



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I784063 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 11 月 21 日

(21)申請案號：107134366

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 28 日

(51)Int. Cl. : C12N5/075 (2010.01)

C12N15/85 (2006.01)

C07K16/24 (2006.01)

(30)優先權：2017/12/27 美國

62/610,918

(71)申請人：財團法人生物技術開發中心 (中華民國) DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY (TW)

臺北市南港區研究院路一段 130 巷 107 號 E 棟

(72)發明人：滕昭怡 TENG, CHAO-YI (TW)；林茜儀 LIN, CHIEN-I (TW)；盧信霖 LU, HSIN-LIN (TW)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

期刊 Sung YH et al. "Influence of down-regulation of caspase-3 by siRNAs on sodium-butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin" Metabolic engineering vol.7 no.5-6 Elsevier 2005/09/19 457-466

期刊 Chusainow J et al. "A Study of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines: What Makes a Stable High Producer?" Biotechnology and Bioengineering vol.102 no.4 Wiley Periodicals 2008/10/08 1182-1196

期刊 Cheng G et al. "Caspase-3 Gene Silencing for Inhibiting Apoptosis in Insulinoma Cells and Human Islets" Molecular Pharmaceutics vol.5 no.6 American Chemical Society 2008/10/02 1093-1102

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：16 共 46 頁

(54)名稱

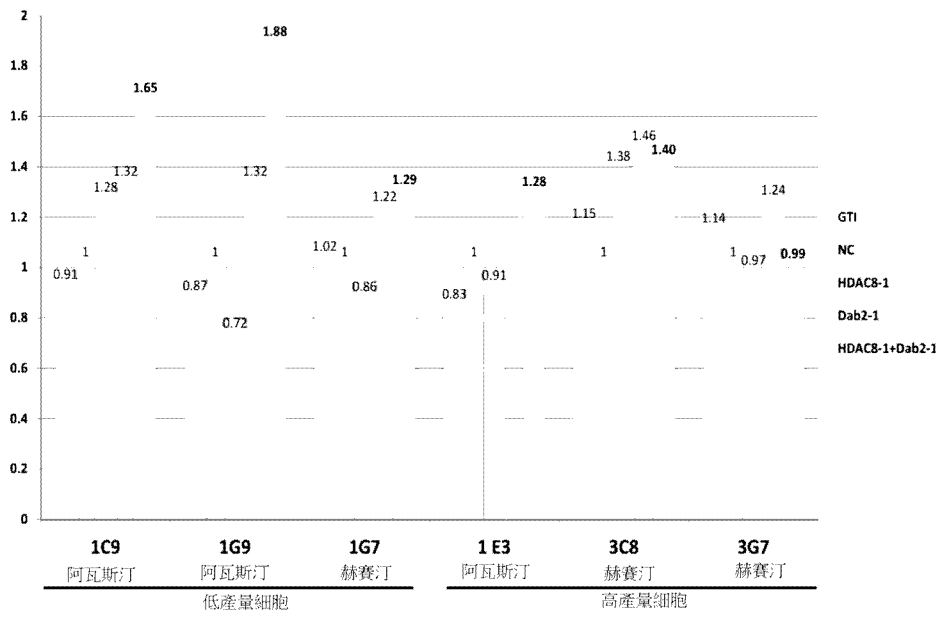
具有增進蛋白質表現功效的宿主細胞及其用途

(57)摘要

本發明提供一種用於蛋白質表現之宿主細胞，其相較於野生型細胞具有較低的基因表現水準，其中該基因選自 HDAC8、Dab2、凋亡蛋白酶 3、Sys1、Ergic3、Grasp、Trim 23 或其組合。該等宿主細胞為 CHO 細胞。該基因之較低表現水準係由 RNA 干擾造成，該 RNA 干擾可藉由轉染含有靶向該基因之 shRNA 之載體實現。

A host cell for protein expression having a lower expression level of a gene, as compared to a wild-type cell, wherein the gene is selected from HDAC8, Dab2, Caspase3, Sys1, Ergic3, Grasp, Trim 23, or a combination thereof. The host cells are CHO cells. The lower expression level of the gene results from RNA interference, which may be achieved by transfecting a vector that contains an shRNA targeting the gene.

指定代表圖：



【圖3】



I784063

【發明摘要】

【中文發明名稱】

具有增進蛋白質表現功效的宿主細胞及其用途

【英文發明名稱】

HOST CELLS WITH ENHANCED PROTEIN EXPRESSION  
EFFICIENCY AND USES THEREOF

【中文】

本發明提供一種用於蛋白質表現之宿主細胞，其相較於野生型細胞具有較低的基因表現水準，其中該基因選自HDAC8、Dab2、凋亡蛋白酶3、Sys1、Ergic3、Grasp、Trim 23或其組合。該等宿主細胞為CHO細胞。該基因之較低表現水準係由RNA干擾造成，該RNA干擾可藉由轉染含有靶向該基因之shRNA之載體實現。

【英文】

A host cell for protein expression having a lower expression level of a gene, as compared to a wild-type cell, wherein the gene is selected from HDAC8, Dab2, Caspase3, Sys1, Ergic3, Grasp, Trim 23, or a combination thereof. The host cells are CHO cells. The lower expression level of the gene results from RNA interference, which may be achieved by transfecting a vector that contains an shRNA targeting the gene.

【指定代表圖】

圖3

【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

具有增進蛋白質表現功效的宿主細胞及其用途

### 【英文發明名稱】

HOST CELLS WITH ENHANCED PROTEIN EXPRESSION  
EFFICIENCY AND USES THEREOF

### 【技術領域】

【0001】 本發明係關於用於蛋白質生產之宿主細胞，尤其關於經工程改造之宿主細胞，諸如 CHO 細胞，該細胞相較於野生型細胞可以產生較高水準之蛋白質。

### 【先前技術】

【0002】 蛋白質藥劑典型地係藉由在適合的宿主細胞中表現所產生的。中國倉鼠卵巢(CHO)細胞為用於蛋白質藥物生產之最常使用之宿主細胞。為了增進蛋白質藥物生產效率，正在開發研究宿主細胞之最佳化(例如藉由修飾宿主細胞之基因)或下游製程之最佳化。目前多種策略可用於增強蛋白質表現及/或分泌，例如藉由使用化學試劑或藉由修飾細胞之基因。

【0003】 在基因修飾之情況下，典型地係靶向涉及轉錄、轉錄後調節、轉譯及轉譯後事件之基因。舉例而言，轉錄後調節元件(PTRE)業已成操作的標的以增進蛋白質表現。(參見Mariati等人，「*Post-transcriptional regulatory elements for enhancing transient gene expression levels in mammalian cells,*」 *Methods Mol. Biol.*, 2012, 801: 125-35。)

【0004】 儘管用於調節蛋白質表現宿主細胞之先前技術為適用的，但仍存在對增進宿主細胞中之蛋白質表現之其他方法之需求。

**【發明內容】**

**【0005】** 本發明之實施例係關於具有經改良蛋白質(例如抗體)生產效率之新類型宿主細胞。新類型宿主細胞係經基因工程改造以改變一或多種基因，出乎意料地發現該等基因會影響蛋白質表現或分泌。此類基因不同於前已知的基因，諸如靶向用於操作增進蛋白質表現之轉錄後調節元件。本發明中所操作之基因無關於轉錄、轉錄後調節、轉譯或轉譯後事件。因此，出人意料的是，遏制此等基因表現可能導致增進的蛋白質表現/分泌。

**【0006】** 根據本發明之實施例，宿主細胞之基因工程改造可能涉及一或多種選自以下之基因之減弱：HDAC8、Dab2、凋亡蛋白酶3、Sys1、Ergic3、Grasp及Trim23。藉由此項技術中已知之任何適合的基因工程改造技術(諸如與靶基因之RNA干擾)實現基因減弱。靶向此等基因之RNAi可藉由將合適構築體轉染至細胞中以減弱此等靶基因表現，從而產生經工程改造之宿主細胞。

**【0007】** 在較佳實施例中，宿主細胞為CHO細胞，且靶基因可為HDAC8、DAB2或凋亡蛋白酶3基因或其組合。用短髮夾RNA (shRNA)或siRNA抑制或遏制此等基因中之一或多者會產生可支持增進的蛋白質表現及/或分泌之宿主細胞。舉例而言，凋亡蛋白酶3之shRNA抑制可使得宿主細胞細胞凋亡減少。因此，藉由siRNA或shRNA，藉由短期抑制或長期抑制來抑制凋亡蛋白酶3基因可提高蛋白質(例如抗體)產量。

**【0008】** 根據本發明之一些實施例，HDAC8、DAB2或凋亡蛋白酶3之siRNA或shRNA抑制可產生穩定細胞株。此等穩定細胞株經過評估其轉染效率、抗體表現提高、乳酸代謝、生長速率、新培養基適應性及/或長期

繼代(例如60代或多於60代)穩定性之後加以選擇。除了能夠產生/分泌更多蛋白質(例如抗體)之外，此等穩定細胞亦具有較高穩定性之特徵且能夠適應新培養基。因此，其適用於下游製程開發。

【0009】本發明之一個態樣係關於用於蛋白質表現之宿主細胞。根據本發明之一實施例，相較於野生型細胞，該宿主細胞包含較低HDAC8、Dab2、凋亡蛋白酶3、Sys1及/或Trim23基因之表現水準。舉例而言，經工程改造之宿主細胞具有明顯基因減弱15%或15%以上之較低表現水準。亦即，相較於野生型細胞，該基因減弱之細胞可以85%水準或低於85%水準表現出特定基因。

【0010】根據本發明之較佳實施例，具有較低表現水準之基因為HDAC8、Dab2、凋亡蛋白酶3或其組合。根據基因之一些實施例，宿主細胞為CHO細胞。根據本發明之一些實施例，轉錄後調節基因或細胞凋亡基因之較低表現水準係由RNA干擾造成。

【0011】藉由以下描述、圖式及隨附申請專利範圍，本發明之其他態樣將變得顯而易見。

#### 【圖式簡單說明】

【0012】圖1顯示在1C9細胞中之各種基因減弱後之蛋白質生產水準。1C9為較低IgG生產細胞株(批次培養的第6天為1.28 mg/L)。1C9細胞係用於判斷IgG分泌是否可藉由各種基因之siRNA抑制來增強。

【0013】圖2顯示用於基因減弱的候選基因，其係如選自使用NimbleGene及Agilent之基因陣列之較高及較低產量細胞之分析。

【0014】圖3顯示具有靶基因減弱之各種細胞株中的蛋白質(阿瓦斯汀(Avastin)及赫賽汀(Herceptin))表現水準。

- 【0015】 圖4顯示適用於shRNA構築體之非慢病毒載體(質體)。
- 【0016】 圖5顯示衍生自慢病毒用於構築shRNA之質體。
- 【0017】 圖6顯示shRNA之序列形式之一個實例。
- 【0018】 圖7顯示使用各種嘌呤黴素濃度下之細胞群的選擇。
- 【0019】 圖8顯示用嘌呤黴素選擇之各種轉染物細胞之蛋白質表現水準，如圖7中所描述。
- 【0020】 圖9顯示說明用於分離經工程改造之細胞之單一細胞株之程序的示意圖。
- 【0021】 圖10顯示具有凋亡蛋白酶3減弱之前五個單一細胞株之蛋白質表現水準(短暫表現)。
- 【0022】 圖11A顯示前5名單一細胞株在長期培養(長達6週)所分析其等特性(群體倍增時間、乳酸水準、凋亡蛋白酶3基因表現量)之結果。
- 【0023】 圖11B顯示在長期培養期間不同時間前5名單一細胞株之凋亡蛋白酶3減弱水準。
- 【0024】 圖12說明前5名單一細胞株之長期穩定性，顯示隨時間變化之倍增時間及活細胞百分比(多達100代)。
- 【0025】 圖13顯示使用前3名個單一細胞株隨時間變化(第0週、第3週及第6週)之蛋白質表現水準。
- 【0026】 圖14A顯示衍生自前3名單一細胞株之第二代細胞之特性。
- 【0027】 圖14B顯示根據本發明之實施例之CHO細胞之轉染率。
- 【0028】 圖14C顯示第二代細胞中之凋亡蛋白酶3表現水準。
- 【0029】 圖15顯示相比於第一代細胞及母細胞之第二代細胞之蛋白質表現水準。



【0030】圖16顯示本發明CHO細胞中所產生之赫賽汀的聚醣數據圖，顯示主要聚糖包括G0F、G1Fa、G1Fb及G2F，該等聚醣與市售赫賽汀之彼等類似。

#### 【實施方式】

【0031】本發明之實施例係關於研發用於蛋白質生產之新細胞株。此等新宿主細胞具有經改良蛋白質(例如抗體)產量及/或分泌效率。此等細胞中所操作之基因與轉錄、轉錄後調節、轉譯或轉譯後事件無直接關聯性，且因此，出人意料的是，遏制此等基因之表現可導致增進的蛋白質表現/分泌。

【0032】藉由分析CHO細胞基因組及總轉錄本，本發明之發明者發現遏制HDAC8、Dab2、凋亡蛋白酶3、Sys1、Ergic3、Grasp及Trim23基因中之一或多者可產生具有經改良蛋白質表現及/或分泌之CHO細胞。在細胞分裂期間調節染色體之結構及組織中涉及HDAC8。Dab2為一種銜接子蛋白質，其具有充當所選運送蛋白質之網格蛋白介導之內飲作用所需的網格蛋白相關分選蛋白質(CLASP)之功能。負責細胞凋亡執行之半胱天冬酶之活化級聯中涉及凋亡蛋白酶3。在細胞凋亡開始時，凋亡蛋白酶3會以蛋白水解方式分解聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)。Sys1為位於高爾基體的整合膜蛋白質同源物且涉及高爾基體轉運。Trim23(含有三聯基元之23)在形成自一個隔室移動至另一個之細胞內轉運囊泡方面起作用。Ergic3編碼循環膜蛋白質，其為內質網-高爾基體中間隔室(ERGIC)蛋白質，其與此蛋白質家族之其他成員相互作用以提高其轉換。Grasp編碼充當分子支架之蛋白質，其將受體(包括第1組代謝型麩胺酸受體)連接至神經元蛋白質。此等基因中無一者直接涉及轉錄或轉譯調節。因此，遏制此等基因可導致

