

CHO细胞重组抗体表达载体的构建策略及进展

李艳梅^{1,2} 田政伟^{1,2} 徐丹华^{1,2} 王稳^{1,2} 王小引^{1,2} 张贵虎³ 王天云^{1,2*}

(¹新乡医学院生物化学与分子生物学教研室, 新乡 453003; ²河南省重组药物蛋白表达系统国际联合实验室, 新乡 453003; ³平顶山市电业局职工医院, 平顶山 467000)

摘要 近年来, 重组蛋白被用来治疗多种不同的疾病, 其中重组单克隆抗体是增长最快速的一类生物治疗性重组蛋白。中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞是目前最常用的重组抗体生产的宿主细胞。表达载体是重组抗体表达的重要部分, 直接影响抗体表达的水平和质量。目前, CHO细胞重组抗体表达载体的构建策略主要有单顺反子表达载体、多启动子表达载体、IRES连接载体、Furin-2A连接载体、抗体融合蛋白等。其中, Furin-2A连接载体由于具有多种优点而逐渐成为表达重组抗体的一种重要策略, 尤其是其具有较高的自剪切效率, 连接的两个基因表达较为平衡、基因序列短小等优点。该文概括了目前构建CHO细胞重组抗体表达载体的策略、优缺点及其进展。

关键词 重组蛋白; CHO细胞; 单克隆抗体; IRES; Furin-2A

The Construction Strategy and Progress of the Recombinant Antibody Expression Vector in CHO Cells

Li Yanmei^{1,2}, Tian Zhengwei^{1,2}, Xu Danhua^{1,2}, Wang Wen^{1,2}, Wang Xiaoyin^{1,2}, Zhang Guihu³, Wang Tianyun^{1,2*}

(¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;

²International Joint Research Laboratory for Recombinant Pharmaceutical Protein Expression System of Henan, Xinxiang 453003, China; ³Electric Power Bureau Staff Hospital of Pingdingshan, Pingdingshan 467000, China)

Abstract In recent years, recombinant proteins are used in the treatment of different diseases. Among of them, monoclonal antibodies (mAbs) are currently the fastest growing class of biotherapeutic recombinant proteins. Chinese hamster ovary (CHO) cell is the most commonly host cells for the production of recombinant antibodies. Expression vector is an important part of recombinant antibody expression, which influences the expression level and quality of recombinant antibody. At present, the construction strategies of recombinant monoclonal antibodies expression vectors are mainly multiple-promoter expression vector, IRES-mediated vector, Furin-2A-mediated vector and antibody fusion protein in CHO cells. Among of them, Furin-2A-mediated vector present an effective approach to construct the recombinant protein expression vector with a variety of advantages, especially of its high “self-cleavage” efficiency, good balance of two genes expression and its short gene sequences. In this study, the strategies of constructing recombinant monoclonal antibodies expression vector in CHO cells and its potential advantages, disadvantages and progress are reviewed.

Keywords recombinant proteins; CHO cells; monoclonal antibodies; IRES; Furin-2A

收稿日期: 2018-05-21 接受日期: 2018-08-15

国家自然科学基金(批准号: 81673337)和河南省高校科技创新团队(批准号: 18IRTSTHN027)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0373-3029488, E-mail: wtianyun@126.com

Received: May 21, 2018 Accepted: August 15, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81673337) and the Program for Innovative Research Team (in Science and Technology) in University of Henan Province (Grant No.18IRTSTHN027)

*Corresponding author. Tel: +86-373-3029488, E-mail: wtianyun@126.com

网络出版时间: 2018-10-26 10:24:08

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181026.1023.004.html>

随着基因工程的不断发展,对重组性治疗蛋白的需求大幅度增长^[1-2]。治疗性单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)作为一种重要的重组蛋白具有特异性和免疫原性小等特点,近年来发展迅速,已成为肿瘤、免疫系统疾病等多种疾病的前沿治疗药物^[3-4]。到目前为止,已有69种治疗性抗体及11个Fc抗体融合蛋白获得批准,还有几百种仍在进行临床实验^[5]。

