

载体对与宿主细胞和高表达细胞株的构建方法

5 技术领域

本申请涉及蛋白质表达技术领域，具体涉及利用断裂博来霉素抗性蛋白获得载体对与宿主细胞和高表达细胞株的构建方法。

背景技术

10 近年来越来越多生物药特别是大分子药物被成功应用在多种疾病领域如肿瘤、免疫性和代谢性以及中枢神经性疾病治疗当中。随着临床需求不断增加，对大分子药物的产量和质量提出了更高的要求。重组蛋白技术广泛应用在大分子药物的研发和生产过程，有多种表达系统包括细菌、真菌、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞等可以用来表达不同种类的蛋白药物。其中，哺乳动物表达系统又因其能够生产具有类似人源翻译后修
15 饰蛋白，在生物制药领域占有绝对优势。然而构建哺乳细胞株非常耗时耗力，经常遇到蛋白表达量低、质量不理想，稳定性差等问题。构建高表达稳定的哺乳细胞株对于降低药物生产成本和保证药物质量方面至关重要。

筛选标记如抗生素、荧光蛋白等广泛应用在重组蛋白表达以及基因编辑领域，用于筛选稳定表达特定基因或蛋白的细胞株。然而，当需要引入多个基因时，常常会受限于
20 筛选标记数量不够，特别是在生物制药方面，可用的筛选标记种类较为有限，主要包括抗生素类和代谢酶类筛选标记比如 DHFR 和 GS。随着开发的分子结构愈加复杂，如双抗、多抗等，需要多条异源性多肽链同时表达，这可能会需要使用多种筛选压力，这不可避免地会对细胞生长产生负面影响，并且多种筛选抗性的使用也会增加生产成本。断裂蛋白重组技术（Protein-fragment complementation, PCA）指的是将一个蛋白拆分两个
25 多肽片段，将这两个多肽片段分别和互补的两段蛋白如 GCN4 亮氨酸拉链序列融合起来，由于亮氨酸拉链的形成这两部分多肽片段可重新组装成具有功能的蛋白。该技术不仅是研究蛋白折叠、进化和亚基功能调节以及蛋白相互作用方面的重要手段，还可以给筛选标记受限提供了一个很好的解决思路。Pelletier 和 Levray 等发现通过平行亮氨酸拉链可以将两段互补的鼠源四氢叶酸还原酶（DHFR）蛋白片段重构，在一定程度上可以恢复
30 蛋白的活性和功能。2000 年 Ghosh 等报道了当将两段互补的 GFP 蛋白片段分别与反平行亮氨酸拉链结构融合起来，在分子和细胞水平均可以重新组装成有活性的 GFP 蛋白。

在哺乳细胞表达系统中，常用的抗生素则主要包括遗传霉素（G418/geneticin）、杀稻瘟菌素（Blasticidin）、潮霉素 B（Hygromycin B）、嘌呤霉素（Puromycin）和博来霉素（Zeocin），对应的抗性基因分别为 NeoR、BsdR、HygR、PuroR 和 BleoR。研究
35 表明，不同种类抗生素的筛选出来的细胞蛋白表达水平有所差异，其中博来霉素的筛

选力度最佳，筛选出的细胞株蛋白表达量最高并且克隆之间的表达差异最小，G418 和杀稻瘟菌素筛选出的细胞株蛋白表达最低并且克隆之间的表达差异最大，嘌呤霉素和潮霉素则介于两者之间。博来霉素具有很强的 DNA 剪切活性，对于常规细胞，在 0.5 至 1000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下即可杀伤细胞。表达有博来霉素抗性基因的细胞能够在带有博来霉素的培养基中正常生长。博来霉素抗性基因编码的抗性蛋白，其分子量为 14 kd，其单体形成二聚体和两个博来霉素分子结合（图 1），阻碍博来霉素的细胞杀伤作用。然而，迄今为止尚未有将断裂蛋白技术应用于博来霉素抗性蛋白的报道。

本领域仍然需要寻找一种将断裂蛋白技术应用于博来霉素抗性蛋白，从而实现只使用一种抗生素压力就能对稳转细胞株进行高效筛选，构建出高表达单克隆细胞株的载体、宿主细胞和方法。

发明内容

为解决上述技术问题，本申请的一个方面提供一种载体对，所述载体对包括第一载体和第二载体，所述第一载体包含博来霉素抗性蛋白的第一片段的表达序列，所述第二载体包含博来霉素抗性蛋白的第二片段的表达序列，并且所述第一载体和/或第二载体还包含目标蛋白的表达序列。

