



(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 I881970 B

(45) 公告日：中華民國 114 (2025) 年 05 月 01 日

(21) 申請案號：109109257

(22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 03 月 19 日

(51) Int. Cl. : C12N5/18 (2006.01)

C12N15/85 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

(30) 優先權：2019/03/19 歐洲專利局

19305331.1

(71) 申請人：法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72) 發明人：當馬斯 布魯諾 DUMAS, BRUNO LOUIS (FR) ; 路易士 穆罕默德 LOUNIS,

MOHAMMED NABIL (FR)

(74) 代理人：陳彥希；何愛文

(56) 參考文獻：

WO 2016/062837A1

期刊 Bajzikova et al. Reactivation of Dihydroorotate Dehydrogenase-Driven Pyrimidine Biosynthesis Restores Tumor Growth of

Respiration-Deficient Cancer Cells Cell Metab 29(2) 2019 Feb 5 1-50

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：8 共 81 頁

(54) 名稱

含有新穎選擇標記的細胞株及其用於蛋白製造的用途

(57) 摘要

本發明係關於包括部分或完全失活之內生性二氫乳清酸脫氫酶(DHODH)基因之細胞株以及其用於製造重組蛋白的用途。

The present invention concerns a cell line comprising an endogenous dehydroorotate dehydrogenase (DHODH) gene which is partially or fully inactivated, and its use for producing recombinant proteins.

109109257

I881970

【發明摘要】

【中文發明名稱】 含有新穎選擇標記的細胞株及其用於蛋白製造的用途

【英文發明名稱】 NOVEL SELECTION MARKER-COMPRISING CELL
LINE AND USES THEREOF FOR PROTEIN
PRODUCTION

【中文】

本發明係關於包括部分或完全失活之內生性二氫乳清酸脫氫酶(DHODH)基因之細胞株以及其用於製造重組蛋白的用途。

【英文】

The present invention concerns a cell line comprising an endogenous dehydroorotate dehydrogenase (DHODH) gene which is partially or fully inactivated, and its use for producing recombinant proteins.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 含有新穎選擇標記的細胞株及其用於蛋白製造的用途

【英文發明名稱】 NOVEL SELECTION MARKER-COMPRISING CELL
LINE AND USES THEREOF FOR PROTEIN
PRODUCTION

【技術領域】

【0001】 本發明係關於用於蛋白製造之細胞株和選擇標記。

【先前技術】

【0002】 工業規模的重組蛋白製造需要分離出製造高量重組蛋白之選殖株。將異源性基因導入動物宿主細胞並就加入的基因表現進行篩選為一冗長及複雜的方法。此方法涉及轉染和選擇具有穩定長期表現之選殖株，以及篩選對相應的重組蛋白具有高表現率的選殖株。

【0003】 當從表現載體產生表現一重組蛋白之選殖株時，宿主細胞通常係以編碼感興趣蛋白和在相同載體上的選擇標記二者之DNA載體轉染。此一表現載體因此係包括一得以選擇其中有表現載體存在之選殖株的可選擇標記。此一可選擇標記亦可使經轉染的DNA同步擴增，藉此而得以分離出高產量的選殖株。

【0004】 大部分的選擇標記為賦予抗生素或其他毒性物質之抗藥性的蛋白或為細胞存活之必須蛋白。在本項技術中已知有數種此等選擇標記，包括，例如G418、潮黴素(hygromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、博來黴素(zeomycin)、二氫葉酸還原酶(DHFR)、麩醯胺酸合成酶(GS)和次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核苷轉移酶(HPRT)。特言之，GS係廣泛地用作為真核細胞之工業級重組蛋白生產領域中的選擇標記。GS基因允許麩醯胺酸合成，為細胞生長所需，且受到MSX(L-甲硫胺酸磺醯亞胺)抑制。在MSX存在下，只有表現較高量GS的細胞能存活。在適當篩選後，可能選擇出製造外生性蛋白的細胞。

【0005】在先前的申請案WO2016/062837中，發明者們開發了一種以使用二氫乳清酸脫氫酶(DHODH)作為選擇標記為基礎的表現系統。DHODH為一種嘧啶合成所需要的酵素。抑制DHODH的化合物因此係抑制DNA合成且因而抑制細胞增生。此選擇標記因此係包括一編碼用於與DHODH抑制劑，例如來氟米特(leflunomide)和特立氟胺(teriflunomide)組合之DHODH的表現載體。

【0006】然而大部分與上述選擇標記一起使用的抑制劑為有毒的。在DHODH選擇標記的情況下，例如特立氟胺為一強力的免疫抑制劑且其尤其是在大規模處理上就安全性理由可能具挑戰性。在GS選擇標記的情況下，MSX高劑量時為一驚厥劑且可能因此亦有處理問題。在DHFR選擇標記的情況下，甲胺喋呤(methotrexate)已知具有造血和消化毒性，因此亦有處理問題。

【0007】因此，對於其中可進行製造感興趣蛋白選殖株之選擇而不會增加處理化合物之困難性的表現系統，有其需求。

【0008】本發明符合此項需求。

【發明內容】

【0009】本發明係源自於細胞株發明者們的設計，其中由於該細胞株中部分或完全失活的DHODH基因，而可在無尿苷(uridine)的培養基中選出製造感興趣蛋白的細胞。此細胞株，其中DHODH基因為部分或完全失活的，典型地係在添加尿苷的培養基中生長，但當以一包括編碼哺乳動物DHODH，尤其是編碼突變的哺乳動物DHODH之核苷酸序列及一表現感興趣蛋白之表現匣的表現載體轉染時，此培養基典型地被換成無尿苷的培養基，藉此來選擇製造感興趣蛋白之細胞。

【0010】此一表現系統特別有利，因為藉由避開使用抑制劑作為選擇壓力，而增加製造細胞的存活。發明者們進一步驗證此毒性的下降係與高產量有關。

【0011】本發明因此係關於包括部分或完全失活的內生性二氫乳清酸脫氫酶(DHODH)基因的細胞株。

【0012】 在一特定的具體實例中，該細胞株為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株。

【0013】 在一更特定的具體實例中，此細胞株係藉由下列所製造

- a) 使一細胞中的內生性 DHODH 基因失活，尤其是藉由基因編輯法，例如 CRISPR-Cas9 法，及
- b) 在適合產生其中內生性 DHODH 基因為部分或完全失活之細胞株的條件下，於包括尿苷的培養基中培養此細胞。

【0014】 在一特定的具體實例中，該細胞株的內生性 DHODH 基因之所有等位基因為部分或完全失活的。

【0015】 在另一具體實例中，該細胞株進一步係包括一包含編碼外生性哺乳動物 DHODH 之核苷酸序列和至少一用於表現重組蛋白之表現匣的表現載體，其中該外生性 DHODH 係包括與序列 SEQ ID NO: 2 或與序列 SEQ ID NO: 4 至少 60% 相同之序列。

【0016】 在一其特定的具體實例中，該核苷酸序列係包括 SEQ ID NO: 1 之序列或 SEQ ID NO: 3 之序列。

【0017】 在其另外特定的具體實例中，該重組蛋白為一單株抗體。

【0018】 又在其特定的具體實例中，該載體係包括一適用於選殖抗體輕鏈之第一表現匣和一適用於選殖抗體重鏈之第二表現匣。

【0019】 本發明另外的目標為一表現系統，其係包括：

- (i) 包括如上所定義之部分或完全失活的內生性二氫乳清酸脫氫酶(DHODH)基因之細胞株，及
- (ii) 包括一編碼外生性哺乳動物 DHODH 之核苷酸序列和至少一用於表現重組蛋白之表現匣的表現載體，其中該外生性 DHODH 係包括與序列 SEQ ID NO: 2 或與序列 SEQ ID NO: 4 至少 60% 相同之序列。

【0020】 在一特定的具體實例中，該核苷酸序列係包括 SEQ ID NO: 1 之序列或 SEQ ID NO: 3 之序列。

【0021】 在另外特定的具體實例中，該重組蛋白為一單株抗體。

【0022】 又在一特定的具體實例中，該載體係包括一適用於選殖抗體輕鏈之第一表現匣和一適用於選殖抗體重鏈之第二表現匣。

【0023】 本發明進一步係關於(i)如上所定義之細胞株，或如上所定義之表現系統，以及(ii)無尿苷之培養基。

【0024】 本發明另外的目標係關於活體外製造重組蛋白之方法，其係包括下列步驟：

A) a1)提供進一步包括一表現載體之如上所定義的細胞株，而該表現載體係包括一編碼外生性哺乳動物 DHODH 之核苷酸序列和至少一用於表現重組蛋白之表現匣，其中該外生性 DHODH 係包括與序列 SEQ ID NO: 2 或與序列 SEQ ID NO: 4 至少 60%相同之序列；

或

a2)提供一如上所定義的細胞株，及

a2')將一如上所定義的表現載體導入步驟 a2)所提供的細胞株中；

或

a3)提供一包括內生性 DHODH 基因之細胞株，

a3')使步驟 a3)所提供的細胞株中內生性 DHODH 基因部分或完全失活，及

a3'')將如上所定義的表現載體導入步驟 a3')所得到的包括部分或完全失活之內生性 DHODH 基因的細胞株中；

B) 於適合製造此重組蛋白之條件下培養該細胞株；及

C) 分離及/或純化該重組蛋白。

【0025】 在一特定的具體實例中，該方法之步驟B)係在一無尿苷的培養基中進行。

【0026】 在一另外特定的具體實例中，該方法進一步係包括將該重組蛋白調配成醫藥組成物之步驟D)。

【0027】 本發明進一步係關於如上所定義的細胞株、如上所定義的表現系統或如上所定義的套組用於製造重組蛋白之用途。

【0028】 在一特定的具體實例中，細胞株、表現系統或套組係與無尿苷的培養基組合使用。

【圖式簡單說明】

【0029】 圖1係顯示參照2018年12月21日於Genbank NCBI可取得的基因ID: 100756632之人類DHODH基因的基因體結構。

【0030】 圖2係顯示序列n°1 DHODH外顯子2. PAM：前間隔鄰近模體序列(Protospacer Adjacent Motif sequence)(TGG)之比對。