重组抗体又叫基因工程抗体,是利用DNA和蛋白质工程技术,在基因水平上对免疫球蛋白分子进行适当加工改造,重新装配导入受体细胞后表达出来的抗体分子。抗体类药物经历了鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人源化抗体的发展历程。近年来,随着分子生物学技术的不断发展,市场上出现了各类新型抗体药物,包括新结构抗体偶联药物、新结构人源化单克隆抗体、抗体融合蛋白等。其中,抗体融合蛋白是在基因水平上将目的基因同免疫球蛋白部分片段基因通过连接子(linker)基因相连,并在真核或原核表达系统中表达的重组蛋白。根据结合的Ig片段不同,可以将融合蛋白分为Fab融合蛋白、Fc融合蛋白、单链抗体(scFv)融合蛋白。目前已上市的13个融合蛋白药物中,有11种均为抗体Fc融合蛋白药物(表1)。单克隆抗体是一类四聚体糖蛋白。具有生物活性的抗体分子的轻、重链需要经过折叠、组装和适当的糖基化修饰^[6]。已上市抗体的临床研究显示,宿主细胞是影响抗体药物的免疫原性和临床疗效的重要因素^[7]。然而,常用的异源蛋白表达系统中,大肠杆菌表达系统的表达产物翻译后修饰简单,只适合表达抗体片段或单链抗体,不适合表达翻译后修饰对其有影响的全抗体分子^[8-9]。由于昆虫细胞、酵母细胞和转基因植物等不具有翻译后修饰能力,导致其所表达的重组抗体和人天然抗体的质量差异显著^[10]。重组抗体的表达只有哺乳动物细胞比较适合。因此,目前已经上市的治疗性抗体中,除了一部分抗体片段外,大部分是由哺乳动物细胞生产的^[11-13]。与其他系统相比,哺乳动物细胞表达系统产生的重组抗体与天然抗体的分子结构、糖基化的类型和方式极为相似,并且哺乳动物细胞能够以悬浮培养或者在无血清的培养基中进行大规模培养^[14]。中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞表达系统是目前重组抗体生产的首选系统,重组抗体表达载体是CHO细胞表达外源蛋白的关键因

素^[15]。本文对一些目前在CHO表达系统中常用的构建重组抗体表达载体策略的特点及优缺点进行了综述(表2),并对重组抗体表达载体在重组抗体的表达研究进行了展望。

1 CHO表达系统

治疗性重组抗体由于需要糖基化等翻译后修饰才能够具备活性,因此,绝大部分治疗性重组抗体是在哺乳动物细胞中生产的。其中CHO细胞是最常用的表达系统^[16]。当前,经欧洲药品管理局(EMA)或美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市的抗体药物超过70种,其中51种是由CHO细胞产生的^[17-18](表1)。与其他表达系统相比,CHO表达系统占有很大优势:(1)更适用于悬浮培养,可以满足大规模工业生产重组蛋白的要求^[19];(2)产生的抗体分子在结构、功能方面和天然抗体分子较接近;⁽³⁾所含人类病毒极少^[20];(4)外源基因可以在CHO细胞中稳定地整合;⁽⁵⁾CHO细胞是成纤维细胞,几乎不分泌内源性蛋白,因此对目标重组抗体的分离纯化工作十分有利^[11]。治疗性重组抗体在CHO细胞表达时,需要将重链、轻链两种基因同时转染,如何成功筛选单克隆抗体细胞株,以及两种基因表达效率是否一致,这些问题都给抗体药物研发带来了一定的挑战。因此,重组抗体表达载体的构建尤为重要。

2 重组抗体表达载体构建策略

2.1 单顺反子载体

目前较为普遍应用的一种表达重组抗体的方法,是使用两种载体分别携带重链和轻链编码序列共同转染靶细胞,载体整合到宿主细胞进行重组抗体表达(图1A)。由于重链和轻链分别在各自的启动子和开放读码框转录出重链或者轻链抗体,所以具有重链和轻链的表达量可控的优势,缺点是工作量较大,筛选出目的蛋白的概率较低^[21-22]。此外,在实践中会遇到一些问题^[23-24]:(1)采用两种独立载体转染细胞时需要提取两种质粒,增加了质粒提取的工作量;(2)需要选择两种筛选标记,给目的基因的筛选带来一定的难度;(3)需要精确调整两种载体转染量;(4)两种目标载体的共转染效率和目的基因的共表达效率存在一定的差异;(5)不同筛选标记基因与目的基因的共整合效率影响目的基因的表达。这些问题会给抗体药物的研发和生产带来时间和成本上