本发明的另一个方面提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞包含载体对，所述载体对包括第一载体和第二载体，所述第一载体包含博来霉素抗性蛋白的第一片段的表达序列，所述第二载体包含博来霉素抗性蛋白的第二片段的表达序列，并且所述第一载体和/或第二载体还包含目标蛋白的表达序列。

本发明的另一个方面提供了一种高表达细胞株的构建方法，所述方法包括：

- a. 获得载体对，所述载体对包括第一载体和第二载体，所述第一载体包含博来霉素抗性蛋白的第一片段的表达序列，所述第二载体包含博来霉素抗性蛋白的第二片段的表达序列，并且所述第一载体和/或第二载体还包含目标蛋白的表达序列；
- b. 将步骤 a 的载体对转入宿主细胞；
- c. 使用细胞培养基培养步骤 b 的宿主细胞，所述细胞培养基包含至少 50 $\mu\text{g/ml}$ ，优选 50-500 $\mu\text{g/ml}$ 的博来霉素；并且
- d. 对步骤 c 的经筛选的宿主细胞进行分选以获得所述高表达细胞株。

附图说明

下面结合附图更详细地说明本申请，附图中：

图 1 是博来霉素抗性蛋白二聚体三维结构及单体氨基酸序列（SEQ ID NO: 1）的示意图；

图 2 是博来霉素抗性蛋白断裂位点 N61|T62 及突变型（NZ-61 为 SEQ ID NO 2，CZ-62 为 SEQ ID NO 3，NZ-G18E,D32V-61 为 SEQ ID NO 4，CZ-L63Q,G98V-62 为 SEQ ID NO 5）的三维结构及氨基酸序列的示意图，其中红色下划线标注处为连接子 GSGG，

加粗序列为互补反向平行亮氨酸拉链；

图 3 是双压表达系统载体示意图；

图 4 是 N61|T62 断裂博来霉素抗性蛋白表达载体示意图；

图 5 是 N61|T62 断裂博来霉素抗性蛋白在单抗表达筛选中的结果示意图，其中将不同组质粒转染后加压筛选，恢复至正常活率后将稳定细胞池进行分批补料（fed-batch）培养 14 天，其中：（A）分批补料培养过程中最高活细胞密度峰值 VCD；（B）分批补料培养 14 天收获时细胞活率；（C）分批补料培养过程中第 14 天蛋白表达水平滴度；（D）收获的上清一步 ProA 纯化后进行分子排阻层析分析 SEC-HPLC；和（E）一步纯化样品糖型检测结果；

图 6 是博来霉素抗性蛋白断裂位点 T62|L63 及突变型（NZ-61 为 SEQ ID NO 6, CZ-63 为 SEQ ID NO 7, NZ-G18E,D32V-62 为 SEQ ID NO 8, CZ-L63Q,G98V-63 为 SEQ ID NO 9）的三维结构及氨基酸序列的示意图；

图 7 是 T62|L63 突变型断裂博来霉素抗性蛋白表达载体示意图；

图 8 是 T62|L63 突变型断裂博来霉素抗性蛋白在单抗表达筛选中的结果示意图，其中对照组转染了 HC-博来霉素抗性蛋白和 LC-杀稻瘟菌素抗性蛋白质粒；splitT62|L63-IRES 转染了 NZ-G18E,D32V-62-HC 和 CZ-L63Q,G98V-63-LC 质粒，其中：（A）转染之后细胞池活率随时间的变化；（B）细胞池恢复后进行 FB 培养期间活率变化；（C）细胞池 FB 培养期间活细胞密度 VCD 变化；（D）FB 培养第 14 天单抗表达水平；（E）细胞池上清经一步纯化样品 SEC-HPLC 结果；和（F）一步纯化样品糖型分析结果；

图 9 是载体优化提高断裂蛋白筛选活性的结果示意图，其中：（A）转染后细胞池恢复过程中活率变化；（B-C）细胞池恢复后 FB 培养期间活率（B）和 VCD（C）变化；和（D）细胞池 FB 培养第 14 天单抗表达水平；

图 10 是 T62|L63 突变型断裂博来霉素抗性蛋白在单抗克隆筛选中的结果示意图，其中对稳转细胞池进行单细胞克隆筛选，对照组和断裂蛋白组分分批补料培养第 11 天和第 14 天最高克隆单抗表达水平。