【0031】 圖3係顯示在不同濃度特立氟胺作為選擇劑之存在下，篩選用於製造抗體之不同KO(基因剔除)DHODH選植株。

【0032】 圖4係顯示使用不同DHODH變體作為選擇標記所製造的蛋白之產量(以mg/mL表示)。

【0033】 圖5係顯示使用人類DHODH G202A或人類GS選擇標記和DHODH KO或野生型CHO細胞在第14天之脂解酶產量。

【0034】 圖6係顯示使用人類DHODH G202A或人類GS選擇標記和DHODH KO或野生型CHO細胞在第14天之單株抗體mAb-B產量。

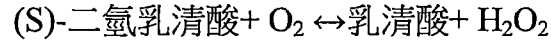
【0035】 圖7係顯示使用人類DHODH G202A及/或人類GS選擇標記和DHODH KO或野生型CHO細胞在第14天之雙專一性抗體產量。

【0036】 圖8係顯示使用人類DHODH G202A和人類GS選擇標記以及DHODH KO或野生型CHO細胞在第14天之三專一性抗體產量。

【實施方式】

二氫乳清酸脫氫酶

【0037】 如文中所用，術語「二氫乳清酸脫氫酶」或「DHODH」係指能催化以下式反應表示之二氫乳清酸(4,5-二氫乳清酸或2,6-二側氧-1,3-二吡啶-4-羧酸)轉變為乳清酸(乳清酸或1,2,3,6-四氫-2,6-二側氧-4-嘧啶羧酸)的多肽：



此一多肽係歸類於 Enzyme Commission (EC) 編號 1.3.3.1。能催化上述反應的多肽係具有「DHODH 活性」。

【0038】上述反應為合成DNA和RNA所須之單磷酸尿苷(rUMP)全程合成的第四個步驟。抑制DHODH或使其失活因此具有抑制DNA和RNA合成的效應且因而抑制細胞增生。

細胞株

【0039】本發明係關於包括部分或完全失活的內生性二氫乳清酸脫氫酶(DHODH)基因之細胞株。

【0040】此細胞株為真核細胞株，例如哺乳動物細胞株，如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株、猴子細胞株或人類細胞株。

【0041】在一特定的具體實例中，此細胞株為CHO細胞株。

【0042】CHO細胞常用於工業蛋白製造，且許多CHO細胞株已為熟習本項技術者所知。例如，此等CHO細胞株包括可從美國菌種保存中心公開取得的株系，例如CHO-K1細胞株(ATCC編號:CCL-61)、CHO-S細胞株(例如Invitrogen和Gibco所販售的)、CHO DP-12細胞株(ATCC編號CRL-12444和12445)及CHO 1-15細胞株(ATCC編號CRL-9606)。適合工業蛋白製造之另外的細胞株有CHO 9E4細胞株。9E4細胞株係從CHO-K1細胞株的選殖株經由單一細胞選殖方法所建立。9E4細胞株的建立係更深入呈現在**實例1**中。CHO-K1細胞株係在1957年由Puck所製得且存放在ATCC編號為CCL-61。

【0043】為了得到原態糖基化型式之重組人類蛋白，人類細胞例如HEK293(ATCC編號CRL-1573)、HKB11(ATCC編號CRL-12568)、PER-C6(Crucell)、HT1080(ATCC編號CRL-121)、Jurkat、Daudi、Raji和CAP(ATCC編號CRL-1098)細胞亦可用於蛋白製造。

【0044】在一具體實例中，此細胞株能生長於無血清培養基(例如化學成分確定的培養基)及/或懸浮液中。此一細胞株可由熟習本項技術者藉著讓母細胞株適應

生長於無血清培養基中而容易地製得(例如，經由單一細胞選殖，經由逐步適應及/或經由「飢餓和生存」法)。

【0045】本發明之細胞株為一包括部分或完全失活的內生性二氫乳清酸脫氫酶(DHODH)基因之細胞株。

【0046】「內生性DHODH基因」在文中係指正常存在特定環境條件下該特定細胞特定發育時期中的DHODH基因。

【0047】「內生性DHODH基因」與下文所定義的「外生性DHODH」的區別在於該外生性DHODH係藉由如下所定義的表現載體提供，若該表現載體經導入該細胞株中，則其可能存在本發明之細胞株中。

【0048】熟習本項技術者應了解，內生性DHODH基因係依照細胞株而定。例如，在一CHO細胞株中，此內生性DHODH基因為中國倉鼠DHODH基因；在人類細胞株中，此內生性DHODH基因為人類DHODH基因。

【0049】典型地，野生型中國倉鼠DHODH係指包括或由SEQ ID NO: 2所組成的序列，以及具有DHODH活性之其變體。此等變體可例如相當於天然發生在倉鼠物種中的變體(例如等位基因變體或剪接變體)。

【0050】典型地，野生型人類DHODH係指包括或由SEQ ID NO: 4所組成的序列，以及具有DHODH活性之其變體。此等變體可例如相當於天然發生在人類中的變體(例如等位基因變體或剪接變體)。

【0051】如文中所用，「基因」包括編碼一基因產物的DNA區，以及調節基因產物製造的所有DNA區，無論此調節序列有或無與編碼及/或轉錄序列相鄰。因此，基因係包括啟動子序列、終止子、轉譯調節序列例如核糖體結合位點和內部核糖體進入位點、強化子、沉默子、隔絕子、邊界元素、複製起點、基質附著位點和基因座控制區。

【0052】基因「失活」係指相較於對應的野生型細胞之任何基因表現的下降。基因失活可為完全性(完全失活或基因剔除)或部分的(例如，其中基因具有低於

正常表現量之亞效等位基因或在其影響的活性上顯示部分下降之突變基因的產物)。

【0053】 在一特定的具體實例中，此內生性DHODH基因的所有等位基因為部分或完全失活。

【0054】 在一特定的具體實例中，該內生性DHODH基因為完全失活的。

【0055】 在一更特定的具體實例中，此內生性DHODH基因的所有等位基因為完全失活的。

【0056】 在一特定的具體實例中，此內生性DHODH基因係使用如Aga *et al.* (2015) *BMC Proceedings* 9(suppl 9):P2中所述之CRISPR-Cas9法，使其失活。

【0057】 如熟習技術者所熟知的，CRISPR-Cas9系統為一使用非編碼RNA來引導Cas9核酸酶引發位點-專一性DNA裂解之原核細胞後天性免疫反應系統。此DNA損傷係藉由細胞DNA修復機制，經由非同源性末端接合DNA修復路徑(NHEJ)或同源引導修復(HDR)路徑加以修復。為了製造基因破壞，單一引導RNA(gRNA)，由對DNA標靶具專一性之crRNA序列所組成，和與Cas9蛋白相互作用的tracrRNA序列，係與具有DNA核酸內切酶活性之重組形式Cas9蛋白結合。所產生的複合物將造成目標專一性雙股DNA裂解。裂解位點將藉由非同源性末端接合(NHEJ) DNA修復路徑，一種可能造成基因功能破壞之插入/刪除(INDEL)的錯誤傾向法，加以修復。

【0058】 在一特定的具體實例中，係針對至少一個DHODH基因的外顯子進行失活化，尤其是藉由編輯法，例如CRIPR-Cas9法。在一更特定的具體實例中，係針對編碼DHODH蛋白N-端部分之部分DHODH基因進行失活，尤其是藉由編輯法，例如CRIPR-Cas9法。又在另外的具體實例中，係針對DHODH基因的第二外顯子進行失活化，尤其是藉由編輯法，例如CRIPR-Cas9法。

【0059】 在一具體實例中，係使用序列CAAGGATGATGGCTGCATCC (SEQ ID NO: 23)或GGATGCAGCCATCATCCTTG (SEQ ID NO: 5)的20個-核苷酸序列或任何與剔除DHODH基因相容而不會損害CHO存活的序列作為對應的DNA片段

供產生gRNA，其係以DHODH基因的第二外顯子為標靶。此gRNA典型地係使用序列 CACCGCACCGGGATGCAGCCATCATCCTTG (SEQ ID NO: 6) 和 AAAACCAAGGATGATGGCTGCATCC (SEQ ID NO: 7)的寡核苷酸或使用序列 GGATGCAGCCATCATCCTTGGTTTT (SEQ ID NO: 24) 和 CAAGGATGATGGCTGCATCCCGGTG (SEQ ID NO: 25)的寡核苷酸所製得，典型地在質體的獨特限制性位點，例如pCM3561質體的*BaeI*位點(由Invitrogen公司商品化)選殖，因此所選殖的DNA序列係在U6啟動子的控制下，且一旦該質體導入到細胞中，則轉錄至含有一crRNA融合tracrRNA之單一轉錄單元，該crRNA部分對DHODH基因的第二外顯子具專一性而該tracrRNA部分則可被Cas9酵素所辨識。

【0060】 為了鑑別失活化的細胞株，就DHODH基因，典型地係藉由孔盤中限制稀釋分離單一細胞，及達到適當的滿度(confluence)，例如90%滿度後，將細胞分置於至少2個條件，例如一種在添加尿苷的培養基而另一種在無尿苷的培養基。感興趣的選殖株典型地係對缺乏尿苷具敏感性的選殖株。

