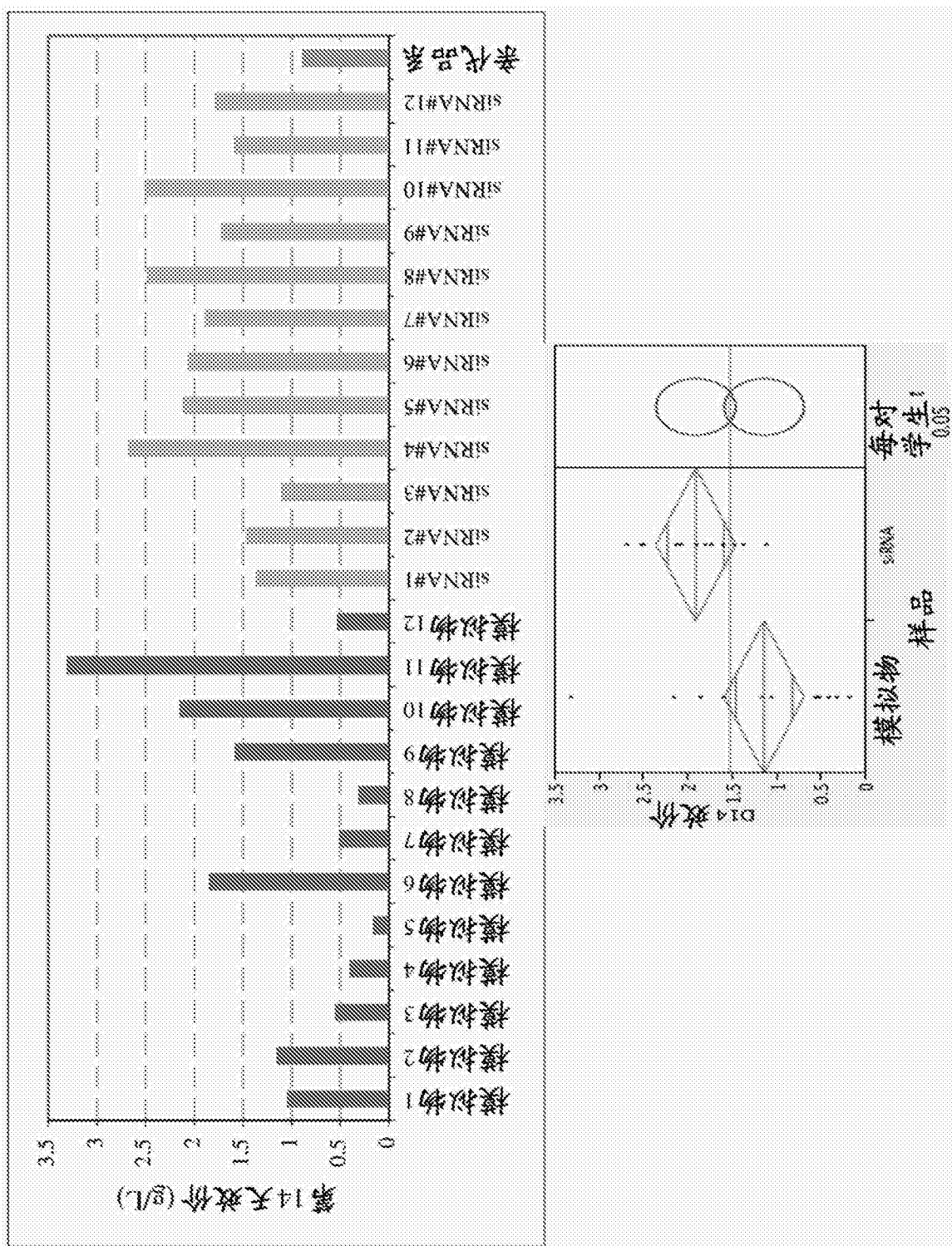


图4A