具体实施方式

本申请涉及一种载体对，所述载体对包括第一载体和第二载体。在本申请中，第一载体和第二载体可以是本领域已知适合宿主细胞中蛋白表达的任何表达载体。在本申请的一个实施方式中，第一载体和第二载体包括，但不限于哺乳动物表达载体（例如，pcDNA3.3 和 pOptiVEC），酵母细胞表达载体（例如，pGAPZ），以及昆虫细胞表达载体（例如，pFastBac 和 pIB/V5-His）。在本申请的一个实施方式中，第一载体包含博来霉素抗性蛋白的第一片段的表达序列，并且第二载体包含博来霉素抗性蛋白的第二片段的表达序列。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白由博来霉素抗性蛋白的第一片段和博来霉素抗性蛋白的第二片段组成。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗

- 性蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 3 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 6 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 7 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 7。在本申请的一个实施方式中，第一载体和第二载体的比例约为 1:3~3:1。
- 15 在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段和博来霉素抗性蛋白的第二片段包含可互相结合的蛋白质结合基序。在本申请中，蛋白质结合基序是本领域中已知可以与另一蛋白质结合基序特异性结合的肽片段，其在结合后可以与它们连接的其他无活性蛋白片段恢复至少部分完整蛋白质的活性，例如，恢复全部活性。在本申请的一个优选实施方式中，蛋白质结合基序包括亮氨酸拉链。在本申请的一个实施方式中，亮氨酸拉链包括 N 端反向平行亮氨酸拉链和 C 端反向平行亮氨酸拉链。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段包括 N 端反向平行亮氨酸拉链。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段包括 C 端反向平行亮氨酸拉链。在本申请的一个实施方式中，N 端反向平行亮氨酸拉链的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 10 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性。在本申请的一个实施方式中，N 端反向平行亮氨酸拉链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10。在本申请的一个实施方式中，C 端反向平行亮氨酸拉链的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 11 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性。在本申请的一个实施方式中，C 端反向平行亮氨酸拉链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 11。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段和/或博来霉素抗性蛋白的第二片段还包含连接肽序列。在本申请的一个实施方式中，连接肽序列包括柔性连接肽序列。在本申请的一个实施方式中，柔性连接肽序列选自：GGGGS、GSGG 和 GGGGGG。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段的 C 端包含蛋白质结合基序和连接肽序列，例如，柔性连接肽序列和 N 端反向平行亮氨酸拉链。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段的 N 端包含蛋白质结合基序和连接肽序列，例如，柔性连接肽序列和 C 端反向平行亮氨酸拉链。
- 35 在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段和/或第二片段包含突变。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段包括选自下组的一个或

两个突变：G18E 和 D32V。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段包括突变：G18E 和 D32V。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段包括选自下组的一个或两个突变：L63Q 和 G98V。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段包括突变：L63Q 和 G98V。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 4 至少具有 80%、85%、90%、95% 或 100% 同源性。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 5 至少具有 80%、85%、90%、95% 或 100% 同源性。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8 至少具有 80%、85%、90%、95% 或 100% 同源性。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 9 至少具有 80%、85%、90%、95% 或 100% 同源性。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 9。

在本申请的一个实施方式中，第一载体和/或第二载体还包含目标蛋白的表达序列。在本申请中，目标蛋白可以是任何适合在宿主细胞中表达的蛋白。在本申请的一个实施方式中，第一载体和第二载体之一包含目标蛋白的表达序列。在本申请的一个实施方式中，第一载体包含目标蛋白的第一表达序列，并且第二载体包含目标蛋白的第二表达序列。在本申请的一个实施方式中，目标蛋白的表达序列由目标蛋白的第一表达序列和目标蛋白的第二表达序列组成。在本申请的一个实施方式中，目标蛋白的第一表达序列表达第一目标蛋白，并且目标蛋白的第二表达序列表达第二目标蛋白。在本申请的一个实施方式中，可由第一目标蛋白和第二目标蛋白组成功能性蛋白。在本申请的一个实施方式中，目标蛋白包括异源或同源蛋白，例如单抗，双抗，融合蛋白或重组蛋白。在本申请的一个优选实施方式中，目标蛋白包括单抗，例如阿达木单抗。在本申请的一个实施方式中，第一目标蛋白和第二目标蛋白分别是抗体的两个部分。在本申请的一个实施方式中，第一目标蛋白是抗体的重链，并且第二目标蛋白是抗体的轻链。在本申请的另一个实施方式中，第一目标蛋白是抗体的轻链，并且第二目标蛋白是抗体的重链。在本申请的一个实施方式中，第一目标蛋白是阿达木单抗的重链，并且第二目标蛋白是阿达木单抗的轻链。在本申请的一个实施方式中，第一目标蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 12 至少具有 80%、85%、90%、95% 或 100% 同源性。在本申请的一个实施方式中，第二目标蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 13 至少具有 80%、85%、90%、95% 或 100% 同源性。在本申请的一个实施方式中，第一目标蛋白的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12。在本申请的一个实施方式中，第二目标蛋白的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 13。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一片段和/或博来霉素抗性蛋白的第二片段通过接头序列与目标蛋白的表达序列连接。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第一