表1 美国食品药品监督管理局和欧洲药品管理局批准的CHO细胞中产生的重组抗体^a
Table 1 Recombinant antibody produced in CHO cell approved in the US Food and Drug Administration and European Medicines Agency^a

重组抗体 Recombinant antibody	FDA第一次批准年份 Year of first FDA approval	EMA第一次批准年份 Year of first EMA approval	适应症 Therapeutic indication
Bezlotoxumab	2016	2017	预防艰难梭菌感染复发
Benralizumab	2017	Not approval	严重的嗜酸性哮喘
Avelumab	2017	Not approval	默克细胞癌
Dupilumab	2017	Not approval	湿疹依赖性哮喘、特应性皮炎
Durvalumab	2017	Not approval	转移性移行细胞癌
Ocrelizumab	2017	Not approval	多发性硬化症
Brodalumab	2017	Not approval	银屑病
Olaratumab	2016	2016	肉瘤
Daratumumab	2015	2016	多发性骨髓瘤
Ixekizumab	2016	2016	斑块性银屑病
Atezolizumab	2016	Not approval	尿路上皮癌
Secukinumab	2015	2015	严重斑块性银屑病
Mepolizumab	2015	2015	哮喘
Nivolumab	2015	2015	黑色素瘤
Alirocumab	2015	2015	高胆固醇血症
Idarucizumab	2015	2015	血栓与止血
Evolocumab	2015	2015	血脂异常、高胆固醇血症
Pembrolizumab	2014	2015	黑色素瘤
Vedolizumab	2014	2014	溃疡性结肠炎
Siltuximab	2014	2014	中心型巨大淋巴结增生症
Alemtuzumab	2013	2014	多发性硬化症
Trastuzumab emtansine	2013	2013	乳腺癌
Pertuzumab	2012	2013	乳腺癌
Obinutuzumab	2013	Not approval	白血病
Brentuximab	2011	2012	淋巴瘤
Ipilimumab	2011	2011	黑色素瘤
Denosumab	2011	2011	骨质疏松
Tocilizumab	2009	2010	类风湿性关节炎
Panitumumab	2006	2007	转移性结直肠癌
Catumaxomab	2009	2009	恶性腹水
Bevacizumab	2004	2005	结直肠癌
Omalizumab	2003	2005	过敏性鼻炎
Efalizumab	2003	2004	银屑病
Ibritumomab tiuxetan	2002	2004	淋巴瘤
Adalimumab	2002	2003	类风湿性关节炎
Alemtuzumab	2001	2001	淋巴瘤
Trastuzumab	1998	2000	乳腺癌、胃癌
Rituximab	1997	1998	非霍奇金淋巴瘤
Basiliximab (fusion protein)	1998	1998	肾脏移植
Alefacept (fusion protein)	2003	2009	银屑病
Abatacept (fusion protein)	2005	2016	类风湿性关节炎
Aflibercept (fusion protein)	2011	2012	黄斑性变
Belatacept (fusion protein)	2011	Not approval	移植排斥
Etanercept (fusion protein)	1998	2000	风湿性关节炎
Romiplostin (fusion protein)	2008	Not approval	血小板减少症
Dulaglutide (fusion protein)	2014	2015	2型糖尿病
Albiglutide (fusion protein)	2014	2014	2型糖尿病
Eloctate (fusion protein)	2014	Not approval	血友病A
Alprolix (fusion protein)	2014	2017	血友病B
Rilonacept (fusion protein)	2008	2009	自身免疫性疾病
Ziv-Aflibercept (fusion protein)	2012	2012	结直肠癌

