

说明书

发明名称: 一种构建生产去岩藻糖 基化蛋白质的细胞的方法及其应用

技术领域

[0001] 本公开涉及分子生物学及生物制药领域；具体地，涉及通过利用锌指蛋白核酸酶技术进行基因编辑而构建的生产去岩藻糖基化蛋白质的细胞及其应用。

背景技术

[0002] 近年来，随着基因工程抗体的成功制备和广泛应用，以及抗体生产水平的显著提高，抗体药物的研发进入了一个快速发展的新阶段。据文献报道，截止2019年12月，市场上已有79种治疗性抗体，主要用于肿瘤、自身免疫病、代谢及传染性疾病(Lu RM等(2020)J Biomed Sci.27(1): 1-30)。2022年全球十大畅销抗肿瘤药物中包括四款抗体药，其总销售额达近424.92亿美元。

[0003] 抗体通过两种机制激活免疫系统破坏攻击细胞：补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。ADCC是主要由针对抗体包被的靶的天然杀伤(NK)细胞产生的免疫应答。在ADCC中，NK细胞主要经由与NK细胞Fc γ R III受体的相互作用来识别抗体的恒定(Fc)区。然后，NK细胞沉积穿孔蛋白和颗粒酶于靶细胞表面，分别诱导细胞裂解和凋亡。

[0004] 大多数哺乳动物免疫球蛋白被岩藻糖基化，包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)产生的免疫球蛋白。 α -1, 6岩藻糖转移酶(FUT8)催化岩藻糖残基由二磷酸鸟苷-岩藻糖(GDP-Fuc)转移至N-糖链核心最内侧乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)的末位以形成附着于抗体Fc核心区的岩藻糖。已有研究表明，当从IgG抗体Fc片段的CH2结构域Asn297位置处的糖链结构去除岩藻糖时，能够增强NK细胞Fc γ R IIIa与IgG抗体Fc片段之间的结合，从而增强抗体的ADCC效应(Shinkawa T等(2003)J Biol Chem.278(5): 3466-73)。

[0005] 目前，工业生产去岩藻糖基化抗体的常见方法有三种：(1)在培养基中添加岩藻糖基化抑制剂，如2-氟岩藻糖(2FF)(Rillahan CD等(2012)Nat Chem Biol.8(7): 66

1-8); (2)在工程细胞中稳定过表达细菌RMD蛋白(GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己酮糖还原酶)(von Horsten HH等(2010)Glycobiology.20(12): 1607-18), 通过干扰底物GDP-岩藻糖的形成, 阻断Fc区域的岩藻糖基化修饰; (3)干扰岩藻糖生成通路中的关键基因, 如导入表达 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III(GnTIII)(Poppe O等(2018)MAbs.10(2): 290-303), 敲除GDP-岩藻糖转运蛋白(GFT)(Omasa T等(2008)J Biosci Bioeng.106(2): 168-73), 或敲除 α -1, 6-岩藻糖基转移酶(FUT8)(Yamane-Ohnuki N等(2004)Biotechnol Bioeng.87(5): 614-22)等。

[0006] 本领域仍需构建去岩藻糖基化蛋白质生产细胞的新方法。

发明内容

[0007] 为满足上述需求, 经过长期深入的探索研究, 发明人开发出了用于构建去岩藻糖基化蛋白质生产细胞的新方法。该方法利用锌指核酸酶使细胞中的FUT8基因失活, 所得细胞产生具有强效应功能的去岩藻糖基化蛋白质(例如, 抗体), 在工业上具有广泛的应用前景。

[0008] 一方面, 本文提供一种能靶向结合FUT8基因的锌指蛋白, 其以自N至C端顺序包含下表同行所示的锌指F1至F5或至F6的锌指识别区氨基酸序列:

F1	F2	F3	F4	F5	
SKWNLRS (SEQ ID NO: 24)	AQSNLLS (SEQ ID NO: 25)	LRHQLRR (SEQ ID NO: 26)	RS DYLTN (SEQ ID NO: 17)	RS DYLTN (SEQ ID NO: 17)	
F1	F2	F3	F4	F5	
RADNLTE (SEQ ID NO: 30)	TSGNLTE (SEQ ID NO: 31)	TSGHLVR (SEQ ID NO: 32)	RKDNLKN (SEQ ID NO: 33)	RKDNLKN (SEQ ID NO: 33)	
F1	F2	F3	F4	F5	
DRSNLLS (SEQ ID NO: 39)	NQSNLLR (SEQ ID NO: 40)	FHSNLLA (SEQ ID NO: 18)	QLSTLNY (SEQ ID NO: 41)	QSGNLSR (SEQ ID NO: 42)	
F1	F2	F3	F4	F5	F6
QLATLNR (SEQ ID NO: 13)	TRWNLRA (SEQ ID NO: 14)	SRRDLRR (SEQ ID NO: 15)	WRRRLLS (SEQ ID NO: 16)	RS DYLTN (SEQ ID NO: 17)	FHSNLLA (SEQ ID NO: 18)
F1	F2	F3	F4	F5	F6
RKSHLTM (SEQ ID NO: 19)	FHSGLLA (SEQ ID NO: 20)	WRRRLLS (SEQ ID NO: 16)	RKYVLLR (SEQ ID NO: 21)	RKDYLVL (SEQ ID NO: 22)	QQAGLIN (SEQ ID NO: 23)
F1	F2	F3	F4	F5	F6
RS DYLTN (SEQ ID NO: 17)	QKITLVR (SEQ ID NO: 27)	RS DYLTN (SEQ ID NO: 17)	QLATLNR (SEQ ID NO: 13)	SRFNLTR (SEQ ID NO: 28)	TKYILT N (SEQ ID NO: 29)
F1	F2	F3	F4	F5	F6
RS DNLSV (SEQ ID NO: 34)	SPADLTR (SEQ ID NO: 35)	RS DHLSQ (SEQ ID NO: 36)	QSGDLRR (SEQ ID NO: 37)	RS DNLVR (SEQ ID NO: 38)	RKDNLKN (SEQ ID NO: 33)
F1	F2	F3	F4	F5	F6
FHSGLLA	HPSTLSK	ARWTLDC	HPSTLSK	HPSTLSK	RKFTLTN
(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 44)	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 45)

- [0009] 另一方面，本文提供一种针对FUT8基因的锌指核酸酶(ZFN)，其为融合蛋白，且包含本文所述的ZFP和至少一个DNA切割域或切割半域。
- [0010] 本文的又一方面提供一种多核苷酸，其编码本文所述的ZFP或ZFN。
- [0011] 本文的另一方面提供一种载体，其包含如上所述的多核苷酸。
- [0012] 本文的另一方面提供一种分离的细胞(例如，宿主细胞)，其包含本文所述的ZFP、ZFN、多核苷酸或载体。
- [0013] 本文的另一方面提供一种其中FUT8基因被失活或部分失活的细胞系，其包含本文所述的ZFP、ZFN、多核苷酸或载体。
- [0014] 本文的另一方面提供一种产生FUT8缺陷型细胞的方法，所述方法包括：

- [0015] (a)将编码一种或多种ZFN的多核苷酸引入细胞，其中所述ZFN包含：(i)本文所述的ZFP，所述ZFP能与细胞中FUT8基因中的靶位点结合；和(ii)DNA切割域或切割半域；
- [0016] (b)使所述ZFN在所述细胞中表达，从而所述ZFN与所述靶位点结合，并切割所述FUT8基因。
- [0017] 本文的另一方面提供一种产生FUT8缺陷型细胞系的方法，所述方法包括：
- [0018] (a)通过如本文所述的产生FUT8缺陷型细胞的方法使细胞中的内源FUT8基因失活；和
- [0019] (b)在适合产生FUT8缺陷型细胞系的条件下培养所述细胞。
- [0020] 本文的又一方面提供一种在宿主细胞中产生目标重组蛋白的方法，所述方法包括：
- [0021] (a)提供本文所述的FUT8缺陷型细胞，
- [0022] (b)将包含编码所述目标重组蛋白的核酸的表达载体引入所述细胞，由此产生所述目标重组蛋白。
- [0023] 本文的另一方面提供一种在宿主细胞中产生目标重组蛋白的方法，所述方法包括：
- [0024] (a)提供包含内源FUT8基因的细胞；
- [0025] (b)通过如本文所述的产生FUT8缺陷型细胞的方法使所述细胞中的内源FUT8基因失活；和
- [0026] (c)将包含编码所述目标重组蛋白的核酸的表达载体引入所述细胞，由此产生所述目标重组蛋白。
- [0027] 本文的另一方面提供本文所述的ZFP、ZFN、多核苷酸、载体用于产生FUT8缺陷型细胞的用途。
- [0028] 本文的另一方面提供本文所述的ZFP、ZFN、多核苷酸、载体、细胞或细胞系用于产生去岩藻糖基化的含Fc重组蛋白的用途。
- [0029] 本文的另一方面提供本文所述的ZFP、ZFN、多核苷酸、载体、细胞或细胞系用于产生能引发增强ADCC效应的抗体(如单克隆抗体)的用途。