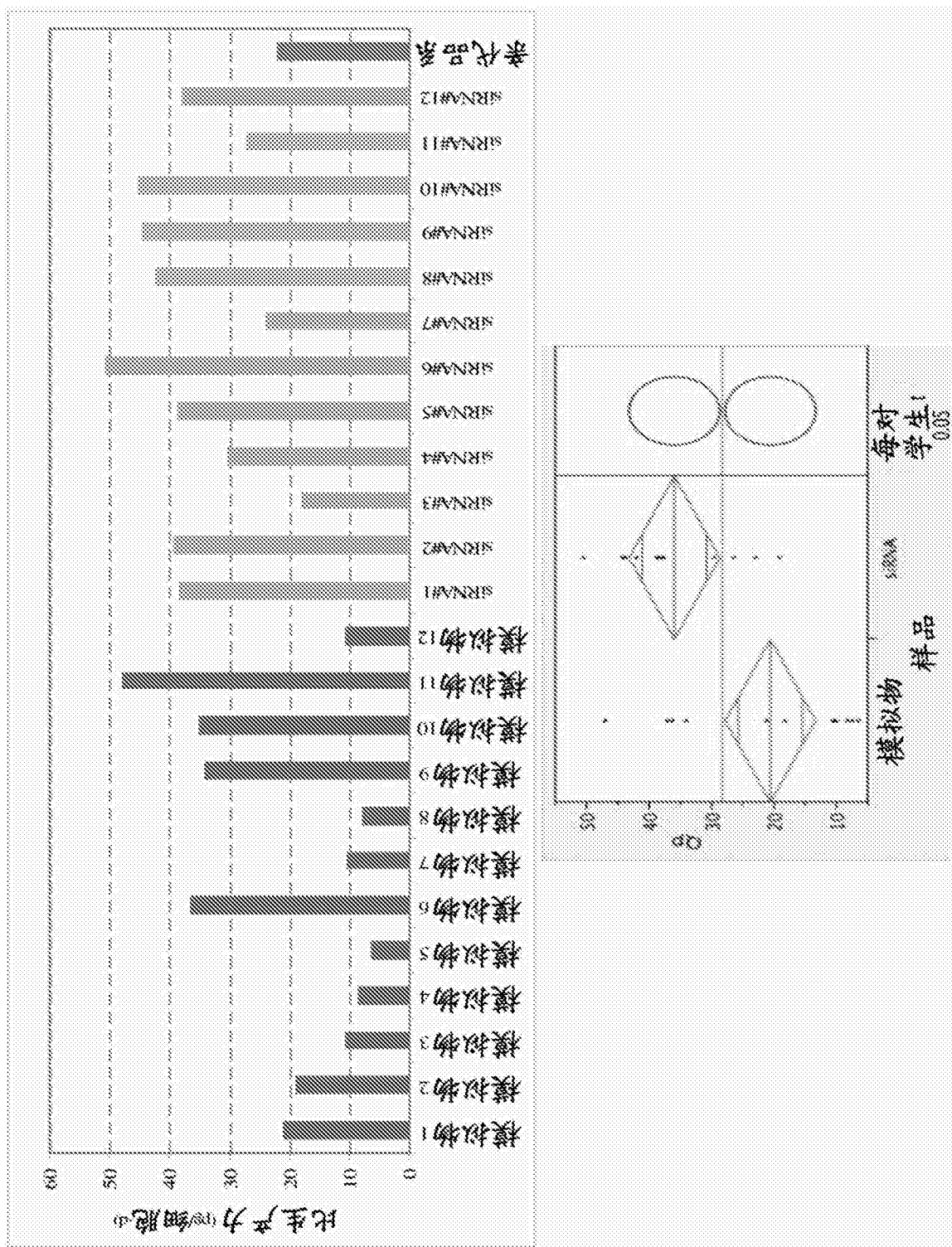


图4B