增進的蛋白質表現及/或分泌之事實是出人意料的。

【0033】根據本發明之實施例，分析CHO染色體及總轉錄本以選擇用於工程改造之靶基因。簡言之，分析CHO共生物種所產生之基因晶片。在一個實例中，分析總共四種不具有轉基因之CHO細胞株。其中一個細胞株為CHO-S生產細胞株，而另外三個細胞株為已人工培養於實驗室中之懸浮液CHO細胞株。

【0034】此外，分析具有較高或較低產率特徵之三對CHO細胞。在較高產率CHO細胞中以較低水準表現但在較低產率CHO細胞中以較高水準表現之基因為可能不利於蛋白質之高水準表現之基因。因此，此類基因可為用於RNAi干擾之候選靶標以改良宿主細胞中之蛋白質表現。為了研究此類基因是否實際上會影響蛋白質表現/分泌效率，藉由RNA干擾降低此等靶基因之表現水準。製備用於此等基因干擾之各種RNAi構築體。此等構築體暫時轉染至CHO細胞中以篩檢其對蛋白質表現及細胞生長及穩定性之作用。

【0035】如圖1中所示，HDAC8、Trim23、Sys1、Ergic3、Dab2及Grasp之基因減弱可使得經修飾細胞中之蛋白質表現及/或分泌增進。此外，發現HDAC8及Dab2基因減弱之組合在蛋白質表現改良方面產生最主要效果。具體言之，減弱HDAC8及Dab2基因兩者之細胞產生可表現1.65倍至1.8倍蛋白質。

【0036】使用類似途徑，分析兩個額外CHO細胞基因陣列，一個來自Agilent (Santa Clara, CA)，而一個來自Roche NimbleGen (Madison, WI)。較低產率細胞株中高度表現之彼等基因鑑別做為干擾的靶標。自此等分析，兩個額外基因(BAX及凋亡蛋白酶3)鑑別為基因減弱候選物，如

圖2中所示。

【0037】基於此等靶基因，可以使用抑制該等基因功能之各種RNA干擾之方法。舉例而言，可構築含有靶序列(HDAC8+Dab2、凋亡蛋白酶3、BAX及凋亡蛋白酶3+BAX)之shRNA質體。本發明之實施例可使用任何適合的質體或載體。舉例而言，慢病毒質體或pcDNA3.1(+)載體常用於shRNA。可使用商購套組，諸如來自Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)之BLOCK-iT™慢病毒RNAi表現系統。

【0038】此等質體可在細菌中擴增。隨後，將含有shRNA之質體轉染至相關細胞株(例如DXB11-S1)中。評定轉染體之轉染功效(基於質體中之抗生素抗性，例如藉由測定使用0.5-10 µg/ml嘌呤黴素之殺死曲線)且分析其等基因遏制之長期效應。此等細胞株中靶基因之基因遏制可使用即時PCR分析。最終，用生物化學、細胞或分子生物分析來分析此等細胞以研究此等基因之功能。

【0039】除了此等基因個別性的干擾之外，亦探究此等靶基因之基因減弱的組合。如圖3中所示，HDAC8及Dab2基因減弱之組合使得大部分細胞株(1C9、1G9、1G7、1E3及3C8)中之蛋白質表現水準提高1.28倍至1.88倍。相比於較高產量細胞(1E3、3C8及3G7)，生產促進在較低產量細胞(1C9、1G9及1G7)中更顯著。以此等細胞中所表現之不同抗體(阿瓦斯汀及赫賽汀)可見此等增進，顯示產量增進將適用於蛋白質生產，一般不限於特定蛋白質。

【0040】兩個靶基因之基因減弱組合可同時產生協同作用。舉例而言，HDAC8及Dab2之基因減弱分別在1C9細胞中產生1.28倍及1.32倍阿瓦斯汀產量，而HDAC8及Dab2之基因減弱組合在相同細胞中則產生1.65倍表

現。類似地，HDAC8及Dab2之基因減弱在1G9細胞中分別產生0.78倍及1.32倍阿瓦斯汀產量，而HDAC8及Dab2之基因減弱組合在相同細胞中產生1.88倍表現，顯示具有協同作用。

【0041】 允許於宿主細胞中暫時且穩定的轉染以及shRNA表現卡匣之穩定遞送之各種shRNA載體是可用的。根據本發明之實施例，shRNA構築體轉染至CHO細胞中可使用任何適合的載體，包括商購載體，諸如pcDNA3.1 (+) (圖4，可購自Thermo Fisher, Waltham, MA)及pGFP-C-ShLenti (圖5，可購自OriGene, Rockville, MD)。亦可使用此項技術中已知之其他適合的載體。

【0042】 儘管慢病毒載體可提供適宜方法以將shRNA構築體遞送及整合至細胞基因組中，在不使用慢病毒元件之情況下產生醫藥蛋白質係較佳的。以下實例表明來自Thermo Fisher (Waltham, MA)之pcDNA3.1(+)-用途。

【0043】 使用pcDNA3.1(+)(圖4)質體作為實例，可將具有圖6中所示之結構之莖-環序列/構架插入質體中。圖6中之寡核苷酸說明典型的莖環結構構築體。用此等質體已製備含有用於靶基因之序列之若干構築體。此等質體之成功構造可用限制酶消化物確認以產生正確尺寸之片段。

【0044】 此等構築體係用於轉染CHO細胞，諸如DXB11細胞。隨後評定經轉染細胞之靶基因抑制。如圖7中所示，可基於可選擇標記物(例如嘌呤黴素抗性)選擇各種經轉染之細胞株(DXB11 sh-HDAC8+Dab2、DXB11 sh-凋亡蛋白酶3、DXB11 sh-BAX-池及DXB11 sh-BAX+凋亡蛋白酶3)，且隨後篩選出靶基因之更佳抑制。簡言之，用各種濃度之抗生素(例如嘌呤黴素)篩選此等經轉染之細胞株，且用即時PCR評定靶基因之遏制。基

於此等篩檢，鑑別最佳候選宿主細胞。此等最佳細胞株包括例如用50  $\mu\text{g/ml}$  嘌呤黴素選擇之DXB11 sh-HDAC8+Dab2(HD50P)、用10  $\mu\text{g/ml}$  嘌呤黴素選擇之DXB11 sh-凋亡蛋白酶3(C10P)、用7.5  $\mu\text{g/ml}$  嘌呤黴素選擇之DXB11 sh-BAX(B7.5P)及用10  $\mu\text{g/ml}$  嘌呤黴素選擇之DXB11 sh-BAX+ 凋亡蛋白酶3(BC10P)。

**【0045】** 進一步評估最佳候選宿主細胞支持增進蛋白質生產之能力。用各種蛋白質，諸如SEAP (分泌的鹼性磷酸酶)、赫賽汀及阿瓦斯汀之產量測試此等細胞。如圖8中所示，大部分此等細胞株在各種培養條件下產生較多蛋白質。

**【0046】** 為了獲得穩定細胞株，此等細胞可經連續稀釋且挑取單一細胞株。使用用10  $\mu\text{g/ml}$  嘌呤黴素選擇之DXB11 sh-凋亡蛋白酶3細胞(C10P)作為實例，使用圖9中所說明之程序，使用ClonePix或任何其他適合的設備/方案分離單一細胞株。圖9說明用於分離單一細胞株之一個方案。簡言之，在細胞轉染之後，擴增且篩選細胞，且隨後次選殖。細胞株可適應無血清化學成分確定的培養基中之懸浮培養物。隨後，轉染體之穩定細胞群可在產生較高產量穩定單一細胞株之前產生並加以特性分析。熟習此項技術者將瞭解，此僅用於說明且亦可使用用於實現單一細胞株之分離之其他程序。

**【0047】** 如圖9中所示，此等細胞中之基因表現之遏制可使用即時PCR確認。自此等分析，吾人可獲得具有不同靶基因(例如凋亡蛋白酶3)基因減弱百分比之細胞。隨後，在適合的濃度(例如各5 ml孔中 $3 \times 10^5$ 個細胞/毫升)下將此等細胞接種於6孔盤中且培養適當的持續時間。量測此等細胞之活細胞密度(VCD)、群體倍增時間(PDT)及乳酸水準以評估細胞健康狀

態。

【0048】隨後，可用攜載蛋白質基因(例如IgG)之表現載體之暫時轉染，探究此等細胞中之靶基因減弱對蛋白質產量之作用。在此等細胞確認支持高水準蛋白質表現後，可藉由將選擇藥物(例如遺傳黴素(geneticin)或嘌呤黴素)添加至培養基中來選擇穩定細胞群。首先滴定恰當藥物濃度以使用且隨後在藥物之所選濃度下使細胞生長，如此僅具有所選抗性標記物之轉染體是具有活力的且可以合理的速率生長。

【0049】在已選擇細胞之穩定群之後，此等細胞群可進一步經稀釋且測試其穩定性。舉例而言，此等穩定細胞池可進行限制性稀釋並且選擇出次細胞株，評定該次細胞株的穩定性。

【0050】最終，必要時，可分離穩定轉染體之單一細胞株以確定研究細胞庫(RCB)，自其中可獲得主要細胞庫(MCB)或工作細胞庫(WCB)，並以低溫保存。具體言之，可基於單一細胞株特性(例如細胞株穩定性及蛋白質生產效率)評估單一細胞株且將選擇最佳表現細胞株用於產生RCB。可在作為MCB低溫保存之前進一步測試且表徵RCB細胞。

【0051】使用來自DXB11-sh-凋亡蛋白酶3轉染體之前5名的單一細胞株作為實例，探究此等細胞支持蛋白質表現之效率。如圖10中所示，相比於母體DXB11-J1.0細胞，所有5個細胞株(CI-1B、CI-1H、CII-1H、CII-4G及CII-3B)在經含有赫賽汀或阿瓦斯汀之載體暫時轉染之後顯示出增進的蛋白質表現。增進係在1.5倍至2.4倍範圍內。此等結果顯示凋亡蛋白酶3之遏制可導致較高蛋白質產量的宿主細胞。此研究結果為出人意料的，因為發現凋亡蛋白酶-1之遏制係在桿狀病毒昆蟲細胞(sf9細胞)表現系統中產生經改良的蛋白質摺疊，而非增進的蛋白質產量或積聚量(X. Zhang等人，

BMC Biotechnol., 2018年5月2日, 18(1):24 ; doi: 10.1186/s12896-018-0434-1)。

【0052】 進一步探究此等前5名之細胞株的長期行為。如圖11A中所示，自第0週至第6週，此等5個細胞株之細胞密度不具有顯著變化，無關於接種密度(D0、D4及D5， $0.3-25 \times 10^6$ 個細胞/毫升)。細胞數目之長期穩定性顯示此等細胞具有長期存活率，其可能歸因於細胞凋亡之遏制。

【0053】 此等細胞之群體倍增時間(PDT)係在16至19小時範圍內且隨時間推移未顯示顯著變化。在相同條件下，此等群體倍增時間與未經轉染之CHO細胞相當。同樣，此等結果顯示，凋亡蛋白酶3經遏制的細胞具有與母體CHO細胞實質上相同的生物特性。

【0054】 在分批饋料方法中，長期培養可在培養基中產生顯著乳酸及氨積聚量。較高水準乳酸不利於細胞生長及產物品質。CHO細胞亦顯示與較高乳酸產量相關之失調葡萄糖代謝，其可導致培養基酸化或非所需重量莫耳滲透濃度變化。因此，乳酸產量可用作細胞健康狀態之指標。

【0055】 如圖11A中所示，此等細胞培養物中之乳酸水準在6週時間段內無顯著變化。乳酸水準以及乳酸/細胞數目相對較低。此等前幾名細胞株之較低乳酸水準推測，此等細胞可高效地利用能量源(葡萄糖)。

【0056】 圖11B顯示凋亡蛋白酶3基因之表現水準。所有5個細胞株具有較低凋亡蛋白酶3表現且水準在6週時間段內無實質性變化。此等結果顯示，凋亡蛋白酶3基因之遏制是相對穩定。

【0057】 如圖12中所示，此等細胞維持接近100%活力達一段長時間(超過100代)。另外，此等細胞之群體倍增時間(PDT)相對恆定。此等結果均顯示，此等轉染物細胞極其穩定達一段長時間(例如100代或多於100代)。

【0058】 此等細胞不僅長期穩定，且此等細胞支持增進蛋白質表現之能力亦極其穩定。如圖13中所示，阿瓦斯汀及赫賽汀之表現水準維持在實質上相同的水準下，CII-4G細胞株除外，該純系顯示在第6週表現水準有些降低。

【0059】 為了進一步研究此等細胞之長期健康狀態，藉由連續稀釋產生此等細胞之第二代，並挑選出如上文所描述之單一細胞株。亦評估此等第二代細胞之各種特性。

表1

基因表現		*10 <sup>6</sup> 個細胞/毫升			PDT	乳酸	乳酸/細胞
		D0	D4	D5	D0-D4		
0.83	CI-1B-D3	0.26	8.20	18.13	19	0.777	0.043
0.58	CI-1B-E2	0.29	7.54	16.63	20	0.81	0.049
1.05	CI-1B-F6	0.34	7.59	17.19	21	1.072	0.062
0.89	CI-1B-G5	0.34	5.68	13.00	23	0.791	0.061
1.33	CII-4G-F6	0.29	6.43	14.29	21	0.355	0.025
0.31	CII-4G-G6	0.32	9.69	21.25	19	0.066	0.003

【0060】 表1顯示衍生自第一代細胞CI-1B之4種第二代細胞(CI-1B-D3、CI-1B-E2、CI-1B-F6及CI-1B-G5)及衍生自第一代細胞CII-4G之2種第二代細胞(CII-4G-F6及CII-4G-G6)之分析結果。此等第二代細胞之群體倍增時間(PDT)與第一代細胞之彼等者類似，顯示對於第二代細胞略微較低的生長速率。然而，差值極小。另外，乳酸水準以及每個細胞之乳酸水準在第二代細胞中亦略微較高。

【0061】 圖14A顯示三種例示性第二代細胞株C1-1B-D3、CII-4G-G5及CII-4G-G6之特性。此等第二代細胞株之長期穩定性可藉由9週培養後幾乎仍100%存活率而得到證明。另外，此等細胞隨時間推移維持一致轉染效率。如圖14B中所示，CHO-C (亦即，CII-4G-G6)及CI-1B-G5細胞自0