- [0030] 本文的另一方面提供一种FUT8缺陷型细胞系，其根据本文所述的产生FUT8缺陷型细胞系的方法制备。
- [0031] 本文的另一方面提供一种FUT8缺陷型细胞系，其在FUT8基因座处包含如SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58和SEQ ID NO: 59中一或多者所示的核苷酸序列。
- [0032] 本文的另一方面提供一种FUT8缺陷型细胞系，其包含经改造的FUT8基因座，所述经改造的FUT8基因座能通过如下引物被检测：
- [0033] 引物对(i)：
- [0034] 正向引物：AGCCTGAAGTACATAGCCGA(SEQ ID NO: 46)；和
- [0035] 反向引物：TGCCACTGCTTCTATATACTGATTC(SEQ ID NO: 47)；
- [0036] 和/或
- [0037] 引物对(ii)：
- [0038] 正向引物：GACGCACTGACAAAGTGGGA(SEQ ID NO: 48)；和
- [0039] 反向引物：GGTCTGTTCCATCCCCAGAATG(SEQ ID NO: 49)；
- [0040] 和/或
- [0041] 引物对(iii)：
- [0042] 正向引物：CTGTTGATTCCAGGTTCCCA(SEQ ID NO: 50)；和
- [0043] 反向引物：TGTTACTTAAGCCCCAGGC(SEQ ID NO: 51)。
- [0044] 本文的另一方面提供一种培育FUT8缺陷型细胞系的方法，其包括：
- [0045] (a)提供根据权利要求15-17中任一项所述的FUT8缺陷型细胞系；和
- [0046] (b)培养或扩增所述细胞系的细胞。

附图说明

- [0047] 下面结合附图对本发明作进一步说明，其中这些显示仅为了图示说明本发明的实施方式，而不是为了局限本发明的范围。
- [0048] 图1显示根据本文的示例性实施方式之一的针对FUT8外显子3和外显子10及其附近区域的锌指蛋白核酸酶的结合位点、切割位点，及PCR引物位点。

- [0049] 图2A显示根据本文的示例性实施方式之一的锌指蛋白核酸酶的表达质粒图谱示意图。其中，锌指蛋白和限制性内切酶FokI切割半域被融合并克隆在质粒中。该融合蛋白在CMV启动子控制下。图2B显示的是根据本文的示例性实施方式之一的锌指蛋白核酸酶的具体结构示意图，其中各个锌指结合域按顺序插入在天然锌指蛋白的框架(Framework)序列之间，并在C端和FokI切割半域连接。
- [0050] 图3显示T7E1酶切实验验证ZFN质粒是否有效切除目的基因序列。泳道1：S2-L和S4-R转染，根据ImageJ测算的条带亮度计算的编辑效率为4.7%；泳道2：L3和R3转染，编辑效率为6.2%；NC：阴性对照组，即未敲除FUT8基因的细胞基因组DNA；PC：阳性对照组，即含有50%比例的已敲除FUT8基因的细胞基因组。
- [0051] 图4显示采用流式细胞仪分析经绿色荧光标记小扁豆凝集素(LCA-FITC)染色后的细胞池的结果。(A)不同亚细胞群的定量分析，其中，被圈出的绿色荧光更低的细胞群即为FUT8^{-/-}细胞群，在该细胞池中所占比例为27.44%。(B)不同亚细胞群的峰位移。
- [0052] 图5显示克隆154-F8ZFN-09-08和阴性对照经过LCA-FITC染色后的流式分析结果。实线：154-F8ZFN-09-08细胞；虚线：未敲除FUT8基因的阴性对照。
- [0053] 图6显示NGS验证结果，证明克隆154-F8ZFN-09-08和154-F8ZFN-10-02的一对等位基因被敲除。
- [0054] 图7显示FUT8^{-/-}细胞株(即154-F8ZFN-09-08和154-F8ZFN-10-02)在单抗表达筛选中的应用。NC：FUT8基因未经敲除的阴性对照。(A)细胞池恢复后进行FB培养期间活率变化；(B)细胞池FB培养期间活细胞密度VCD变化；(C)流加式培养过程中第14天蛋白表达水平效价；(D)收获的上清一步ProA纯化后进行分子排阻层析分析SEC-HPLC；(E)一步纯化样品进行SDS Caliper NR及SDS Caliper R；(F)一步纯化样品糖型检测结果。
- [0055] 图8显示FUT8^{-/-}细胞株(154-F8ZFN-09-08)在抗体生产中的性能评估结果。(A)在FB培养过程中，154-F8ZFN-09-08组的细胞活力；(B)活细胞密度(VCD)变化；(C)蛋白质表达效价；(D)SEC-HPLC与SDS Caliper NR分析结果；(E)糖型分析结果。

- [0056] 图9显示基因编辑效率检测结果。泳道1：31-L1/31-R1敲除样品，编辑效率为9.4%；泳道2：32-L1/32-R1敲除样品，编辑效率为10.9%；NC：野生型CHO-K1。
- [0057] 图10显示SCP单克隆分选结果。未染色样品为CHO K1；Fut8^{-/-}克隆C6为分选单克隆后进行LCA-FITC染色后挑选的单克隆；Fut8 wt为CHO K1进行LCA-FITC染色。
- [0058] 图11显示SCP单克隆分选结果。未染色样品为CHO K1-N079；Fut8^{-/-}克隆F2为分选后进行LCA-FITC染色后挑选的单克隆；Fut8 wt为CHO K1进行LCA-FITC染色。
- [0059] 图12显示NGS验证结果，证明克隆C6和F2的一对等位基因被敲除。
- [0060] 图13显示敲除Fut8基因后的宿主细胞生产的阿达木单抗的ADCC效应比野生型的对照显著增强。

具体实施方式

- [0061] 本申请中科技术语的含意与本领域技术人员的普遍理解一致，除非另做说明。本申请中，“一”或与其与各种量词的组合既包括单数含意也包括复数含意，除非特别说明。本申请中，对于同一参数或变量，当给出多个数值、数值范围、或其组合予以说明时，相当于具体揭示了这些数值、范围端值以及由它们任意组合而成的数值范围。本申请中，任一数值不论是否带有“约”之类的修饰词，一律涵盖本领域技术人员能够理解的约略范围，例如正负10%、5%等。本文中，每一“实施方式”均同等地指代且涵盖了本申请各项方法和各项系统的实施方式。本申请中，任意实施方式中一项或多项技术特征可以与任何一个或多个其它实施方式中的一项或多项技术特征自由组合，由此得到的实施方式同样属于本申请公开的内容。
- [0062] 在哺乳动物细胞中，Fut8将核心岩藻糖附着于存在于抗体Fc区上的寡糖上，其一般被认为对抗体依赖性细胞的细胞毒性的效应功能非常重要。人类Fut8结构的三维分析显示3个 α 2/ α 6岩藻糖基转移酶基序形成酶的催化核心。参见，Ihara等(2007)Glycobiology 17: 455-66。该区域中，许多单个残基点突变为丙氨酸导致酶的完全失活。参见，Ihara等(2007)Glycobiology 17: 455-66；Takahashi等(20

00)Glycobiology 10: 503–10。已有研究表明，其中FUT8的表达降低或消除的细胞(例如敲除细胞系或使用siRNA)能产生具有更强效应功能的非岩藻糖基化的抗体。参见，例如，Kanada等(2007)Biotechnol.130(3): 300–310；Kanada等(2007)Glycobiology 18: 104–118；Mori等(2004)Biotechnol.Bioeng.88: 901–908。

[0063] 本文提供了一种构建去岩藻糖基化蛋白质生产细胞的方法，该方法利用靶向FUT8基因的锌指核酸酶使细胞中的FUT8基因失活。所述锌指蛋白核酸酶(ZFN)包含锌指蛋白(ZFP)和核酸酶切割域或切割伴域。发明人惊奇地发现，利用根据本文所述特别设计的锌指核酸酶，能够高度有效地敲除细胞中的FUT8基因，所得细胞产生具有更强效应功能的去岩藻糖基化蛋白质(例如，抗体)。

[0064] A.锌指蛋白

[0065] 一方面，本文提供一种能够靶向结合FUT8基因的锌指蛋白(ZFP)。

[0066] 本文中，术语“锌指蛋白”或“ZFP”指这样的蛋白质，其通过一个或多个锌指(或锌指识别区)以序列特异性的方式结合DNA。所述锌指是所述蛋白质内的结构由锌离子的配位而稳定的氨基酸序列区。

[0067] 本文所述的ZFP是非天然存在的ZFP。所述ZFP可具有1、2、3、4、5、6个或更多个锌指，其各自具有能够结合FUT8基因中靶位点的锌指识别区。在一些实施方式中，所述ZFP包含五或六个锌指。

[0068] 本文中，术语“靶位点”指的是本文所述的ZFP或ZFN将要结合的靶基因(例如FUT8基因)的DNA的部分的核苷酸序列。

[0069] 在一些实施方式中，靶位点可包括FUT8基因的外显子3(相关序列示于SEQ ID NO: 1)。在一些实施方式中，靶位点可包括FUT8基因的外显子10及其附近区域(相关序列示于SEQ ID NO: 2)。

[0070] 本文中，ZFP中的锌指以“F+自N至C端顺序数字编号”方式命名。例如，就某ZFP而言，以自N至C端顺序，第一锌指命名为“F1”、第二锌指命名为“F2”，以此类推。

[0071] 在一些实施方式中，所述ZFP的一个或多个锌指具有工程化锌指识别区。在一些实施方式中，所述ZFP具有表1中同行所示锌指(F1至F5或至F6)的识别区氨基酸序列：