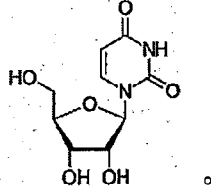
【0061】 一旦分離後，這些感興趣細胞可於包括嘧啶鹼基的培養基，尤其是包括尿苷的培養基中培養。

【0062】 「嘧啶」在文中係指嘧啶本身和各種具有嘧啶核作為架構之嘧啶衍生物。此等嘧啶鹼基的實例包括尿嘧啶相關的物質，例如尿嘧啶、尿苷、磷酸尿苷，尤其是單磷酸尿苷(UMP)、二磷酸尿苷(UDP)和三磷酸尿苷(UTP)、去氧尿苷、磷酸去氧尿苷，尤其是單磷酸去氧尿苷(dUMP)、二磷酸去氧尿苷(dUDP)和三磷酸去氧尿苷(dUTP)；胞嘧啶核酸相關的物質，例如胞嘧啶、磷酸胞嘧啶，尤其是單磷酸胞嘧啶(CMP)、二磷酸胞嘧啶(CDP)、三磷酸胞嘧啶(CTP)、去氧胞嘧啶、2'-去氧胞嘧啶、磷酸去氧胞嘧啶，尤其是單磷酸去氧胞嘧啶(dCMP)、二磷酸去氧胞嘧啶(dCDP)和三磷酸去氧胞嘧啶(dCTP)；胸腺嘧啶、胸苷、磷酸胸苷，尤其是單磷酸胸苷(TMP)、二磷酸胸苷(TDP)、三磷酸胸苷(TTP)、去氧胸苷、

磷酸去氧胸苷，尤其是單磷酸去氧胸苷(dTMP)、二磷酸去氧胸苷(dTDP)和三磷酸去氧胸苷(dTTP)以及乳清酸。

【0063】 在一特定的具體實例中，該嘧啶鹼基為尿苷。

【0064】 「尿苷」在文中係指下式之核苷



【0065】 「無尿苷培養基」係指任何適合特定細胞株生長的基礎培養基，其中該培養基係包括低於1 mM的尿苷，尤其是該培養基不包括任何尿苷。

【0066】 「包括尿苷的培養基」係指任何適合特定細胞株生長的基礎培養基，其中該培養基進一步係包括1 mM至25 mM的尿苷，尤其是5 mM至10 mM的尿苷。

【0067】 「基礎培養基」在文中係指適合暴露於細胞，例如CHO細胞之無添加培養基。熟習技術者應了解，所使用的基礎培養基將依照所使用的細胞類型而定。基礎培養基的實例包括CDCHO培養基、OPTiCHO™培養基、Fecto CHO™培養基、FortiCHO™培養基、ExpiCHO™培養基、Ex-Cell™培養基、ActiPRO™培養基、MAM PF77™培養基和PowerCHO™培養基。

【0068】 在一特定的具體實例中，此基礎培養基進一步係添加麩醯胺酸，典型地4至6 mM的麩醯胺酸。

【0069】 因此，在一特定的具體實例中，本發明之細胞株係藉由下列所產生：

a) 使一細胞中的內生性 DHODH 基因失活化，尤其是藉由基因編輯法，例如CRISPR-Cas9法，及

b)於一包括尿苷的培養基中在適合產生細胞株的條件下培養細胞，其中該內生性DHODH基因為部分或完全失活。

【0070】 藉由CRISPR-Cas9法製造包括部分或完全失活之內生性DHODH基因的CHO細胞株係更深入以實例2和3示例說明。

【0071】製造包括部分或完全失活之內生性DHODH基因的細胞株，例如CHO細胞株可藉由本項技術中已知的各種其他分子生物法來產生。例如，可用於產生具有部分或完全失活之內生性DHODH基因之細胞株的其他基因編輯技術包括使用鋅指核酸酶(ZFN)或類轉錄因子效應子核酸酶(TALEN)。亦可使用Cre/Lox法剔除DHODH基因的一或多個或所有的等位基因。

【0072】在一特定的具體實例中，本發明之細胞株進一步係包括如下文「表現載體」章節中所定義之表現載體。

【0073】該表現載體可藉由任何熟習技術者熟知的適合技術來導入，例如藉由轉染，尤其是藉由電穿孔或化學轉染或轉導。

【0074】在一特定的具體實例中，該本發明之細胞株可進一步包括與本發明載體不相同之包含選擇標記的另外表現載體，典型地另外的表現載體係包括一編碼麩醯胺酸合成酶之序列。

外生性 DHODH

【0075】由用於本發明之表現載體所編碼的DHODH(另外稱為「外生性DHODH」)可包括或由至少60%、62%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4相同之序列所組成。其亦可包括或由SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之至少100個、150個、200個、250個、300個或350個連續胺基酸的片段所組成，其限制條件為此蛋白保留DHODH活性。

【0076】在某些具體實例中，根據本發明之外生性DHODH係包括或由至少60%、62%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%或100%與SEQ ID NO: 2序列及與SEQ ID NO: 4相同之序列所組成。

【0077】在某些具體實例中，根據本發明之外生性DHODH為人類DHODH，亦即人類來源之DHODH。

【0078】如文中所用，術語「人類DHODH」係指包括或由SEQ ID NO: 4所組成之蛋白序列，以及具有DHODH活性之其變體。此等變體可例如相當於天然發生在人類中變體(例如等位基因變體或剪接變體)。另一種選擇，此等變體可相當於藉由基因工程所得到的變體。在一具體實例中，當相較於SEQ ID NO: 4時，此等變體與SEQ ID NO: 4序列的差異最多僅存在有150個、140個、130個、120個、110個、100個、90個、80個、70個、60個、50個、40個、30個、25個、24個、23個、22個、21個、20個、19個、18個、17個、16個、15個、14個、13個、12個、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個或1個胺基酸變異(該變異包括取代、插入和刪除)。

【0079】在一特定的具體實例中，該人類DHODH相較於野生行序列為一包括G202A突變的變體，典型地係包括或由胺基酸序列SEQ ID NO: 26所組成之蛋白。

【0080】在某些具體實例中，此外生性DHODH為一倉鼠DHODH，亦即倉鼠來源之DHODH。此倉鼠DHODH可為，例如中國倉鼠(*Cetulus griseus*) DHODH。

【0081】如文中所用，術語「中國倉鼠DHODH」係指包括或由SEQ ID NO: 2所組成之蛋白序列，以及具有DHODH活性之其變體。此等變體可例如相當於天然發生在倉鼠中變體(例如等位基因變體或剪接變體)。另一種選擇，此等變體可相當於藉由基因工程所得到的變體。在一具體實例中，當相較於SEQ ID NO: 2時，此等變體與SEQ ID NO: 2序列的差異最多僅存在有150個、140個、130個、120個、110個、100個、90個、80個、70個、60個、50個、40個、30個、25個、24個、23個、22個、21個、20個、19個、18個、17個、16個、15個、14個、13個、12個、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個或1個胺基酸變異(該變異包括取代、插入和刪除)。

【0082】在另外的具體實例中，此變異的DHODH將具有DHODH活性，視需要與野生型蛋白同等級的活性，或為野生型蛋白之50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%或更高等級的活性。

【0083】具有與本發明尋求的胺基酸序列至少，例如95%「相同」的胺基酸序列之多肽，係希望此目標多肽的胺基酸序列係與所尋求的序列相同，但是該目標多肽序列每100個此尋求胺基酸序列的胺基酸可能包括至高5個胺基酸改變。換言之，就得到具有與尋求的胺基酸至少95%相同的胺基酸序列之多肽，在目標序列中至高5%(100個中有5個)的胺基殘基可為插入的、刪除的或經另外的胺基酸取代。

【0084】序列相同度可在全長的變體序列、全長的參照序列或二者中測定。例如，相同度百分比可使用全局比對(亦即以其全長比較二個序列)來計算。比較二或多個序列之相同度和同源性的方法已為本項技術所熟知。當考量其全長時，使用尼德曼-翁施(Needleman-Wunsch)全局比對演算法的「尼氏(needle)」程式(Needleman和Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453)找到了二個序列的最佳比對(包括缺位)，當進行全局比對時可例如使用此法。此尼氏程式(needle program)可列如在ebi.ac.uk全球資訊網站中取得。依據本發明之相同度百分比，較佳地係使用EMBOSS::尼氏(全局)程式以「開放缺位」參數等於10.0、「缺位延長」參數等於5和Blosum62矩陣來計算。

【0085】相較於參照序列，參照序列的變體可包括突變，例如刪除、插入及/或取代。就取代的情況，取代較佳地係相當於如下表中所指的保守性取代。

保守性取代	胺基酸類型
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	帶有脂肪族疏水性側鏈的胺基酸
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	帶有不帶電但極性側鏈的胺基酸
Asp, Glu	帶有酸性側鏈的胺基酸
Lys, Arg, His	帶有鹼性側鏈的胺基酸
Gly	中性側鏈

表現載體

【0086】用於本發明內容中的表現載體係適用於製造重組蛋白並且包括一編碼二氫乳清酸脫氫酶(DHODH)之序列。

【0087】此表現載體較佳地為DNA載體。

【0088】用於本發明內容中的表現載體係包括一編碼如上文「外生性DHODH」章節中所定義的外生性DHODH之序列。

【0089】在一特定的具體實例中，導入表現載體的細胞為一CHO細胞株，而該外生性DHODH為異源性來源(亦即，外生性DHODH並非倉鼠DHODH)。

【0090】編碼此一外生性DHODH的序列可為天然生成的核苷酸序列。另一種選擇，編碼此一DHODH的序列三聯密碼子在CHO細胞中的表現可能有偏差。用於得到最佳表現之偏向序列的軟體和演算法已為本項技術所知並包括，例如Raab *et al.* (2010) *Syst Synth Biol.* 4:215-225中所述的演算法。此演算法不僅提供最佳可取得的表現密碼子，亦考量GC含量且無不欲的DNA模組。