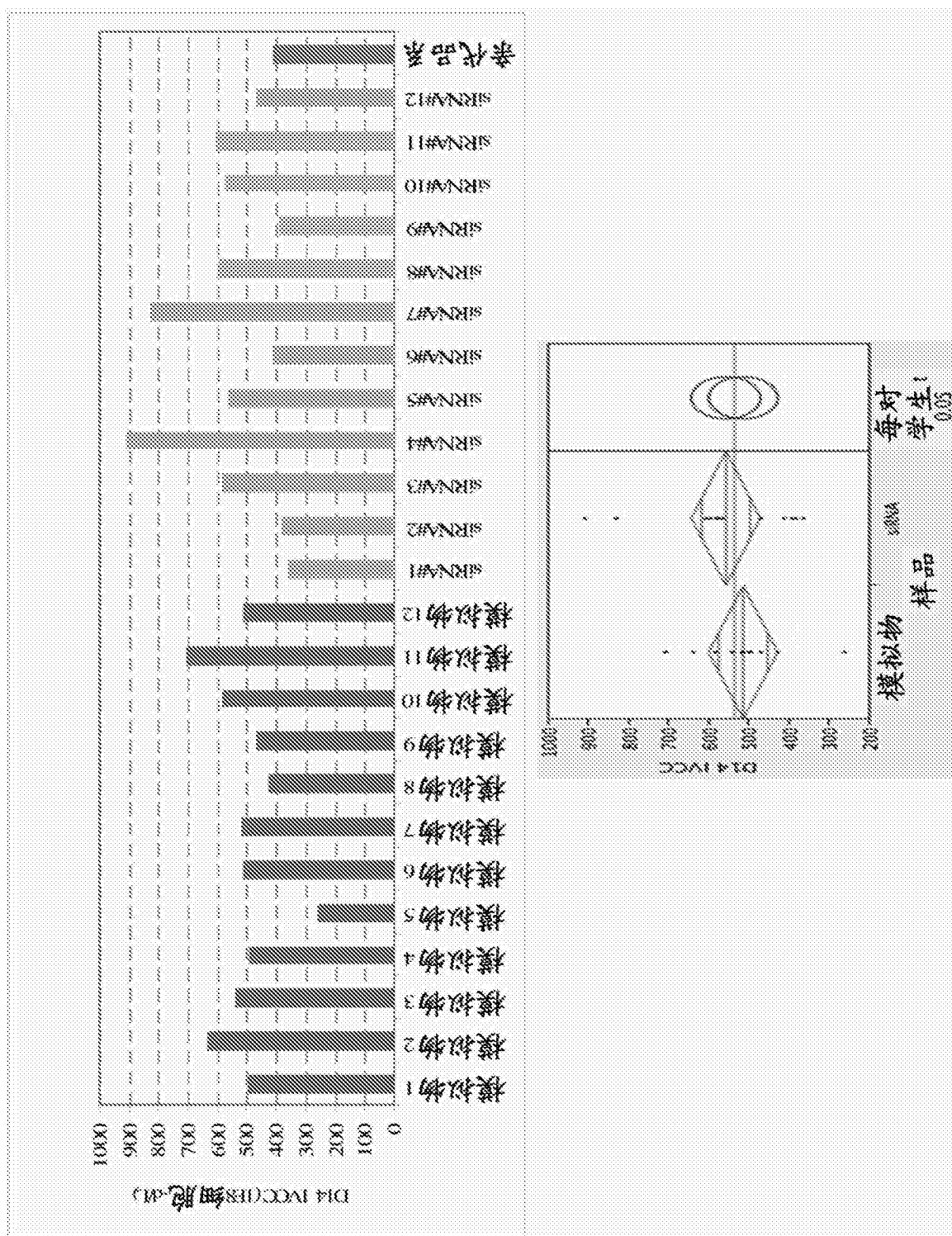


图4C

