

动物生物反应器的研究进展与展望

纪欣宇, 安梓康, 刘悦, 张然*, 赵要风*

中国农业大学生物学院, 北京 100193

* 联系人, E-mail: yaofengzhao@cau.edu.cn; zhangran0628@cau.edu.cn

2024-12-31 收稿, 2025-04-08 修回, 2025-05-26 接受, 2025-05-26 网络版发表

国家科技重大专项(2023ZD0404304, 2023ZD0407402)资助

摘要 动物生物反应器作为生物医药领域内实现特定蛋白质或细胞因子高效表达的重要技术平台, 凭借其低成本、高产量及精准的翻译后修饰等显著优势, 展现出广阔的商业应用前景。历经四十载的不懈探索, 中国农业大学生物学院在动物生物反应器, 尤其是乳腺生物反应器的研究与优化方面取得了一系列突破性进展, 成功获取多种高产量的药用重组蛋白与重组抗体。这些成果不仅推动了农业生物技术的创新发展, 同时也为人类重大疾病的研究与治疗开辟了全新途径。本综述系统总结了国内外动物生物反应器的研究进展与关键成果, 探讨基因编辑技术的迅猛发展对制备动物生物反应器产生的深远影响, 并展望其未来的研究方向与发展趋势, 旨在为该领域的深入研究提供全面且有价值的参考与借鉴, 推动动物生物反应器技术的持续创新与广泛应用。

关键词 动物生物反应器, 转基因动物, 乳腺生物反应器, 基因编辑技术

动物生物反应器作为极具创新性的前沿技术, 通过转基因动物体内特定器官或组织强大高效的外源蛋白表达能力, 实现活性功能蛋白的工业化生产。相较于传统的微生物及细胞生物反应器, 其展现出显著优势, 具体包括: (1) 能够以较低成本实现大规模活性蛋白的生产; (2) 表达产物经过充分修饰, 具备稳定的生物活性; (3) 产品质量上乘且易于提纯。这些特性极大地满足了生物技术、医学研究以及临床治疗等领域对于药用重组蛋白日益增长的迫切需求。自1982年具有划时代意义的“超级小鼠”问世以来, 动物生物反应器领域取得了令人瞩目的辉煌成就, 尤其是基因编辑技术的不断革新, 为动物生物反应器的制备提供了更为坚实有力的技术支撑, 进一步拓宽了其商业化应用的广阔前景。当前, 动物生物反应器类型丰富多样, 主要包括乳腺、血液、膀胱、家禽输卵管以及昆虫(例如家蚕)等。在众多类型中, 乳腺生物反应器以其高效且广泛的应用性脱颖而出。截至目前, 已有30余种药物重组蛋白通过乳腺生物反应器进入临床阶段, 部分产品成功上

市, 为众多患者带来了实质性的治疗帮助。

本文旨在全面综合回顾并深入分析国内外动物生物反应器领域, 特别是乳腺生物反应器方面的研究成果与进展, 深入探讨基因编辑技术的进步对动物生物反应器制备的推动作用, 并在此基础上, 对未来的发展方向以及可能面临的风险进行展望, 以期为该领域的后续研究与发展提供参考。

1 动物生物反应器研究进展

1.1 动物生物反应器类型

动物生物反应器技术的起源可追溯至20世纪80年代初期。Gordon等人^[1]通过显微注射技术将外源性胸苷激酶基因整合至小鼠基因组中, 标志着转基因小鼠模型的诞生。随后, Palmiter等人^[2]将大鼠生长激素基因导入小鼠受精卵, 培育出体重远超普通小鼠的“超级小鼠”, 并据此提出了从转基因动物体内提取生物活性蛋白的创新构想。历经四十余载的蓬勃发展, 科研人员

引用格式: 纪欣宇, 安梓康, 刘悦, 等. 动物生物反应器的研究进展与展望. 科学通报, 2025, 70: 4223–4231

Ji X, An Z, Liu Y, et al. Research progress and prospects of animal bioreactors (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 4223–4231, doi: [10.1360/TB-2024-1408](https://doi.org/10.1360/TB-2024-1408)

广泛利用多种转基因动物模型(涵盖小鼠、兔、鸡、牛、猪、山羊、绵羊及蚕等物种)生产一系列具有重要价值的重组蛋白,表1展示了动物生物反应器技术发展历程中的部分重大标志性事件.

1.2 乳腺生物反应器研究进展

乳腺生物反应器技术通过精确地将目的基因与乳腺特异性启动子融合,实现了外源蛋白在乳汁中的高效表达(图1). 这种创新策略不仅极大简化了蛋白的收集与纯化流程,还具有成本低、产量大、易纯化、环境友好以及对转基因动物自身损伤小等诸多优势,可将外源蛋白的表达量提升至g/L级别[8]. Echelard等人[9]构建的转基因奶牛可在牛奶中分泌出1~5 g/L的重组人白蛋白,进一步验证了该技术的巨大潜力.