至9週維持類似的轉染率(約15%)。

【0062】 如即時PCR所評定之此等第二代細胞中之凋亡蛋白酶3基因表現水準變化超過第一代細胞(圖14C)。舉例而言，CI-1B-D3及CI-1B-E2細胞仍顯示對凋亡蛋白酶3基因具有極好的遏制，但CI-1B-F6及CII-4G-F6相對於第一代極低幾乎無變化。有趣的是，CII-4G-G6細胞具有凋亡蛋白酶3基因之明顯經改良遏制，而CI-1B-F6細胞則失去抑制凋亡蛋白酶3表現之能力。

【0063】 圖15顯示第二代細胞支持增進的抗體(阿瓦斯汀及赫賽汀)表現之評估結果。如所示，相比於對照細胞(DXB-11)，此等第二代細胞顯示1.21至2.4倍的此等抗體之表現水準。

【0064】 上述結果清楚地顯示，凋亡蛋白酶3以及HDAC8、Dab2、Sys1及Trim23之基因減弱可以產生出具有增進的生產能力的CHO細胞。已發現各種CHO細胞株，包括CHO-DXB11、CHO-S、CHO-K1及CHOC細胞之此等增進的能力。另外，各種蛋白質已在此等細胞中表現，包括針對Her2、間皮素(MSLN)及T細胞免疫球蛋白黏蛋白-3 (Tim3)之抗體。一般而言，此等細胞可以約200 mg/L或高於200 mg/L之水準產生蛋白質(抗體)。

【0065】 此等細胞中表現之蛋白質具有標準特性，包括轉譯後修飾。作為實例，將DXB11及CHOC細胞中所表現之赫賽汀與商購赫賽汀進行比較且發現具有類似分子量(約145 KDa)。相比於市售赫賽汀/曲妥珠單抗(Trastuzumab)之彼等者，RP-HPLC (還原性及非還原性)揭示用此等細胞所產生之赫賽汀具有類似條帶圖譜。圖16顯示CHOC細胞中所產生之赫賽汀之N-鍵聯聚醣數據圖(在PNGase F釋放之後)，如ACQUITY UPLC

BEH聚醣管柱(1.7  $\mu\text{m}$ ; Waters Corp., Milford, MA, USA)所分析且用乙腈及50 mM甲酸銨之梯度溶離。聚醣分析揭示，此蛋白質主要含有G0F、G1Fa、G1Fb及G2F聚醣。

【0066】上述描述清楚地展現本發明之實施例。出乎意料地發現與蛋白質生產無直接關聯之基因會影響蛋白質表現及/或分泌。根據本發明之實施例，選擇此等基因作為RNAi靶標。靶向此等基因之RNAi藉由將恰當構築體轉染至細胞中，以基因減弱此等靶基因表現，從而工程改造宿主細胞(例如CHO細胞)。

【0067】本發明之實施例顯示，藉由siRNA及shRNA，藉由短期抑制或長期抑制抑制所選靶基因(例如HDAC8、Dab2及凋亡蛋白酶3基因)可產生可支持提高的蛋白質表現及/或分泌之細胞。此等結果顯示，所選基因抑制宿主細胞作為用於蛋白質藥物生產之新宿主具有極大潛能。儘管特定實例係使用凋亡蛋白酶3來說明本發明之實施例，亦可針對基因減弱靶向其他基因(尤其HDAC8、Dab2及HDAC8+Dab2)以改良蛋白質產量及/或分泌。

【0068】用於各種程序之方法為此項技術中已知的。以下描述提供例示性程序及各種實例以說明本發明之實施例。熟習此項技術者將瞭解，此等實例僅用於說明且其他變化及修改在不脫離本發明之範疇的情況下係可能的。舉例而言，下文使用HDAC8、Dab2、BAX及凋亡蛋白酶3作為實例以說明本發明之實施例。然而，可在不脫離本發明之範疇之情況下使用其他基因。

細胞培養物及培養基

【0069】中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株DXB11獲自哥倫比亞大學之

Lawrence Chasin博士。在培育箱中，在5% CO<sub>2</sub>下，在37°C及95%濕度之溫度下，進行細胞培養。用於細胞培養之培養基包括Hyclone及混合培養基(50% CDFortiCHO及50% ActiCHO)。在用錐蟲藍染色之後，使用自動細胞計數器TC10 (Bio-Rad，美國)進行細胞計數及存活率分析。

【0070】轉染構築體包括嘌呤黴素抗性基因。基於嘌呤黴素抗性選擇穩定池。一旦其變成單一細胞株後，就不需要選擇。

#### 載體構築

【0071】在此實例中，選擇HDAC8、Dab2、BAX及凋亡蛋白酶3作為用於RNA干擾之靶基因。來自針對RNA干擾所選之此等基因之特定序列片段顯示於表2中：

表2

標靶	靶序列	SEQ ID NO
HDAC	5'-GCATACAGGATGAGAAGTA-3'	1
Dab2	5'-CAGCAAAGCAGAAGAGAAT-3'	2
BAX	5'-CCAAAGTGCCCGAGCTAAT-3'	3
凋亡蛋白酶3	5'-CGATAGAATTTGAGTCCTT-3'	4

【0072】將此等靶序列選殖至pcDNA3.1(+)載體(圖5)中，以產生用於抑制此等基因之shRNA質體，從而產生經工程改造之宿主細胞。

【0073】質體構造如下：設計個別引子，以在5'端含有*MfeI*限制位點及在3'端含有*KpnI*限制位點。使用pGFP-C-Dab2及pGFP-C-BAX作為模板，進行PCR以使含有U6啟動子及嘌呤黴素選擇基因之所需片段(對應於所需RNA序列)擴增。GFP-C-Dab2及p-GFP-C-BAX為藉由將對應於所需RNA序列之聚核苷酸選殖至pGFP-C-shLenti載體(圖6)中由OriGene構築之HuSH shRNA質體。

【0074】個別地設計在5'端具有*EcoRI*限制位點及在3'端具有*XmaI*限制位

點之類似引子。以類似方式，使用pGFP-HDAC8及pGFP-C-凋亡蛋白酶3作為模板進行PCR以使含有U6啟動子及嘌呤黴素選擇基因之所需片段(對應於所需RNA序列)擴增。表3顯示各種引子序列：

表3：寡核苷酸序列

#	名稱	序列	SEQ ID NO
1	shLenti-U6-Forw-MfeI-I	5'AACAATTgCCCAgTggAAAgACgCgC3'	5
2	shLenti-U6-Forw-EcoRI-II	5'AAgAATTCCCCAgTggAAAgACgCgC3'	6
3	shLenti-Rev-Puro-kpnI-I	5'AAggTACCAACTgCTgAgggCTggAC3'	7
4	shLenti-Rev-Puro-XmaI-II	5'ATACCCgggAACTgCTgAgggCTggAC3'	8

【0075】 PCR片段暫時選殖至pJET1.2載體(Thermo Fisher)中且確認序列。分別使用限制酶*MfeI/KpnI*及*EcoRI/XmaI*自暫時pJET1.2載體切割HDAC8、Dab2、BAX及凋亡蛋白酶3片段。

【0076】 用限制酶*EcoRI*及*XmaI*切割pcDNA3.1(+)載體。隨後，分別將HDAC8及凋亡蛋白酶3片段選殖至載體中以獲得pcDNA3.1(+)-HDAC8及pcDNA3.1(+)-凋亡蛋白酶3載體。

【0077】 用限制酶*MfeI*及*KpnI*切割pcDNA3.1(+)-HDAC8載體，且隨後將Dab2片段構築至切割載體中以獲得pcDNA3.1(+)-Dab2-HDAC8載體。

【0078】 另外，pcDNA3.1(+)及pcDNA3.1(+)-凋亡蛋白酶3載體用限制酶*MfeI*及*KpnI*切割。隨後，使BAX片段與切割載體連接以獲得pcDNA3.1(+)-BAX及pcDNA3.1(+)-BAX-凋亡蛋白酶3。在構築此等載體之後，藉由限制酶消化確認恰當構造以確認恰當片段(亦即，恰當尺寸)構築至載體中。

### CHO細胞轉染

【0079】 在6孔盤中培養DXB11細胞。各孔在3 mL含有8 mM GlutaMAX™ (Thermo Fischer)之Hyclone™ HyCell™ CHO培養基(GE

Healthcare)中具有 $3 \times 10^6$ 個細胞。

【0080】可使用此項技術中已知之任何適合的試劑，諸如親脂性試劑 FreeStyle MAX (Thermo Fischer) 進行含有shRNA構築體之載體(例如 pcDNA3.1)之轉染。舉例而言，將 RNAi/shRNA 載體及轉染劑 FreestyleMAX™ (Thermo Fischer) 單獨地添加至 OptiPRO™ SFM (Thermo Fischer) 中以製備如表4中所示之載體溶液。此等溶液靜置5分鐘，之後將其添加至轉染試劑中且充分混合。使所得溶液靜置20分鐘，之後轉染至細胞中。隨後在轉染之後3天評估細胞。

表4

#### RNAi載體轉染

RNAi	儲備液濃度	RNAi (50 nM)	OPTI	FreeStyle MAX	OPTI	細胞
siGLO Green轉染指標	5 nM	10.0	140.0	3	147	1C9
非靶向siRNA	5 nM	10.0	140.0	3	147	1E3
siRNA	5 nM	10.0	140.0	3	147	$2 \times 10^6$ 2ml

#### shRNA載體轉染

shRNA質體	濃度 ng/ul	DNA 16.6 ug	DNA 體積	OPTI	試管	FreeStyle MAX	OPTI	細胞
pcDNA3.1-Dab2-HDAC8	3659.9	4.54	100.0	400.0	500.0	16.6	483.4	DXB11
pcDNA3.1-BAX	3249.2	5.11	100.0	400.0	500.0	16.6	483.4	
pcDNA3.1-凋亡蛋白酶3	2850.3	5.82	100.0	400.0	500.0	16.6	483.4	$10 \times 10^6$ 10ml
pcDNA3.1-BAX-凋亡蛋白酶3	2892.7	5.74	100.0	400.0	500.0	16.6	483.4	

#### 蛋白質表現

【0081】對於測試CHO細胞中之蛋白質/抗體產生，抗體/蛋白質表現構築體可來自市售來源或基於此項技術中已知之程序製備且經轉染至用於抗體或蛋白質之短暫表現之測試CHO細胞中。培養經轉染之CHO細胞適當的持續時間(例如3天)以產生抗體。

【0082】 可使用任何適合的方法評定蛋白質表現水準。舉例而言，GreatEscAPE™化學螢光套組獲自Clontech。藉由用ddH<sub>2</sub>O稀釋5×稀釋緩衝液1:5來製備1×稀釋緩衝液。

【0083】 為了評估蛋白質表現水準，將來自經轉染細胞之25 µl細胞培養基移轉至96孔微量滴定盤中或將經轉染細胞模擬至96孔微量滴定盤。必要時，盤可密封且冷凍在-20°C下以便將來分析。在96孔微量滴定盤中將75 µl 1×稀釋緩衝液添加至各樣品中。用黏著鋁箔或規則96孔蓋子密封該盤且使用加熱塊在65°C下或水浴培育經稀釋之樣品30分鐘。

【0084】 在冰上冷卻樣品2-3分鐘，隨後平衡至室溫。將100 µl SEAP受質溶液添加至各樣品中。在讀取之前在室溫下培育30分鐘。使用96孔盤讀取器光度計(例如CLARIOstar®)偵測且記錄化學螢光信號。

使用即時PCR之基因減弱分析

【0085】 靶基因表現水準可用QPCR評估。簡言之，來自細胞之RNA使用RNA純化試劑(來自Qiagen)提取且使用NanoDrop 2000定量。使用以下條件進行QPCR反應(表5)：

表5

Power SYBR® Green RT-PCR混合物(2×)	5 µl
10 µM正向引子(表4)	0.5 µl
10 µM反向引子(表4)	0.5 µl
RT酶混合物(125×)	0.08 µl
模板gDNA	50 ng
超純水	直至10 µl

使用StepOne 即時PCR機械，用以下方案進行QPCR (表6)：

表6

階段	步驟	溫度	時間
保持	逆轉錄	48°C	30分鐘
保持	AmpliTaq Gold®DNA聚合	95°C	10分鐘

	酶活化，UP (超純)		
循環(40次 循環)	變性	95°C	15秒
	黏合/延伸	60°C	1分鐘
熔化曲線 (視情況)	變性	95°C	15秒
	黏合	60°C	15秒
	變性	95°C	15秒

為了評估凋亡基因(凋亡蛋白酶3及BAX)及其他基因(例如HDAC8及DAB2)之表現水準，使用以下引子(表7)：

表7

基因	引子	長度	引子序列(5'→3')	SEQ ID No
HDAC8	HDAC8-F	24	CTATGCAGCAGCTATAGCAGGAGC	9
	HDAC8-R	22	CTTTCTTTGCGTGATGCCACCC	10
	HDAC8-F-2	25	CCAGGAACAGGTGACATGTCTGATG	11
	HDAC8-R-2	23	GGTGTGGAGCCTTTCACAGATG	12
Dab2	Dab2-F	23	GGCCAGATTCAAAGGTGATGGTG	13
	Dab2-R	27	CATCATAGAATCTTGGCTCATTTTGTC	14
	Dab2-F-2	26	GTGCAGCTTAAACCTAACATTCTAC	15
	Dab2-R-2	24	GAGATGGTCCCATGTGCTTTTGAG	16
BAX	Bax-F	24	ATGAGCTGGACAGCAACATGGAGC	17
	Bax-R	25	AGTTGAAGTTGCCATCAGCAAACAT	18
	Bax-F-2	19	CCGAGAGCGGCTGCTTGTC	19
	Bax -R-2	25	GCCACAAAGATAGTCACTGTCTGCC	20
凋亡蛋白酶3	凋亡蛋白酶3-F	26	GGAGAACAATGAAACCTCAGTAGATT	21
	凋亡蛋白酶3-R	27	CTATTGTCCAGATACATTCCAGAGTCC	22
	凋亡蛋白酶3-F-2	24	CACCAGAGATTAAAGGACCATGGC	23
	凋亡蛋白酶3-R-2	21	GGAAGCCTGGAGCACCACCTC	24
	凋亡蛋白酶3-F-3	20	CAAAGGACGGGTCCTGGTTC	25
	凋亡蛋白酶3-R-3	22	CCTTCCGGTAACTCGAGTAAG	26
	凋亡蛋白酶3-F-4	22	CTTACTCGAGTTAACCGGAAGG	27
	凋亡蛋白酶3-R-4	23	GCATGGACACAATACCGGAATC	28