[0072] 表1.靶向FUT8基因的锌指蛋白

ZFP 名称 靶序列(5'-3')	F1	F2	F3	F4	F5	F6
32-L1 AATAAGGTCCCCAGGCA (SEQ ID NO: 7)	QLATLNR (SEQ ID NO: 13)	TRWNLRA (SEQ ID NO: 14)	SRRDLRR (SEQ ID NO: 15)	WRRRLLS (SEQ ID NO: 16)	RSDYLTN (SEQ ID NO: 17)	FHSNLLA (SEQ ID NO: 18)
32-R1 ATATAGGTGGTCATTGG (SEQ ID NO: 8)	RKSHLTM (SEQ ID NO: 19)	FHSGLLA (SEQ ID NO: 20)	WRRRLLS (SEQ ID NO: 16)	RKYVLLR (SEQ ID NO: 21)	RKDYLVL (SEQ ID NO: 22)	QQAGLIN (SEQ ID NO: 23)
L3 AAGAAGGGTCATCAG (SEQ ID NO: 9)	SKWNLRS (SEQ ID NO: 24)	AQSNLLS (SEQ ID NO: 25)	LRHQLRR (SEQ ID NO: 26)	RSDYLTN (SEQ ID NO: 17)	RSDYLTN (SEQ ID NO: 17)	—
R3 AAGGAGGCAAAGACAAAG (SEQ ID NO: 10)	RSDYLTN (SEQ ID NO: 17)	QKITLVR (SEQ ID NO: 27)	RSDYLTN (SEQ ID NO: 17)	QLATLNR (SEQ ID NO: 13)	SRFNLTR (SEQ ID NO: 28)	TKYILTIN (SEQ ID NO: 29)
S2-L AAGAAGGGTCATCAG (SEQ ID NO: 9)	RADNLTE (SEQ ID NO: 30)	TSGNLTE (SEQ ID NO: 31)	TSGLHVR (SEQ ID NO: 32)	RKDNLKN (SEQ ID NO: 33)	RKDNLKN (SEQ ID NO: 33)	—
S4-R AAGGAGGCAAAGACAAAG (SEQ ID NO: 10)	RSDNLSV (SEQ ID NO: 34)	SPADLTR (SEQ ID NO: 35)	RSDHLSQ (SEQ ID NO: 36)	QSGDLRR (SEQ ID NO: 37)	RSDNLVR (SEQ ID NO: 38)	RKDNLKN (SEQ ID NO: 33)
31-L1 GAACCAAATGACCACCTA (SEQ ID NO: 11)	DRSNLLS (SEQ ID NO: 39)	NQSNLLR (SEQ ID NO: 40)	FHSNLLA (SEQ ID NO: 18)	QLSTLNY (SEQ ID NO: 41)	QSGNLSR (SEQ ID NO: 42)	—
31-R1 ATGACCACCTGACCATT (SEQ ID NO: 12)	FHSGLLA (SEQ ID NO: 20)	HPSTLSK (SEQ ID NO: 43)	ARWTLDC (SEQ ID NO: 44)	HPSTLSK (SEQ ID NO: 43)	HPSTLSK (SEQ ID NO: 43)	RKFTLTN (SEQ ID NO: 45)

- [0073] 表1中，各行分别描述了单一ZFP。各ZFP的名称和DNA靶序列(以5’-3’顺序)显示于第1列，第2至6或7列显示了各ZFP中锌指(F1至F5或至F6)的识别区氨基酸序列。
- [0074] 在一些实施方式中，所述ZFP的多个锌指可由适合的连接体序列连接。在一些实施方式中，所述连接体序列可包括长度为1、2、3、4、5个或更多个氨基酸的连接体。
- [0075] 进一步地，本文还提供ZFP对，其包括左ZFP和右ZFP。所述ZFP对中的左ZFP的靶位点与右ZFP的靶位点位于靶基因DNA序列上相近位置处(例如，相隔5至10个核苷酸碱基对)的相对链上。例如，所述ZFP对中的左ZFP能够结合至靶基因DNA序列的一条链(例如，模板链或编码链)上的靶位点，而右ZFP能够结合至该靶基因DNA序列的相反链(例如，编码链或模板链)上位于左ZFP靶位点附近(例如，相隔5至20个核苷酸碱基对)处的靶位点。在一些实施方式中，左ZFP的靶位点和右ZFP的靶位点之间相隔5至20个核苷酸碱基对，例如，相隔5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个核苷酸碱基对。
- [0076] 在一些实施方式中，左ZFP可具有以下识别区氨基酸序列(ZFP 32-L1)：

- [0077] F1: QLATLNR(SEQ ID NO: 13);
- [0078] F2: TRWNLRA(SEQ ID NO: 14);
- [0079] F3: SRRDLRR(SEQ ID NO: 15);
- [0080] F4: WRRRLLS(SEQ ID NO: 16);
- [0081] F5: RSDYLTN(SEQ ID NO: 17), 和
- [0082] F6: FHSNLLA(SEQ ID NO: 18)。
- [0083] 在一些实施方式中, 左ZFP可具有以下识别区氨基酸序列(ZFP L3):
- [0084] F1: SKWNLRS(SEQ ID NO: 24);
- [0085] F2: AQSNLLS(SEQ ID NO: 25);
- [0086] F3: LRHQLRR(SEQ ID NO: 26);
- [0087] F4: RSDYLTN(SEQ ID NO: 17);
- [0088] F5: RSDYLTN(SEQ ID NO: 17)。
- [0089] 在一些实施方式中, 左ZFP可具有以下识别区氨基酸序列(ZFP S2-L):
- [0090] F1: RADNLTE(SEQ ID NO: 30);
- [0091] F2: TSGNLTE(SEQ ID NO: 31);
- [0092] F3: TSGHLVR(SEQ ID NO: 32);
- [0093] F4: RKDNLKN(SEQ ID NO: 33); 和
- [0094] F5: RKDNLKN(SEQ ID NO: 33)。
- [0095] 在一些实施方式中, 左ZFP可具有以下识别区氨基酸序列(ZFP 31-L1):
- [0096] F1: DRSNLLS(SEQ ID NO: 39);
- [0097] F2: NQSNLLR(SEQ ID NO: 40);
- [0098] F3: FHSNLLA(SEQ ID NO: 18);
- [0099] F4: QLSTLNY(SEQ ID NO: 41); 和
- [0100] F5: QSGNLSR(SEQ ID NO: 42)。
- [0101] 在一些实施方式中, 右ZFP可具有以下识别区氨基酸序列(ZFP 32-R1):
- [0102] F1: RKSHLTM(SEQ ID NO: 19);
- [0103] F2: FHSGLLA(SEQ ID NO: 20);
- [0104] F3: WRRRLLS(SEQ ID NO: 16);

- [0105] F4: RKYVLLR(SEQ ID NO: 21);
- [0106] F5: RKDYLVVL(SEQ ID NO: 22); 和
- [0107] F6: QQAGLIN(SEQ ID NO: 23)。
- [0108] 在一些实施方式中, 右ZFP可具有以下识别区氨基酸序列(ZFP R3):
- [0109] RSDYLTN(SEQ ID NO: 17);
- [0110] QKITLVR(SEQ ID NO: 27);
- [0111] RSDYLTN(SEQ ID NO: 17);
- [0112] QLATLNR(SEQ ID NO: 13);
- [0113] SRFNLTR(SEQ ID NO: 28); 和
- [0114] TKYILTIN(SEQ ID NO: 29)。
- [0115] 在一些实施方式中, 右ZFP可具有以下识别区氨基酸序列(ZFP S4-R):
- [0116] RSDNLSV(SEQ ID NO: 34);
- [0117] SPADLTR(SEQ ID NO: 35);
- [0118] RSDHLSQ(SEQ ID NO: 36);
- [0119] QSGDLRR(SEQ ID NO: 37);
- [0120] RSDNLVR(SEQ ID NO: 38); 和
- [0121] RKDNLKN(SEQ ID NO: 33)。
- [0122] 在一些实施方式中, 右ZFP可具有以下识别区氨基酸序列(ZFP 31-R1):
- [0123] FHSGLLA(SEQ ID NO: 20);
- [0124] HPSTLSK(SEQ ID NO: 43);
- [0125] ARWTLDC(SEQ ID NO: 44);
- [0126] HPSTLSK(SEQ ID NO: 43);
- [0127] HPSTLSK(SEQ ID NO: 43); 和
- [0128] RKFTLTN(SEQ ID NO: 45)。
- [0129] 在一些实施方式中, ZFP对可由ZFP 32-L1与ZFP 32-R1组成。在一些实施方式中, ZFP对可由ZFP L3与ZFP R3组成。在一些实施方式中, ZFP对可由ZFP S2-L与S4-R组成。在一些实施方式中, ZFP对可由ZFP 31-L1与ZFP 31-R1组成。

[0130] B. 锌指核酸酶

[0131] 另一方面，本文提供一种针对FUT8基因的锌指核酸酶(ZFN)，其为融合蛋白，且包含本文所述的ZFP和至少一个DNA切割域或切割半域。

[0132] 本文中，术语“融合蛋白”指其中两个或更多个亚基分子(例如本文所述的ZFP和DNA切割域或切割半域)彼此连接(优选共价连接)而形成的蛋白质分子。

[0133] 本文中，术语“切割”指DNA分子共价骨架的断裂。切割可由各种方法来起始，这些方法包括但不限于磷酸二酯键的酶促或化学水解。在一些实施方式中，切割可以是单链切割或双链切割。在一些实施方式中，双链切割可由两个不同的单链切割事件所致。DNA的切割可导致平末端或交错末端的产生。在某些实施方式中，所述ZFN用于靶向双链DNA切割。

[0134] 本文中，术语“切割半结构域”是能与(相同或不同的)另一多肽结合形成具有切割活性(优选双链切割活性)的复合体的多肽序列。在一些实施方式中，两个切割半结构域通常以二聚化形式(成对)发挥切割作用。

[0135] 在一些实施方式中，ZFP和至少一个DNA切割域或切割半域操作性地连接。

[0136] 本文中，术语“操作性地连接”可指某组分与其它组分以有功能的方式彼此连接。例如，就其中ZFP与切割域融合的融合蛋白而言，如果融合蛋白中ZFP能结合其靶位点和/或其结合位点，而切割域能在靶位点附近切割DNA，那么该ZFP与切割域为操作性连接关系。

[0137] 本文所述的锌指核酸酶可用作靶向切割并使靶基因(如FUT8基因)失活的工具，其通过在靶基因的靶位点处引入双链DNA断裂(DSB)，并利用非同源末端连接(NHEJ)介导的DSB修复可达到靶基因定向敲除的目的。

[0138] 进一步地，本文还提供ZFN对，其包括左ZFN和右ZFN。所述左ZFN和右ZFN各自由本文所述的ZFP与至少一个DNA切割域或切割半域融合而成。例如，ZFN 32-L1为包含ZFP 32-L1与至少一个DNA切割域或切割半域的融合蛋白。