1987年, Gordon等人[4]利用转基因小鼠模型成功表达了人组织型纤溶酶原激活剂,标志着乳腺生物反应器研究的正式启航. 随着研究持续深入,全球范围内相继成立了20余家大型生物公司,研发出多种重组蛋白的生产工艺,包括人抗凝血酶III、人抗胰蛋白酶、人蛋白C、人纤维蛋白原、抗体、人凝血因子VIII和IX、人血清白蛋白(human serum albumin, hSA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、人溶菌酶(human

表 1 动物生物反应器的研究进展

Table 1 Research progress on animal bioreactors

时间	重要事件
1982年	表达外源生长激素的转基因“超级小鼠”诞生 ^[2]
1985年	首例转基因家畜诞生 ^[3]
1987年	利用转基因小鼠乳腺表达人组织型纤溶酶原激活剂 ^[4]
1997年	我国首例转基因绵羊乳腺生物反应器诞生 ^[5]
2006年	全球首个商业化动物乳腺生物反应器产品上市 ^[6]
2015年	全球首个商业化鸡蛋生物反应器产品上市 ^[7]
2023年	我国首个获批进入临床试验期的乳腺生物反应器产品诞生

lysozyme, hLYZ)和人乳铁蛋白(human lactoferrin, hLF)等,为生物医药领域的发展注入了全新活力.

我国在乳腺生物反应器领域的研究起步于20世纪80年代,中国科学院上海细胞生物学研究所施履吉院士前瞻性地提出利用转基因动物乳腺生产重组蛋白的开创性设想,为我国乳腺生物反应器研究奠定了坚实的基础. 进入20世纪90年代,复旦大学遗传研究所与上海市儿童医院医学遗传研究所合作,成功构建了表达活性F-IX蛋白的转基因小鼠和转基因绵羊,标志着乳腺生物反应器研究正式迈入发展阶段.