【0086】即使本發明之實施例已用有限數目之實例加以說明，熟習此項技術者仍應理解，其他修飾及變化在不脫離本發明之範疇的情況下係可能的。因此，本發明之保護範疇應僅受所附申請專利範圍限制。

## 【序列表】

- <110> 財團法人生物技術開發中心  
DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY
- <120> 具有增進蛋白質表現功效的宿主細胞及其用途
- <140> TW107134366  
<141> 2018-09-28
- <150> US 62/610,918  
<151> 2017-12-27
- <160> 28
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 合成
- <400> 1  
gcatacagga tgagaagta 19
- <210> 2  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 合成
- <400> 2  
cagcaagca gaagagaat 19
- <210> 3  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 合成
- <400> 3  
ccaangtccc cgagetaat 19
- <210> 4  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 合成
- <400> 4  
cgatagaatt tgagtcctt 19
- <210> 5  
<211> 26



<212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 5  
 aacaattgcc cagtggaaag acgcgc 26

<210> 6  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 6  
 aagaattccc cagtggaaag acgcgc 26

<210> 7  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 7  
 aaggtaccaa ctgctgaggg ctggac 26

<210> 8  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 8  
 ataccggga actgctgagg gctggac 27

<210> 9  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 9  
 ctatgcagca gctatagcag gagc 24

<210> 10  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成  
  
 <400> 10

etttetttgc gtgatgceac cc	22
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 11	
ccaggaacag gtgacatgic tgatg	25
<210> 12	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 12	
ggtgttggag ccttccacag atg	23
<210> 13	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 13	
ggccagatcc aaaggtgatg glg	23
<210> 14	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 14	
catcatagaa tcttggctca ttttgc	27
<210> 15	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成	
<400> 15	
gtgcagctta aacctaaaca ttctac	26
<210> 16	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>  
 <223> 合成  
 <400> 16  
 gagatgggcc catgtgcttt tsag 24

<210> 17  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 17  
 atgagctgga cagcaacatg gagg 24

<210> 18  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 18  
 agttgaagtt gccatcagca aacat 25

<210> 19  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 19  
 ccgagagcgg ctgcttggc 19

<210> 20  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 20  
 gccacaaaga tagtactgt ctgcc 25

<210> 21  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成  
 <400> 21  
 ggagaacaat gaaacctcag tagatt 26

<210>	22	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成	
<400>	22	
	ctattgtcca gatacattcc agagtc	27
<210>	23	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成	
<400>	23	
	caccagagat taaaggacca tggc	24
<210>	24	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成	
<400>	24	
	agaagcctgg agcaccacct c	21
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成	
<400>	25	
	caaaggacgg gtctctggttc	20
<210>	26	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成	
<400>	26	
	ccttccgggtt aactcgagta ag	22
<210>	27	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 合成

<400> 27

cttactcgag ttaaccggaa gg

22

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 28

gcatggacac aatacacgga atc

23

## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種用於蛋白質表現之宿主細胞，其中該宿主細胞包含相比於野生型細胞表現水準減弱至少15%之基因，其中該基因為凋亡蛋白酶3，其中該宿主細胞可穩定繼代至少60代，且該宿主細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，其中該宿主細胞係單一細胞株，以及該宿主細胞相較於野生型細胞具有增進的蛋白質產量及/或分泌效率。

### 【第2項】

如請求項1之宿主細胞，其中該基因之較低表現水準係由RNA干擾造成。

### 【第3項】

如請求項2之宿主細胞，其中該RNA干擾藉由轉染，使用包含靶向凋亡蛋白酶3之shRNA之載體實現。

### 【第4項】

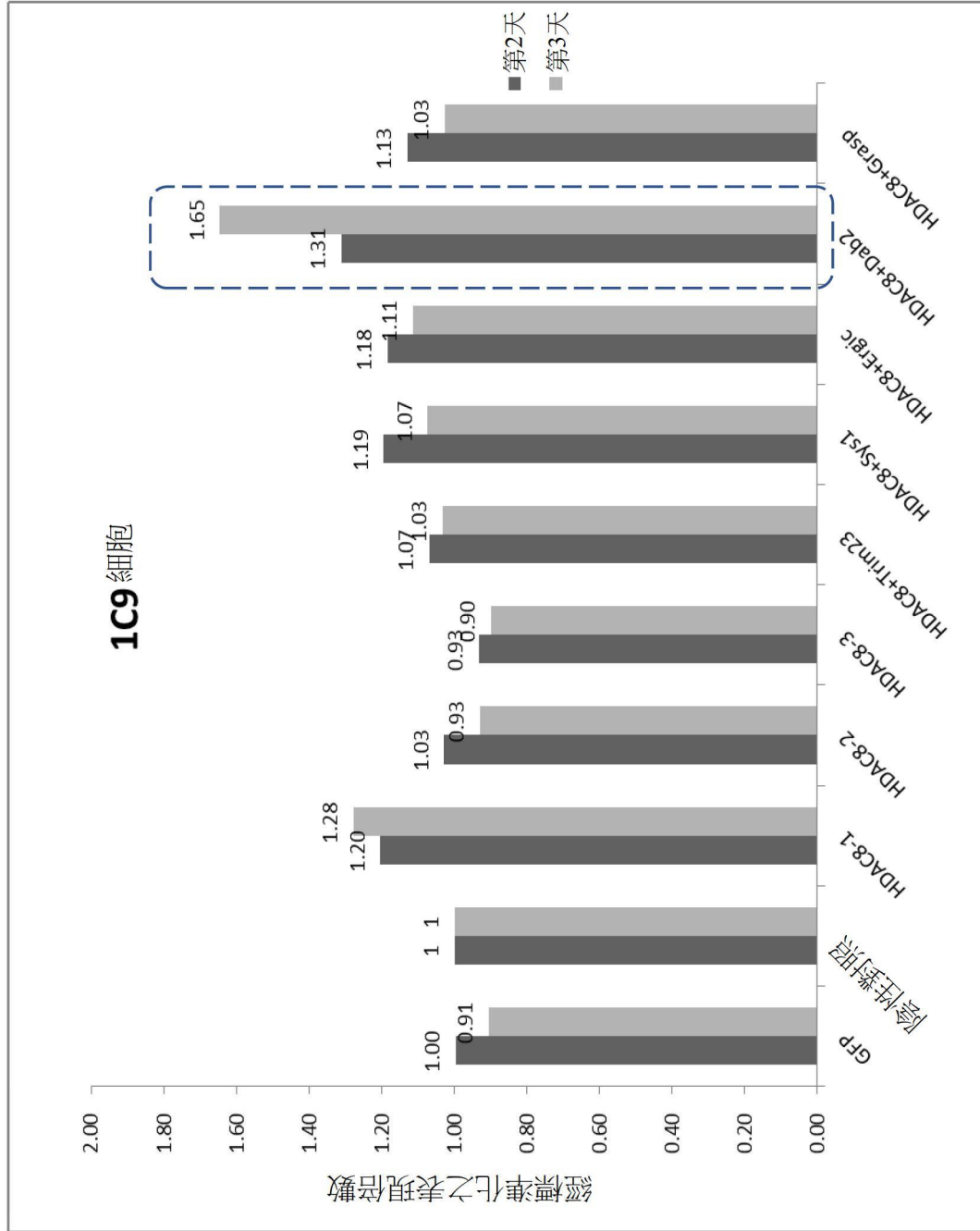
一種使用如請求項1至3中任一項之宿主細胞生產蛋白質之方法，其包含將編碼該蛋白質之表現載體轉染至該宿主細胞中且培養經轉染之宿主細胞。

### 【第5項】

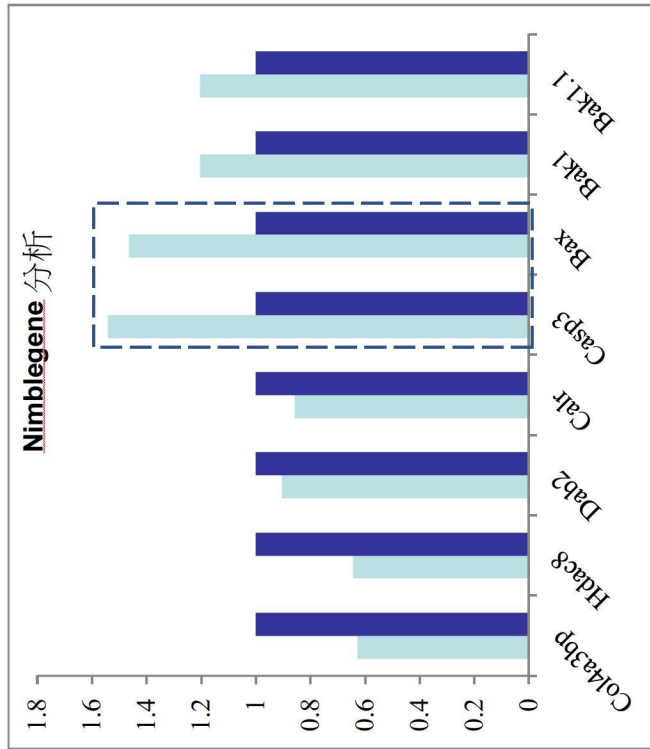
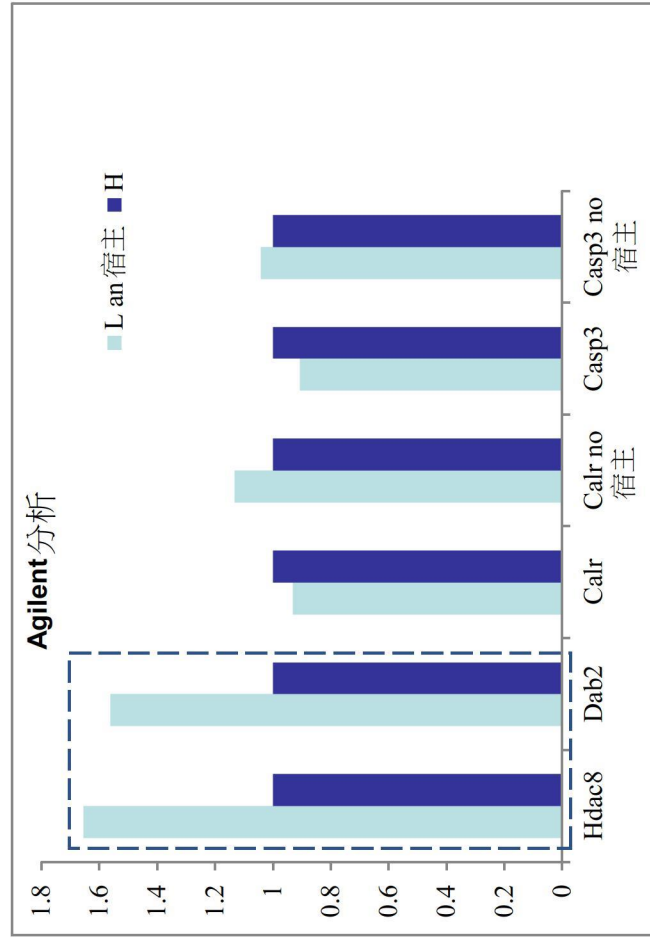
如請求項4之方法，其中該蛋白質為抗體。