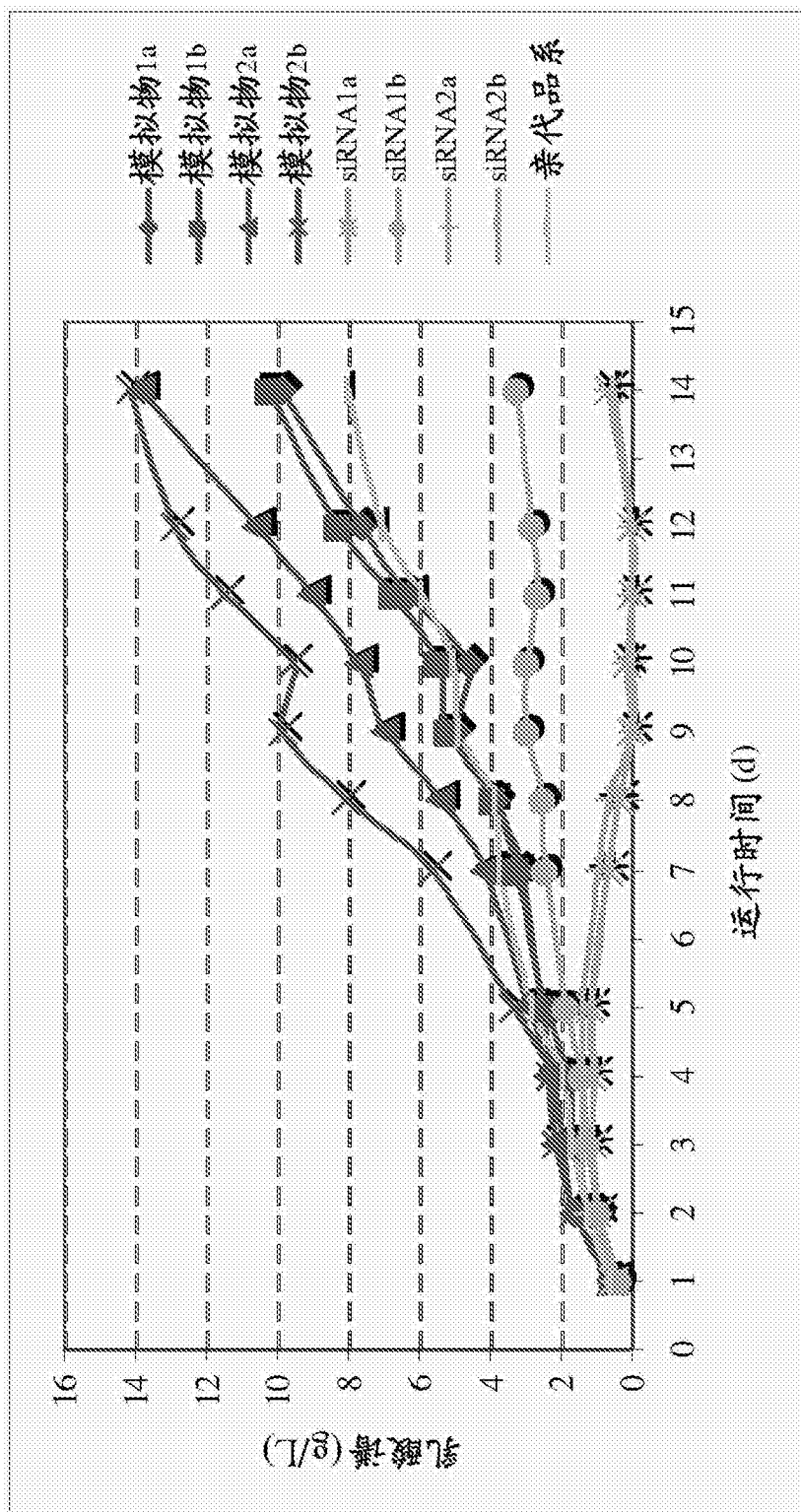


图5A