中国农业大学生物学院在乳腺生物反应器的制备与优化方面成绩斐然(图2). 小鼠因饲养成本低(约为大

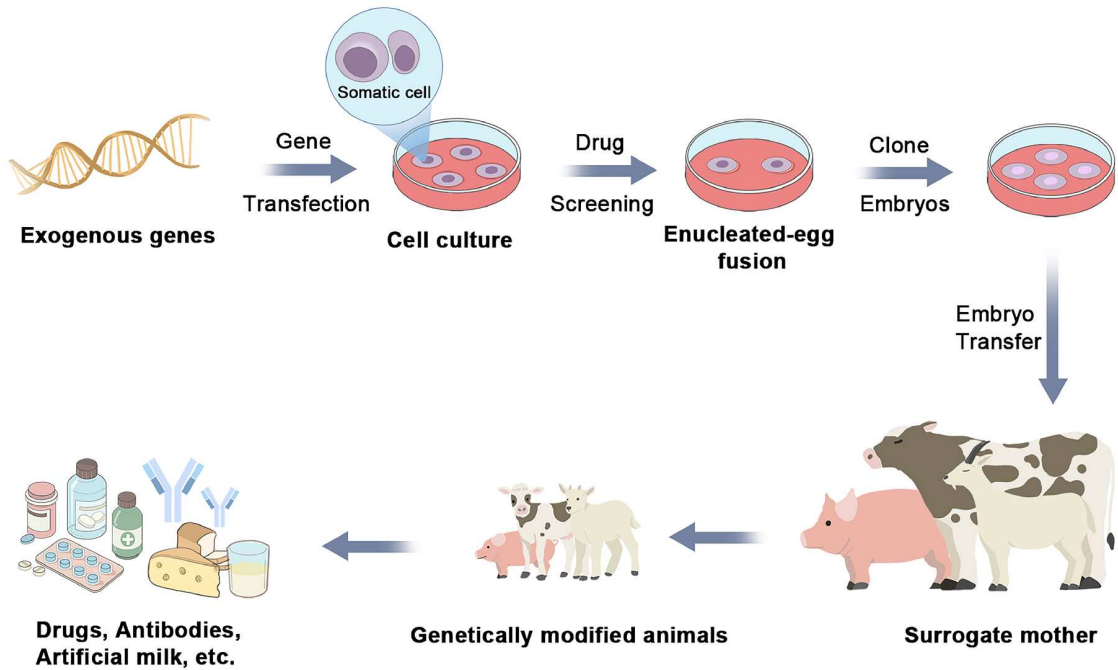


图 1 乳腺生物反应器制备流程

Figure 1 Preparation process of mammary gland bioreactors

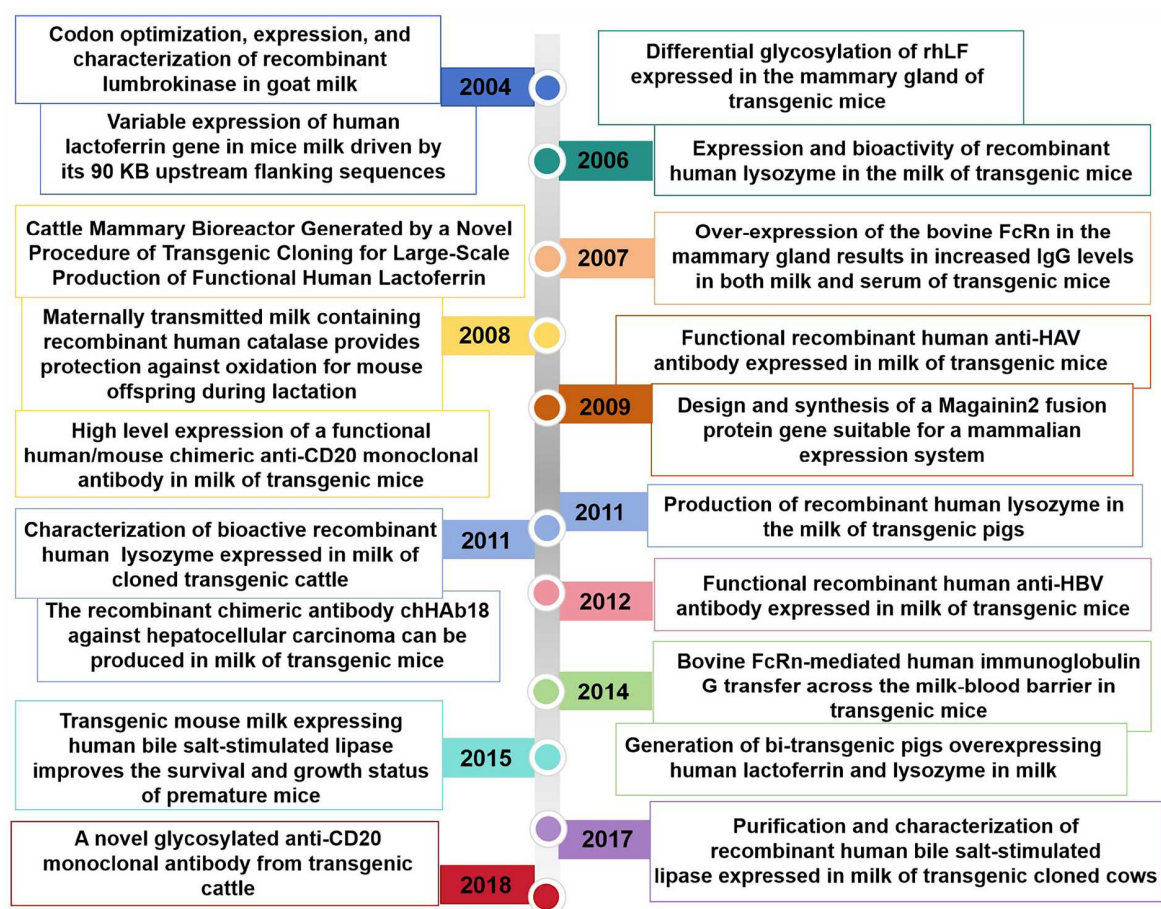


图2 中国农业大学生物学院在动物生物反应器领域的研究成果

Figure 2 Research achievements in animal bioreactor technology by the College of Biological Sciences, China Agricultural University

型哺乳动物的1/20)、妊娠周期短、遗传背景清晰等技术优势,成为乳腺特异性表达系统研发的重要实验动物模型。李宁团队通过改进乳腺特异性启动子调控元件和优化密码子策略,将hLYZ在转基因小鼠乳汁中的表达量提升至1.405 g/L,并证明其体外抑菌活性较人乳清中天然hLYZ提升3倍^[10]。该团队还实现了治疗性抗体CD20在小鼠乳腺生物反应器中的高效表达,为利用乳腺生物反应器制备单克隆抗体提供了可行方案^[11]。

大型哺乳动物(如猪、牛、羊等)产奶量高,约为兔类的20~400倍,使其成为大规模生产高需求药用重组蛋白的理想候选模型。2004年,李宁团队利用山羊乳腺系统成功表达了野生型和密码子优化后的重组蚓激酶^[12],首次鉴定出影响蚓激酶表达的关键元件,并显著提高其表达量,为抗血栓药物研发提供了新思路。在随后的十余年中,该团队先后制备了多种大动物乳腺生物反应器^[13~16],并创下转基因牛表达hLF含量的最高

纪录^[17]。这些研究聚焦于生产具有重要的药用价值和营养价值的蛋白,例如人胆盐激活酯酶不仅可以促进乳脂的消化、吸收和小胎龄早产儿的生长,还可用于脂肪吸收不良患者的治疗^[18,19]。hLYZ作为一种保护人类婴儿免受微生物感染的杀菌蛋白,在大动物母乳中表达可提高幼畜免疫力和存活率^[13]。2018年,该团队在前期成果基础上,在转基因牛乳汁中高表达重组CD20单克隆抗体^[20]。该重组抗体在重症联合免疫缺陷小鼠中展现出了优于市场药物Rituxan的B细胞淋巴瘤疗效,为利用转基因牛大规模制备治疗性抗体提供了有力证据,这些成果不仅深化了对转基因大动物乳腺生物反应器功能的理解,也为未来生物医药和营养品领域的发展开拓了新路径。

从转基因动物的乳汁中高效富集外源重组蛋白,并最终转化为具有实际应用价值的产品,需要经过一系列复杂、精细的分离纯化过程。一个例子是李宁团

队利用转基因奶牛制备重组hLF的流程^[21]。该团队首先通过转基因技术与体细胞克隆技术培育出高效表达重组hLF的转基因奶牛。经过一系列加工工艺,包括牛奶收集、预处理、层析分离、病毒灭活与去除、超滤浓缩与缓冲液置换、无菌过滤以及冷冻干燥等,获得纯度超过95%的重组hLF原料。最后与辅料混合制成口服胶囊制剂。由此可见,生产一项转基因产品需要同时考虑转基因技术的可操作性以及生产工艺的有效性与安全性。因此,从转基因动物的规模化培育到转基因产品的每一个环节都必须经过严格的质量控制(图3),以保证转基因动物群体的福利、饲养人员的安全以及转基因产品的安全性和卫生标准。