### 【第6項】

如請求項5之方法，其中該抗體為針對Her2之抗體、針對間皮素(MSLN)之抗體或針對T細胞免疫球蛋白黏蛋白-3 (Tim3)之抗體。

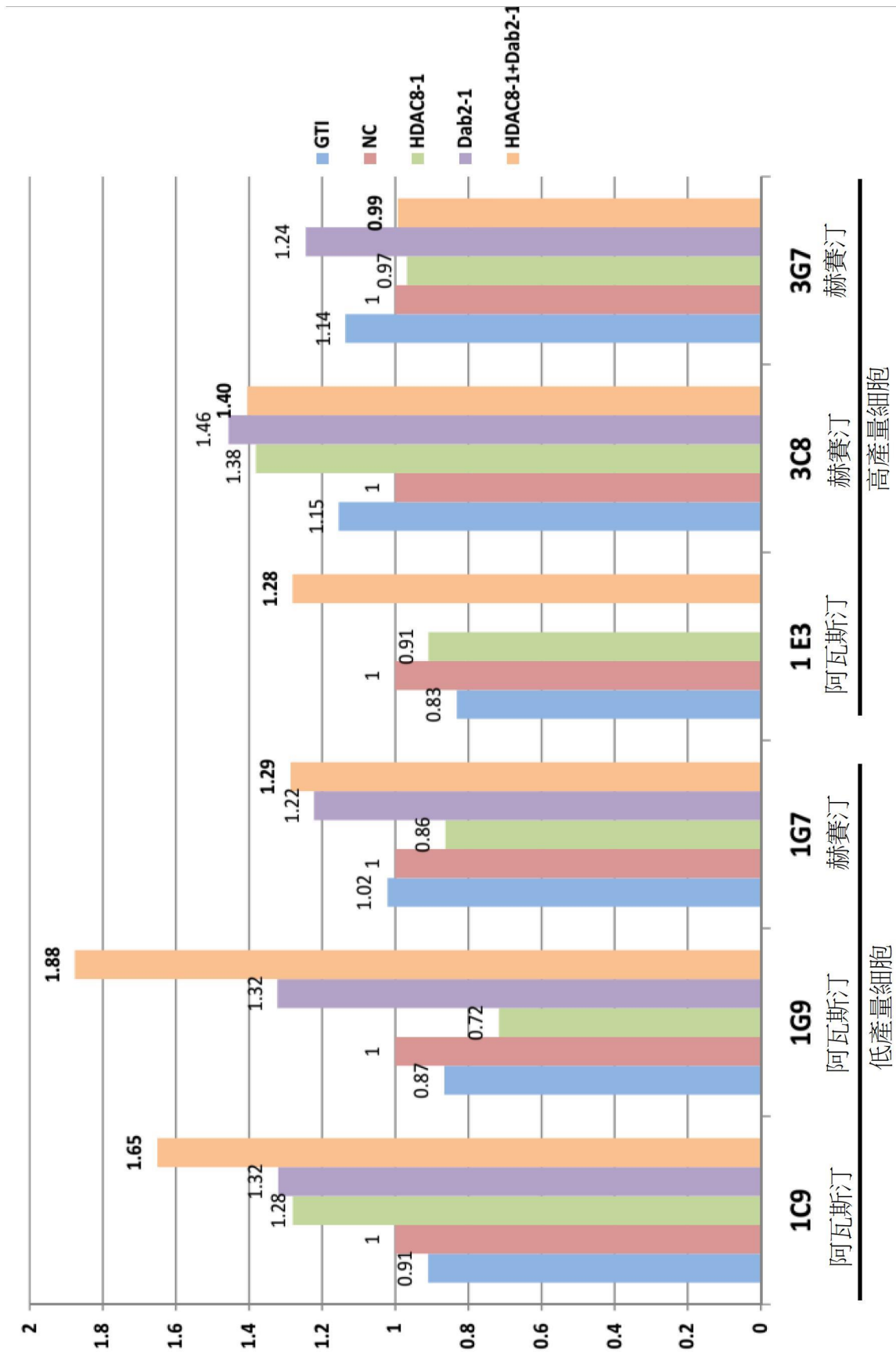


【圖1】

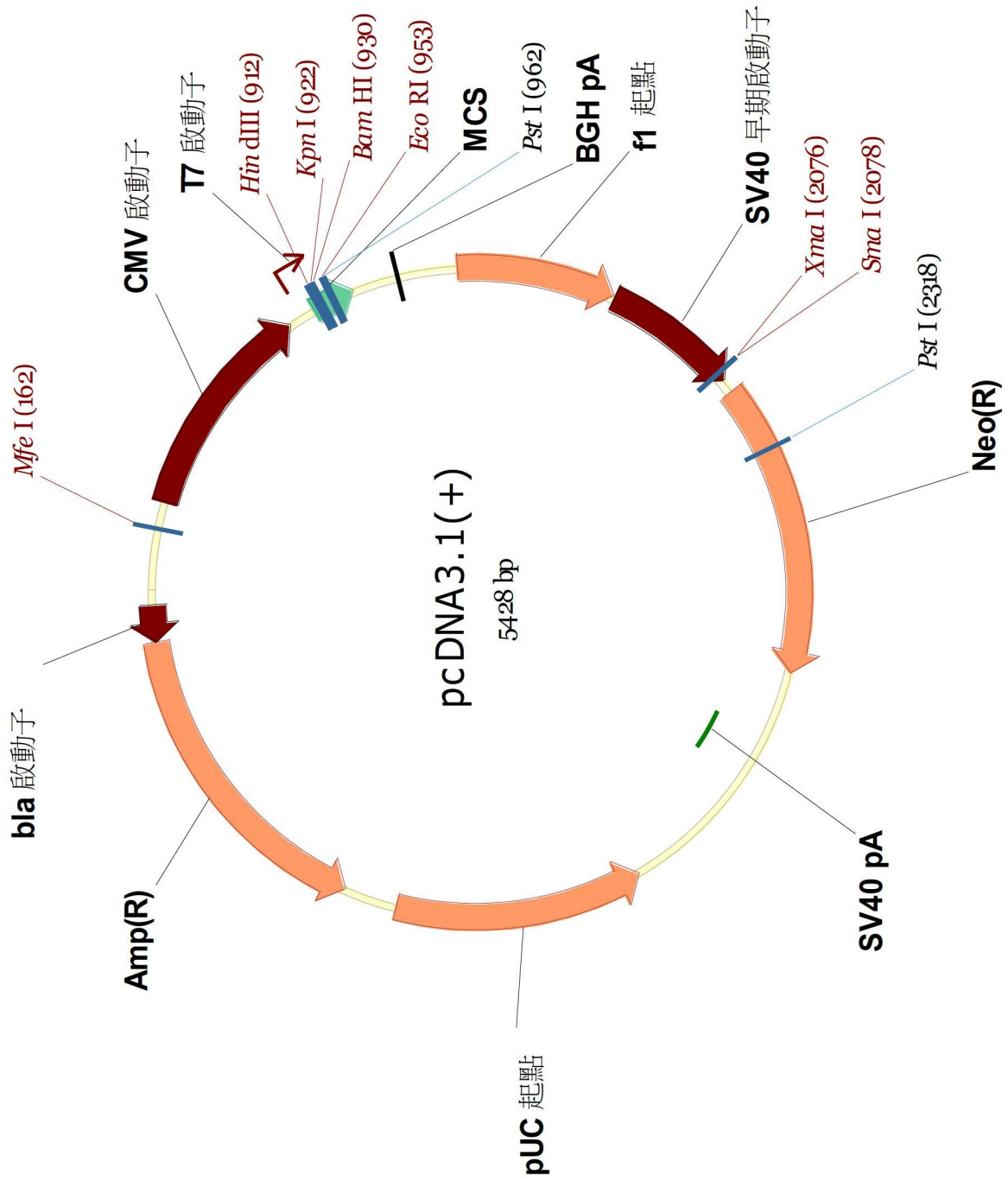


【圖2】

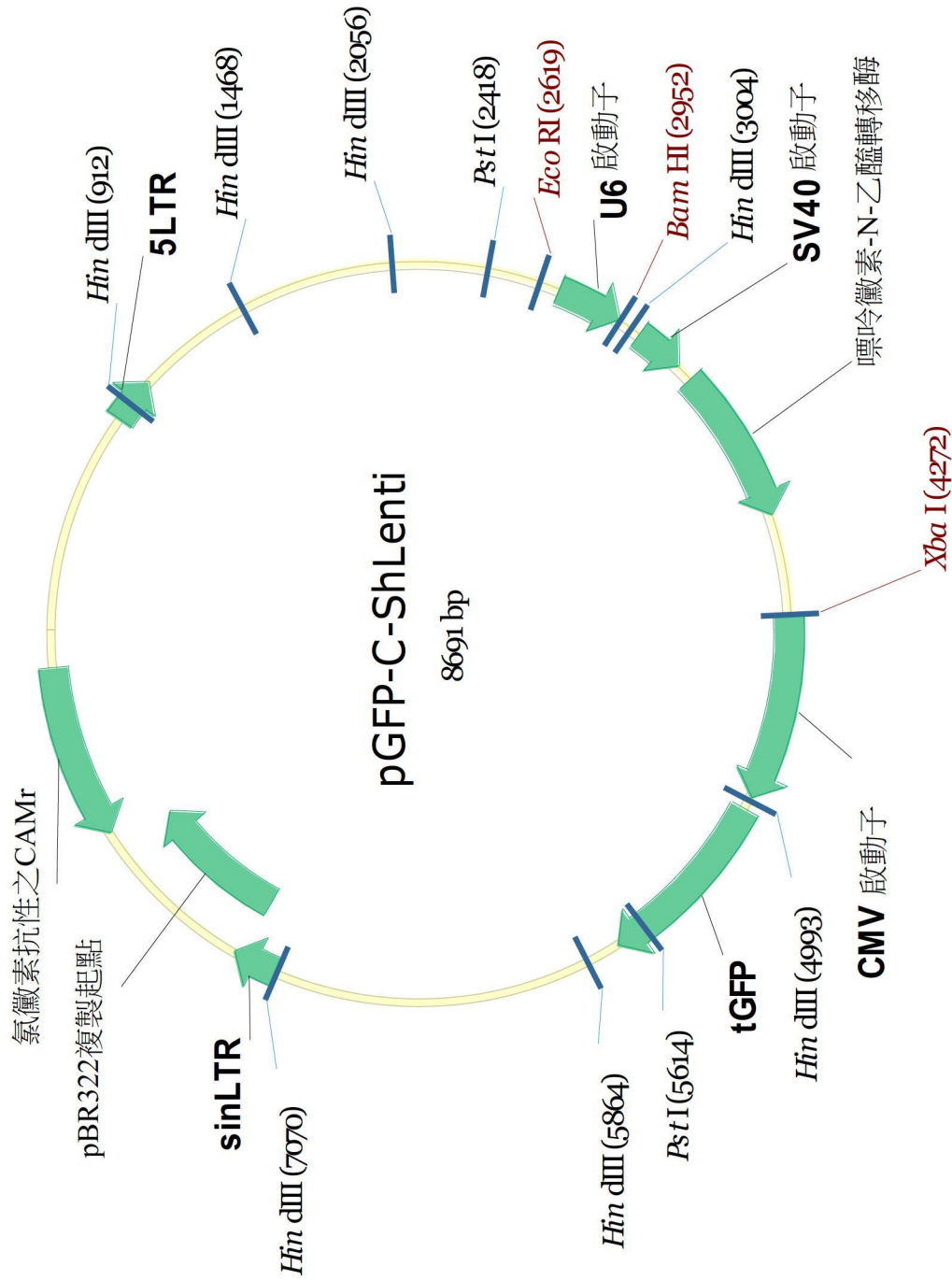




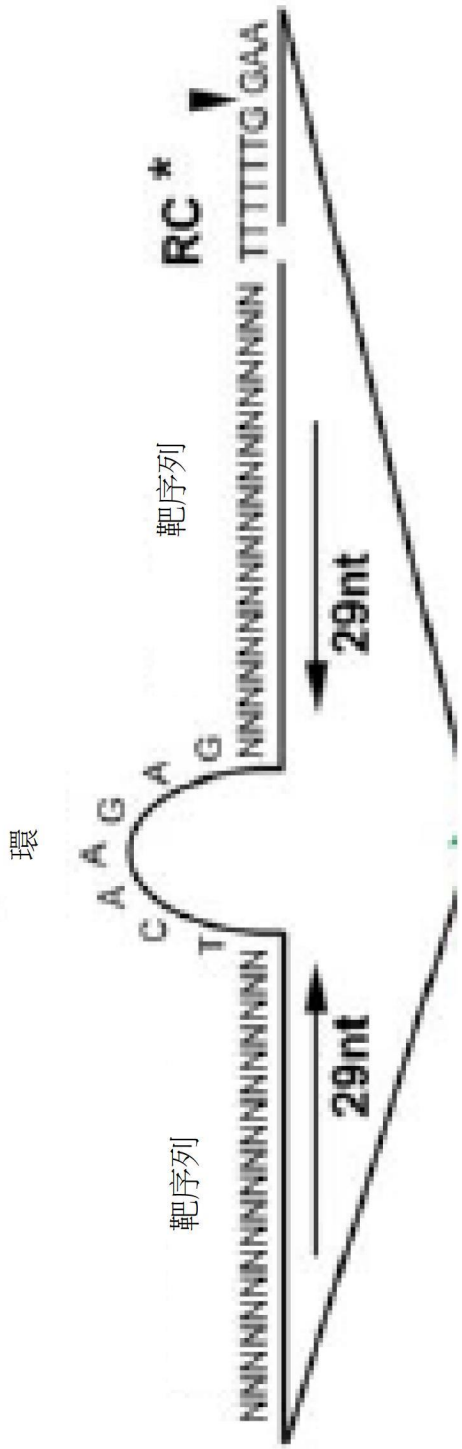
【圖3】



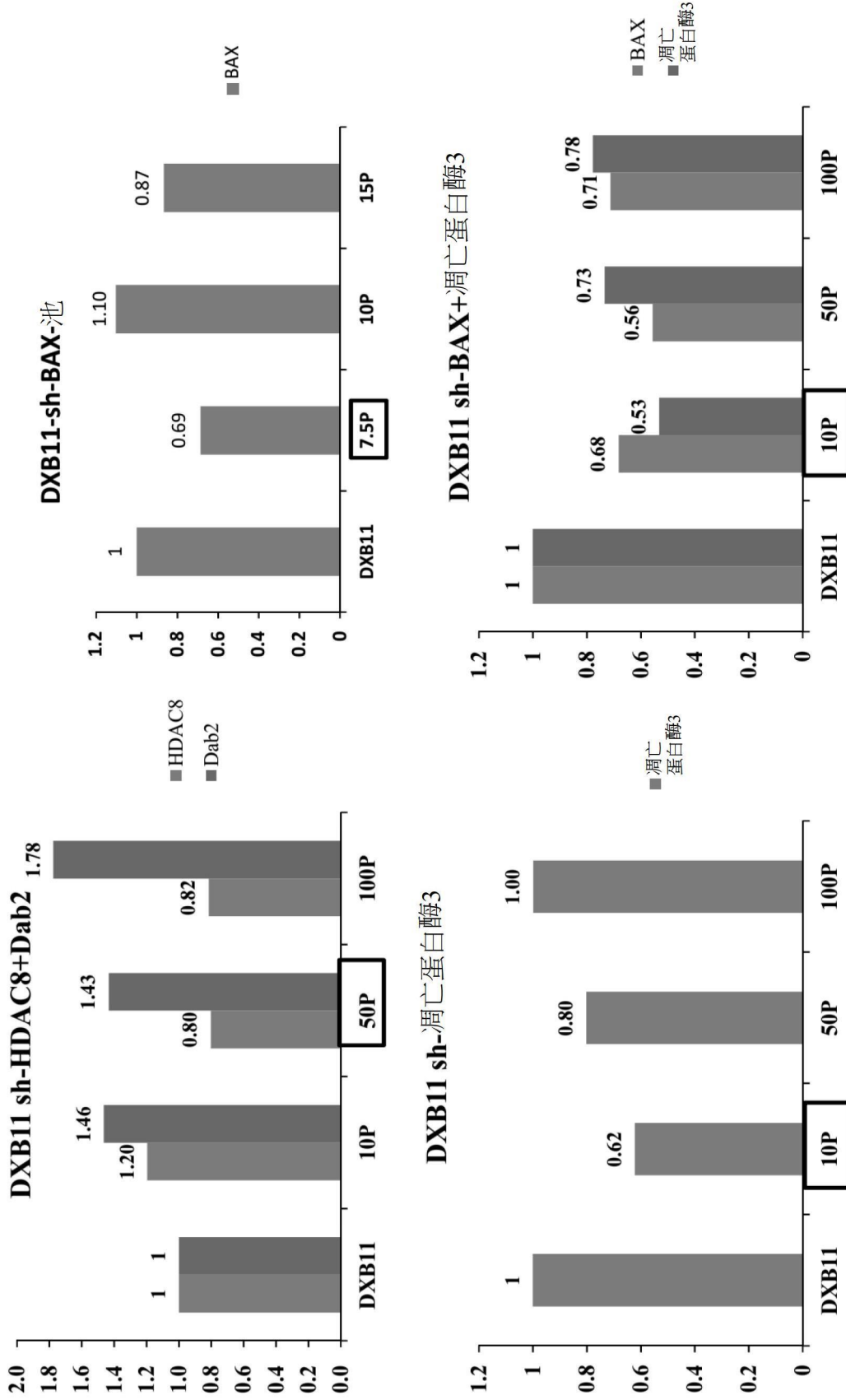
【圖4】



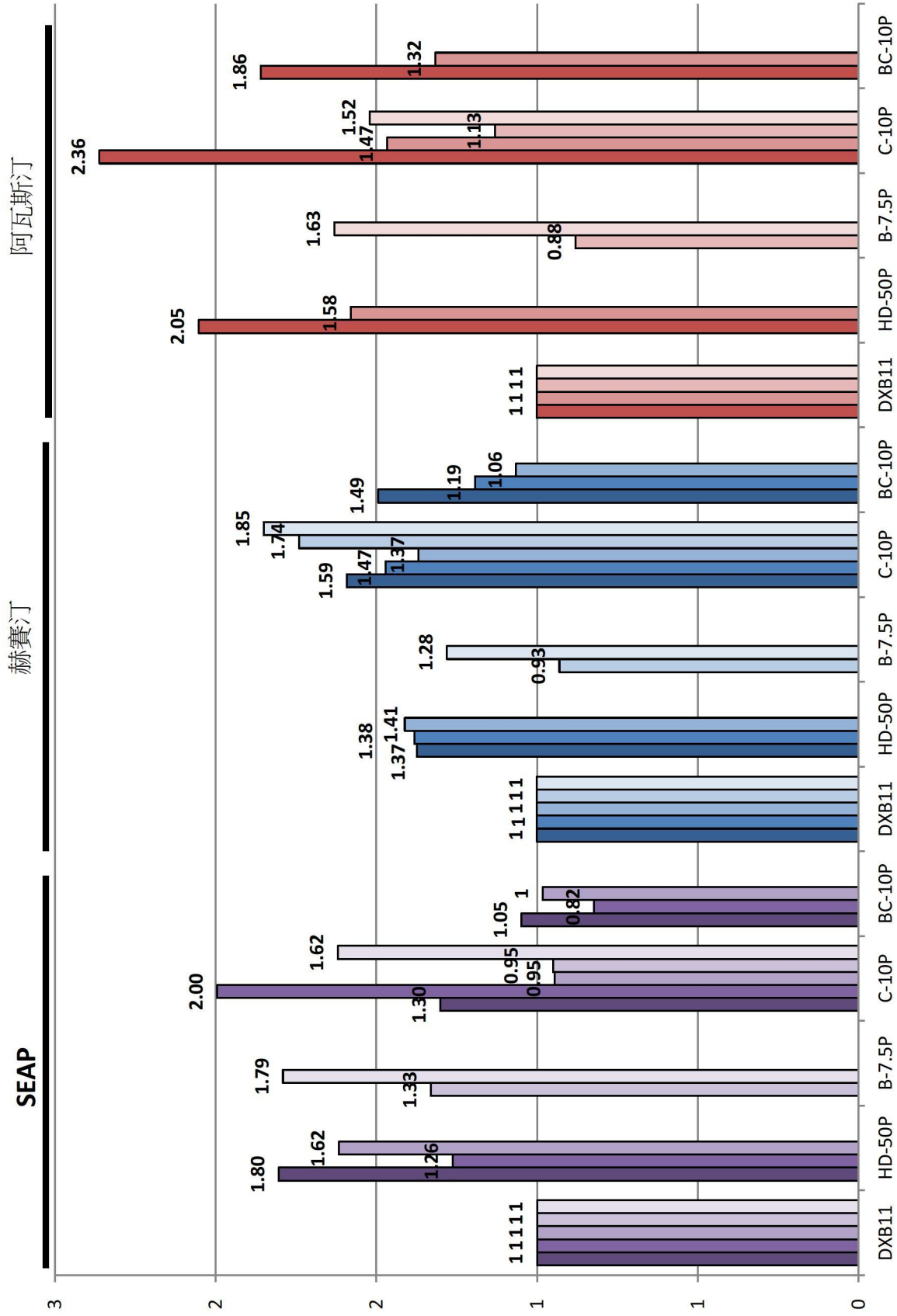
【圖5】



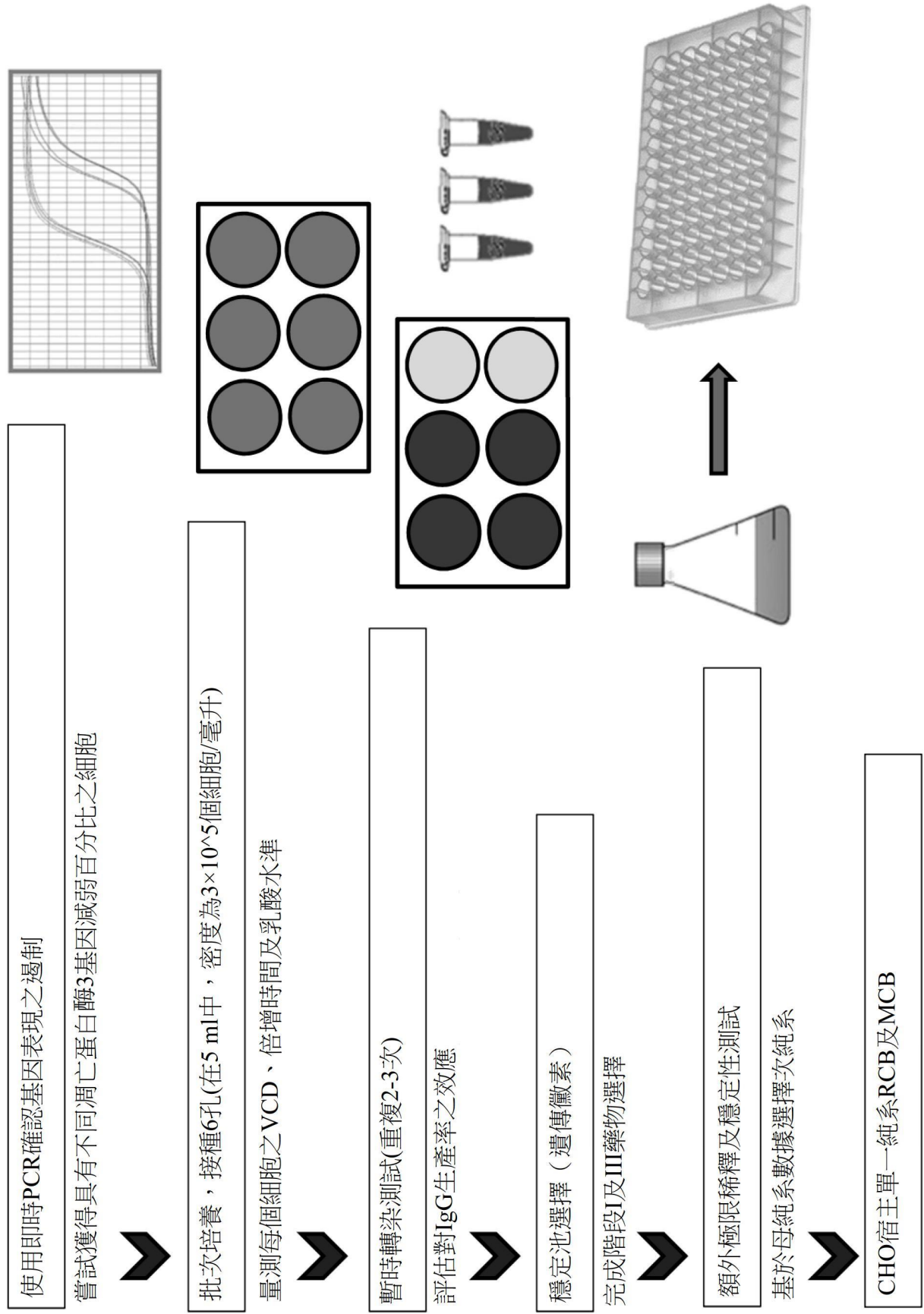
【圖6】



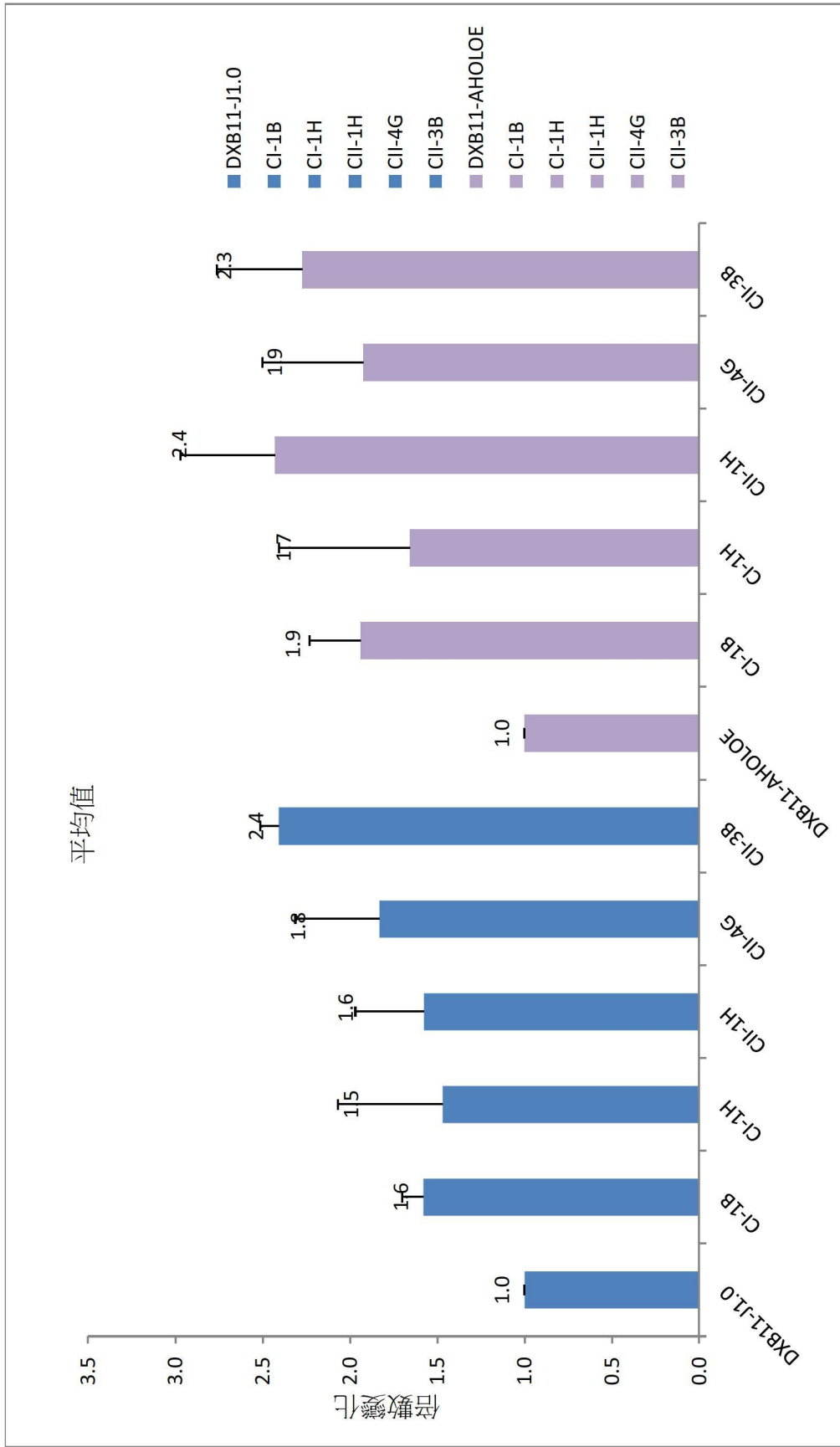
【圖7】



【圖8】



【圖9】



【圖10】

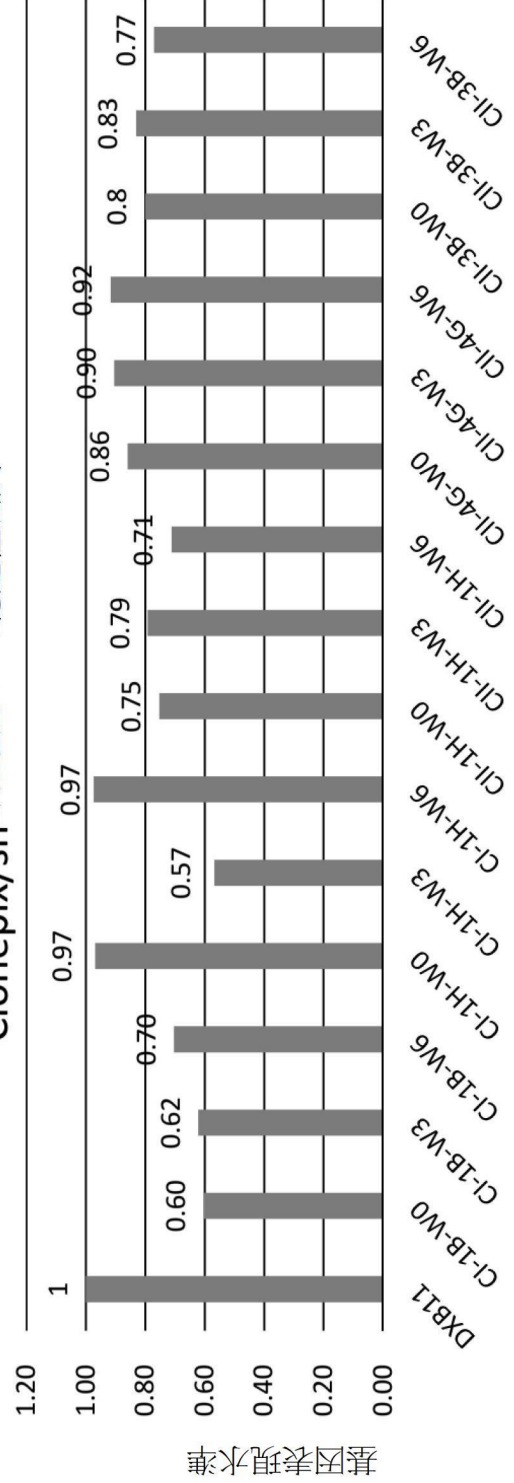


【圖11A】

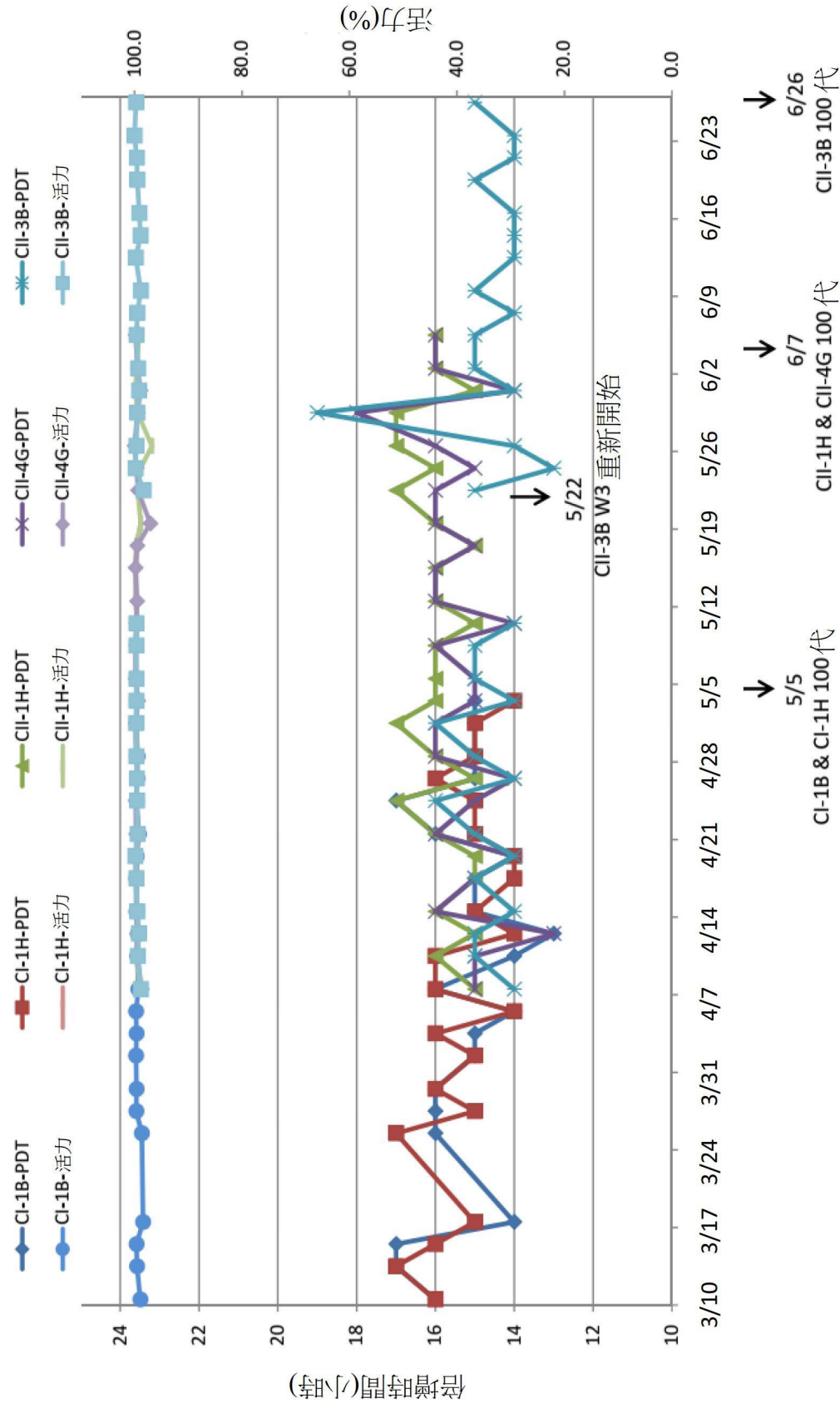
基因表現	*10 <sup>6</sup> 個細胞/毫升	PDT			乳酸	乳酸/細胞數目
		D0	D4	D5		
Clonopixil	CI-1B-w0	0.31	14.43	20.86	0.089	0.004
	CI-1B-w3	0.30	13.05	19.15	0.061	0.003
	CI-1B-w6	0.31	13.55	20.52	0.095	0.005
	CI-1H-w0	0.28	15.45	19.40	0.146	0.008
	CI-1H-w3	0.27	14.64	21.24	0.186	0.009
	CI-1H-w6	0.32	16.70	25.49	0.256	0.010
	CII-1H-w0	0.30	13.66	23.43	0.772	0.033
	CII-1H-w3	0.30	14.26	24.10	0.577	0.024
	CII-1H-w6	0.29	12.41	22.79	0.650	0.029
	CII-4G-w0	0.28	11.36	18.82	0.529	0.028
Clonopixil	CII-4G-w3	0.32	11.56	21.50	0.499	0.023
	CII-4G-w6	0.32	13.02	22.15	0.581	0.026
	CII-3B-w0	0.32	14.35	25.26	0.386	0.015
	CII-3B-w3	0.3	17.03	26.31	0.19	0.007
	CII-3B-w6	0.3	17.91	28.33	0.21	0.007
	D0-D4					
	D5					
	D0-D4					