片段通过接头序列与目标蛋白的第一表达序列连接。在本申请的一个实施方式中，博来霉素抗性蛋白的第二片段通过接头序列与目标蛋白的第二表达序列连接。在本申请的一个实施方式中，接头序列包括核糖体进入位点（IRES）或 2A 肽的序列。在本申请的一个实施方式中，接头序列包括 EMCV IRES 序列。

5 在本申请的一个实施方式中，第一载体和/或第二载体还包含启动子。在本申请的一个实施方式中，启动子独立地选自下组：CMV、EF1A、CAG、CBA、CBh 和 SV40。在本申请的一个优选实施方式中，启动子包括 SV40。在本申请的一个实施方式中，第一载体和/或第二载体还包含调控元件。在本申请的一个实施方式中，调控元件独立地选自下组：MAR/SAR 序列、隔离子序列、UCOE 序列和 STAR 序列。

10 本申请还涉及一种宿主细胞，宿主细胞包含本申请的前述任何实施方式的载体对。在本申请的一个优选实施方式中，宿主细胞包括真核细胞。在本申请的一个更优选实施方式中，宿主细胞包括哺乳动物细胞。在本申请的一个实施方式中，宿主细胞选自下组：CHO-K1 细胞、CHO-S、CHO-DXB11、CHO-DG44、NS0、SP2/0 和 HEK293。在本申请的一个优选实施方式中，宿主细胞包括 CHO-K1 细胞。

15 本申请还涉及一种高表达细胞株的构建方法。该方法包括：a 获得包含本申请的前述任何实施方式的载体对。

 该高表达细胞株的构建方法还包括：b 将步骤 a 的载体对转入宿主细胞。在本申请的一个实施方式中，步骤 b 包括磷酸钙共沉淀、阳离子聚合物法、脂质体转染、电穿孔、显微注射或基因枪。在本申请的一个优选实施方式中，步骤 b 包括电穿孔。

20 该高表达细胞株的构建方法还包括：c 使用细胞培养基培养步骤 b 的宿主细胞。在本申请的一个实施方式中，细胞培养基包含至少 50 µg/ml 的博来霉素。在本申请的一个优选实施方式中，细胞培养基包含 50-500 µg/ml 的博来霉素。在本申请中，细胞培养基可以是本领域已知适合宿主细胞生长的任何培养基。在本申请的一个实施方式中，步骤 c 包括在 25-40℃ 下培养。在本申请的一个实施方式中，步骤 c 包括在 30-38℃ 下培养。

25 在本申请的一个实施方式中，步骤 c 包括在 35-37℃ 下培养。在本申请的一个实施方式中，步骤 c 持续 1-5 天。在本申请的一个实施方式中，步骤 c 持续 2-4 天。

 该高表达细胞株的构建方法还包括：d 对步骤 c 的经筛选的宿主细胞进行分选以获得高表达细胞株。在本申请的一个实施方式中，步骤 d 包括有限稀释或固体培养基挑选。

30 下面将结合附图对本申请的技术方案进行清楚、完整的表述，显然，所描述的实施例是本申请的一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例都属于本申请保护的范围。

35 实施例

 下面将结合具体的实施例对本发明的技术方案进行更为详细地阐述。以下实施例仅

为示例，对本发明技术方案不构成任何限定或限制。以下实施例中具体的材料、步骤、条件、数值或数值范围等技术参数仅是举例，并非穷举亦非限定。

除实施例中使用的具体方法、设备、材料外，根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载，还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