【0091】例如，編碼外生性DHODH的序列可包括或由至少60%、62%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%與SEQ ID NO: 3序列(亦即編碼SEQ ID NO: 4之人類DHODH的序列，其係就CHO細胞中最佳表現所設計)及/或與SEQ ID NO: 1序列(亦即編碼SEQ ID NO: 2之倉鼠DHODH的序列，其係就CHO細胞中最佳表現所設計)相同的序列所組成。

【0092】在一具體實例中，編碼外生性DHODH的序列係包括或由SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之序列所組成。

【0093】用於本發明內容中的表現載體、編碼如上所定義的外生性DHODH之序列可由任何熟習本項技術者已知的啟動子來控制。

【0094】例如，編碼如上所定義的外生性DHODH之序列可例如由適合驅動DHODH表現的啟動子來控制，例如猴空泡病毒40(SV40)啟動子(例如，SV40的晚期和早期啟動子)、CMV啟動子、延伸因子1啟動子、GAPDH啟動子、RPL37啟動子、Actin啟動子。早期SV40啟動子例如係描述於Benoist和 Chambon (1981) *Nature* 290:304-310以及Moreau *et al.* (1981) *Nucleic Acids Res.* 9:6047-6068中。特言之，該SV40啟動子為全長啟動子。該SV40啟動子亦可具有一含有72bp重複區的複製起點。

【0095】在某些具體實例中，該SV40啟動子並非其中位置128至270已移除的SV40啟動子，亦即該SV40啟動子並非韓國專利第10-0267720號中所描述的SV40啟動子以及於1997年12月17日存放在Gene Bank, Institute of Bioengineering, KIST，存放編號：KCTC 8860 P之轉化大腸桿菌(*E. coli*)轉化體。

【0096】在其他的具體實例中，編碼如上所定義的外生性DHODH之序列並非由SV40啟動子所控制。

【0097】適用於製造重組蛋白的表現載體已為熟習本項技術者所知。此等載體典型地係相當於包括一複製起點及至少一個得以選殖和表現所欲製造的重組蛋白之表現匣的表現載體。表現匣典型地係包括5'非轉譯區(包括或由啟動子及視需要一強化子序列所組成)、一或多個得以選殖編碼重組蛋白之序列的限制位點、3'非轉譯區(亦即polyA訊號)及視需要一或多個內含子。啟動子序列可等同於任何本項技術熟知的強啟動子，例如人類CMV啟動子。視需要，用於本發明內容中的表現載體係包括一原核生物複製起點(例如，原核複製子，例如大腸桿菌中的ColE1)及至少一個原核生物-選擇標記基因，因而使此等載體得以在原和生物細胞中複製。複製此等載體的細胞亦表現原核生物-選擇標記基因，且因此可被辨識和選擇。原核生物-選擇標記基因已為熟習本項技術者所熟知。原核生物-選擇標記基因的實例有，例如編碼賦予抗生素抗藥性之蛋白的核酸序列(例如，編碼賦予抗安比西林(ampicillin)、氯黴素(chloramphenicol)、滅瘟素(blasticidin)或卡納黴素(kanamycin)抗藥性之蛋白的序列)。

【0098】重組蛋白可相當於熟習本項技術者感興趣的任何蛋白。

【0099】如文中所用，術語「蛋白」係指涵蓋胜肽(亦即低於50個胺基酸的胺基酸鏈)、多肽(亦即至少50個胺基酸的胺基酸鏈)、單體蛋白(亦即由一條胺基酸鏈組成的蛋白)和多聚體蛋白(亦即由二條或二條以上的胺基酸鏈所組成的蛋白，例如單株抗體)。

【0100】用於本發明內容中的表現載體典型地係包括許多與構成此蛋白之不同胺基酸鏈數目相同的表現匣(例如在單體蛋白或同源二聚體蛋白的情況為一個表現匣，就異源二聚體或單株抗體等等的情況為二個)。

【0101】另一種選擇，用於本發明內容中的表現載體可僅包括一個表現匣，即使是在希望製造異源性二聚體蛋白或單株抗體時。在此一情況下，編碼此蛋白之其他胺基酸鏈的序列係存在個別的表現載體上，與根據本發明之表現載體共轉染至宿主細胞株中，尤其是轉染至CHO細胞株中。

【0102】在該情況下，此補充的個別表現載體可包括與文中所述的DHODH選擇標記不同的選擇標記，例如DHFR、GS或HPRT。

【0103】在一具體實例中，用於本發明內容中的表現載體可無表現匣。在此一情況下，適合表現重組蛋白的表現匣係存在個別的載體上，與根據本發明之表現載體共轉染至宿主細胞株中，尤其是轉染至本發明之DHODH-失活的細胞株中，更特言之，轉染至本發明之DHODH-失活的CHO細胞株中。

【0104】因此，在某些具體實例中，用於本發明內容中的表現載體係包括：

- 一編碼如上所定義之外生性 DHODH，由早期 SV40 啟動子所控制的序列；
- 一第一表現匣，其中編碼該抗體輕鏈之序列係由 CMV 啟動所控制；
- 一第二表現匣，其中編碼該抗體重鏈之序列係由 CMV 啟動所控制；
- 一原核生物之複製起點；及
- 一用於原核細胞的選擇標記，亦即一編碼賦予抗安西林抗藥性之蛋白、由其天然啟動子所控制的序列。

【0105】在整個說明書中，術語「重組蛋白」係指任何希望製造的重組蛋白。其可例如相當於治療性及/或預防性蛋白，亦即希望用作為醫藥品(包括疫苗)之蛋白。在一特定的具體實例中，所希望製造的重組蛋白並非DHODH。在另外的特定具體實例中，所希望製造的重組蛋白為抗體，例如單株抗體。又在另外的特定具體實例中，所希望製造的重組蛋白為抗原蛋白。

【0106】術語「抗體」在文中係以最廣義來使用，且特言之係涵蓋任何同功型之單株抗體(包括全長的單株抗體)，例如IgG、IgM、IgA、IgD和IgE，多株抗體、多專一性抗體(包括雙專一性和三專一性抗體)、抗體片段(例如，Fv、scFv、ds、Fab、Fab'或F(ab')₂片段)、單區抗體及其片段，以及包括一抗體片段的融合蛋白。具特定抗原反應性之抗體可藉由重組法產生，例如選擇在噬菌體或類似載體中重組抗體之資料庫，或藉由以抗原或編碼抗原的核酸使一動物免疫。

【0107】「單株抗體」如文中所用，係由實質上同源抗體之族群的抗體所製得，亦即形成此群族之抗體，除了可小量存在之可能天然發生的突變之外，基本上為相同的。這些抗體係直接對抗一單一表位(或在多專一性單株抗體的情況下為一單一群族的表位)且因此具高度專一性。

【0108】典型的單株抗體係包括藉由雙硫鍵相連結的二條相同重鏈和二條相同輕鏈。各重鏈和輕鏈係含有一恆定區和一可變區。各可變區含有三段稱為「互補決定區」(「CDR」)或「高可變區」之部分，其主要係負責與抗原的表位結合。其由N-端起依序編號，通常稱為CDR1、CDR2和CDR3 (參見Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th edition, National Institute of Health, Bethesda, MD, 1991)。可變區的更高保守部分係稱為「架構區」。

【0109】此單株抗體可為，例如鼠科抗體、嵌合抗體、人源化抗體或全人類抗體。

【0110】此單株抗體可為單專一性、雙專一性或三專一性抗體。

【0111】當所欲製造的重組蛋白為單株抗體時，根據本發明之表現載體可包括適用於選殖抗體輕鏈之第一表現匣及適用於選殖抗體重鏈之第二表現匣。

【0112】在一特定的具體實例中，該第一和第二表現匣各自係包括巨細胞病毒(CMV)啟動子，例如來自人類或鼠科CMV之CMV啟動子。更特言之，該第一和第二表現匣可包括：

- 一 CMV 前早期強化子啟動子(例如，一具有 Teschendorf *et al.* (2002) *Anticancer Res.* 22:3325-3330 中所描述的序列者)；或

- 一來自小鼠CMV之IE2啟動子/強化子區(例如,一具有 Chatellard *et al.* (2007) *Biotechnol Bioeng.* 96:106-117 中所描述的序列者); 或
- 一hCMV-MIE調節元件(例如,一具有 WO 89/01036 中所描述的序列者)。

【0113】術語「抗原蛋白」在文中係以最廣義來使用且係涵蓋,單獨或與佐劑組合,能產生免疫反應之任何蛋白。其可能希望用於預防性疫苗或治療性疫苗中。在一特定的具體實例中,此抗原蛋白為一疫苗蛋白,亦即希望用於預防性疫苗的蛋白。

【0114】此表現載體可包括至少一編碼感興趣重組蛋白之序列(例如,一編碼單體蛋白之序列,一編碼抗體鏈之序列,或二條分別編碼抗體輕鏈和抗體重鏈之序列),或其可為空白的(亦即,缺乏此一編碼感興趣重組蛋白之序列)。

表現系統、套組、方法和用途

【0115】本發明係提供包含下列之表現系統:

- (i) 一如上文「細胞株」章節中所定義的細胞株,其係包括一如上文「細胞株」章節中所定義之部分或完全失活的內生性DHODH基因,及
- (ii) 一如上文「表現載體」章節中所定義的表現載體。