[0139] 所述ZFN对中的左ZFN的靶位点与右ZFN的靶位点位于靶基因DNA序列上相近位置处(例如，相隔5至10个核苷酸碱基对)的相对链上。例如，所述ZFN对中的左ZFN能够结合至靶基因DNA序列的一条链(例如，模板链或编码链)上的靶位点，而右ZFN能够结合至该靶基因DNA序列的相反链(例如，编码链或模板链)

上位于左ZFN靶位点附近(例如,相隔5至20个核苷酸碱基对)处的靶位点。在一些实施方式中,左ZFN的靶位点和右ZFN的靶位点之间相隔5至20个核苷酸碱基对,例如,相隔5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个核苷酸碱基对。

[0140] 在一些实施方式中,ZFN对可由ZFN 32-L1与ZFN 32-R1组成。在一些实施方式中,ZFN对可由ZFN L3与ZFN R3组成。在一些实施方式中,ZFN对可由ZFN S2-L与S4-R组成。在一些实施方式中,ZFN对可由ZFN 31-L1与ZFN 31-R1组成。

[0141] 本文公开的融合蛋白的切割域部分可获自任何内切核酸酶或外切核酸酶。可衍生切割域的示例性内切核酸酶包括但不限于限制性内切核酸酶和归巢内切核酸酶。参见,例如,新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs)2002-2003目录,马萨诸塞州贝弗利;和Belfort等(1997)*Nucleic Acids Res.*25: 3379-3388。能够切割DNA的其它酶是已知的(例如,S1核酸酶;绿豆核酸酶;胰腺DNA酶I;微球菌核酸酶;酵母HO内切核酸酶;还参见Linn等(编)《核酸酶》(Nucleases),冷全港出版社,1993)。这些酶(或其功能性片段)的一种或多种可用作切割域和切割半域的来源。

[0142] 相似地,切割半域可衍生自如上文提到其切割活性需要二聚化的任何核酸酶或其片段。一般而言,如果融合蛋白包含切割半域,则需要两个融合蛋白来执行切割。任选地,可使用包含两个切割半域的单个蛋白质。两个切割半域可衍生自相同的内切核酸酶(或其功能性片段),或者各切割半域可衍生自不同的内切核酸酶(或其功能性片段)。另外,两个融合蛋白的靶位点设置为使得这两个融合蛋白与其各自靶位点的结合将切割半域置于允许切割半域(例如通过二聚化)形成功能性切割域的彼此的空间定向。因此,在某些实施方式中,靶位点可相隔5-20个或更多个核苷酸碱基对。一般而言,切割位点位于靶位点之间。

[0143] 限制性内切核酸酶(限制酶)存在于许多物种,并且能序列特异地结合DNA(在识别位点),并在结合位点或接近结合位点处切割DNA。某些限制酶(例如,IIS型)在远离识别位点的位点处切割DNA,并具有可分的结合结构域和切割域。示例性的IIS型限制性内切酶描述于国际公布WO 07/014275,其全文通过引用方式纳

入本文。因此，在一个实施方式中，所述融合蛋白包含所述锌指蛋白和来自至少一个IIS型限制酶的切割域(或切割半域)。

- [0144] 切割域或切割半域可以是保留切割活性或保留多聚化(例如二聚化)以形成功能性切割域的能力的蛋白质的任何部分。
- [0145] 在一些实施方式中，所述IIS型限制酶是FokI。该酶以二聚体形式发挥活性。相应地，在一些实施方式中，融合蛋白中所用的FokI酶的一部分被认为是切割半域。因此，对使用锌指蛋白-FokI融合体的细胞序列的靶向双链切割和/或靶向替代而言，各包含FokI切割半域的两个融合蛋白可用来重构催化上有活性的切割域。任选地，也可使用含有锌指蛋白和两个FokI切割半域的单个多肽分子。在一些实施方式中，切割半域是FokI切割半域。在一些实施方式中，切割半域是野生型FokI切割半结构域。在另一些实施方式中，切割半域是改造的FokI切割半结构域。
- [0146] 在一些示例性的实施方式中，所述切割半域来自在野生型FokI基础上通过氨基酸突变而得的Sharkey FokI核酸酶，其示例性氨基酸序列示于SEQ ID NO: 3。
- [0147] 本文描述的经改造切割半域可使用任何适合的方法来制备，例如，通过位点定向诱变。
- [0148] 本文也考虑包含可分的结合结构域和切割域的其他限制酶。参见例如，Roberts等(2003)*Nucleic Acids Res.*31: 418-420。
- [0149] 在一些实施方式中，切割域可包含例如在美国专利公布第20050064474; 20060188987和20080131962号(其所有公开内容通过引用整体并入本文)中所述最小化或阻止同源二聚化的一个或多个改造的切割半域(也称为二聚化结构域突变体)。位于FokI的446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537和538位置的氨基酸残基都是影响FokI切割半域二聚化的靶。
- [0150] 在一些实施方式中，形成专性异源二聚体的FokI的示例性经改造切割半域包括其中第一切割半域包括在FokI的490和538位置的氨基酸残基的突变，而第二切割半域包括在氨基酸残基486和499处的突变的对。
- [0151] 在一个实施方式中，在490处的突变用Lys(K)替代Glu(E)；在538处的突变用Lys(K)替代Iso(I)；在486处的突变用Glu(E)替代Gln(Q)；而在499处的突变用Lys(K)替

代Iso(I)。具体地，通过突变一个切割半域中的位置490(E→K)和538(I→K)来产生命名为“E490K: I538K”的经改造切割半域和通过突变另一个切割半域中的位置486(Q→E)和499(I→L)来产生命名为“Q486E: I499L”的经改造切割半域制备本文所述的经改造切割半域。本文所述的经改造切割半域是其中当使用含有这些切割半域的一对或多对核酸酶用于切割时异常切割被最小化或消除的专性异源二聚体突变体。参见，例如，美国专利公布第20080131962号，为所有目的其公开内容通过引用整体并入。

[0152] C.递送

[0153] 可将本文所述的ZFN递送至细胞以使细胞中FUT8基因的失活。可通过将编码所述ZFN的多核苷酸引入细胞来实现所述ZFN向细胞的递送，其中该多核苷酸在细胞中被转录，转录物被翻译产生所述ZFN融合蛋白。细胞中蛋白质的表达还可涉及反式剪接、多肽切割和多肽连接。

[0154] 本文的又一方面提供一种多核苷酸，其编码本文所述的ZFP或ZFN。在一些实施方式中，所述多核苷酸可以是mRNA。

[0155] 本文所述的ZFN可通过多种适合的方法被递送至靶细胞。

[0156] 在一些实施方式中，可采用载体(或载体系统)将所述ZFN递送至靶细胞。

[0157] 本文的另一方面提供一种载体，其包含如上所述的多核苷酸。可用的载体包括但不限于以下一种或多种：质粒载体、反转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体等。

[0158] 在一些实施方式中，所述载体可包含编码一种或多种ZFN的多核苷酸。在一些实施方式中，编码一种或多种ZFN的多核苷酸可位于一种(相同)或多种(不同)载体。在采用多种载体的实施方式中，各载体可包含编码一种或多种ZFN的多核苷酸。在采用多种载体的实施方式中，各载体可同时或先后被递送至靶细胞。

[0159] 在一些实施方式中，可采用非载体递送方法将所述ZFN递送至靶细胞。可用的非载体递送方法包括但不限于，电穿孔、脂质转染、显微注射、基因枪、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂类：核酸轭合物、裸DNA和增强DNA摄取的试剂等。还可使用采用例如Sonitron 2000系统(Rich-Mar)的声孔效应来递送编码所述ZFN的多核苷酸。

- [0160] 本文的另一方面提供一种分离的细胞(例如, 宿主细胞), 其包含本文所述的ZFP、ZFN、多核苷酸或载体。
- [0161] 适合的细胞包括但不限于真核和原核细胞和/或细胞系。此类细胞或细胞系的非限制性实例包括: COS、CHO(例如, CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV)、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293(例如, HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T)和perC6细胞以及诸如草地贪夜蛾(Sf)的昆虫细胞或诸如酿酒酵母、毕赤酵母和裂殖酵母的真菌细胞。在一些实施方式中, 所述细胞为哺乳动物细胞。在一个具体实施方式中, 所述细胞为中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。也可使用这些细胞系的子代、变体和衍生物。
- [0162] 本文的另一方面提供一种其中FUT8基因被失活或部分失活的细胞系, 其包含本文所述的ZFP、ZFN、多核苷酸或载体。
- [0163] 本文还提供一种其中FUT8基因被失活或部分失活的细胞系, 其通过使用本文所述的ZFP、ZFN、多核苷酸和/或载体生成。
- [0164] 本文还提供一种FUT8缺陷型细胞系, 其在FUT8基因座处包含如SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58和SEQ ID NO: 59中一或多者所示的核苷酸序列。
- [0165] 在一些实施方式中, 所述FUT8缺陷型细胞系在FUT8基因座处包含SEQ ID NO: 52和SEQ ID NO: 53所示的核苷酸序列。在一些实施方式中, 所述FUT8缺陷型细胞系在FUT8基因座处包含SEQ ID NO: 54和SEQ ID NO: 55所示的核苷酸序列。在一些实施方式中, 所述FUT8缺陷型细胞系在FUT8基因座处包含SEQ ID NO: 56和SEQ ID NO: 57所示的核苷酸序列。在一些实施方式中, 所述FUT8缺陷型细胞系在FUT8基因座处包含SEQ ID NO: 58和SEQ ID NO: 59所示的核苷酸序列。
- [0166] 本文还提供一种FUT8缺陷型细胞系, 其包含经改造的FUT8基因座, 所述经改造的FUT8基因座能通过如下引物对被检测:
- [0167] 引物对(i):