表 1：实验设备列表

设备名称	设备厂商	型号
Biorad 电转仪	BIO-RAD	Gene Pulser 1652661
摇床	Kuhner	SMX1503C
proA 纯化设备	cytiva	AKTA Pure M150
SEC-HPLC	Thermo Fisher	Vanquish
电转杯	BIO-RAD	0.4 cm electrode
96 孔细胞板	COSTAR	Flat Bottom with Lid
细胞活率分析仪	BECKMAN COULTER	Vi-CELL XR

表 2：实验试剂列表

名称	级别	生产商/供应商	批次货号
CHO-K1 宿主细胞	NA	ATCC	CCL61
DPBS 溶液	研究级	cytiva	SH30028.02
无压培养基	研究级	Gibco	12490
生产培养基	研究级	Hyclone	SH31037
补料 1	研究级	Hyclone	SH31026
补料 2	研究级	Hyclone	SH31027
补糖	研究级	Avantor	1919
人 IgG HTRF 试剂盒	研究级	cisbio	6FHIGPEH
博来霉素	研究级	Thermo	R25005
杀稻瘟菌素	研究级	Gibco	A11139-03

10 为了更清楚地说明本发明的技术方案，将结合实施例作进一步描述。

实施例 1. N61|T62 断裂博来霉素抗性蛋白在开发稳定表达阿达木单抗的单抗细胞池的应用

1.表达载体构建

15 1.1 在商业化载体 pcDNA3.3 的基础上，通过限制性内切酶 BglII 和 AgeI 将博来霉素抗性蛋白的两部分克隆进质粒中取代原有的新霉素抗性蛋白。根据博来霉素抗性蛋白

三维结构特点，在位点 N61|T62 处将其拆成两部分，N 端部分通过 GSGG 与 C 端反向平行亮氨酸拉链序列 (SEQ ID NO: 11) 相连，命名为 NZ-61，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，N 端反向平行亮氨酸拉链序列 (SEQ ID NO: 10) 通过 GSGG 与 C 端部分相连，命名为 CZ-62，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示，其结构如图 2 所示。单抗 HC 和 LC 表达载体按照图 4 质粒示意图构建，将单抗 HC 序列 (SEQ ID NO: 12) 构建到 NZ-61 表达序列的上游，同样地将单抗 LC 序列 (SEQ ID NO: 13) 构建到 CZ-62 表达序列上游，中间均通过 EMCV IRES 序列相连接。

1.2 对照组表达载体如图 3 所示，单抗 HC 和完整的博来霉素抗性基因通过 EMCV IRES 序列相连，LC 序列放在杀稻瘟菌素抗性基因上游，LC 和抗性基因元件属于两个独立的阅读框，杀稻瘟菌素抗性基因由 SV40 启动子驱动表达。

2. 细胞转染和细胞池筛选

2.1 取 1×10^7 个 CHO-K1 宿主细胞悬液 290g 离心 5 分钟后弃上清，加入 300 μ l DPBS 溶液重悬均匀，取 10 μ g HC 表达载体和 10 μ g LC 表达载体到 250 μ l DPBS 溶液中混合均匀，将质粒溶液和细胞悬液充分混匀后加到电转杯中。将电转杯放在 Biorad 电转仪卡槽中按照宿主细胞相应的程序进行电转。转染后将细胞悬液从电转杯吸出转移到 10 mL 提前预热好的无压培养基，置于 36.5°C 225 rpm 摇床中培养。

2.2 转染 24 小时后，加入相同体积的带压培养基（含抗生素的无压培养基）进行筛选，在本实施例中对照组杀稻瘟菌素浓度为 18 $\mu\text{g/mL}$ ，博来霉素浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$ ，断裂蛋白组博来霉素浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 。培养 3-4 天后将细胞传代到带压培养基进行筛选，只有表达了目标载体的细胞方可存活下来。

3. 细胞池分批补料培养和检测

3.1 连续传代 3-4 周后，等细胞池活率恢复到 95% 以上，以 4×10^5 细胞密度接种到生产培养基中进行分批补料培养。在培养第 3、5、7、9 和 11 天取细胞样品，使用 Vi-CELL XR 细胞活率分析仪检测活细胞密度和活率，并进行补料补糖。在培养第 9 天和第 14 天取适量细胞离心后取上清使用 ProA-HPLC 法检测单抗表达滴度。