FDA: 美国食品药品监督管理局; EMA: 欧洲药品管理局; Not approval: 未批准。*表示公共资源获得数据(2017); 可能的批准的产品未全部列出。

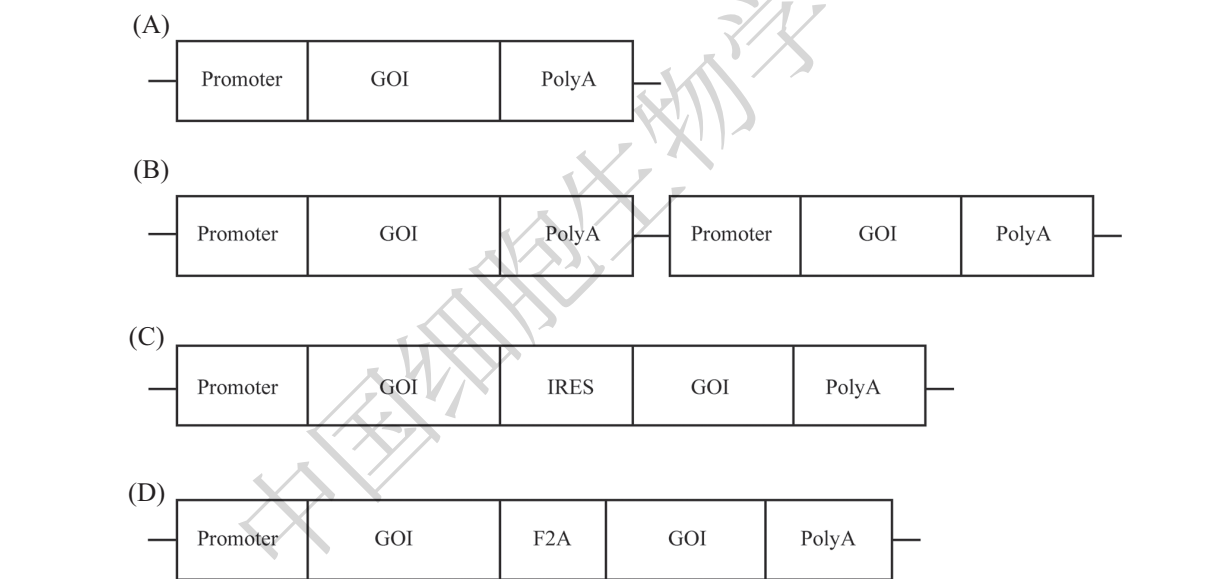
FDA: US Food and Drug Administration; EMA: European Medicines Agency; *data acquired from publically available resources (2017); all approved products may not be included.

表2 在CHO细胞中重组抗体表达载体的优缺点

Table 2 Advantages and disadvantages of vectors for recombinant antibody expression vector in CHO cells

载体 Vector	启动子 Promoter	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 References
Monocistronic vector	CMV SV40	HC and LC are proportionally coordinated	Big workload; low target protein screening	[21-24]
Multi-promoter vector	CMV SV40 EF-1α	Higher antibody titers; improve the expression efficiency of exogenous genes	Imbalance of gene expression level; interference or inhibition between promoters	[5,25-26,28]
Tricistronic vector				
IRES-mediated vector	CMV SV40 CHEF	Avoid protein inactivation and misla-beling; express relatively complete recombinant proteins	The downstream translation efficiency is low	[29,31-34,36-37]
Furin-2A-mediated vector	CMV SV40 CHEF	Short gene sequences; self-cleaving efficiency; balanced expression of the two linked genes	Unsheared precursors; 2C residual protein	[38,41]

CMV: 巨细胞早期病毒; SV40: 猿猴病毒40; CHEF: 中国仓鼠延长因子; EF-1α: 延长因子-1α; HC: 重链; LC: 轻链。
CMV: cytomegalovirus major immediate-early; SV40: 40 Simian virus; CHEF: Chinese hamster elongation factor; EF-1α: elongation factor-1α; HC: heavy chain; LC: light chain.