1.3 鸡蛋生物反应器研究进展

鸡蛋生物反应器利用鸡输卵管特异性表达系统,最终在蛋清^[22]或蛋黄^[23]中高效富集目标蛋白。与世代时间较长、每窝后代数量有限的大动物相比,该系统展现出周期短、产量高、成本低等优势。具体而言,一只母鸡年产蛋量可达330枚,且蛋清成分相对简单,有利于完成目的蛋白的纯化。对于可能损害哺乳动物健康的蛋白质或需要经过复杂修饰产生免疫原性的蛋白,鸡蛋生物反应器无疑是更优的选择。例如,人促红细胞生成素对转基因动物存在危害,无法通过兔子乳腺获得^[24],但在鸡蛋中表达则不会有类似影响。此外,蛋清中表达的人类单克隆抗体和治疗性蛋白能够实现正确

的翻译后修饰^[25,26],其无菌环境也为维持蛋白质的稳定性提供保障^[27]。这充分表明转基因鸡蛋在实现重组蛋白高产方面具有巨大潜力,有望在未来推动生物医药领域的快速发展。

中国农业大学生物学院在此方面的研究中同样取得显著成果。针对靶蛋白表达引发的宿主免疫排斥问题,李赞东团队系统评估了鸡胚胎不同发育阶段对异种抗原的免疫应答特征,首次阐明鸡胚胎的免疫耐受诱导关键窗口期,为突破瓶颈提供了创新性解决方案^[28,29]。其自主研发的鸡胚无壳孵化技术也为研究外源性因素(如药物、放射线等)对鸡胚胎发育的影响提供了有利条件,并为在早期胚胎中导入外源基因创造了技术平台。李宁团队则利用慢病毒载体系统,实现hLYZ^[30,31]和人中性粒细胞防御素4^[32]在转基因鸡卵清中的定向分泌。该系统具有基因遗传稳定性高、表达组织特异性强等技术优势,配合优化的三级层析纯化流程,为规模化生产高活性重组蛋白提供了关键技术储备。相关成果不仅证实了鸡蛋生物反应器在复杂糖基化蛋白制备中的可行性,更为新型抗菌肽工业化生产奠定了实验基础。

1.4 其他生物反应器研究进展

与之类似的表达系统还存在于动物的体液及部分昆虫中。Massoud等人^[33]曾在转基因兔的血清中成功获得高水平的人 α -抗胰蛋白酶。然而在大多数动物模型

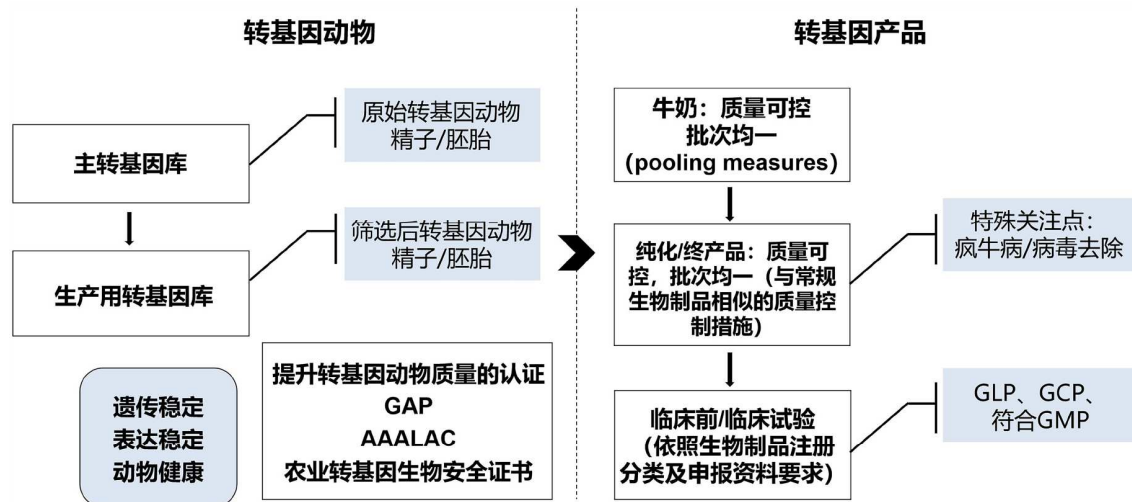


图3 重组蛋白的质量控制。AAALAC: 国际实验动物评估和认可委员会; GAP: 良好农业规范; GCP: 药物临床试验质量管理规范; GLP: 药物非临床研究质量管理规范; GMP: 药品生产质量管理规范

Figure 3 Quality control of recombinant proteins. AAALAC: Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care; GAP: good agriculture practices; GCP: good clinical practices; GLP: good laboratory practices; GMP: good manufacturing practices

中,血液生物反应器暴露出抗体浓度较低、存在内源蛋白抗体、目的蛋白纯化难度大等缺陷,重组蛋白或多肽进入转基因动物血液循环,也可能对动物健康造成损害。相较而言,利用尿液产生外源蛋白对动物的健康危害更小,并且动物产生尿液的时间早于分泌乳汁,重组蛋白通常在动物出生后数周即可被检测到,不仅显著缩短外源蛋白表达的检测周期,还提升转基因动物生物反应器的开发效率。目前,尿液已被应用于促性腺激素、生长激素等蛋白的制备^[34],但由于膀胱上皮细胞分泌蛋白质的速率较低,在一定程度上制约了其研究进展,致使其研究热度不及血液生物反应器^[35]。