【0116】本發明之表現系統可進一步包括補充的個別表現載體,其各自係包括一編碼不同於DHODH的選擇標記,例如DHFR、GS或HPRT之核苷酸序列,以及至少一用於表現重組蛋白之表現匣。

【0117】另一種選擇,本發明之表現載體可進一步包括如上文「表現載體」章節中所定義的補充表現載體。

【0118】本發明係提供一套組,其包括(i)包括如上文「表現載體」章節中所定義的表現載體之根據本發明細胞株,或根據本發明之表現系統,以及(ii)如上所定義,無尿苷之培養基。

【0119】此套組可包括一如上所定義之編碼外生性DHODH表現載體(在表現系統中)。在此一套組中,載體較佳地為空白的,因為這樣才能使熟習技術者得以選殖感興趣蛋白。此外,表現載體較佳地係從此一套組中的細胞株分離。

【0120】 此套組進一步係包括一如上文「細胞株」章節中所定義的無尿苷培養基。

【0121】 此套組可進一步包括適合培養此細胞株的培養基，適合將載體轉染至細胞株的培養基，包裝材料及/或使用表現系統的說明。

【0122】 在一特定的具體實例中，此套組並無DHODH抑制劑。

【0123】 DHODH抑制劑的實例包括二辛可寧酸(bicinchoninic acid)、布喹那(brequinar)(6-氟-2-(2'-氟-1,1'-聯苯-4-基)-3-甲基-4-喹啉羧酸)、萘醌衍生物，例如二氯烯丙基指甲花醌(dichlororally lawsone)，異喹啉衍生物例如來氟米特(5-甲基-N-[4-(三氟甲基)苯基]-異喹啉-4-甲醯胺)及其活性代謝物特立氟胺((2Z)-2-氰基-3-羥基-N-[4-(三氟甲基)苯基]丁-2-烯醯胺)、喹諾酮(quinolone)羧酸、萘醌、異喹啉、苯喹啉、redoxal及衍生物、指甲花醌(lawsone)、拉帕醇(Lapachol)、阿托奎酮(atovaquone)和(8-氯-4-(2-氯-4-氟-苯氧基)喹啉)。DHODH之抑制劑可能能夠抑制至少20、30、40、50、60、70、80、90、95、99或100%的DHODH活性。

【0124】 在一特定的具體實例中，此套組並無特立氟胺。

【0125】 本發明進一步係提供包括如上文「表現載體」章節中所定義的表現載體之細胞株、根據本發明之表現系統或根據本發明之套組，用於活體外製造重組蛋白之用途。

【0126】 在一特定的具體實例中，該細胞株、表現系統或套組係與如上所定義的無尿苷培養基組合使用，更特言之無DHODH抑制劑。

【0127】 本發明進一步係提供根據本發明之表現系統、包括如上文「表現載體」章節中所定義的表現載體之根據本發明之細胞株或根據本發明之套組，用於分離出活體外製造高量重組蛋白之選殖細胞(「高產量選殖株」)的用途，特言之無DHODH抑制劑。

【0128】 在本發明內容中，術語「高量重組蛋白」希望係指培養基中重組蛋白的濃度為至少0.05 g/l，較佳地至少0.1 g/l，又較佳地至少0.2 g/l，更佳地至少介於0.3至1 g/l。重組蛋白的濃度可藉由熟習本項技術者熟知的方法來測定，包括

尤其是酵素連接免疫吸附分析(ELISA)、西方墨點、化微器技術(caliper technology)和相當於重組蛋白之一濃度範圍的純化蛋白。

【0129】本發明進一步係提供活體外製造重組蛋白的方法，其係包括下列步驟：

A) a1)提供一包括如上文「表現載體」章節中所定義的表現載體之根據本發明的細胞株；

或

a2)提供一根據本發明之細胞株，及

a2')將如上文「表現載體」章節中所定義的表現載體導入步驟 a2)所提供的細胞株中；

或

a3)提供一包括內生性 DHODH 基因的細胞株，

a3')使步驟 a3)所提供的細胞株中的內生性 DHODH 基因部分或完全失活，及

a3'')將如上文「表現載體」章節中所定義的表現載體導入步驟 a3')所得到之包括部分或完全失活的內生性 DHODH 基因之細胞株；

B) 於適用於製造重組蛋白的條件下培養該細胞株；及

C) 分離及/或純化該重組蛋白。

【0130】在一特定的具體實例中，上述方法之步驟B)係在無尿苷的培養基中進行，更特言之亦無DHODH抑制劑，及尤其是包括一在於選擇轉染細胞之子步驟，其中該轉染細胞儘管缺乏尿苷，尤其是進一步在無DHODH抑制劑下仍能生長。

【0131】本發明係提供一活體外分離出製造高量重組蛋白之選殖細胞的方法，該方法係包括或由下列步驟所組成：

A) a1)提供一包括如上文「表現載體」章節中所定義的表現載體之根據本發明細胞株；

或

a2)提供一根據本發明之細胞株，及

a2') 將如上文「表現載體」章節中所定義的表現載體導入步驟 a2)所提供的細胞株中；

或

a3) 提供一包括內生性 DHODH 基因的細胞株，

a3')使步驟 a3)所提供的細胞株中的內生性 DHODH 基因部分或完全失活，及

a3'')將如上文「表現載體」章節中所定義的表現載體導入步驟 a3')所得到之包括部分或完全失活的內生性 DHODH 基因之細胞株；

B) 於適合製造重組蛋白的條件下培養該細胞株；及

C) 分離出製造高量重組蛋白之選殖株。

【0132】 在一特定的具體實例中，上述方法之步驟B)係在無尿苷的培養基中進行，更特言之亦無DHODH抑制劑，及尤其是包括一在於選擇轉染細胞之子步驟，其中該轉染細胞儘管缺乏尿苷，尤其是進一步在無DHODH抑制劑下仍能生長。

【0133】 在步驟a2')或a3'')中，可藉由任何熟習技術者所熟知的技術將該表現載體導入該細胞株中，例如藉由轉染，尤其是藉由電穿孔或化學轉染或轉導。

【0134】 適用於製造重組蛋白的條件已為熟習本項技術者所熟知。例如可使用實例中所述的方法。

【0135】 在一特定的實施例中，用於步驟B)的培養基係包括遞減濃度的尿苷。此舉能選擇出其中載體衍生的外生性DHODH基因(及因此編碼此重組蛋白的序列)已擴增的選殖株。

【0136】 上述方法可進一步包括將重組蛋白調配成醫藥組成物的步驟。

【0137】 整個說明書中，術語例如「包括」係具有大多數專利管轄權，較佳地所指的管轄權中歸因於彼等之意義；例如，其可指「包含」等。術語例如「由...組成」、「基本上由...組成」係具有在大多數專利管轄權，較佳地所指的管轄權中歸因於彼等之意義；例如，其係意味著排除所有、大部分或全部而非可忽

略量的其他元素，其係允許未明確敘述的元素，但排除在先前技術中所見的元素或影響本發明之基本或新穎特徵之元素。

【0138】在整個本說明書的文本中引述了數個文件。文中所引述的各文件(包括任何期刊文章或摘要、公開或未公開的專利申請案、頒布的專利、製造商說明書、用法說明等)係以引用的方式併入。然而，並非承認文中所引述的任何文件確實為本發明相關的先前技術。

【0139】本發明將藉由參照下列圖式和實例進一步描述，而該圖式和實例僅為說明性，且不希望限制本發明。

【0140】本發明係藉由申請專利範圍加以定義，其應在說明書和圖式的幫助下闡釋。

序列之簡單說明

SEQ ID NO:	說明
1	編碼中國倉鼠(<i>Cricetulus griseus</i> 來源)之 DHODH 的 cDNA 序列
2	中國倉鼠來源之 DHODH 的胺基酸序列
3	編碼人類來源之 DHODH 的 cDNA 序列
4	人類來源之 DHODH 的胺基酸序列
5	用於產生 gRNA 之對應 DNA 片段
6	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 1)
7	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 1)
8	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 2)
9	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 2)
10	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 3)
11	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 3)
12	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 4)
13	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 4)
14	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 5)
15	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 5)
16	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 6)
17	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 6)
18	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 7)
19	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 7)
20	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 8)
21	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 8)
22	CHO DHODH 基因序列
23	用於產生 gRNA 之對應 DNA 片段
24	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 1')
25	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 1')

26	人類 DHODH G202A 之胺基酸序列
27	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 2')
28	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 2')
29	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 3')
30	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 3')
31	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 4')
32	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 4')
33	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 5')
34	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 5')
35	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 6')
36	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 6')
37	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 7')
38	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 7')
39	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 8')
40	用於得到 gRNA 的寡核苷酸(序列 8')
41	603 正義寡核苷酸
42	503 反義寡核苷酸
43	包括標靶序列和 PAM 的序列
44	包括 CrispR 序列 n°1 之正義 DHODH 外顯子 2 序列區
45	包括 CrispR 序列 n°1 之反義 DHODH 外顯子 2 序列區

實例

實例 1：獲得 CHO 9E4 細胞株

【0141】本實例係描述從 ATCC 編號 ATCC CCL-61 之市售 CHO-K1 細胞株得到 CHO 9E4 細胞株。

1. CHO-K1 細胞株

【0142】從 ATCC 得到 1969 年在牛血清存在下冷凍的 CHO-K1 細胞(ATCC CCL-61)小瓶。

2. 以 Ex-Cell™ 302 培養基解凍小瓶並製備 CHO-LG-APF 庫

【0143】將 CHO-K1 小瓶直接以添加 4 mM 麩醯胺酸的 Ex-Cell™ 302 培養基 (SAFC) 解凍並於靜置式撐體上擴增，然後置於旋轉器中。在 12 個繼代和 17.3 個世代後，將產生的 CHO-LG-APF 庫冷凍於 Ex-Cell™ 302 培養基中。