A: 单顺反子表达载体; B: 多启动子表达载体; C: IRES介导表达载体; D: Furin-2A介导表达载体。GOI: 目的基因; PolyA: 多聚腺苷酸信号肽; IRES: 内部核糖体进入位点; F2A: Furin-2A.

A: monocistronic vector; B: multi-promoter expression vector; C: IRES-mediated vector; D: Furin-2A-mediated vector. GOI: gene of interest; PolyA: polyadenylation signal; IRES: internal ribosomal entry; F2A: Furin-2A.

图1 单克隆抗体表达载体的示意图

Fig.1 Schematic representation of the monoclonal antibody expression vectors

的挑战。因此, 需要构建多顺反子载体实现单一载体上重组抗体的重连和轻链基因和筛选标记基因共同表达。

2.2 多启动子表达载体

多启动子表达载体是基因工程中重组抗体表达载体的一种, 多启动子表达载体是单一载体内含多个独立转录单元, 各自含启动子和开放读码框, 转

录出多种不同的mRNA并翻译出不同的蛋白。目前, CHO细胞表达载体中的启动子主要来自SV40、LTR(long terminal repeat)、EF-1α(eukaryotic translation elongation factor-1α)和CMV(cytomegalovirus)。研究发现, EF-1α是最强的启动子之一[25]。采用多启动子表达载体启动单克隆抗体表达, 其表达盒含有各自的独立启动子, 能转录出两种不同的mRNA并

翻译出重链和轻链抗体(图1B)。这种方法操作简单、可靠,独立的启动子易于调节表达产物抗体的活性和特异性,并且可以提高重组抗体的表达效率。在一定程度上优越于两个独立载体分别携带重链和轻链基因同时转染靶细胞^[5,26]。Bayat等^[5]采用CMV启动子构建了双启动子重组抗体表达载体、单顺反子表达载体及双顺反子表达载体,瞬转结果及稳定结果都显示,双启动子表达载体抗体滴度最高。

研究发现,启动子和核基质结合区组合可以提高重组蛋白的表达,阻止启动子的甲基化并增加表达的稳定性^[27]。但是由于多启动子表达载体中各个基因分别含有各自的转录子,这就有可能造成基因表达水平不平衡^[28],即导致抗体表达的重链和轻链的比例不平衡,启动子间也有可能发生干扰、抑制或者基因的重排现象。大多数情况下,载体的容量有限,导致难以容纳两个以上的转录单元,这也在一定程度上限制了这种方法的应用。

2.3 三顺反子表达载体

三顺反子载体允许LC(light chain)、HC(heavy chain)和选择标记基因表达在同一个信使RNA中,即三个基因同时表达,并尽量减少传统载体带来的相关问题。此外,三顺反子表达载体可以使LC和HC的生产有类似的水平,产生较高的mAb表达水平,较少的聚合物和一致的糖基化。此外,可以利用内部核糖体进入位点(IRES)和Furin-2A肽联合构建三顺反子表达载体。

2.3.1 IRES连接载体 内部核糖体进入位点(internal ribozyme entry site, IRES)是位于一些病毒基因组内部的一段含有几百个碱基对非编码序列,通常位于RNA病毒的5'UTR中,它介导5'帽非依赖性的翻译起始,允许多种基因在同一条mRNA上表达^[29]。在翻译过程中,IRES可以与核糖体结合,起始IRES下游基因的表达^[30]。采用IRES连接重组抗体的重链和轻链时,IRES和重链、轻链在上游启动子的控制下转录成为同一条mRNA,并且在翻译时,位于IRES上游基因遵循真核生物基因的帽依赖性方式进行翻译起始,而其余基因通过帽独立机制进行起始翻译,实现了IRES序列连接的重链和轻链在同一个转录单位表达^[29,31-32]。两个基因位于IRES元件的前后位置,能够表达较为完整的重组蛋白(图1C)。