一些昆虫的茧含有丰富的蛋白质,是作为生产外源蛋白的良好生物反应器。近年来的研究表明蚕生物反应器在规模化、经济化生产高质量重组HSA方面具有突出的技术优势。Tan等人^[36]在转基因蚕茧中获得的重组HSA,展现出有效的药物结合能力、出色的生物相容性和生物安全性。这些特性使其有望成为无血清细胞培养的潜在替代品^[37]。此外,有研究利用转基因蚕合成了高产率的甜菜素,其幼虫和蛹呈明显的红色,证明昆虫可以通过多种酶介导的合成途径合成天然植物色素等植物源化合物。

2 基因编辑技术在制备动物生物反应器中的应用

2.1 基因编辑技术概述

动物生物反应器技术的发展与基因编辑工具的迭代升级相关。基于同源重组的早期基因编辑技术通过引入同源DNA序列,依赖细胞固有的修复机制实现定向编辑,但因效率低下,限制了其广泛应用。锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子效应物核酸酶(transcriptional activator-like effect nucleases, TALENs)的相继问世,首次实现了哺乳动物基因组(特别是猪、牛等大动物)的精准编辑^[38,39]。然而ZFN技术的载体设计过程复杂,脱靶率高,细胞毒性强;TALEN技术虽在特异性和模块化设计方面有所改进,但成本高昂,阻碍重组蛋白的大规模生产。

2.2 基因编辑在动物生物反应器中的应用

规律成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)系统的飞速发展促进了动物生物反应器领域的研究,在

鸡蛋生物反应器取得的成果尤为显著。近年来,利用CRISPR/Cas9技术,研究人员已成功在卵清蛋白中获得高水平的人干扰素 β ^[40]、单克隆抗体^[41]、脂联素^[42,43]等重要治疗性蛋白和抗体。然而,受限于F0代鸡至G1代之间较长的世代间隔,通常需要约18个月的时间来评估重组蛋白的生产能力,阻碍了验证外源蛋白表达的进程。为解决这一难题, Kim等人^[44]利用CRISPR/Cas9技术制备了一种鸡卵清蛋白和绿色荧光蛋白共表达的转基因鸡,实现在早期阶段对外源蛋白的快速鉴定和分离。

类似的策略也被应用于动物乳腺生物反应器的制备中^[45,46]。利用天然乳蛋白的调控序列(如启动子、内含子及分泌信号肽)在乳腺组织中特异表达外源基因,能有效规避随机整合导致的位点效应和表观遗传干扰,有助于获得稳定高表达的目的蛋白。结合基因编辑技术,尤其是CRISPR/Cas9技术,是未来制备乳腺生物反应器的重要发展趋势。

3 动物生物反应器的主要产品和应用案例

3.1 生物医药领域的产品及应用

动物生物反应器作为转基因技术的重要应用方向,凭借其独特的生产优势,在生物医药领域展现出显著的商业化潜力与产业化价值。以美国GTC公司为代表的生物技术企业,凭借在转基因动物模型构建、基因表达调控及蛋白纯化工艺等核心技术领域的长期积累,已开发诸多重组蛋白药物。例如,基于转基因山羊表达系统的CD20单克隆抗体、CD137单克隆抗体及重组人 α -胎儿蛋白均已进入临床试验阶段,显示出在自身免疫性疾病治疗领域的广阔应用前景;荷兰PBV公司和英国PPL公司等研发的SOD、hBSSL、胶原蛋白、人抗胰蛋白酶、人蛋白C等一系列重组蛋白产品也为生物医药领域的发展注入了新的活力。表2总结了目前已获批上市的转基因动物制药产品。

我国在转基因动物源重组蛋白药物开发领域长期遵循审慎监管原则。随着《生物技术研究开发安全管理办法》《基因工程安全评价指南》等政策框架的修订和动态调整,特别是“十四五”生物经济发展规划对合成生物学技术的部署,监管体系已逐步构建起“风险分级-过程控制-全生命周期管理”的三维管控模式,以回应生物医药领域的市场需求。2023年12月,成都生物制品研究所自主研发的重组人C1酯酶抑制剂获得国家药品监督管理局临床试验许可,标志着我国首个具有

表 2 获批上市的动物生物反应器制药产品

Table 2 Approved pharmaceutical products

研发产品	动物模型	用途	研发公司	获批时间
Atryn (人抗凝血酶III)	山羊	预防和控制遗传性抗凝血酶缺乏患者在术中或分娩时可能出现的凝血	GTC	EMA: 2006年 FDA: 2009年
Ruconest (人C1酯酶抑制剂)	兔	治疗成人及青少年遗传性血管性水肿急性发作	Pharming	EMA: 2009年 FDA: 2014年
Kanuma (人溶酶体酸性脂肪酶)	鸡	治疗由该酶缺乏症引起的肝脏内脂肪异常积累	Alexion (AstraZeneca)	FDA: 2015年
Sevenfact (人凝血因子VIIa)	兔	治疗和控制存在八因子或九因子抑制物的成人和青少年A型或B型血友病患者的出血	LFB	FDA: 2020年