【圖11B】

Clonopixil/sh-凋亡蛋白酶3 -穩定性測試

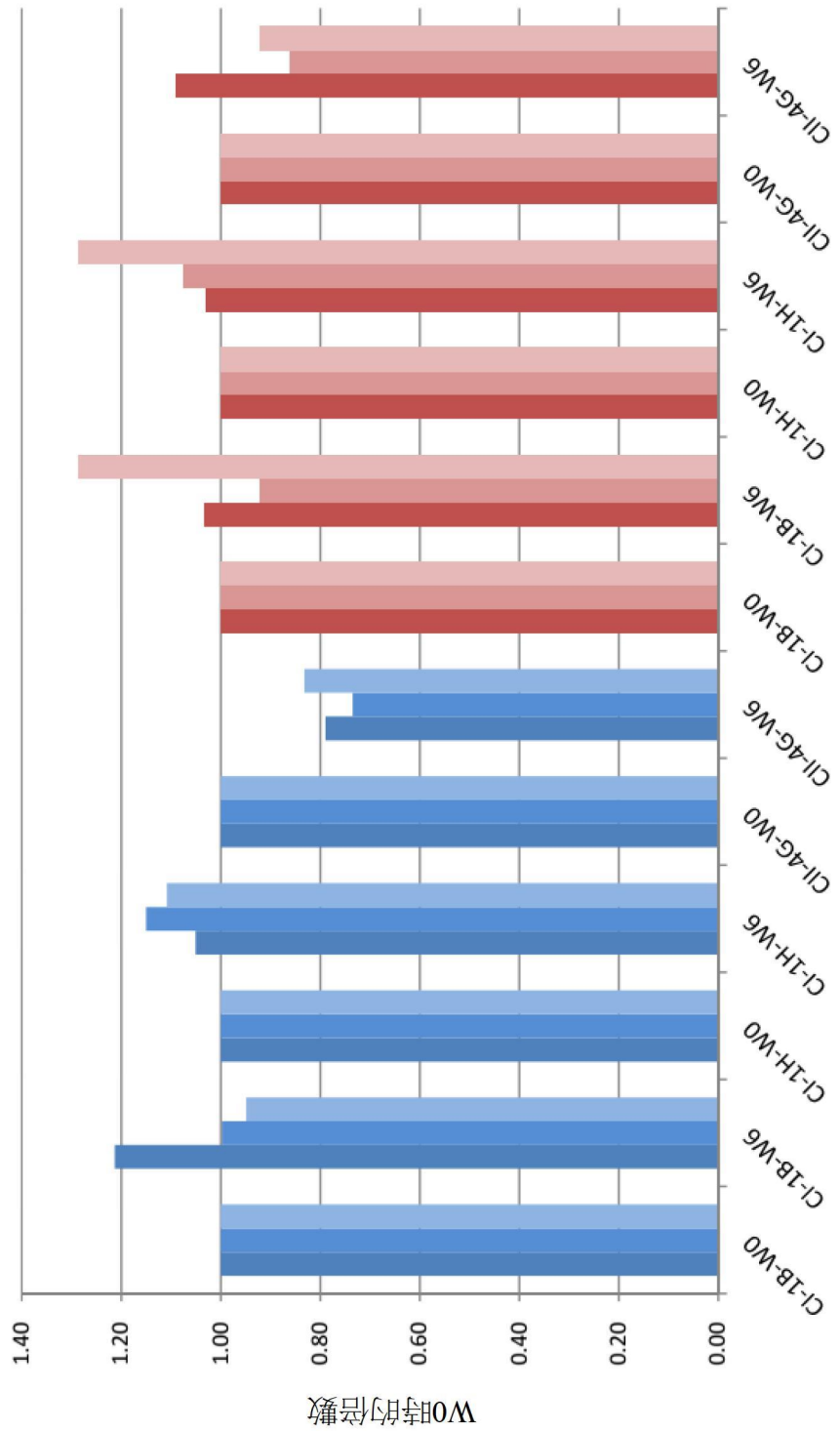


前5名單一純系-穩定性測試

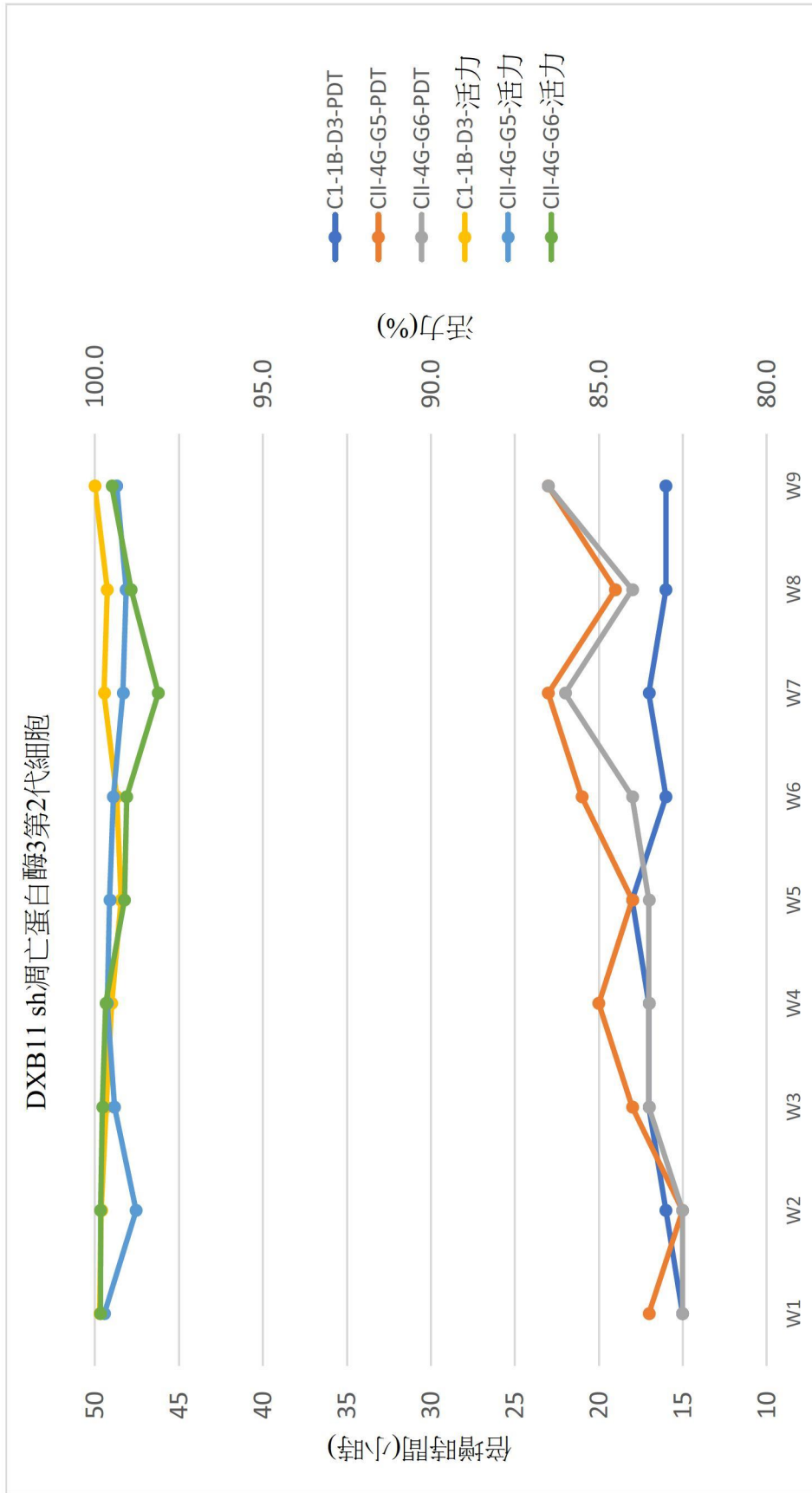


【圖12】

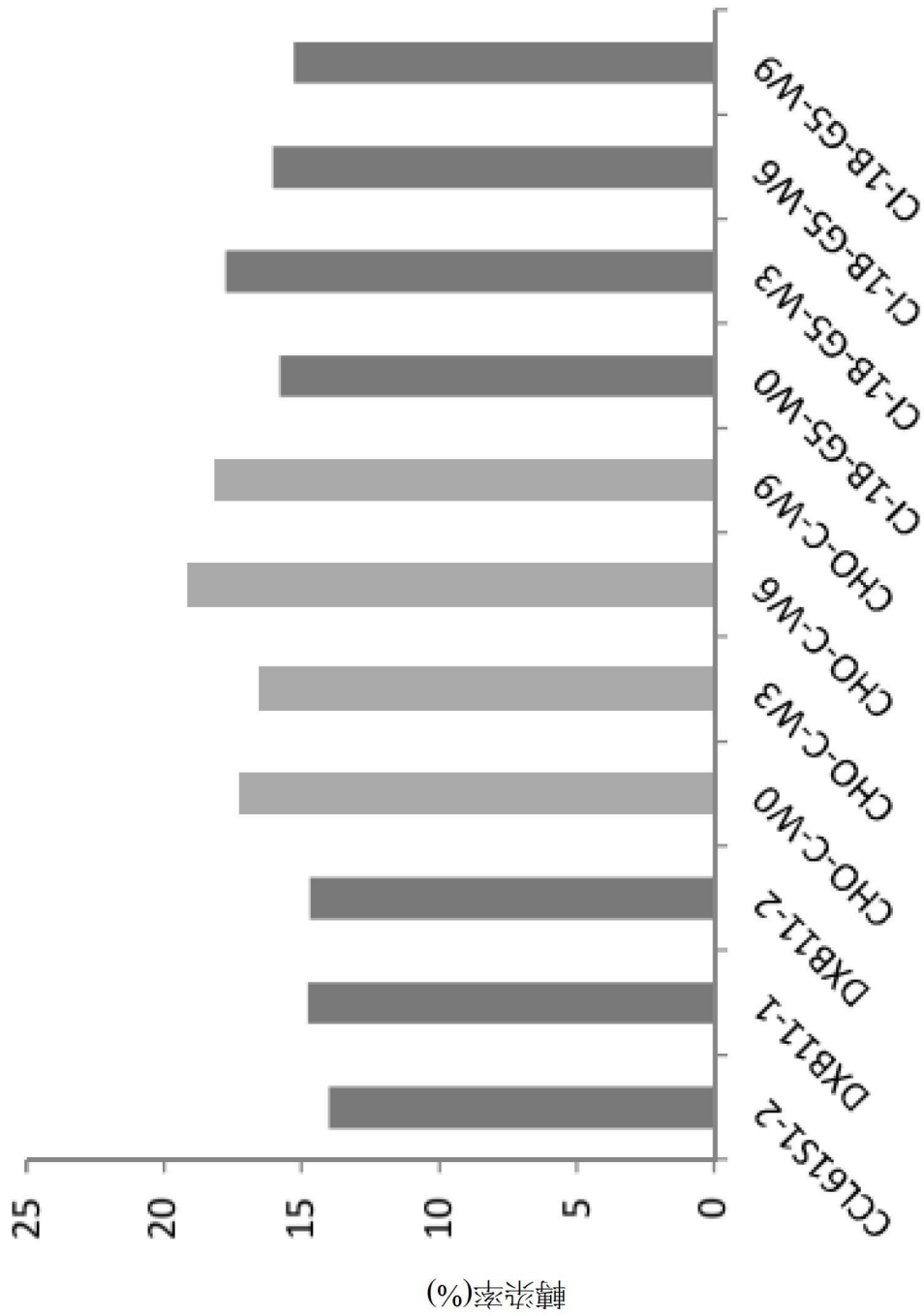
赫賽汀		阿瓦斯汀					
CI-1B-W0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
CI-1B-W6	1.21	1.00	0.95	1.03	0.92	1.29	1.00
CI-1H-W0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