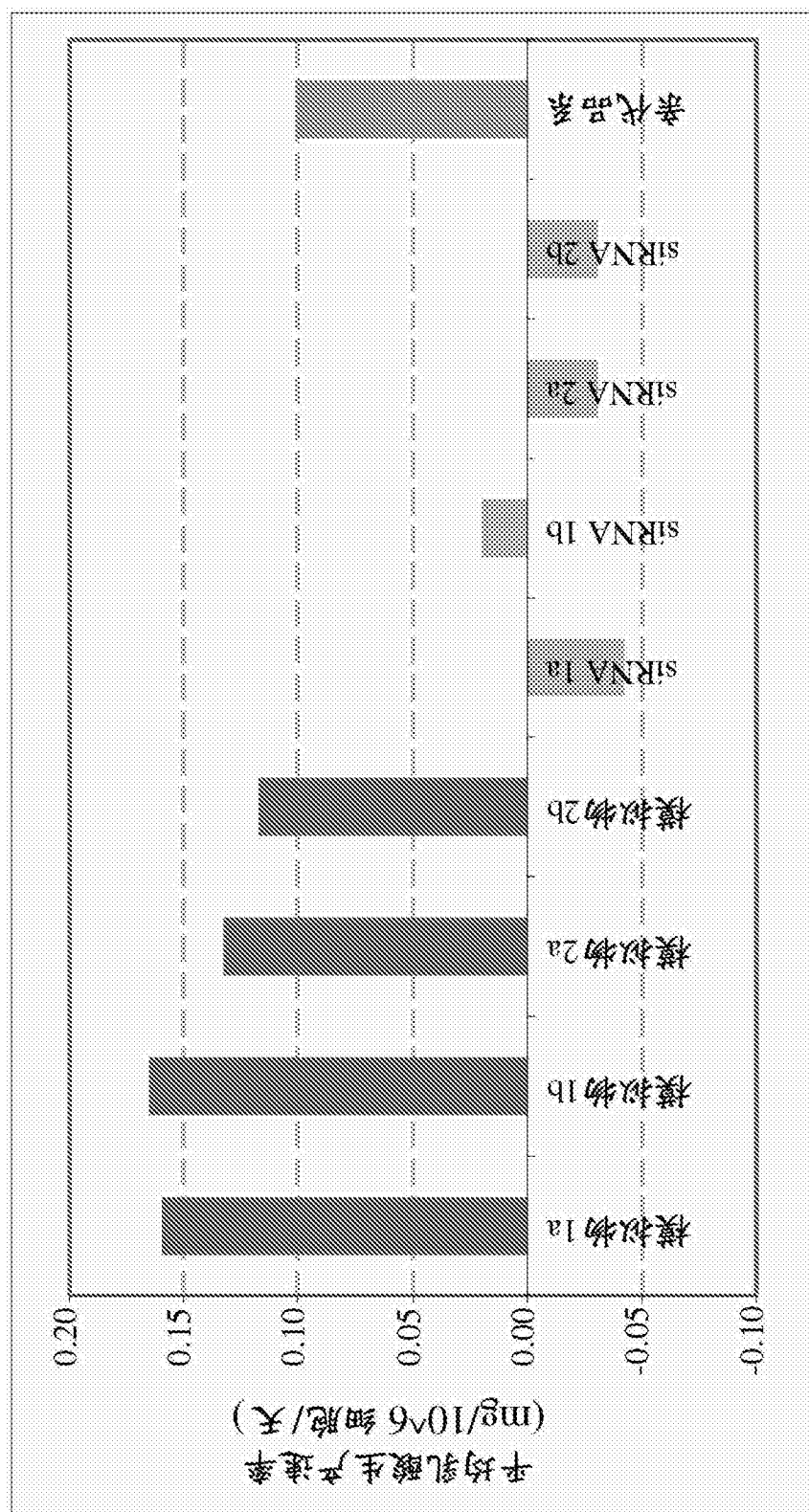


图5B