完全自主知识产权的动物乳腺生物反应器药物正式进入临床转化阶段。这表明我国在生物医药创新领域实现了重要突破,在技术上形成基于CRISPR/Cas9的精准基因打靶技术平台,在政策上构建涵盖生物安全评估、伦理审查与技术标准化的政策支持系统,并建立起符合ICH标准的转基因动物生物制品质量控制体系。

展望未来,在技术进步与政策优化的双重驱动下,乳腺生物反应器技术有望成为医药领域的关键技术平台,为人类健康事业提供更具创新性与可及性的解决方案。

3.2 农业与食品领域的产品及应用

乳腺生物反应器不仅在生物制药领域展现出巨大潜力,还极大地推动了乳制品行业的创新与发展。例如通过基因编辑技术靶向敲除乳糖合成关键基因 α -乳白蛋白^[47],在乳腺中异源表达乳糖酶以及敲除 β -乳球蛋白等过敏原^[48],实现对特殊人群的精准营养设计,为乳糖不耐受人群、糖代谢异常患者及过敏体质消费者提供功能性乳制品解决方案,显著拓展了传统奶业的市场边界。

据中国农业科学院农业信息研究所与国家工程科技知识中心2022年联合发布的《全球合成生物学战略布局与产业发展研究》显示,人造奶作为合成生物学与食品工业融合的标志性产物,正以年均17.3%的复合增长率形成千亿级市场规模。在该领域的全球专利布局中,中国以57项核心专利位居世界第三(占比13.2%),仅次于瑞典(89项)和美国(63项),彰显了我国在合成乳品技术创新活力。专利数量排名第一的瑞典SYMBICOM公司凭借在乳腺生物反应器中表达重组A2- β 酪蛋白和 κ -酪蛋白等关键乳蛋白的专利集群(占全球专利池21%),确立了其在功能性乳品开发领域的技术主导地位,进一步验证了乳腺生物反应器在食品营养强化与药物递送系统开发中的跨领域应用价值。

4 总结与展望

4.1 风险与挑战

尽管动物生物反应器技术在重组蛋白生产领域展现出独特优势,并已实现多项突破性进展,但其产业化进程仍面临多维度的瓶颈与系统性风险。

在技术层面,随着CRISPR/Cas9技术的广泛应用,外源基因整合效率已显著提升,但动物源性糖基化修饰引发的免疫原性问题仍制约其发展。此外,大动物胚胎移植效率低下、幼畜死亡率高等技术瓶颈也亟待突破。

在生物安全层面,高表达的外源蛋白可能引起宿主代谢紊乱。典型案例是转基因动物因活性人促卵泡激素过量引发的器官损伤。最近的一项研究通过调控山羊乳腺中重组人促卵泡激素的表达时序,成功减少其在动物体内的异常积累,为解决代谢负担问题提供了创新范式^[49]。

在市场发展方面,当前动物生物反应器的技术推广受限于公众认知偏差与制度保障缺失。据2023年中国生物工程学会调研显示,我国公众对转基因动物药物的接受度仅为34.7%,较欧盟平均水平(55.9%)存在显著差距,此外在食品安全(76.2%受访者担忧)与生态风险(63.5%受访者质疑)两大领域的顾虑也尤为突出。

在政策监管方面,尽管我国已建立基于《基因治疗产品非临床研究评价技术指导原则》的审查框架,但与国际接轨的标准化评价体系仍待完善。产业化进程也受制于高研发成本和跨国企业的技术垄断,凸显建立国家级技术共享平台的必要性。

针对上述风险,建议采取“技术革新-制度优化-社会协同”三位一体推进策略:技术层面,重点开发新型基因编辑工具以提升基因组靶向精度;制度层面,构建国际互认的质量评价体系;社会层面,通过官网专栏、科普直播等形式开展公众教育,增强公众信任度。

4.2 展望

综上所述, 动物生物反应器技术已展现出巨大潜力和明确的产业化价值。在合成生物学与监管科学协同创新的驱动下, 我国正通过《生物医药产业高质量发展行动计划》等政策工具, 重点推进以下布局: (1) 建立转基因动物生物反应器药物快速审评通道; (2) 完善重组蛋白药物知识产权保护制度; (3) 建设国家级动

物生物反应器技术共享平台。这种“技术创新-制度创新”的双轮驱动模式, 有望加速乳腺表达系统在疫苗佐剂和罕见病治疗等需求领域的产业化进程, 为突破国外技术垄断提供中国方案。行业分析预测显示, 到2030年我国相关市场规模将突破80亿元, 年均复合增长率达15%, 动物生物反应器技术有望将治疗性蛋白生产成本降低60%~70%, 助力生物医药产业向高效化、绿色化方向实现转型升级。