- [0168] 正向引物: AGCCTGAAGTACATAGCCGA(SEQ ID NO: 46); 和
- [0169] 反向引物: TGCCACTGCTTCTATATACTGATTC(SEQ ID NO: 47);
- [0170] 和/或
- [0171] 引物对(ii):
- [0172] 正向引物: GACGCACTGACAAAGTGGGA(SEQ ID NO: 48); 和
- [0173] 反向引物: GGTCTGTTCCATCCCCAGAATG(SEQ ID NO: 49);
- [0174] 和/或
- [0175] 引物对(iii):
- [0176] 正向引物: CTGTTGATTCCAGGTTCCCA(SEQ ID NO: 50); 和
- [0177] 反向引物: TGTACTTAAGCCCCAGGC(SEQ ID NO: 51)。
- [0178] 在一些实施方式中, 所述检测采用FUT8正常(非缺陷)的等同细胞系作为对照细胞系。在一些实施方式中, 所述检测显示FUT8缺陷型细胞系与对照细胞系之间的结果差异(例如, 电泳所测分子大小及条带亮度差异等)。
- [0179] D.应用
- [0180] 本文所述的ZFN可用于使细胞中的FUT8基因失活。在一些实施方式中, 失活包括部分或完全抑制细胞中FUT8基因的表达。可例如通过单一切割事件、通过切割然后非同源末端连接、通过在两个位点切割然后连接以便删除两个切割位点之间的序列、通过错义或无义密码子靶向重组到编码区、通过不相关序列(即“填充”序列)靶向重组到基因或其调控区以便破坏基因或调控区, 或通过剪接受体序列靶向重组到内含子而引起转录物的错误剪接来实现FUT8基因的失活。
- [0181] 本文所述的ZFN介导的失活(敲除或抑制)有多种应用。
- [0182] 本文的另一方面提供一种产生FUT8缺陷型细胞的方法, 所述方法包括:
- [0183] (a)将编码一种或多种ZFN的多核苷酸引入细胞, 其中所述ZFN包含: (i)本文所述的ZFP, 所述ZFP能与细胞中FUT8基因中的靶位点结合; 和(ii)DNA切割域或切割半域;
- [0184] (b)使所述ZFN在所述细胞中表达, 从而所述ZFN与所述靶位点结合, 并切割所述FUT8基因。
- [0185] 在一些实施方式中, 所述一种或多种ZFN包括本文所述的ZFN对。

- [0186] 在一些实施方式中，所述方法还可包括将在FUT8基因中具有靶位点的附加核酸酶引入所述细胞中。所述附加核酸酶的示例可包括，例如，归巢内切核酸酶和大范围核酸酶。
- [0187] 本文的另一方面提供一种产生FUT8缺陷型细胞系的方法，所述方法包括：
- [0188] (a)通过如本文所述的产生FUT8缺陷型细胞的方法使细胞中的内源FUT8基因失活；和
- [0189] (b)在适合产生FUT8缺陷型细胞系的条件下培养所述细胞。
- [0190] 示例性归巢内切核酸酶包括I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII。其识别序列已知。还参见美国专利第5,420,032号；美国专利第6,833,252号；Belfort等(1997)*Nucleic Acids Res.*25: 3379–3388；Dujon等(1989)*Gene* 82: 115–118；Perler等(1994)*Nucleic Acids Res.*22, 1125–1127；Jasin(1996)*Trends Genet.*12: 224–228；Gimble等(1996)*J. Mol. Biol.*263: 163–180；Argast等(1998)*J. Mol. Biol.*280: 345–353和New England Biolabs目录。
- [0191] 尽管大多数归巢内切核酸酶的切割特异性关于其识别位点不是绝对的，这些位点具有足够的长度使得能通过在含有单拷贝其识别位点的细胞中表达归巢内切核酸酶来获得每个哺乳动物大小的基因组的单个切割事件。另据报道，归巢内切核酸酶和大范围核酸酶的特异性可被改造以便结合非天然的靶位点。参见，例如，Chevalier等(2002)*Molec. Cell* 10: 895–905；Epinat等(2003)*Nucleic Acids Res.*31: 2952–2962；Ashworth等(2006)*Nature* 441: 656–659；Paques等(2007)*Current Gene Therapy* 7: 49–66。
- [0192] 本文还提供通过本文所述的产生FUT8缺陷型细胞系的方法制备的FUT8缺陷型细胞系。
- [0193] 本文的另一方面提供一种培育FUT8缺陷型细胞系的方法，其包括：
- [0194] (a)提供根据本文所述获得的FUT8缺陷型细胞系；和
- [0195] (b)培养或扩增所述细胞系的细胞。
- [0196] 本文的又一方面提供一种在宿主细胞中产生目标重组蛋白的方法，所述方法包括：

- [0197] (a)提供本文所述的FUT8缺陷型细胞，
- [0198] (b)将包含编码所述目标重组蛋白的核酸的表达载体引入所述细胞，由此产生所述目标重组蛋白。
- [0199] 本文的另一方面提供一种在宿主细胞中产生目标重组蛋白的方法，所述方法包括：
- [0200] (a)提供包含内源FUT8基因的细胞；
- [0201] (b)通过如本文所述的产生FUT8缺陷型细胞的方法使所述细胞中的内源FUT8基因失活；和
- [0202] (c)将包含编码所述目标重组蛋白的核酸的表达载体引入所述细胞，由此产生所述目标重组蛋白。
- [0203] 在一些实施方式中，如本文所述使细胞中的内源FUT8基因失活的步骤与将包含编码所述目标重组蛋白的核酸的表达载体引入细胞的步骤可彼此调换次序或同时进行。
- [0204] 适合的细胞包括但不限于真核和原核细胞和/或细胞系。此类细胞或细胞系的非限制性实例包括：COS、CHO(例如，CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV)、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293(例如，HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T)和perC6细胞以及诸如草地贪夜蛾(Sf)的昆虫细胞或诸如酿酒酵母、毕赤酵母和裂殖酵母的真菌细胞。在一些实施方式中，所述细胞为哺乳动物细胞。在一个具体实施方式中，所述细胞为中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。也可使用这些细胞系的子代、变体和衍生物。在一些实施方式中，所述细胞为哺乳动物细胞。在一个具体实施方式中，所述细胞为中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。
- [0205] 在一些实施方式中，所述目标重组蛋白包括含Fc重组蛋白。在一些实施方式中，所述目标重组蛋白为去岩藻糖基化的含Fc重组蛋白。
- [0206] 本文的另一方面提供本文所述的ZFP、ZFN、多核苷酸、载体用于产生FUT8缺陷型细胞的用途。

- [0207] 本文的另一方面提供本文所述的ZFP、ZFN、多核苷酸、载体、细胞或细胞系用于产生去岩藻糖基化的含Fc重组蛋白的用途。
- [0208] 本文的另一方面提供本文所述的ZFP、ZFN、多核苷酸、载体、细胞或细胞系用于产生能引发增强的ADCC效应的抗体(如单克隆抗体)的用途。
- [0209] 在一些实施方式中，含Fc重组蛋白可以是抗体(例如单克隆抗体、多克隆抗体)或Fc融合蛋白。经本文所述方法提供的去岩藻糖基化的含Fc重组蛋白表现出更强的效应功能，特别是在ADCC的诱导中。
- [0210] 实施例
- [0211] 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。
- [0212] 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。
- [0213] 实施例中所用的设备和试剂分别列于表2和表3。
- [0214] 表2：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
电转杯	Bio-Rad	Gene Pulser Cuvettes 0.4 cm
生物安全柜	AIRTECH	BSC-1300 II A2
台式离心机	Eppendorf	5424R
凝胶成像仪	Bio-Rad	GELDOC XR+
电泳仪	Invitrogen	ZP10002
紫外分光光度仪	THERMO SCIENTIFIC	ND2000
96孔细胞板	CORNING	3599
24孔板	GREINER	662102

设备名称	设备厂商	型号
细胞活力分析仪(Cell Viability Analyzer)	BECKMAN COULTER	Vi-CELL XR
离心机	EPPENDORF	5810R
二氧化碳培养箱	THERMO SCIENTIFIC	HERA cell 240i
酶标仪	MOLECULAR DEVICE	i3x, M5e

[0215] 表3：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	GMP	WuXi Bio	Lot: CB2020009
DPBS溶液	R&D	Corning, Cat#21-031-V	03322003
T7高效转录试剂盒(T7 High Efficiency Transcription Kit)	R&D	Invitrogen, Cat# AM1344	Lot#01149211
DPBS溶液	R&D	HyClone	21-031-CVC,
CD CHO AGT™	R&D	Gibco	12490-003
ActiPro™	R&D	HyClone	SH31037
Cell Boost 7a	R&D	HyClone	SH31026
Cell Boost 7b	R&D	HyClone	SH31027
博来霉素	R&D	Thermo	R25005, 2417496
杀稻瘟菌素	R&D	Gibco	A11139-03, 965513
小扁豆凝集素	R&D	Medicago	264427-01
HT1080-TNFα细胞	R&D	WuXi Bio	NA
外周血单核细胞 PBMC	R&D	赛笠生物	NA
DELFI A 裂解液 (DELFI A Lysis Buffer)	R&D	Perkin Elmer	4005-0010
BATDA 试剂 (BATDA Reagent)	R&D	Perkin Elmer	C136-100

名称	级别	生产商/供应商	批次货号
DELFI A 铈 溶 液 (DELFI A Europium Solution)	R&D	Perkin Elmer	C135-100