CI-1H-W6	1.05	1.15	1.11	1.03	1.08	1.28	1.00
CII-4G-W0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
CII-4G-W6	0.79	0.73	0.83	1.09	0.86	0.92	0.92



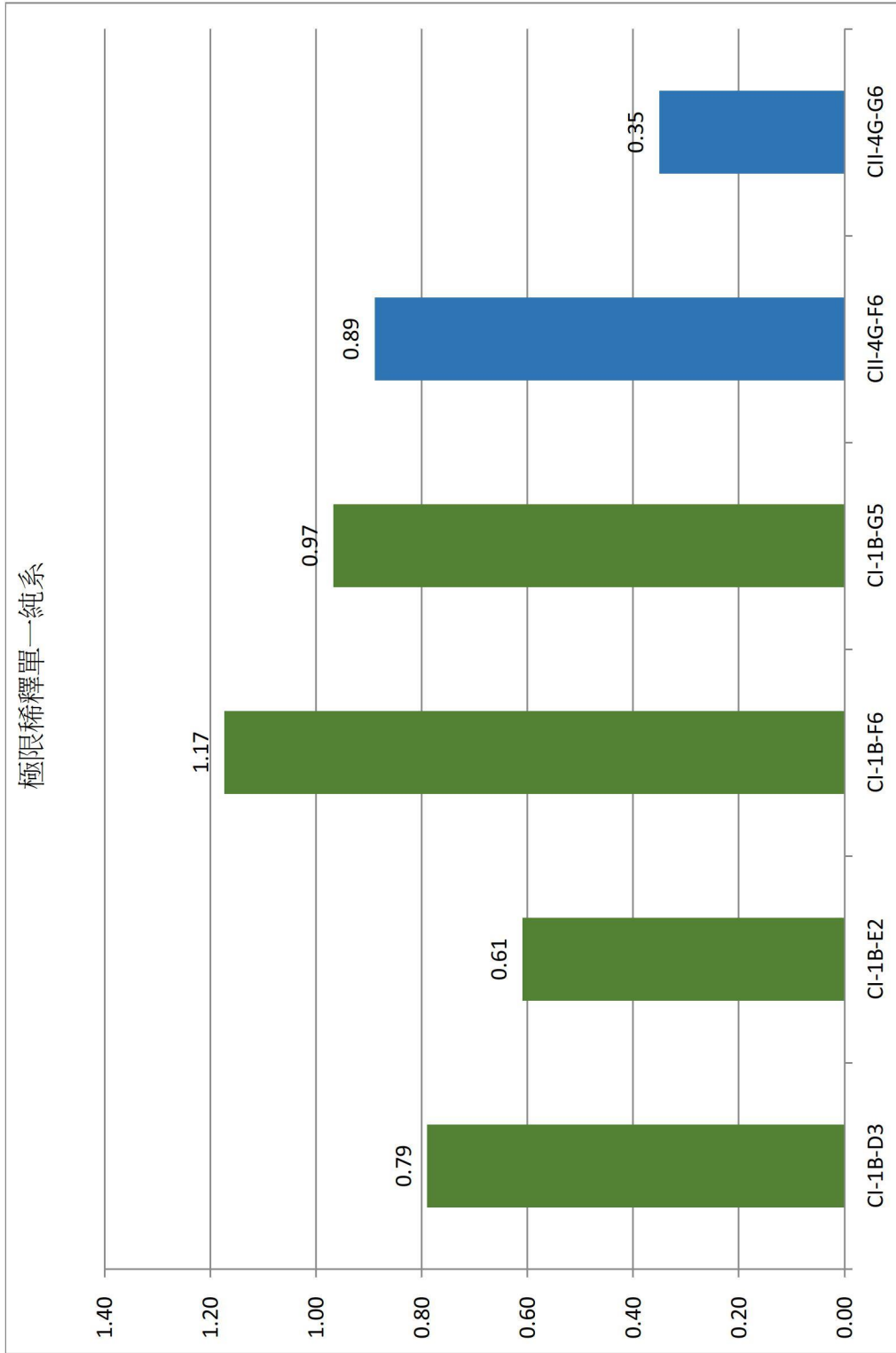
【圖13】



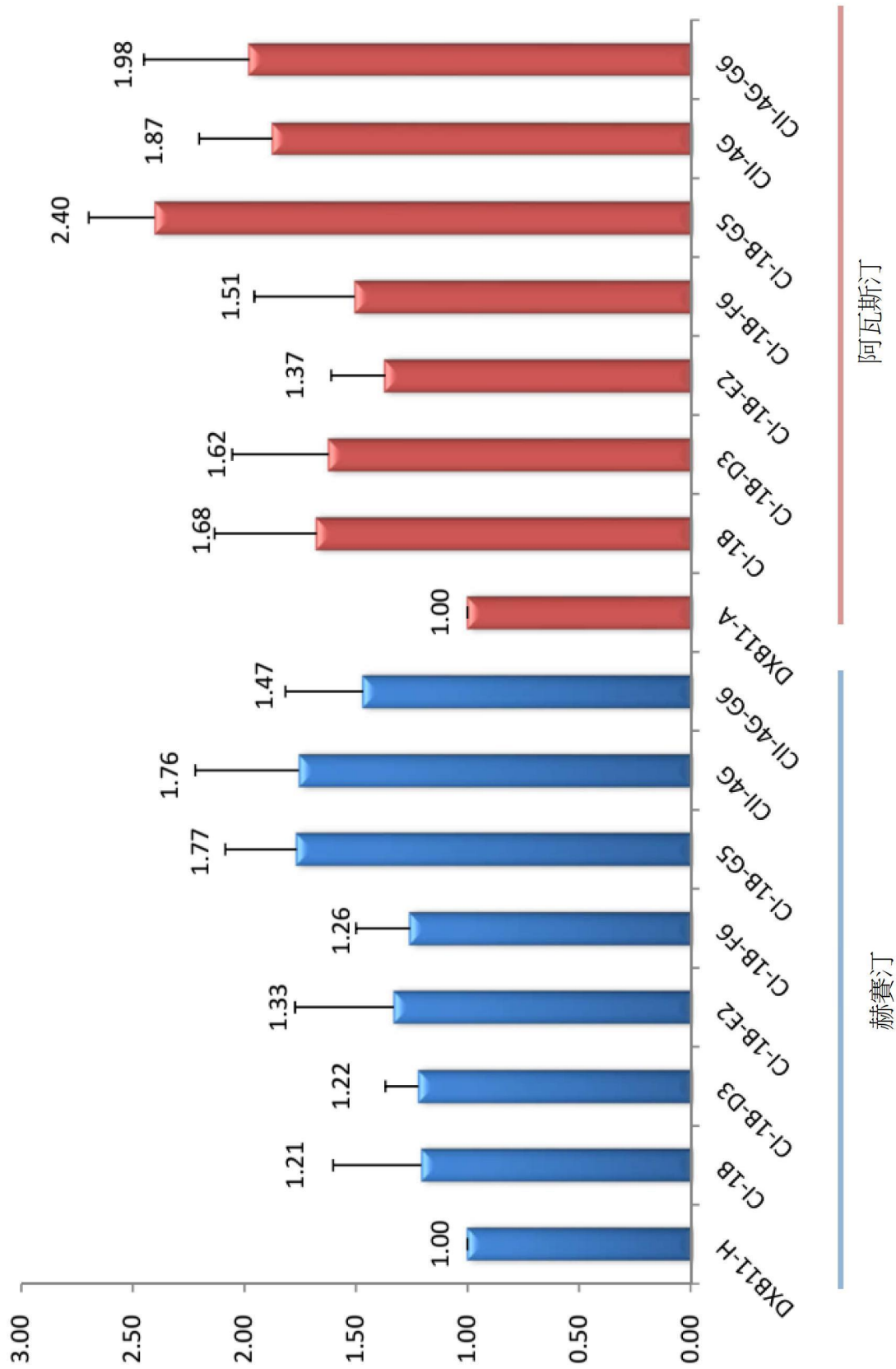
【圖14A】



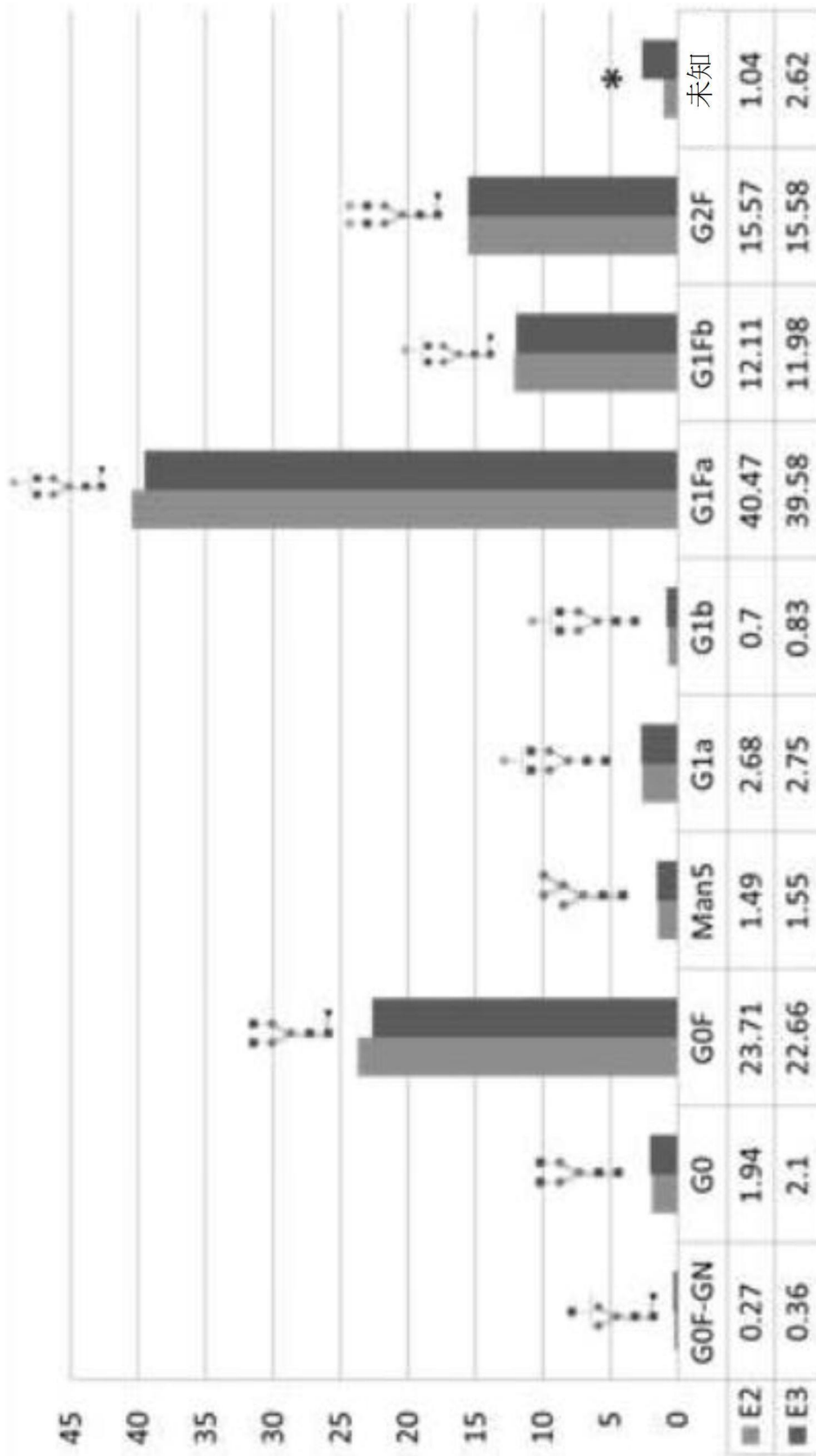
【圖14B】



【圖14C】



【圖15】



【圖16】