参考文献

- Gordon J W, Ruddle F H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 1981, 214: 1244–1246
- Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein–growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982, 300: 611–615
- Hammer R E, Pursel V G, Rexroad Jr C E, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985, 315: 680–683
- Gordon K, Lee E, Vitale J A, et al. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Nat Biotechnol*, 1987, 5: 1183–1187
- Zhang K, Lu D, Xue J, et al. Construction of mammary gland-specific expression vectors for human clotting factor IX and its secretory expression in goat milk. *Chin J Biotechnol*, 1997, 13: 271–276
- Houdebine L M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 32: 107–121
- Shirley M. Sebelipase alfa: first global approval. *Drugs*, 2015, 75: 1935–1940
- Houdebine L M. The production of pharmaceutical proteins from the milk of transgenic animals. *Reprod Nutr Dev*, 1995, 35: 609–617
- Echelard Y, Williams J L, Destremes M M, et al. Production of recombinant albumin by a herd of cloned transgenic cattle. *Transgenic Res*, 2009, 18: 361–376
- Yu Z, Meng Q, Yu H, et al. Expression and bioactivity of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic mice. *J Dairy Sci*, 2006, 89: 2911–2918
- Tang B, Yu S, Zheng M, et al. High level expression of a functional human/mouse chimeric anti-CD20 monoclonal antibody in milk of transgenic mice. *Transgenic Res*, 2008, 17: 727–732
- Hu R, Zhang S, Liang H, et al. Codon optimization, expression, and characterization of recombinant lumbrokinase in goat milk. *Protein Expression Purification*, 2004, 37: 83–88
- Tong J, Wei H X, Liu X F, et al. Production of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic pigs. *Transgenic Res*, 2011, 20: 417–419
- Yang B, Wang J, Tang B, et al. Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. *PLoS One*, 2011, 6: e17593
- Wang Y, Ding F, Wang T, et al. Purification and characterization of recombinant human bile salt-stimulated lipase expressed in milk of transgenic cloned cows. *PLoS One*, 2017, 12: e0176864
- Cui D, Li J, Zhang L, et al. Generation of bi-transgenic pigs overexpressing human lactoferrin and lysozyme in milk. *Transgenic Res*, 2015, 24: 365–373
- Yang P, Wang J, Gong G, et al. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin. *PLoS One*, 2008, 3: e3453
- Lindquist S, Hernell O. Lipid digestion and absorption in early life: an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010, 13: 314–320
- Wang Y, Sheng Z, Wang Y, et al. Transgenic mouse milk expressing human bile salt-stimulated lipase improves the survival and growth status of premature mice. *Mol Biotechnol*, 2015, 57: 287–297
- Zhang R, Tang C, Guo H, et al. A novel glycosylated anti-CD20 monoclonal antibody from transgenic cattle. *Sci Rep*, 2018, 8: 13208
- Tang B, Dai Y P, Gong G C, et al. Production methodology for transgenic cloned livestock expressing human lactoferrin (in Chinese). PRC Patent, CN1873001ATP1, 2006-12-06 [汤波, 戴蕴平, 龚国春, 等. 转人乳铁蛋白基因的转基因克隆大型家畜的生产方法. 中国专利, CN1873001ATP1, 2006-12-06]
- Zhu L, van de Lavoie M C, Albanese J, et al. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1159–1169

- 23 Felegary A, Nazarian S, Zafarmand-Samarin M, et al. Evaluation of the prophylactic effect of egg yolk antibody (IgY) produced against the recombinant protein containing IpaD, IpaB, StxB, and VirG proteins from Shigella. *Mol Immunol*, 2024, 173: 53–60
- 24 Massoud M, Attal J, Thépot D, et al. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod Nutr Dev*, 1996, 36: 555–563
- 25 Kojima Y, Wakita J, Inayoshi Y, et al. Galactosylation of human erythropoietin produced by chimeric chickens expressing galactosyltransferase. *J Biosci Bioeng*, 2014, 117: 676–679
- 26 Mizutani A, Tsunashima H, Nishijima K, et al. Genetic modification of a chicken expression system for the galactosylation of therapeutic proteins produced in egg white. *Transgenic Res*, 2012, 21: 63–75
- 27 Harvey A J, Ivarie R. Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white. *Poultry Sci*, 2003, 82: 927–930
- 28 Zhao C, Song C, Wang X, et al. Induction of immunological tolerance in chickens inoculated with xenogeneic antigens at an early stage of embryonic development. *Dev Comp Immunol*, 2006, 30: 431–440
- 29 Yuan F, Li Z. Induction of immunological tolerance in chickens inoculated with xenogeneic antigens at a late stage of embryonic development. *Int Immunol*, 2012, 24: 267–272
- 30 Cao D, Wu H, Li Q, et al. Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens. *PLoS One*, 2015, 10: e0118626
- 31 Wu H, Cao D, Liu T, et al. Purification and characterization of recombinant human lysozyme from eggs of transgenic chickens. *PLoS One*, 2015, 10: e0146032
- 32 Liu T, Wu H, Cao D, et al. Oviduct-specific expression of human neutrophil defensin 4 in lentivirally generated transgenic chickens. *PLoS One*, 2015, 10: e0127922
- 33 Massoud M. Expression of active recombinant human α 1-antitrypsin in transgenic rabbits. *J Biotechnol*, 1991, 18: 193–204
- 34 Kerr D E, Liang F, Bondioli K R, et al. The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 75–79
- 35 Dyck M K, Lacroix D, Pothier F, et al. Making recombinant proteins in animals – different systems, different applications. *Trends Biotechnol*, 2003, 21: 394–399
- 36 Chen K, Yu Y, Zhang Z, et al. Engineering a complex, multiple enzyme-mediated synthesis of natural plant pigments in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120: e2306322120
- 37 Tan H, Ji Y, Lei H, et al. Large-scale and cost-effective production of recombinant human serum albumin (rHSA) in transgenic *Bombyx mori* cocoons. *Int J Biol Macromol*, 2023, 245: 125527
- 38 Liu X, Wang Y, Guo W, et al. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat Commun*, 2013, 4: 2565
- 39 Moghaddassi S, Eyestone W, Bishop C E, et al. TALEN-mediated modification of the bovine genome for large-scale production of human serum albumin. *PLoS One*, 2014, 9: e89631
- 40 Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, et al. Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens. *Sci Rep*, 2018, 8: 10203
- 41 Mukae T, Okumura S, Watanobe T, et al. Production of recombinant monoclonal antibodies in the egg white of gene-targeted transgenic chickens. *Genes*, 2020, 12: 38
- 42 Yoo E, Choi H J, Kim J K, et al. Sustainable production of multimeric and functional recombinant human adiponectin using genome-edited chickens. *J Biol Eng*, 2024, 18: 32
- 43 Kim Y M, Park J S, Choi H J, et al. Efficient production of recombinant human adiponectin in egg white using genome edited chickens. *Front Nutr*, 2023, 9: 1068558
- 44 Kim Y M, Shim J H, Park J S, et al. Sequential verification of exogenous protein production in OVA gene-targeted chicken bioreactors. *Poultry Sci*, 2023, 102: 102247
- 45 Li D, Guo R, Chen F, et al. Genetically engineered goats as efficient mammary gland bioreactors for production of recombinant human neutrophil peptide 1 using CRISPR/Cas9. *Biology*, 2024, 13: 367
- 46 Ma T, Tao J, Yang M, et al. An *AANAT* /*ASMT* transgenic animal model constructed with CRISPR/Cas9 system serving as the mammary gland bioreactor to produce melatonin-enriched milk in sheep. *J Pineal Res*, 2017, 63: e12406
- 47 Jost B, Vilotte J, Duluc I, et al. Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 160–164
- 48 Wang M, Sun Z, Yu T, et al. Large-scale production of recombinant human lactoferrin from high-expression, marker-free transgenic cloned cows. *Sci Rep*, 2017, 7: 10733
- 49 Hua R, Liu J, Li Y, et al. Novel functional recombinant human follicle-stimulating hormone acquired from goat milk. *J Agric Food Chem*, 2021, 69: 2793–2804