利用IRES元件可以克服内部启动子间的抑制现象,更有利于IRES上下游目的基因的有效表达,

是近年来构建重组抗体表达载体的重要方法。传统的构建载体中目的基因和筛选基因存在不同的表达盒,一般通过在抗药基因上施加压力进行筛选阳性克隆,所以筛选出的阳性克隆的表达一般不高。然而,采用IRES元件连接两目的基因的载体,筛选出的阳性克隆大多数均可表达目的基因^[33]。IRES介导的三顺反子表达单克隆抗体时,IRES连接重链、轻链和抗性基因在同一个载体上进行表达,增加阳性克隆的产生,提高单克隆抗体的产量,并且使重链和轻链的比例控制在相似水平上^[34]。采用IRES构建抗人肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体的三顺反子表达质粒并在CHO细胞中进行表达,结果显示,抗体表达量有明显的提高^[35]。

然而,研究显示,由IRES元件介导三顺反子表达载体中,IRES上下游的目的基因表达量存在一定差异,帽依赖性基因的表达量高于帽独立性基因^[36]。虽然转录时mRNA是等量的,但翻译存在差异,所以构建重组抗体表达载体时需要考虑目的基因的位置^[37]。

2.3.2 Furin-2A连接载体 2A肽是首先在小核糖核酸病毒中发现的一种具有“自剪切”功能的肽链。除了首次在口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)中发现的2A肽外,其又在多种病毒中发现,如马鼻炎A病毒(equine rhinitis A virus, ERAV)、猪特罗病毒(porcine teschovirus)和点褐翅蛾病毒(Thossea asigna virus)等病毒。FMDV2A是其中的典型代表,具有多种优点而逐渐成为表达重组抗体的一种重要策略,尤其是其较高的自剪切效率、连接的两个基因表达较为平衡并且具有短小的基因序列^[38]。

相关研究表明,在2A肽上游加上一段Furin蛋白序列可以去除裂解后多余的氨基酸^[39-40](图1D)。2A肽比IRES小很多,大约20个氨基酸,“自剪切”发生在最后两个氨基酸甘氨酸(G)和脯氨酸(P)之间,在2A肽的C-端,产生等量的共表达重组抗体^[41]。已有实验研究显示,当在CHO细胞中表达单克隆抗体时,分别用IRES介导和Furin-2A介导的三顺反子载体表达重组抗体时,采用Furin-2A元件时产生的单克隆表达量明显高于采用IRES元件,并且重组抗体表达量受到重链和轻链的顺反子位置的影响^[29]。当轻链置于2A上游、重链置于2A下游时(LC-F2A-HC),单克隆抗体表达量是IRES介导的LC-IRES-HC的三倍^[29]。即Furin-2A介导的表达载体重组抗体表达量高于

IRES介导的表达载体, 并且当轻链表达量高于重链时, 更有利于重组抗体的表达。相关研究已证实, 将2A序列与IRES一起用于构建多顺反子载体, 可提高基因治疗的效率^[34]。

然而, 运用Furin-2A在体外构建三顺反子表达载体时, 常常出现不完全剪切现象, 剪切效率在85%~95%之间。同时, 上游抗体C-端2A残基的残留可能影响蛋白的功能和定位。这些都是需要进一步解决的问题。

3 展望

目前, 单顺反子表达载体、多启动子表达载体、多顺反子表达载体、抗体融合蛋白等策略在重组抗体表达中已经得到了应用。其中, 2A序列在构建重组抗体表达载体中具有序列短小、操作简单、上下游基因表达平衡性好等优点。但是, 2A自剪切的确切机制还不清楚, 存在未剪切的多聚蛋白前体, 同时, 上游蛋白C-端2A残基的残留可能影响重组抗体的功能, 这些都需要进一步研究和解决。我们提出, 在今后的研究中需要通过使用顺式作用元件来进一步提高重组mAb的生产力。此外, 增强Furin-2A介导的载体的自我裂解能力也有利于确保HC和LC蛋白的正确和等量表达。

参考文献 (References)