3.2 培养第 14 天将细胞离心后收获上清，进行一步 ProA 纯化后进行 SEC-HPLC 法进行高聚含量检测和 Quick N-glycan (QNG) 法进行糖型分析。

4. 实验结果

双压系统筛选的细胞池生长恢复需要 2 周左右，在断裂博来霉素抗性蛋白单压系统下细胞池恢复则需要更久，大约需要 3-4 周，提示博来霉素抗性蛋白活性在细胞内重组后可能与野生型完整蛋白相比较低。从图 5A, 5B 可以看出在 FB 培养过程中断裂蛋白组细胞池最高 VCD 和收样时活率和对照组相当。图 5C 表明断裂蛋白组第 9 天和第 14 天单抗表达滴度和对照组相比无明显差异。并且 SEC-HPLC 结果表明，断裂蛋白组细胞池一步纯化样品高聚水平和对照组无明显差异（图 5D），说明该 N61|T62 断裂蛋白拆分方法能够有效地让两部分蛋白在细胞内重新组装成有活性的蛋白，在较低的博来霉素浓度下也能起到筛选的作用。另外，QNG 糖型结果说明（图 5E），和对照组相比断裂

蛋白组单抗 Man5 水平较低。文献显示 Man5 水平和抗体在血液中被清除的半衰期有关 (Goetze, Andrew M., et al. "High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans." *Glycobiology* 21.7 (2011): 949-959.) , 更低的 Man5 水平提示断裂蛋白系统生产的单抗可能更在体内稳定性更有优势。

5

实施例 2. T62|L63 突变型断裂博来霉素抗性蛋白在开发稳定表达阿达木单抗细胞池的应用

1. 表达载体构建

由于博来霉素抗性蛋白第 61-63 位氨基酸是蛋白和博来霉素结合的关键位点, 实施例 1 中结果表明 N61|T62 位点断裂蛋白活性明显低于野生型完整蛋白, 可能是由于在此关键位点引入反向平行亮氨酸拉链结构会影响蛋白和博来霉素的结合。因此为避免在该位点引入反向亮氨酸拉链, 提高蛋白和博来霉素结合稳定性, 在 T62/L63 位点将蛋白拆分为 N 端和 C 端两部分, 将 N 端反向亮氨酸拉链通过 GGGGS 连接子与 N 端蛋白连接, 命名为 NZ-62, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO4 见图 6; 将 C 端反向亮氨酸拉链通过 GGGGGGG 与 C 端蛋白 C 端相连, 命名为 CZ-63, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO5 见图 6。为进一步提高博来霉素抗性蛋白热稳定性, 将 NZ-62 蛋白中第 18 位甘氨酸 G 突变为谷氨酸 E, 第 32 位天冬氨酸 D 突变为缬氨酸 V, 该突变型蛋白命名为 NZ-G18E,D32-62, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO6 见图 6; 将 CZ-63 蛋白中第 63 位亮氨酸 L 突变为谷氨酰胺 Q, 第 98 位甘氨酸 G 突变为缬氨酸 V, 该突变型蛋白命名为 CZ-L63Q,G98V-63, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO6 见图 6。

将 T62|L63 突变型断裂博来霉素抗性蛋白应用到单抗 HC 和 LC 表达载体中: 如图 7 质粒示意图所示, 将单抗 HC 序列 (SEQ ID NO10) 构建到 NZ-G18E,D32-62 表达序列的上游, 同样地将单抗 LC 序列 (SEQ ID NO11) 构建到 CZ-L63Q,G98V-63 表达序列上游, 中间均通过 EMCV IRES 序列相连接。更优选地, 使 HC 或 LC 序列和 NZ-G18E,D32-62 表达序列或 CZ-L63Q,G98V-63 表达序列处于独立的阅读框, 分别由 CMV 和 SV40 启动表达, 将 HC 序列构建在 CZ-L63Q,G98V-63 表达序列之前, LC 序列构建在 NZ-G18E,D32-62 表达序列之前。对照组双压表达载体同实施例 1, 见图 3。

2. 细胞转染和细胞池筛选

2.1 取 2E7 个 CHO-K1 宿主细胞悬液 290g 离心 5 分钟后弃上清, 加入 300 ul 无钙镁离子 DPBS 溶液重悬均匀, 取 20 ug HC 表达载体和 20ug LC 表达载体到 250ul DPBS 溶液中混合均匀, 将质粒溶液和细胞悬液充分混匀后加到电转杯中。将电转杯放在 Biorad 电转仪卡槽中按照宿主细胞相应的程序进行电转。转染后将细胞悬液从电转杯吸出转移到 12.5 mL 提前预热好的无压培养基, 置于 36.5°C 225 rpm 摇床中培养。