Summary for “动物生物反应器的研究进展与展望”

Research progress and prospects of animal bioreactors

Xinyu Ji, Zikang An, Yue Liu, Ran Zhang* & Yaofeng Zhao*

College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

* Correspondence authors, E-mail: yaofengzhao@cau.edu.cn; zhangran0628@cau.edu.cn

Animal bioreactors have emerged as a transformative platform in biopharmaceutical manufacturing, providing a cost-effective and scalable approach for producing functional proteins through transgenic expression in specific animal tissues or organs. Over the past four decades, advancements in transgenic animal technologies and precision gene-editing tools—particularly CRISPR-Cas9—have significantly accelerated progress in this field. Among various bioreactor systems, the mammary gland remains predominant due to its high biosynthetic capacity and broad applicability, achieving gram-per-liter yields of complex biologics, including recombinant human lactoferrin, monoclonal antibodies, and therapeutic enzymes. The College of Biological Sciences at China Agricultural University has made pioneering contributions, such as generating transgenic cattle with unprecedented levels of human lactoferrin expression and developing optimized expression systems for human lysozyme and anti-CD20 monoclonal antibodies in murine and caprine models.

Egg-based bioreactors have also gained attention due to rapid production cycles and minimal physiological impacts on hosts. Transgenic hens expressing recombinant human lysozyme and neutrophil defensin 4 in egg whites demonstrate substantial industrial potential. Commercial milestones, such as ATryn from goat milk and Kanuma from transgenic hens, along with over 30 therapeutic proteins currently in clinical trials, underscore the translational success of animal bioreactor technologies.

Precision genome-editing technologies have become pivotal catalysts for innovation in this domain. Platforms such as CRISPR-Cas9 have substantially improved the specificity and efficiency of targeted gene insertion. By facilitating the site-specific integration of transgenes under the control of mammary gland-specific regulatory elements (e.g., milk protein promoters), these technologies mitigate the risks of ectopic expression and transgene silencing commonly associated with random integration events.

Despite these advances, several challenges persist. Species-specific glycosylation patterns can affect the immunogenicity and efficacy of recombinant proteins, and high-level expression of exogenous proteins imposes metabolic burdens that may compromise animal health and welfare. Public perception remains a significant barrier, particularly in China, where only 34.7% of respondents accept transgenic biopharmaceuticals, highlighting the need for improved science communication and stakeholder engagement. Regulatory landscapes are gradually evolving; China's 14th Five-Year Plan for the Bioeconomy has expedited approval processes for innovative biologics, exemplified by the 2023 clinical trial authorization of a domestically developed C1 esterase inhibitor.

Future advancements will require further refinement of gene-editing technologies and, integration of synthetic biology. Emerging applications include rare disease therapeutics, sustainable agriculture via hypoallergenic dairy products, and insect bioreactors producing plant-derived compounds. Market forecasts predict the animal bioreactor sector will surpass \$1.1 billion by 2030, driven by rising demand and strategic investments in CRISPR-based platforms. Aligning technological innovation with societal acceptance positions animal bioreactors to revolutionize biopharmaceutical production, offering scalable and ethically viable solutions to global health challenges.

animal bioreactors, transgenic animals, mammary gland bioreactors, gene editing technology

doi: [10.1360/TB-2024-1408](https://doi.org/10.1360/TB-2024-1408)