- Ho RJ, Chien J. Trends in translational medicine and drug targeting and delivery: new insights on an old concept-targeted drug delivery with antibody-drug conjugates for cancers. *J Pharm Sci* 2014; 103(1): 71-7.
- Durocher Y, Butler M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(6): 700-7.
- Sun H, Chen Q, Lai H. Development of Antibody Therapeutics against Flaviviruses. *Int J Mol Sci* 2017; 19(1): 54.
- Singh S, Kumar N, Dwiwedi P, Charan J, Kaur R, Sidhu P, *et al.* Monoclonal antibodies: a review. *Curr Clin Pharmacol* 2017; 12: 1-15.
- Bayat H, Hossienzadeh S, Pourmaleki E, Ahani R, Rahimpour A. Evaluation of different vector design strategies for the expression of recombinant monoclonal antibody in CHO cells. *Prep Biochem Biotechnol* 2018; 48(2): 160-4.
- Mikhail Belov A, Zang L, Sebastiano R, Santos MR, Bush DR, Karger BL, *et al.* Complementary middle-down and intact monoclonal antibody proteoform characterization by capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2018; doi: 10.1002/elps.201800067.
- Mohan C, Kim YG, Koo J, Lee GM. Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells. *Biotechnol J* 2008; 3(5): 624-30.
- Li CH, Narhi LO, Wen J, Dimitrova M, Wen ZQ, Li J, *et al.* The Effect of pH, temperature and salt on the stability of *E.coli*-and CHO-derived IgG1 Fc. *Biochemistry* 2012; 51(50): 10056-65.
- Robinson MP, Ke N, Lobstein J, Peterson C, Szkodny A, Mansell TJ, *et al.* Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria. *Nat Commun* 2015; 6: 8072.
- Dalton AC, Barton WA. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Sci* 2014; 23(5): 517-25.
- 孙秋丽, 王天云. 重组中国仓鼠卵巢细胞表达系统高效表达载体研究进展. *新乡医学院学报* (Sun Qiuli, Wang Tianyun. Latest developments in highly efficient expression vectors in CHO cells. *Journal of Xinxiang Medical University*) 2016; 33(3): 161-3,8.
- Mullard A. 2012 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12(2): 87-90.
- Mullard A. 2011 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11(2): 91-4.
- Li F, Natarajan V, Shen A, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs* 2010; 2(5): 466-79.
- You M, Yang Y, Zhong C, Chen FT, Wang X, Jia TR, *et al.* Efficient mAb production in CHO cells with optimized signal peptide, codon, and UTR. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018; doi: 10.1007/s00253-018-8986-5.
- Jayapal KR, Wlaschin KF, Hu WS, Yap MG. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem Eng Prog* 2007; 103(10): 40-7.
- Wells E. Cellular engineering for therapeutic protein production: product quality, host modification, and process improvement. *Biotechnol J* 2017; doi:10.1002/biot.201600105.
- Dumont J, Euwart D, Mei B, Estes R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* 2016; 36(6): 1110-22.
- Lai T, Yang Y, Ng SK. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals (Basel)* 2013; 6(5): 579-603.
- Boeger H, Bushnell DA, Davis R, Griesenbeck J, Lorch Y, Trattan JS, *et al.* Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Lett* 2005; 579(4): 899-903.
- Wum FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22(11): 1393-8.
- Pei ZF, Chu L, Zou WG, Qiu S, Qi R, Gu J, *et al.* An oncolytic adenoviral vector of smac increase antitumor activity of against HCC in human cells and in mice. *Hepatology* 2004; 39(5): 1371-81.
- Allera-Moreau C, Chomarat P, Audinot V, Cogé F, Gillard M, Martineau Y, *et al.* The use of IRES-based bicistronic vectors allows the stable expression of recombinant G-protein coupled receptors such as NPY5 and histamine 4. *Biochimie* 2006; 88(6): 737-46.
- Davies SL, O'Callaghan PM, McLeod J, Pybus LP, Sung YH, Rance J, *et al.* Impact of gene vector design on the control of recombinant monoclonal antibody production by chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog* 2011; 27(6): 1689-99.
- Wang W, Jia YL, Li YC, Jing CQ, Guo X, Shang XF, *et al.* Impact of different promoters, promoter mutation, and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells. *Sci Rep* 2017; 7(1): 10416.
- Kim KJ, Kim HE, Lee KH, Han W, Yi MJ, Jeong J, *et al.* Two-promoter vector is highly efficient for overproduction of protein