2.2 转染 24 小时后, 加入相同体积的带压培养基 (含抗生素的无压培养基) 进行筛选, 在本实施例中对照组杀稻瘟菌素浓度为 18 $\mu\text{g/mL}$, 博来霉素浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$, 断裂蛋白组博来霉素浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 。培养 3-4 天后将细胞传代到带压培养基进行筛选,

只有表达了目标载体的细胞方可存活下来。

3.细胞池分批补料培养和检测

3.1 连续传代等细胞池活率恢复到 95%以上，以 4E5 细胞密度接种到生产培养基中进行分批补料培养。在培养第 3、5、7、9 和 11 天取细胞检测活细胞密度和活率，并进行补料补糖。在培养第 14 天取适量细胞离心后取上清检测单抗表达滴度。

3.2 培养第 14 天将细胞离心后收获上清，进行一步 proA 纯化后进行 SEC-HPLC 高聚含量检测和 Quick N-glycan 糖型分析。

4.实验结果

如图 8A 所示，转染后 T62/L63 突变型断裂博来霉素抗性蛋白筛选的细胞池（以下简称 T62/L63 突变组）活率低于对照组，但在 2-3 周后活率能恢复到 95%以上，和对照组相当。在 FB 培养过程中，T62/L63 突变组活率变化和对照组一致（图 8B），VCD 稍低于对照组（图 8C），但第 14 天单抗滴度均高于对照组（图 8D），说明 T62/L63 突变型断裂博来霉素抗性蛋白能够有效地筛选高表达细胞。SEC-HPLC 结果显示 T62/L63 突变组主峰纯度高于对照组，而聚体纯度低于对照组（图 8E）。糖型结果显示 G0F、G1F、G0、G1、G2 和 G0F-GN 含量与对照组无明显差异，但 Man5 含量明显低于对照组（图 8F）。

当表达载体优化后即使用 SV40 启动断裂博来霉素抗性蛋白表达，细胞池恢复时间得到明显缩短，2 周后细胞活率恢复至 95%以上（图 9A）。FB 培养过程中生长情况与对照组无明显差异（图 9B-C）。第 14 天单抗滴度比对照组提高约 10%（图 9D）。

实施例 3. T62/L63 突变型断裂博来霉素抗性蛋白在稳定表达单抗单克隆细胞筛选中的应用

3.1 对实施例 2 中对照组和 T62/L63 突变型断裂博来霉素抗性蛋白筛选的细胞池（图 9A）使用单细胞打印技术进行单克隆分选，即利用 Single Cell Printer(单细胞打印机)将悬浮细胞通过 SCP 芯片以 1 个细胞每个孔的密度铺板，每组铺 4 块 96 孔细胞培养板。所用培养基为含有添加剂的无压培养基。铺板后第 1 天和第 7 天进行拍照进行单克隆验证。

3.2 在铺板后第 12 天左右用人 IgG HTRF 试剂盒（Cisbio）对克隆单抗表达水平进行检测，将 HTRF 值排名靠前即单抗表达较高的克隆筛选出来，将这些克隆从 96 孔细胞板上所在的孔位转移至 24 孔细胞培养板进行静置培养。所用培养基为添加有 200mg/L 博来霉素的带压培养基。在 24 孔板中培养 2~3 天后，将克隆进一步转移至细胞培养管中振荡培养并传代培养。继续将选中的克隆传代约 2 周后，以 4E5 细胞密度接种到生产培养基中进行分批补料培养。在培养第 3、5、7、9 和 11 天取细胞检测活细胞密度和活率，并进行补料补糖。在培养第 11 天和第 14 天取适量细胞离心后取上清检测单抗表达滴度。

3.3 如图 10 所示，T62/L63 突变型断裂蛋白组克隆第 11 和 14 天最高滴度均高于对

照组，提示该策略能够有效地筛选到高表达克隆。

综上所述，本发明与现有技术相比，具有以下优点：

- 5 1. 本发明首次将该技术应用在博来霉素抗性蛋白，仅使用一种抗生素压力，可实现稳转细胞株的高效筛选，构建出高表达单克隆细胞株；
2. 本发明能够减少大分子药物生产过程中抗生素的使用，降低博来霉素的使用浓度，而且由于表达量比常规双压筛选体系明显提高，能够有效地降低生产成本；
3. 本发明提供的断裂博来霉素抗性蛋白筛选体系生产的分子，其高甘露糖（man5）水平显著低于双压筛选体系，这将有益于提高分子体内稳定性。