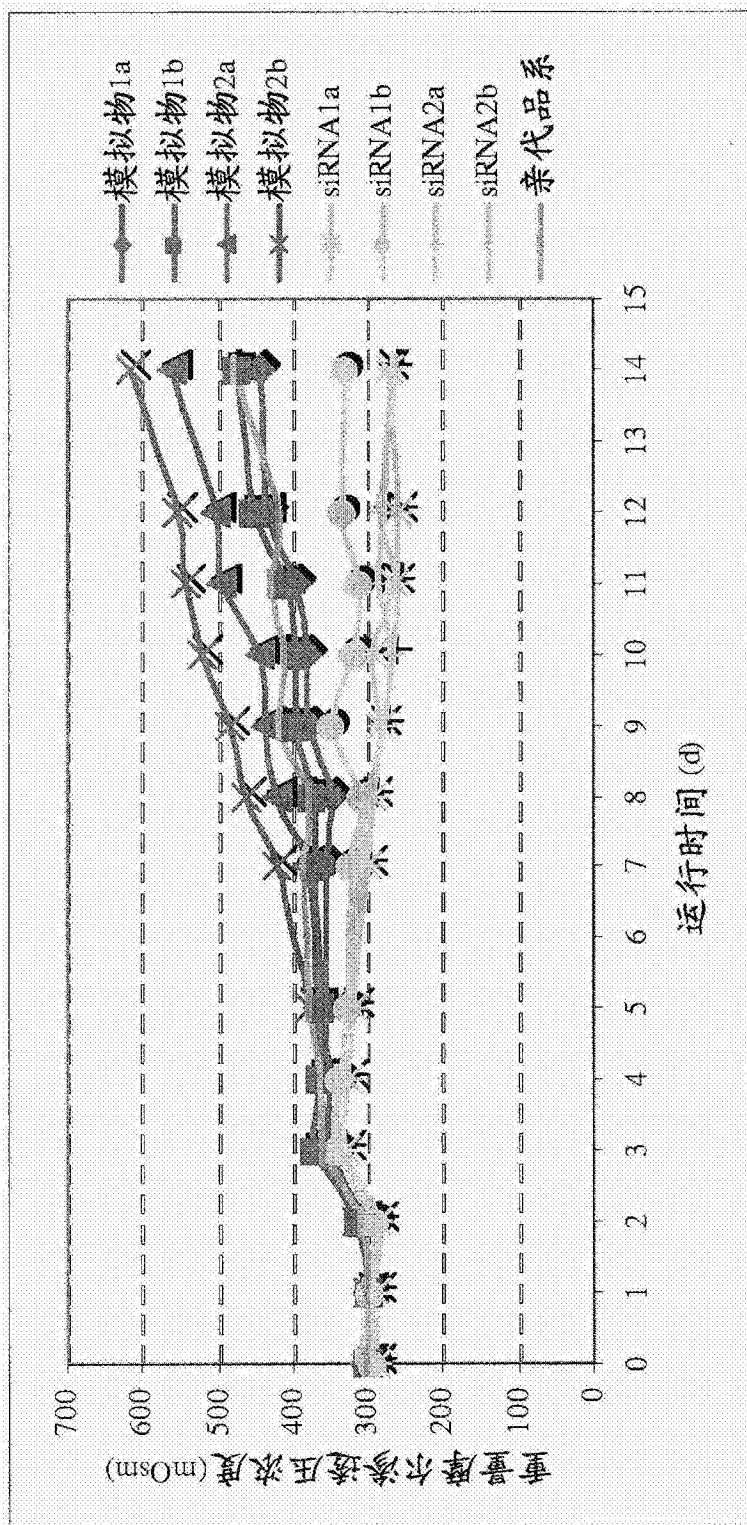