3. 將 Ex-Cell™ 302 培養基中的 CHO-LG-APF 庫解凍並製備 ABC-024 P22 庫

【0144】將 CHO-LG-APF 小瓶以 Ex-Cell™ 302 培養基解凍並擴增。在 18.5 個世代後將所生成的 ABC-024 P22 庫解凍。

4. 使 CMV07-024 庫適應 CDCHO 融合培養基及製備 ABC-003 庫

【0145】將 CMV07-024 庫解凍並直接使其適應添加 4 mM 麩醯胺酸的 Ex-cell™ CDCHO 融合培養基(SAFC)並於震盪器中適應培養歷經 12.5 個世代，直到將 ABC-003 庫冷凍於 Ex-cell™ CDCHO 融合培養基。

5.以 CDCHO 融合培養基解凍 ABC-003 庫並以 CDCHO 融合培養基製備 ABC-053 庫

【0146】將 ABC-003 小瓶以 CDCHO 融合培養基解凍，及稀釋後，於 4.2 個世代後將 ABC-53 庫冷凍。

6.以 CDCHO 融合培養基解凍 ABC-053 庫、選擇、選殖及以 CDCHO 融合培養基製備 P15A11 庫。

【0147】將 ABC-053 庫以添加 4 mM 麩醯胺酸的 Ex-cell™ CDCHO 融合培養基(SAFC)解凍。擴增培養後，於培養盤中藉由限制稀釋選殖，及然後於 CDCHO 融合培養基中擴增。將由該選殖所產生的選殖株 P15A11 細胞庫冷凍。此選殖和擴增相當於大約 94 個世代。

7.將 P15A11 庫以 CDCHO 融合培養基解凍，藉由以 CDCHO 直接繼代培養使細胞庫適應並以 CDCHO 培養基製備 CHOSP10-002 庫。

【0148】將 P15A11 庫以添加 4 mM 麩醯胺酸的 Ex-cell™ CDCHO 融合培養基(SAFC)溶解，及在 CDCHO 融合培養基中 2 個繼代後，將細胞以 CDCHO 培養基稀釋。在 CDCHO 培養基中 3 個繼代後，總計 15.9 個世代後將 CHOSP10-002 庫冷凍。

8.以 CDCHO 培養基解凍 CHOSP10-002 庫、擴增、以離心移除團塊及藉由 96-孔盤中無團塊繼代培養選擇，於 6-孔盤中擴增及於震盪器中以 CDCHO 培養基製備 CHOSP10-012 庫

【0149】將 CHOSP10-002 庫以添加 6 mM 麩醯胺酸的 CDCHO 培養基(Invitrogen)解凍，然後擴增。將培養物離心以便移除細胞團塊並持續培養從上清液分離出的單純細胞。從解凍起，在此階段產生了 11.3 個世代。

【0150】將此培養物以每孔 10 個細胞分置於 96-孔盤中。於 6-孔盤中將帶有多次分離於懸浮液中之細胞的孔槽擴增，然後置於震盪器中。直到將 CHOSP10-012 庫冷凍為止，有 23.2 個額外的世代。

9. 將 CHOSP10-012 庫解凍、擴增及製備 CHOSP11-008 庫(9E4 庫)

【0151】將 CHOSP10-012 庫以添加 6 mM 麩醯胺酸的 CDCHO 培養基 (Invitrogen)解凍，然後從 Erlenmeyer 階段擴增至 171 生物反應器。

【0152】總計 10 個世代後將 9E4 庫冷凍。

實例 2：製造其中 DHODH 基因為無效之 CHO 細胞株

A – 設計和建構 CRISPR CAS9 引導 RNA (gRNA)

【0153】為了使 CHO 細胞中的 DHODH 基因失效，發明者們係由回收倉鼠基因序列開始並使用可公開取得的 Tefor 軟體設計不同的引導 RNA (gRNA)供以 CHO 基因體中的 CRISPR-Cas9 轉染。整個 CHO DHODH 序列，包含內含子和外顯子係如圖 1 所示。

【0154】此軟體係測定 8 個能以 DHODH 基因為標靶的序列：

序列 1

CACCGGGATGCAGCCATCATCCTTG (SEQ ID NO: 6)

AAAACCAAGGATGATGGCTGCATCC (SEQ ID NO: 7)

序列 2

CACCGGATGCAGCCATCATCCTTGG (SEQ ID NO: 8)

AAAACCCAAGGATGATGGCTGCATC (SEQ ID NO: 9)

序列 3

CACCGGCAGCCATCATCCTTGGGGG (SEQ ID NO: 10)

AAAACCCCCCAAGGATGATGGCTGC (SEQ ID NO: 11)

序列 4

CACCGGCCATCATCCTTGGGGGAGG (SEQ ID NO: 12)

AAAACCCTCCCCCAAGGATGATGGC (SEQ ID NO: 13)

序列 5

CACCGGCTATTCGCTTCACGTCCCT (SEQ ID NO: 14)

AAAACAGGGACGTGAAGCGAATAGC (SEQ ID NO: 15)

序列 6

CACCGGCCTCTACAAACTGGGCTTT (SEQ ID NO: 16)

AAAACAAAGCCCAGTTTGTAGAGGC (SEQ ID NO: 17)

序列 7

CACCGGGCTTTGGGTTTGTTCGAGGT (SEQ ID NO: 18)

AAAACACCTCGACAAACCCAAAGCC (SEQ ID NO: 19)

序列 8

CACCGGCTGGTCTGAGGAGCCTACA (SEQ ID NO: 20)

AAAACCTGTAGGCTCCTCAGACCAGC (SEQ ID NO: 21)

【0155】 雖然檢測和選殖 8 個序列，但 8 個序列中僅轉染了的 4 個選殖序列且僅有 1 個成功地產生剔除 DHODH 基因。使用下列 20 個核苷酸 GGATGCAGCCATCATCCTTG (SEQ ID NO: 5) 作為產生如圖 2 所示之 gRNA 的對應 DNA 片段。其係以 DHODH 基因的第二外顯子為標靶。為了得到適當 gRNA 的轉錄，係以合成製造二條寡核苷酸 CACCGGGATGCAGCCATCATCCTTG (oligo1, SEQ ID NO: 6) 和 AAAACCAAGGATGATGGCTGCATCC (oligo2, SEQ ID NO: 7)，黏合及於 pCM3561 的獨特 *BaeI* 位點(由 Invitrogen 公司商品化)選殖。

【0156】 將選殖的 DNA 序列藉此由 U6 啟動子控制且一旦 DNA 轉染於 CHO 細胞中，其係轉錄成含有 crRNA 融合 tracrRNA 之單一轉錄單元。此 crRNA 部分對於 DHODH 基因的第二外顯子具有專一性，而 tracrRNA 可被 Cas9 酵素本身所辨識。

B-製備用於 CRISPR-Cas9 基因編輯之物質

【0157】 如實例 1 中所揭示，從購自 ATCC 的 CHO K-1 細胞分離及選擇 CHO 9E4 細胞，並以懸浮液培養於添加 6 mM L-麩醯胺酸之 CDCHO 無血清和

化學成份確定對中國倉鼠卵巢(CHO)細胞最佳化的培養基中在 37°C 含有 8% CO₂ 和 80%濕度的培養箱中生長及維養。

【0158】 將 10 µg 的 sgRNA 表現載體(pCM3561)以 1 µL 添加 20 µM S-腺苷基甲硫胺酸(SAM)的 *BaeI* 酵素以 5 個單位/µl 於 25°C 消化 1 小時，然後藉由電穿孔使用 1%瓊膠分離消化的質體。然後藉由凝膠萃取套組(Qiagen Kit)回收所產生的 sgRNA 選殖載體。

【0159】 使用 T4 DNA 連接酶(Biolabs)綁紮 sgRNA 選殖載體和黏合的引導寡核苷酸並於室溫培養 10 min。

【0160】 將 5 µL 的綁紮產物加到 50 µL 的大腸桿菌 DH5a 勝任細胞 (Invitrogen)。

【0161】 將細胞和 DNA 於冰上培養 30 min，及然後於 42°C 熱震盪 45 秒。加入 500 mL S.O.C 培養基後，於 37°C(以 800 rpm)培養 1 小時得到細菌用以產生編碼在質體架構上的抗生素抗藥性蛋白之時間。培養後，將各試管塗覆一層添加 100 µg/mL 安比西林之 LB。將培養皿於 37°C 培養至隔夜。使用負性對照(以水取代插入的 DNA)評估轉化是否成功。

【0162】 就擴增步驟，每次建構係選擇二個菌落並植入試管內添加 100 µg/ml 安比西林之 2 mL 的 LB 培養基中，放置於培養箱中至隔夜(於 37°C, 700 rpm)。藉由離心收取培養至隔夜的培養物。使用 QIAprep Miniprep Kit™ (QIAGEN) 回收擴增的 DNA(以 EB 緩衝液溶解)。然後藉由桑格定序(Sanger sequencing)(正義和反義定序，GATC 公司)檢查感興趣的引導寡核苷酸序列。於 Vector NTI 軟體上(ThermoFisher Scientific)藉由比對確認後，使用對應的菌落植入添加 100 µg/ml 安比西林之 200 mL 的 LB 培養基中。培養 24 小時後，藉由於 4°C 以 6000 g 離心 15 min 收取細菌。使用 EndoFree Plasmid Maxi Kit™ (QIAGEN) 製備 MaxiPrep。藉由於室溫加入異丙醇沉澱 DNA。1 h-離心後(於 4°C, 8000 rpm)，以無內毒素、室溫 70%的乙醇沖洗 DNA 團塊。再一次短暫離心後，於 1 h 期間將