- complexes. *Protein Sci* 2004; 13(6): 1698-703.
- 27 李琴, 赵春澎, 王小引, 孙秋丽, 王天云. 重组CHO细胞中不同启动子对含MAR表达载体转基因表达的影响. 重庆医学(Li Qin, Zhao Chunpeng, Wang Xiaoyin, Sun Qiuli, Wang Tianyun. Influence of different promoters on expression of transgene containing MAR expression vector in recombinant CHO cells. *Chong Qing Yixue*) 2017; 46(17): 2386-8.
 - 28 Semple-Rowland SL, Coggin WE, Geesey M, Eccles KS, Abraham L, Pachigar K, *et al.* Expression characteristics of dual-promoter lentiviral vectors targeting retinal photoreceptors and Müller cells. *Mol Vis* 2010; 16: 916-34.
 - 29 Ho SC, Bardor M, Li B, Lee JJ, Song Z, Tong YW, *et al.* Comparison of internal ribosome entry site (IRES) and Furin-2A (F2A) for monoclonal antibody expression level and quality in CHO cells. *PLoS One* 2013; 8(5): e63247.
 - 30 Chng J, Wang T, Nian R, Lau A, Hoi KM, Ho SC, *et al.* Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells. *MAbs* 2015; 7(2): 403-12.
 - 31 Shatsky IN, Dmitriev SE, Terenin IM, Andreev DE. Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs. *Mol Cells* 2010; 30(4): 285-93.
 - 32 Yamamoto H, Unbehaun A, Spahn CMT. Ribosomal Chamber Music: toward an understanding of IRES Mechanisms. *Trends Biochem Sci* 2017; 42(8): 655-68.
 - 33 曹慧青, 丁金凤. 多基因共表达载体的构建策略. 国外医学(分子生物学分册)(Cao Huiqing, Ding Jinfeng. Strategies in construction of multi-gene co-expression vector. *Foreign Medical*) 2002; 24(1): 1-4.
 - 34 Ho SC, Bardor M, Feng H, Mariati, Tong YW, Song Z, *et al.* IRES-mediated tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines. *J Biotechnol* 2012; 157(1): 130-9.
 - 35 李计来, 崔文禹, 王欣怡, 刘敬, 郝少杰, 徐静. 内部核糖体结合位点介导的三顺反子抗人肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体表达质粒的构建及在CHO细胞中的表达. 中国生物制品学杂志(Li Jilai, Cui Wenyu, Wang Xinyi, Liu Jing, Hao Shaojie, Xu Jing. Construction of internal ribosome entry site-mediated tricistronic vector for expression of monoclonal antibody against human tumor necrosis factor- α in CHO cells. *Chin J Biologicals*) 2017; 30(12): 1252-7.
 - 36 Hennecke M, Kwissa M, Metzger K, Oumard A, Kröger A, Schirmbeck R, *et al.* Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(16): 3327-34.
 - 37 Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* 2000; 1(4): 376-82.
 - 38 Yu W, Grubor-Bauk B, Gargett T, Garrod T, Gowans EJ. A novel challenge model to evaluate the efficacy of hepatitis C virus vaccines in mice. *Vaccine* 2014; 32(27): 3409-16.
 - 39 Fang J, Qian JJ, Yi S, Harding TC, Tu GH, VanRoey M, *et al.* Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat Biotechnol* 2005; 23(5): 584-90.
 - 40 Ebadat S, Ahmadi S, Ahmadi M, Nematpour F, Barkhordari F, Mahdian R, *et al.* Evaluating the efficiency of CHEF and CMV promoter with IRES and Furin/2A linker sequences for monoclonal antibody expression in CHO cells. *PLoS One* 2017; 12: e0185967.
 - 41 Mattion NM, Harnish EC, Crowley JC, Reilly PA. Foot-and-mouth disease virus 2A protease mediates cleavage in attenuated sabin 3 poliovirus vectors engineered for delivery of foreign antigens. *J Virol* 1996; 70(11): 8124-7.