10

以上仅是本申请的具体应用范例，对本申请的保护范围不构成任何限制。对于所述领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以列举说明。凡采用等同变换或者等效替换而形成的类似此种的技术方案，均落在本申请权利保护范围之内。

15

权 利 要 求 书

1. 一种载体对，所述载体对包括第一载体和第二载体，所述第一载体包含博来霉素抗性蛋白的第一片段的表达序列，所述第二载体包含博来霉素抗性蛋白的第二片段的表达序列，并且所述第一载体和/或第二载体还包含目标蛋白的表达序列。

2. 如权利要求 1 所述的载体对，其中所述博来霉素抗性蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性。

3. 如权利要求 1 所述的载体对，其中所述博来霉素抗性蛋白的第一片段和博来霉素抗性蛋白的第二片段包含可互相结合的蛋白质结合基序，优选亮氨酸拉链，例如，N 端反向平行亮氨酸拉链和 C 端反向平行亮氨酸拉链，所述 N 端反向平行亮氨酸拉链的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 10 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性，并且所述 C 端反向平行亮氨酸拉链的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 11 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性；

任选地，所述博来霉素抗性蛋白的第一片段和/或博来霉素抗性蛋白的第二片段还包含连接肽序列，优选柔性连接肽序列，例如，所述柔性连接肽序列选自：GGGGS、GSGG 和 GGGGGG；并且

任选地，所述博来霉素抗性蛋白的第一片段的 C 端包含蛋白质结合基序和连接肽序列，例如，柔性连接肽序列和 N 端反向平行亮氨酸拉链，并且所述博来霉素抗性蛋白的第二片段的 N 端包含蛋白质结合基序和连接肽序列，例如，柔性连接肽序列和 C 端反向平行亮氨酸拉链。

4. 如权利要求 1 所述的载体对，其中所述博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性；并且所述博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 3 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性；或者

所述博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 6 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性；并且所述博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 7 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性。

5. 如权利要求 4 所述的载体对，其中所述博来霉素抗性蛋白的第一片段包括选自下组的一个或两个突变：G18E 和 D32V，和/或所述博来霉素抗性蛋白的第二片段包括选自下组的一个或两个突变：L63Q 和 G98V。

6. 如权利要求 5 所述的载体对，其中所述博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 4 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性；和/或所述博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 5 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性；或者

5 所述博来霉素抗性蛋白的第一片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性；和/或所述博来霉素抗性蛋白的第二片段的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 9 至少具有 80%、85%、90%、95%或 100%同源性。

7. 如权利要求 1 所述的载体对，其中所述目标蛋白包括异源或同源蛋白，例如单抗，
10 抗，双抗，融合蛋白或重组蛋白，优选单抗，例如阿达木单抗。

8. 如权利要求 1 所述的载体对，其中所述第一载体和/或第二载体还包含启动子，所述启动子独立地选自下组：CMV、EF1A、CAG、CBA、CBh 和 SV40，优选 SV40；和/或所述第一载体和/或第二载体还包含调控元件，所述调控元件独立地选自下组：
15 MAR/SAR 序列、隔离子序列、UCOE 序列和 STAR 序列。

9. 如权利要求 1 所述的载体对，其中所述第一载体和第二载体的比例约为 1:3~3:1。

10. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求 1-9 中任一项所述的载体对，所述
20 宿主细胞优选包括真核细胞，更优选包括哺乳动物细胞，更优选选自下组：CHO-K1 细胞、CHO-S、CHO-DXB11、CHO-DG44、NS0、SP2/0 和 HEK293。

11. 一种高表达细胞株的构建方法，所述方法包括：
a. 获得包含权利要求 1-9 中任一项所述的载体对；
25 b. 将步骤 a 的载体对转入宿主细胞；
c. 使用细胞培养基培养步骤 b 的宿主细胞，所述细胞培养基包含至少 50 µg/ml，优选 50-500 µg/ml 的博来霉素；并且
d. 对步骤 c 的经筛选的宿主细胞进行分选以获得所述高表达细胞株。