- [0216] 实施例1 FUT8^{-/-}细胞株在开发稳定表达阿达木单抗分子的应用
- [0217] 1表达载体构建
- [0218] 1.1如图2A中示例性地显示，将ZFP蛋白L3/R3、S2-L/S4-R各为一组，分别构建在表达载体上，由CMV作为启动子启动转录，ZFP蛋白作为DNA结合域和下游的FokI切割半域连接在一起，组成一个完整蛋白质，通过同一个ORF进行表达。该表达载体在转染进CHO细胞后不通过抗性筛选，故质粒构建中未插入真核细胞筛选标志物。图2B显示了示例性序列结构，其中5-6个锌指识别区按顺序插入天然锌指蛋白框架序列中(如ZIF268或SP1C)，并在C端连接至FokI切割半域。本实施例中所用S2-L-FokI及S4-R-FokI全长序列如SEQ ID NO: 60及SEQ ID NO: 61示例性地显示。所用其它ZFP蛋白均以类似的方式将对应的锌指识别区构建至相同的框架序列中并与FokI连接。
- [0219] 1.2将阿达木单抗(Adalimumab)的HC序列(SEQ ID NO: 4)构建至表达载体pWX039-HC-Z-105上，和博来霉素(Zeocin)抗性基因通过EMCV IRES连接。阿达木单抗LC序列(SEQ ID NO 5)构建至表达载体pWX040-LC-B-105上，置于杀稻瘟菌素(Blasticidin)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。
- [0220] 2细胞转染和细胞池筛选
- [0221] 2.1取1E7个CHO-K1宿主细胞悬液，取30 μg质粒到250 μL 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。将电转杯置于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7.5mL提前预热好的无压培养基的T25细胞培养瓶，置于36.5℃，5% CO₂，85%湿度的二氧化碳培养箱中静置培养。
- [0222] 2.2转染48小时后，将T25培养瓶转移至36.5℃条件的二氧化碳培养箱中，再经过24小时的静置培养后，对细胞池取样计数取1E6的细胞量进行基因组DNA的提取，并用微量紫外分光光度计定量。选择100ng ~ 200ng基因组DNA用高保真DN

A聚合酶选择合适的引物(引物序列为：引物2F：CTGTTGATTCCAGGTTCCCA(SEQ ID NO 50)；引物R：TGTTACTTAAGCCCCAGGC(SEQ ID NO 51))进行PCR扩增目的基因序列，然后将体系重新变性退火，退火完成后体系中加入1 μ L T7E1酶(10U/ μ L)，37℃孵育15分钟。酶切后进行2%琼脂糖凝胶电泳检测酶切条带和编辑效率。

[0223] 3克隆筛选

[0224] 将活率恢复到90%以上的细胞池通过有限稀释法进行单克隆分选，将细胞静置96孔板培养约2周后，将克隆转移到24孔板中，培养约2-3天后扩增至摇管中培养，同时通过NGS方法检验细胞株中FUT8基因的序列被敲除。在摇管中进行每2-4天的传代，培养条件为36.5℃、6%CO₂、85%湿度，转速为225rpm。

[0225] 4目的细胞株在表达单抗分子方面的应用

[0226] 4.1待筛选到的目的细胞株(本实施例选择单克隆154-F8ZFN-09-08及单克隆154-F8ZFN-10-02)生长恢复后，分别将目的细胞株和未被敲除FUT8基因的细胞株(阴性对照组)作为宿主细胞，取1E7数量的细胞，和阿达木单抗单抗HC和LC质粒20ug。将细胞和质粒溶液混合均匀后转移到电转杯中，使用Biorad电转仪按相应细胞类型选择合适电转参数进行电转。电转之后将细胞全部转移到装有预热好培养基的摇管中，置于摇床中培养，培养条件为36.5℃、6%CO₂、85%湿度，转速为225rpm。

[0227] 4.2在转染24小时后，加入筛选压力培养基后继续培养，每隔2-4天进行传代。

[0228] 4.3连续传代3-4周后，待细胞池活率恢复至95%以上，以4E5/mL的细胞密度接种到生产培养基中进行流加式(fed-batch)培养，在培养第3、5、7、9和11天取样检测活细胞密度及活率，并进行补料补糖。培养14天后离心收获上清，利用ProA-HPLC方法检测上清中单抗的效价水平。此外，将收获的上清样品进一步proA纯化后进行SEC-HPLC高聚含量检测，SDS Caliper和N-聚糖-LC糖型分析。在本实施例中，阴性对照组为未被敲除FUT8基因的宿主细胞进行单抗载体的转染。

[0229] 5实验结果

- [0230] 酶切实验结果成功验证了ZFN质粒能够有效切除目的基因序列(图3)，细胞池使用流式分析(图4)，可发现一定比例的FUT8^{-/-}细胞群。通过克隆筛选流程，克隆154-F8ZFN-09-08和154-F8ZFN-10-02被成功验证一对等位基因被敲除(图5、图6)。从图7A和7B可看出，154-F8ZFN-09-08和154-F8ZFN-10-02在FB培养过程中的活细胞密度及峰值VCD与对照组相当；图7C表明154-F8ZFN-09-08组单抗表达效价与对照组无明显差异。并且SEC-HPLC和Caliper R/NR结果表明，154-F8ZFN-09-08及154-F8ZFN-10-02组细胞池一步纯化样品高聚水平和对照组无明显差异(图7D、7E)。最后，糖型结果(图7F)可看出，154-F8ZFN-09-08和154-F8ZFN-10-02组的岩藻糖水平要远远低于未被敲除FUT8基因的阴性对照组，降到了接近零的水平。
- [0231] 实施例2 FUT8^{-/-}细胞株在开发稳定表达融合蛋白分子Dulaglutide的应用
- [0232] 1表达载体构建
- [0233] Dulaglutide为一种胰高血糖素样肽1(GLP-1)Fc融合蛋白。
- [0234] 将Dulaglutide的序列(SEQ ID NO 6)构建至表达载体pWX039-Pr-Z-126A3和pWX040-Pr-B-126A3上。在pWX039-Pr-Z-126A3载体上，Dulaglutide的序列通过EMCV IRES和Zeocin抗性基因连接。在pWX040-Pr-B-126A3上，Dulaglutide的序列置于杀稻瘟菌素抗性基因上游，目的基因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。
- [0235] 2细胞转染及流加式培养
- [0236] 2.1将实施例1中筛选到的154-F8ZFN-09-08作为宿主细胞，取1E7数量的细胞和20 μg表达载体混合均匀后转移到电转杯中，使用Biorad电转仪按相应细胞类型选择合适电转参数进行电转。电转之后将细胞全部转移到装有预热好培养基的摇管中，置于摇床中培养，培养条件为36.5℃、6% CO₂、85%湿度，转速为25rpm。
- [0237] 2.2在转染24小时后，加入等体积筛选压力培养基后继续培养，每隔2-4天进行传代。
- [0238] 2.3连续传代3-4周后，待细胞池活率恢复至95%以上，以4E5/mL的细胞密度接种到生产培养基中进行流加式培养，在培养第3、5、7、9和11天取样检测活细胞

密度及活率，并进行补料补糖。培养14天后离心收获上清，利用ProA-HPLC方法检测上清中单抗的效价水平。此外，将收获的上清样品进行进一步proA纯化后进行SEC HPLC高聚含量检测，SDS CaliperNR纯度检测和N-聚糖糖型分析。在本实施例中，阳性对照组为被敲除FUT8基因的宿主细胞进行融合蛋白载体的转染。

[0239] 3实验结果

[0240] 图8A显示，154-F8ZFN-09-08组在FB培养过程中的活细胞密度与活率数据在可接受范围之内；图8C、D和E表明154-F8ZFN-09-08组蛋白质表达效价、SEC-HPLC主峰，及SDS CaliperNR主峰均与对照组差异不大。最后，糖型结果(图8E)显示，154-F8ZFN-09-08组的岩藻糖水平要远远低于未被敲除FUT8基因的阴性对照组，降到了接近零的水平。

[0241] 实施例3在外显子3处进行ZFN编辑

[0242] 1.表达载体构建

[0243] 1.1如图2A中示例性地显示，与实施例1中所述类似地，将ZFP蛋白31-L1/31-R1、32-L1/32-R1各为一组，分别构建在表达载体上。

[0244] 2.细胞转染和细胞群(库)筛选

[0245] 2.2将 1×10^7 个CHO-K1细胞与32-L1/32-R1和31-L1/31-R1质粒混合均匀，使用程序WE在Bio-rad电转仪中转染。转染后将细胞在5mL CD CHO培养基中恢复，于30°C静置培养箱中培养。

[0246] 2.3转染后第2天收集细胞，制备基因组DNA，使用引物Fut8-EX3-F1(SEQ ID NO: 46)和Fut8-EX3-R1(SEQ ID NO: 47)扩增FUT8基因的靶向区域；最后使用T7E1试剂盒检测基因编辑效率。如图9泳道2所示，根据ImageJ对条带亮度的计算，32-L1/32-R1修饰FUT8外显子3区域，导致了10.9%的DNA突变；如泳道1所示，31-L1/31-R1修饰FUT8外显子3区域，导致了9.4%的DNA突变。

[0247] 3单克隆筛选

[0248] 转染后第34天，进行SCP单克隆分选。对所有生长起来的单克隆，进行LCA-FITC染色，最终获得2个FUT8^{-/-}表型的单克隆C6及F2(图10、11)。通过序列验证，这两个克隆的测序结果如图12所示，两个等位基因均被敲除。