團塊風乾並再溶解於適量無內毒素的無菌水，得到 5 mg/mL 的 DNA 濃度。使用超微量(nanodrop)裝置測量 DNA 濃度。

【0163】 製備 4 種不同的質體，即 pBH6840 質體(KO DHODH SEQ1)、pBH6841 質體(KO DHODH SEQ4)、pBH6842 質體(KO DHODH SEQ5)和 pBH6843 質體(KO DHODH SEQ7)。在 CHO DHODH 基因中這些質體的標靶係顯示於 SEQ ID NO: 22 上。

【0164】 DNA 定序係由 GATC 分包商- Eurofins Genomics 公司來進行。

C-CRISPR-Cas9 基因編輯

【0165】 藉由電穿孔使用 MaxCyte STX 及其 CHO 定義規程進行轉染。其係於 OC-100(每次轉染 2 千萬個細胞)處理組件上進行。

【0166】 轉染的前一天，將細胞以 1.5×10^6 個細胞/mL 植入添加 6 mM L-麩醯胺酸的 CDCHO 培養基中。

【0167】 轉染當天，以 ViCell 裝置(Beckman & Coulter)計算細胞數。將需要的細胞數以 250 g 離心 10 min 並丟棄上清液。

【0168】 就各轉染條件，係將 20×10^6 個細胞以 250 g 離心 10 min。將團塊以 70 μ L Maxcyte 緩衝液再懸浮。加入 30 μ g 的 DNA 並將混合物(細胞、緩衝液和 DNA)轉置於 100 μ L Maxcyte 電穿孔匣。所使用的處理組件為專門用於 100 μ L 卡匣之 OC-100，並選擇 CHO 之最適化程式。

【0169】 進行下列的轉染。

T1	pBH6840	KO DHODH SEQ1
T2	pBH6841	KO DHODH SEQ4
T3	pBH6842	KO DHODH SEQ5
T4	pBH6843	KO DHODH SEQ7
T5	W/O ADN	H2O

【0170】 電穿孔後，將細胞轉置於 25 mL 工作 Erlenmeyer 燒瓶中。將其放置在 37°C、5% CO₂ 靜置式培養箱中歷時 45 min。然後加入 25 mL 添加 6 mM L-

麩醯胺酸之 CDCHO 培養基將細胞再懸浮並將 Erlenmeyer 燒瓶放置於 37°C、5% CO₂、70%濕度、110 rpm 震盪器中。

【0171】電穿孔後當天，藉由從上述 CHO9E4 轉染池之限制稀釋於每個孔槽植入單一細胞。大約 20 天後，一旦細胞為大約 90%滿度且當於顯微鏡下檢查時顯示為健康的，將細胞分置於 2 個有或無尿苷的新 96 孔盤。

【0172】就其對無尿苷的敏感性選擇數個選殖株。讓這些選殖株適應在添加 6 mM 麩醯胺酸和 5 mM 尿苷的 CDCHO 培養基中生長。

【0173】為了確認基因編輯是否成功，係使用 Qiagen DNeasy kit™ (Qiagen) 從 CRISPR-Cas9 選殖株細胞萃取基因體 DNA。將目標基因座藉由 PCR 使用作為 CRISPR-Cas9 標靶之 DHODH 基因座區域的適當引子擴增，並將 PCR 產物藉由 NGS 使用涵蓋可能刪除區的 PCR 片段定序。

實例 3：製造其中 DHODH 基因為失效的 CHO 細胞株之替代選擇

A -設計和建構 CRISPR CAS9 引導 RNA (gRNA)

【0174】為了使 CHO 細胞中的 DHODH 基因失效，發明者們係由回收倉鼠基因序列開始並使用可公開取得的 Tefor 軟體設計不同的引導 RNA(gRNA)供以 CHO 基因體中的 CRISPR-Cas9 轉染。

【0175】此軟體係測定 8 個能以 DHODH 基因標靶的序列：

序列 1'

GGATGCAGCCATCATCCTTGGTTTT (SEQ ID NO: 24)

CAAGGATGATGGCTGCATCCCGGTG (SEQ ID NO: 25)

序列 2'

GATGCAGCCATCATCCTTGGGTTTT (SEQ ID NO: 27)

CCAAGGATGATGGCTGCATCCCGGTG (SEQ ID NO: 28)

序列 3'

GCAGCCATCATCCTTGGGGGGTTTT (SEQ ID NO: 29)

CCCCCAAGGATGATGGCTGCCCGGTG (SEQ ID NO: 30)

序列 4'

GCCATCATCCTTGGGGGAGGGTTTT (SEQ ID NO: 31)

CCTCCCCCAAGGATGATGGCCGGTG (SEQ ID NO: 32)

序列 5'

GCTATTCGCTTCACGTCCCTGTTTT (SEQ ID NO: 33)

AGGGACGTGAAGCGAATAGCCGGTG (SEQ ID NO: 34)

序列 6'

GCCTCTACAAACTGGGCTTTGTTTT (SEQ ID NO: 35)

AAAGCCCAGTTTGTAGAGGCCGGTG (SEQ ID NO: 36)

序列 7'

GGCTTTGGGTTTGTTCGAGGTGTTTT (SEQ ID NO: 37)

ACCTCGACAAACCCAAAGCCCGGTG (SEQ ID NO: 38)

序列 8'

GCTGGTCTGAGGAGCCTACAGTTTT (SEQ ID NO: 39)

TGTAGGCTCCTCAGACCAGCCGGTG (SEQ ID NO: 40)

【0176】雖然檢測和選殖 8 個序列，但 8 個序列中僅轉染了 4 個選殖序列且僅有 1 個成功地產生剔除 DHODH 基因。使用下列 20 個核苷酸 GGATGCAGCCATCATCCTTG (SEQ ID NO: 5)作為產生 gRNA 的對應 DNA 片段。其係以 DHODH 基因的第二外顯子為標靶。為了得到適當 gRNA 的轉錄，係以合成製造二條寡核苷酸 GGATGCAGCCATCATCCTTGGTTTT(oligo1', SEQ ID NO: 24)和 CAAGGATGATGGCTGCATCCCGGTG (oligo2', SEQ ID NO: 25)，黏合及於 pCM3561 的獨特 *BaeI* 位點(由 Invitrogen 公司商品化)選殖。

【0177】將選殖的 DNA 序列藉此由 U6 啟動子控制且一旦 DNA 轉染在 CHO 細胞中，其係轉錄成含有 crRNA 融合 tracrRNA 之單一轉錄單元。此 crRNA 部分對於 DHODH 基因的第二外顯子具有專一性，而 tracrRNA 可被 Cas9 酵素本身所辨識。

B-製備用於 CRISPR-Cas9 基因編輯之物質

【0178】如實例 1 中所揭示，從購自 ATCC 的 CHO K-1 細胞分離及選擇 CHO 9E4 細胞，並以懸浮液培養於添加 6 mM L-麩醯胺酸之 CDCHO 無血清和化學成份確定對中國倉鼠卵巢(CHO)細胞最佳化的培養基中在 37°C 含有 8% CO₂ 和 80%濕度的培養箱中生長及維養。

【0179】將 10 μg 的 sgRNA 表現載體(pCM3561)以 1 μL 以 5 個單位/μl 添加 20 μM S-腺苷基甲硫胺酸(SAM)的 *BaeI* 酵素於 25°C 消化 1 小時，然後藉由電穿孔使用 1%瓊膠來分離消化的質體。然後藉由凝膠萃取套組(Qiagen Kit)回收所產生的 sgRNA 選殖載體。

【0180】使用 T4 DNA 連接酶酵素(Biolabs)綁紮 sgRNA 選殖載體和黏合的引導寡核苷酸並於室溫培養 10 min。

【0181】將 5 μL 的綁紮產物加到 50 μL 的大腸桿菌 DH5a 勝任細胞 (Invitrogen)。

【0182】將細胞和 DNA 於冰上培養 30 min，及然後於 42°C 熱震盪 45 秒。加入 500 μL S.O.C 培養基後，於 37°C (以 800 rpm)培養 1 小時得到細菌之產生編碼在質體架構上的抗生素抗藥性蛋白的時間。培養後，將各試管塗覆一層添加 100 μg/mL 安比西林之 LB。將培養皿於 37°C 培養至隔夜。使用負性對照(以水取代插入的 DNA)評估轉化是否成功。

【0183】就擴增步驟，每次建構係選擇二個菌落並植入試管內添加 100 μg/ml 安比西林之 2 mL 的 LB 培養基中，放置於培養箱中至隔夜(於 37°C, 700 rpm)。藉由離心收取培養至隔夜的培養物。使用 QIAprep Miniprep Kit™ (QIAGEN) 回收擴增的 DNA (以 EB 緩衝液溶析)。然後藉由桑格定序(Sanger sequencing)(正義和反義定序，GATC 公司)檢查感興趣的引導寡核苷酸序列。於 Vector NTI 軟體上(ThermoFisher Scientific)藉由比對確認後，使用對應的菌落植入添加 100 μg/ml 安比西林之 200 mL 的 LB 培養基中。培養 24 小時後，藉由於 4°C 以 6000 g 離心 15 min 收取細菌。使用 EndoFree Plasmid Maxi Kit™ (QIAGEN)製備