图5C

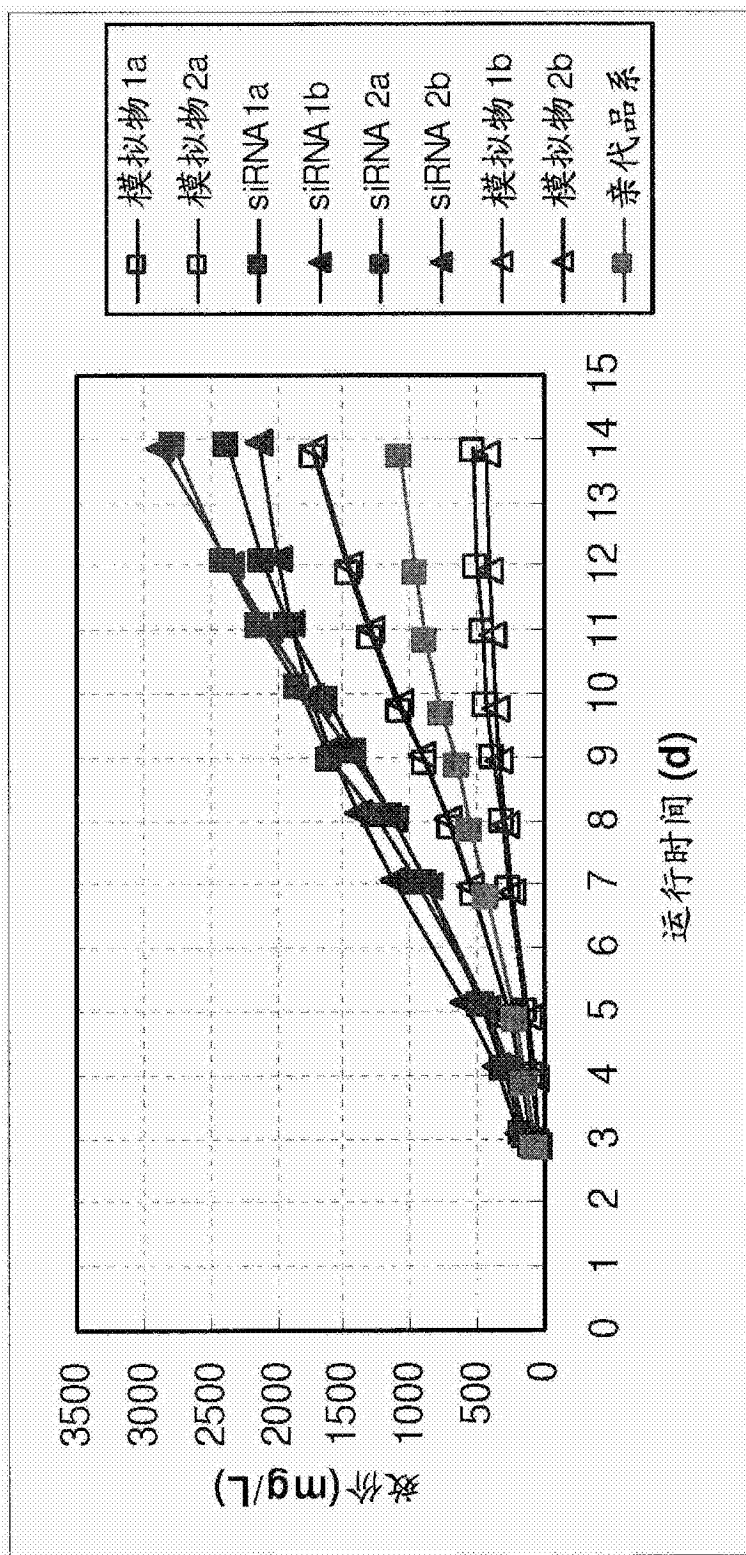


图6