- [0249] 实施例4通过ZFN敲除的FUT8^{-/-}克隆表达的抗体ADCC活性显著提高
- [0250] 1.蛋白质表达
- [0251] 以根据本文所述方法获得的FUT8^{-/-}双敲除的克隆(154-F8ZFN-09-08)作为宿主细胞，以没有进行突变的野生型CHO作为对照，按照如前所述的方法表达阿达木单抗(Adalimumab)并纯化。
- [0252] 2.靶细胞标记
- [0253] 表达TNF α 的HT1080细胞首先用DELFIABATDA(Cat#C136-100, Perkin Elmer, 中国)在37℃、5%CO₂湿润培养箱中在37℃下标记30~40分钟。孵育后，将HT1080细胞离心并用测定培养基洗涤，然后重悬于测定培养基(RPMI 1640+10% HI-FBS)中。
- [0254] 3.靶细胞和效应细胞共孵育
- [0255] 外周血单核细胞(PBMC)重悬于测定培养基中。将 1×10^6 个PBMC与 1×10^4 个表达TNF α 的HT1080细胞充分混合，加入0至50ng/mL抗TNF α 治疗性抗体样品，96孔板中以200 μ L/孔在37℃、5%CO₂培养箱中共培养1~2小时。
- [0256] 4.上清液反应
- [0257] 96孔板以500 $\times$ g离心3~5分钟后，从每个孔中取出20 μ L上清液，并转移到96孔白色微孔板(3912, Corning, 美国)中的相应孔中。随后，向各孔中加入200 μ L DELFIABAT溶液(Cat#C135-100, Perkin Elmer, 中国)，并将板孵育20~30分钟。
- [0258] 5.数据处理
- [0259] 在酶标仪M5e(Molecular Devices, 美国加利福尼亚州)上采集数据。将相对荧光单位(RFU)与抗体浓度作图，以生成4参数逻辑斯蒂(logistic)响应曲线。当满足所有系统和样品适用性时，通过EC50比率计算样品的相对效力。如图13所示，FUT8^{-/-}双敲除的宿主生产的阿达木单抗的ADCC活性显著高于对照组野生型CHO宿主生产的相同蛋白质。

序列表

SEQ ID NO: 1 CHO FUT 8基因外显子3序列

CATGTAGAGCCCAGGAAGCACAGGACAAGAAAGCTGCCTCCTTGTATCACCAGGAAGATC
TTTTTGTAAAGAGTCATCACAGTATACCAGAGAGACTAATTTTGTCTGAAGCATCATGTGTTGAAA
CAACAGAAACTTATTTTCCTGTGTGGCTAACTAGAACAGAGTACAATGTTTCCAATTCTTTGAG
CTCCGAGAAGACAGAAGGGAGTTGAAACTCTGAAAATGCGGGCATGGACTGGTTCCTGGCGTTG
GATTATGCTCATTCTTTTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTGGTCATTGGTTCGAGA
TAATGACCACCCTGACCATTCTAGCAGAGAAGCTCCAAGATTCTTGCAAAGCTGGAGCGCTTA
AAACAACAAAATGAAGACTTGAGGAGAATGGCTGAGTCTCTCCG

SEQ ID NO: 2 CHO FUT 8基因外显子10及其附近区域(包括内含子10的部分)核苷酸序列

AGTCCATGTCAGACGCACTGACAAAGTGGGAACAGAAGCAGCCTTCCATCCCATTGAGGA
ATACATGGTACACGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTCGAACGCAGAAAGTGGATAAAAAA
AGAGTGATCTGGCCACTGATGACCTTCTTTGTTAAAGGAGGCAAAGACAAAGTAAAGTTAGAC
CAACAAGTGGTTCTGTATGGGATTATCTTAGTTGAAGAAAATCCTTAATTCTGGGAAGTTGTG
GTTCTTGTGCTAACTAATAGGTCCAAAATCAAAGACTACATGTGCAAAATATTAATCTAATCAA
GTCATACCTTACTAGCTGTATCTGATGCAAATTAAGAAGTCTAAAATGAAT

SEQ ID NO: 3 限制性内切酶Sharkey FokI氨基酸序列

QLVKSELEEKKSELRLHKLKYPHEYIELIEIARNPTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGEHLGGS
RKPDGAITYVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWKVPSSV
TEFKFLFVSGHFKGNYKAQLRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF

SEQ ID NO: 4 阿达木单抗HC氨基酸序列

MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG
KGLEWVSAITWNSGHIDYADSVGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSL
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 5 阿达木单抗LC氨基酸序列

MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGRNYLAWYQQKP
GKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 6 Dulaglutide氨基酸序列

MPLLLLPLLWAGALAHGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLVKGGGGGGGSGGGGSGGGG
SAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKSKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

SEQ ID NO: 7 ZFN 32-L1靶序列

ACGGACCCCTGGAATAA

SEQ ID NO: 8 ZFN 32-R1靶序列

GGTTTACTGGTGATATA

SEQ ID NO: 9 ZFN L3靶序列、ZFN S2-L靶序列

GACTACTGGGAAGAA

SEQ ID NO: 10 ZFN R3靶序列、ZFN S4-R靶序列

GAAACAGAAACGGAGGAA

SEQ ID NO: 11 ZFN 31-L1靶序列
ATCCACCAGTAAACCAAG

SEQ ID NO: 12 ZFN 31-R1靶序列
TTACCAGTCCCACCAGTA

SEQ ID NO: 13 锌指识别区序列
QLATLNR

SEQ ID NO: 14 锌指识别区序列
TRWNLRA

SEQ ID NO: 15 锌指识别区序列
SRRDLRR

SEQ ID NO: 16 锌指识别区序列
WRRRLLS

SEQ ID NO: 17 锌指识别区序列
RSDYLTN

SEQ ID NO: 18 锌指识别区序列
FHSNLLA

SEQ ID NO: 19 锌指识别区序列
RKSHLTM

SEQ ID NO: 20 锌指识别区序列
FHSGLLA

SEQ ID NO: 21 锌指识别区序列
RKYVLLR

SEQ ID NO: 22 锌指识别区序列
RKDYLVL

SEQ ID NO: 23 锌指识别区序列
QQAGLIN

SEQ ID NO: 24 锌指识别区序列
SKWNLRS

SEQ ID NO: 25 锌指识别区序列
AQSNLLS

SEQ ID NO: 26 锌指识别区序列
LRHQLRR

SEQ ID NO: 27 锌指识别区序列
QKITLVR

SEQ ID NO: 28 锌指识别区序列
SRFNLTR

SEQ ID NO: 29 锌指识别区序列

SEQ ID NO: 30 RADNLTE	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 31 TSGNLTE	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 32 TSGHLVR	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 33 RKDNLKN	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 34 RSDNLSV	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 35 SPADLTR	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 36 RSDHLSQ	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 37 QSGDLRR	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 38 RSDNLVR	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 39 DRSNLLS	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 40 NQSNLLR	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 41 QLSTLNY	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 42 QSGNLSR	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 43 HPSTLSK	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 44 ARWTLDC	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 45 RKFTLTN	锌指识别区序列
SEQ ID NO: 46 AGCCTGAAGTACATAGCCGA	Fut8-EX3-F1引物
SEQ ID NO: 47 TGCCACTGCTTCTATATACTGATTC	Fut8-EX3-R1引物

SEQ ID NO: 48 P5-F引物
GACGCACTGACAAAGTGGGA

SEQ ID NO: 49 P5-R引物
GGTCTGTTCCATCCCCAGAATG

SEQ ID NO: 50 2F引物
CTGTTGATTCCAGGTTCCCA

SEQ ID NO: 51 R引物
TGTTACTTAAGCCCCAGGC

SEQ ID NO: 52 154-F8ZFN-09-08等位基因1
CCCTTCTTAAGGAGGCAAAGA

SEQ ID NO: 53 154-F8ZFN-09-08等位基因2
CCCTTCTAAAGGAGGCAAAGA

SEQ ID NO: 54 154-F8ZFN-10-02等位基因1
CCCTTCTGTAAAGGAGGCAAAGA

SEQ ID NO: 55 154-F8ZFN-10-02等位基因2
CCCTTCTTTAAAGGAGGCAAAGA

SEQ ID NO: 56 C6等位基因1
TTGCCTGGGGGACCTTATTGTTTTATATAGGTG

SEQ ID NO: 57 C6等位基因2
TTGCCTGGGGGACCTTATTATATAGGTG

SEQ ID NO: 58 F2等位基因1
TTGCCTGGGGGACCTTATTTTATATAGGTG

SEQ ID NO: 59 F2等位基因2
TTGCCTGGGGGACCTTATTATTATATAGGTG

SEQ ID NO: 60 ZFP S2-L-FokI全长氨基酸序列
PKKKRKVLEPGKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGNLTEHQR
THTGEKPYKCPECGKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGEKPYKCP
ECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGKKTSGSQLVKSELEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNPTQDRIL
EMKVMEFFMKVYGYRGEHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYV
EENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGE
MIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF

SEQ ID NO: 61 ZFP S4-R-FokI全长氨基酸序列
PKKKRKVLEPGKPYKCPECGKSFSRSDNLSVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQR
THTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLSQHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCP
ECGKSFSRSDNLSVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGKKTSGSQLVKSELEKKKS
ELRHKLKYVPHEYIELIEIARNPTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGEHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYV
VIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWWKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYK
AQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF

权利要求书

[权利要求 1] 一种能靶向结合FUT8基因的锌指蛋白，其以自N至C端顺序包含下表同行所示的锌指F1至F5或至F6的锌指识别区氨基酸序列：

F1	F2	F3	F4	F5	
SKWNLRS (SEQ ID NO: 24)	AQSNLLS (SEQ ID NO: 25)	LRHQLRR (SEQ ID NO: 26)	RSDYLTN (SEQ ID NO: 17)	RSDYLTN (SEQ ID NO: 17)	
F1	F2	F3	F4	F5	
RADNLTE (SEQ ID NO: 30)	TSGNLTE (SEQ ID NO: 31)	TSGHLVR (SEQ ID NO: 32)	RKDNLKN (SEQ ID NO: 33)	RKDNLKN (SEQ ID NO: 33)	
F1	F2	F3	F4	F5	
DRSNLLS (SEQ ID NO: 39)	NQSNLLR (SEQ ID NO: 40)	FHSNLLA (SEQ ID NO: 18)	QLSTLNY (SEQ ID NO: 41)	QSGNLSR (SEQ ID NO: 42)	
F1	F2	F3	F4	F5	F6
QLATLNR (SEQ ID NO: 13)	TRWNLRA (SEQ ID NO: 14)	SRRDLRR (SEQ ID NO: 15)	WRRRLLS (SEQ ID NO: 16)	RSDYLTN (SEQ ID NO: 17)	FHSNLLA (SEQ ID NO: 18)
F1	F2	F3	F4	F5	F6
RKSHLTM (SEQ ID NO: 19)	FHSGLLA (SEQ ID NO: 20)	WRRRLLS (SEQ ID NO: 16)	RKYVLLR (SEQ ID NO: 21)	RKDYLVL (SEQ ID NO: 22)	QQAGLIN (SEQ ID NO: 23)
F1	F2	F3	F4	F5	F6
RSDYLTN (SEQ ID NO: 17)	QKITLVR (SEQ ID NO: 27)	RSDYLTN (SEQ ID NO: 17)	QLATLNR (SEQ ID NO: 13)	SRFNLTR (SEQ ID NO: 28)	TKYILT (SEQ ID NO: 29)
F1	F2	F3	F4	F5	F6
RSDNLSV (SEQ ID NO: 34)	SPADLTR (SEQ ID NO: 35)	RSDHLSQ (SEQ ID NO: 36)	QSGDLRR (SEQ ID NO: 37)	RSDNLVR (SEQ ID NO: 38)	RKDNLKN (SEQ ID NO: 33)
F1	F2	F3	F4	F5	F6
FHSGLLA (SEQ ID NO: 20)	HPSTLSK (SEQ ID NO: 43)	ARWTLDC (SEQ ID NO: 44)	HPSTLSK (SEQ ID NO: 43)	HPSTLSK (SEQ ID NO: 43)	RKFTLTN (SEQ ID NO: 45)

。

[权利要求 2] 一种锌指核酸酶，其包含根据权利要求1所述的锌指蛋白和至少一个DNA切割域或切割半域。

[权利要求 3] 一种多核苷酸，其编码根据权利要求1所述的锌指蛋白。

[权利要求 4] 一种多核苷酸，其编码根据权利要求2所述的锌指核酸酶。

[权利要求 5] 一种载体，其包含根据权利要求3或4所述的多核苷酸。

[权利要求 6] 一种分离的细胞，其包含根据权利要求1所述的锌指蛋白、根据权利要求2所述的锌指核酸酶、根据权利要求3或4所述的多核苷酸，或根据权利要求5所述的载体。

[权利要求 7] 一种产生FUT8缺陷型细胞的方法，所述方法包括：

(a)将编码一种或多种根据权利要求2所述的锌指核酸酶的多核苷酸引入细胞；

(b)使所述锌指核酸酶在所述细胞中表达，从而所述锌指核酸酶与所述靶位点结合并切割FUT8基因。

[权利要求 8]

根据权利要求7所述的方法，其中，在步骤(a)中，将包括左锌指核酸酶和右锌指核酸酶的锌指核酸酶对引入所述细胞，其中，所述锌指核酸酶对包括：

锌指核酸酶对(a)：

具有以下锌指识别区氨基酸序列的左锌指核酸酶：

F1: QLATLNR(SEQ ID NO: 13)；

F2: TRWNLRA(SEQ ID NO: 14)；

F3: SRRDLRR(SEQ ID NO: 15)；

F4: WRRRLLS(SEQ ID NO: 16)；

F5: RSDYLTN(SEQ ID NO: 17)；和

F6: FHSNLLA(SEQ ID NO: 18)；

和

具有以下锌指识别区氨基酸序列的右锌指核酸酶：

F1: RKSHLTM(SEQ ID NO: 19)；

F2: FHSGLLA(SEQ ID NO: 20)；

F3: WRRRLLS(SEQ ID NO: 16)；

F4: RKYVLLR(SEQ ID NO: 21)；

F5: RKDYLVL(SEQ ID NO: 22)；和

F6: QQAGLIN(SEQ ID NO: 23)；

和/或

锌指核酸酶对(b)：

具有以下锌指识别区氨基酸序列的左锌指核酸酶：

F1: SKWNLRS(SEQ ID NO: 24)；

F2: AQSNNLS(SEQ ID NO: 25)；

F3: LRHQLRR(SEQ ID NO: 26);

F4: RSDYLTN(SEQ ID NO: 17); 和

F5: RSDYLTN(SEQ ID NO: 17);

和

具有以下锌指识别区氨基酸序列的右锌指核酸酶:

RSDYLTN(SEQ ID NO: 17);

QKITLVR(SEQ ID NO: 27);

RSDYLTN(SEQ ID NO: 17);

QLATLNR(SEQ ID NO: 13);

SRFNLTR(SEQ ID NO: 28); 和

TKYILTN(SEQ ID NO: 29);

和/或

锌指核酸酶对(c):

具有以下锌指识别区氨基酸序列的左锌指核酸酶:

F1: RADNLTE(SEQ ID NO: 30);

F2: TSGNLTE(SEQ ID NO: 31);

F3: TSGHLVR(SEQ ID NO: 32);

F4: RKDNLKN(SEQ ID NO: 33); 和

F5: RKDNLKN(SEQ ID NO: 33);

和

具有以下锌指识别区氨基酸序列的右锌指核酸酶:

RSDNLSV(SEQ ID NO: 34);

SPADLTR(SEQ ID NO: 35);

RSDHLSQ(SEQ ID NO: 36);

QSGDLRR(SEQ ID NO: 37);

RSDNLVR(SEQ ID NO: 38); 和

RKDNLKN(SEQ ID NO: 33);

和/或

锌指核酸酶对(d):

具有以下锌指识别区氨基酸序列的左锌指核酸酶:

F1: DRSNLLS(SEQ ID NO: 39);

F2: NQSNLLR(SEQ ID NO: 40);

F3: FHSNLLA(SEQ ID NO: 18);

F4: QLSTLNY(SEQ ID NO: 41); 和

F5: QSGNLSR(SEQ ID NO: 42);

或

具有以下锌指识别区氨基酸序列的右锌指核酸酶:

FHSGLLA(SEQ ID NO: 20);

HPSTLSK(SEQ ID NO: 43);

ARWTLDC(SEQ ID NO: 44);

HPSTLSK(SEQ ID NO: 43);

HPSTLSK(SEQ ID NO: 43); 和

RKFTLTN(SEQ ID NO: 45)。

[权利要求 9]

一种产生FUT8缺陷型细胞系的方法,所述方法包括:

(a)通过根据权利要求7所述的方法使细胞中的FUT8基因失活; 和

(b)在适合产生FUT8缺陷型细胞系的条件下培养所述细胞;

具体地,所述细胞为哺乳动物细胞;更具体地,所述细胞为CHO细胞。

[权利要求 10]

一种在宿主细胞中产生目标重组蛋白的方法,所述方法包括:

(a)提供根据权利要求6所述的细胞,所述细胞为FUT8缺陷型细胞,

(b)将包含编码所述目标重组蛋白的核酸的表达载体引入所述细胞,由此产生所述目标重组蛋白;

具体地,所述细胞为哺乳动物细胞;更具体地,所述细胞为CHO细胞。

[权利要求 11]

一种在宿主细胞中产生目标重组蛋白的方法,所述方法包括:

(a)提供包含内源FUT8基因的细胞;

(b)通过根据权利要求7所述的方法使所述细胞中的内源FUT8基因失活；和

(c)将包含编码所述目标重组蛋白的核酸的表达载体引入所述细胞，由此产生所述目标重组蛋白；

更具体地，步骤(b)在步骤(c)之前、同时或之后进行。

[权利要求 12] 根据权利要求1所述的锌指蛋白、根据权利要求2所述的锌指核酸酶、根据权利要求3或4所述的多核苷酸或根据权利要求5所述的载体用于产生FUT8缺陷型细胞的用途。

[权利要求 13] 根据权利要求1所述的锌指蛋白、根据权利要求2所述的锌指核酸酶、根据权利要求3或4所述的多核苷酸、根据权利要求5所述的载体或根据权利要求6所述的细胞用于产生去岩藻糖基化的含Fc重组蛋白的用途。

[权利要求 14] 根据权利要求1所述的锌指蛋白、根据权利要求2所述的锌指核酸酶、根据权利要求3或4所述的多核苷酸、根据权利要求5所述的载体或根据权利要求6所述的细胞用于产生能引发增强ADCC效应的抗体(如单克隆抗体)的用途。

[权利要求 15] 一种FUT8缺陷型细胞系，其根据权利要求9所述的方法制备。

[权利要求 16] 一种FUT8缺陷型细胞系，其在FUT8基因座处包含如SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58和SEQ ID NO: 59中一或多者所示的核苷酸序列。

[权利要求 17] 一种FUT8缺陷型细胞系，其包含经改造的FUT8基因座，所述经改造的FUT8基因座能通过以下引物对被检测：

引物对(i)：

正向引物：AGCCTGAAGTACATAGCCGA(SEQ ID NO: 46)；和

反向引物：TGCCACTGCTTCTATATACTGATTC(SEQ ID NO: 47)；

和/或

引物对(ii):

正向引物: GACGCACTGACAAAGTGGGA(SEQ ID NO: 48); 和

反向引物: GGTCTGTTCCATCCCCAGAATG(SEQ ID NO: 4

9);

和/或

引物对(iii):

正向引物: CTGTTGATTCCAGGTTCCCA(SEQ ID NO: 50); 和

反向引物: TGTTACTTAAGCCCCAGGC(SEQ ID NO: 51)。

[权利要求 18]

一种培育FUT8缺陷型细胞系的方法, 其包括:

(a)提供根据权利要求15-17中任一项所述的FUT8缺陷型细胞系;

和

(b)培养或扩增所述细胞系的细胞。