MaxiPrep。藉由於室溫加入異丙醇沉澱 DNA。1 h-離心後(於 4°C, 8000 rpm)，以無內毒素、室溫 70%的乙醇沖洗 DNA 團塊。再一次短暫離心後，於 1 h 期間將團塊風乾並再溶解於適量無內毒素的無菌水，得到 5 mg/mL 的 DNA 濃度。使用超微量(nanodrop)裝置測量 DNA 濃度。

【0184】製備 4 種不同的質體，即 pBH6840 質體(KO DHODH SEQ1)、pBH6841 質體(KO DHODH SEQ4)、pBH6842 質體(KO DHODH SEQ5)和 pBH6843 質體(KO DHODH SEQ7)。

【0185】DNA 定序係由 GATC 分包商- Eurofins Genomics 公司來進行。

C-CRISPR-Cas9 基因編輯

【0186】藉由電穿孔使用 MaxCyte STX 及其 CHO 定義規程進行轉染。其係於 OC-100(每次轉染 2 千萬個細胞)處理組件上進行。

【0187】轉染的前一天，將細胞以 1.5×10^6 個細胞/mL 植入添加 6 mM L-麩醯胺酸的 CDCHO 培養基中。

【0188】轉染的當天，以 ViCell 裝置(Beckman & Coulter)計算細胞數。將需要的細胞數以 250 g 離心 10 min 並丟棄上清液。

【0189】就各轉染條件，係將 20×10^6 個細胞以 250 g 離心 10 min。將團塊以 70 μ L Maxcyte 緩衝液再懸浮。加入 30 μ g 的 DNA 並將混合物(細胞、緩衝液和 DNA)轉置於 100 μ L Maxcyte 電穿孔匣。所使用的處理組件為專門用於 100 μ L 卡匣之 OC-100，並選擇 CHO 之最適化程式。

【0190】進行下列的轉染。

T1	pBH6840	KO DHODH SEQ1
T2	pBH6841	KO DHODH SEQ4
T3	pBH6842	KO DHODH SEQ5
T4	pBH6843	KO DHODH SEQ7
T5	W/O ADN	H2O

【0191】電穿孔後，將細胞轉置於 25 mL 工作 Erlenmeyer 燒瓶中。將其放置在 37°C、5% CO₂ 靜置式培養箱中歷時 45 min。然後加入 25 mL 添加 6 mM L-麩醯胺酸之 CDCHO 培養基將細胞再懸浮並將 Erlenmeyer 燒瓶放置於 37°C、5% CO₂、70% 濕度、110 rpm 震盪器中。

【0192】電穿孔後當天，藉由從上述 CHO9E4 轉染池之限制稀釋於每個孔槽植入單一細胞。大約 20 天後，一旦細胞為大約 90% 滿度且當於顯微鏡下檢查時顯示為健康的，將細胞分置於 2 個有或無尿苷的新 96 孔盤。

【0193】就其對無尿苷的敏感性選擇數個選殖株。讓這些選殖株適應在添加 6 mM 麩醯胺酸和 5 mM 尿苷的 CDCHO 培養基中生長。

【0194】為了確認基因編輯是否成功，係使用 Qiagen DNeasy kit™ (Qiagen) 從 CRISPR-Cas9 選殖株細胞萃取基因體 DNA。將目標基因座藉由 PCR 使用作為 CRISPR-Cas9 標靶之 DHODH 基因座區域的適當引子擴增，並將 PCR 產物藉由 NGS 使用涵蓋可能刪除區的 PCR 片段定序。

實例 4：使用 DHODH-缺陷 CHO 細胞株製造重組蛋白

【0195】於實例 2 或 3 所得到的有效 DHODH-缺陷 CHO 選殖株上檢測抗體的產量，用以確認這些選殖株能否在無特立氟胺之下表現抗體。

【0196】製造及製備所設計的載體，濃度為 5 mg/mL。其全部皆具有 ITR 而能使用轉位子系統進行製造細胞基因體中的質體整合，但 pBH6209 除外，其為編碼轉位酶之質體。

【0197】所使用的細胞株為 CHO 9E4_SP11 野生型和 DHODH 基因剔除的 KO2 及 KO19。

【0198】將 CHO 9E4_SP11 置於添加 6 mM L-麩醯胺酸之 CDCHO 培養基中培養。

【0199】將 KO2 和 KO19 置於添加 6 mM L-麩醯胺酸和 5 mM 尿苷之 CDCHO 培養基中培養。

【0200】 開始時其係在 25 mL-工作 Erlenmeyer 燒瓶中培養並擴增，直到達到所需要的活細胞數為止。

【0201】 使用由 Maxcyte 所開發的高效電穿孔規程於 Maxcyte STX 裝置上製造不同的蛋白。

【0202】 在轉染的前一天以 1.5×10^6 均分細胞。

【0203】 轉染當天，以二個載體共轉染細胞：含有人類抗 CD38 重鏈(HC)和輕鏈(LC)表現匣及二側帶有 PiggyBac 辨識位點(反向末端重複，ITR)之 DHODH 選擇標記(如 WO2016/062837 中所述)的 DNA 質體表現載體，以及來自 Transposagen 公司的轉位酶載體，其係催化轉位子移動於 TTAA 位點進入 CHO 基因體。

【0204】 就各轉染條件，係將 80×10^6 個細胞以 250 g 離心 10 min。將團塊以 250 μ L Maxcyte 緩衝液再懸浮。加入 120 μ g 的 DNA 並將混合物(細胞、緩衝液和 DNA)轉置於 400 μ L Maxcyt 電穿孔匣。所用的處理組件為專門用於 400 μ L 匣的 OC-400，並選擇 CHO 之最佳程式。

【0205】 就回收階段，係將轉染過的細胞於 37°C，40 min 無攪動下立即轉置於 125 ml 燒瓶中。加入 25 mL 添加 6 mM 麩醯胺酸(KO 細胞 + 5 mM 尿苷)之預熱過 CDCHO 培養基並將轉染培養物維養於 37°C 具有 8% CO₂ 和 80% 濕度的培養箱中。轉染後第 1-天，將細胞離心並以 1×10^6 個細胞/mL 再懸浮於添加 6 mM 麩醯胺酸、30% FeedB (Gibco) 和不同量的特立氟胺(0、5、15 和 25 μ M)之 CD OPTiCHO™ 選擇培養基(Gibco)中。

【0206】 在轉染後第 14 天，將細胞於 25°C 以 200 g 離心 10 min。將上清液經由 0.22 μ m PES 過濾器過濾並使用 Octet 裝置測量抗體效價。

【0207】 如圖 3 所示。二株選殖株(KO2 和 KO19)在無特立氟胺下展現優良的產量，且基因體 NGS 顯示這二株選擇株在 DHODH 基因座的二個對等基因上含有基因剔除的突變。

【0208】顯然，所有的 KO 選殖株即使在缺乏特立氟胺作為選擇劑下皆產生抗體。選擇 2 株選殖株 KO2 和 KO19 進行進一步研究。再者，這些引用的選殖株為顯示同型接合之 DHODH 基因剔除的僅有選殖株。

【0209】因此本實例係顯示，本發明提供了一組能在無使用任何選擇壓力下製造抗體的細胞株和載體。

實例 5：評估三種人類 DHODH 變體

【0210】為了確認使用缺損形式的人類 DHODH 是否能增進整合至 CHO 基因體的複製數目並藉此得到較佳的產量，係以三種米勒症候群(Miller syndrome)病患中所描述的人類 DHODH cDNA 變體(R135C、G202A 和 R346W，參見，特言之，Fang *et al.* (2012) *Biosci.* 32:631-639)轉染 DHODH KO2、KO19 和 WT CHO 9E4 細胞株。轉染帶有一編碼人類 WT DHODH 之 cDNA 的質體，作為對照載體。

【0211】將 50 ng 編碼人類抗 CD38 單株抗體 mAb-A (pBH6204)的質體載體以 *SalI-BglIII* 限制酶消化，與 37.5 ng 對應各變體的 *SalI-BglIII* 純化 DNA 片段(R135C、G202A 和 R346W)混合。加入 1 μ L 的 T4-DNA 連接酶(BioLabs)和濃縮的連接緩衝液後，於室溫進行綁紮反應(最終體積 10 μ L)10 min。

【0212】然後使用 DNA 蓄池的等分試樣轉化大腸桿菌勝任細胞(StellarTM, Takara)。

【0213】以市售的 Qiagen plasmid miniprep 套組(Qiagen)，根據製造商的建議進行小規模的質體製備。

【0214】使用 603 正義(序列 GTTGGCCTTCCAATGGCTT, SEQ ID NO: 41)和 503 反義(序列 GTTCCTTCACAAAGAT, SEQ ID NO: 42)寡核苷酸由 GATC 分包商-Eurofins Genomics 公司進行 DNA 定序。

【0215】使用 MaxCyte STX 藉由電穿孔進行 DHODH 變體的轉染。其係在如上述的 OC-100 處理組件中進行。

【0216】在轉染後的隔天，將細胞離心及以 1×10^6 個細胞/mL 就 9E4 CHO 細胞係再懸浮於添加 6 mM 麩醯胺酸和 25 μ M 特立氟胺的選擇培養基中，而就 KO2 和 KO19 選殖株則無特立氟胺。

【0217】二個繼代後，以 1×10^6 個細胞/mL 就 9E4 CHO 係於添加 30% FeedB 和 6 mM 麩醯胺酸及 25 μ M 特立氟胺的 CD OPTiCHO 培養基中開始製造 mAb-A，而就 KO2 和 KO19 選殖株則無特立氟胺。

【0218】在轉染後第 14 天，將細胞於 25°C 以 200g 離心 10 min。將上清液經由 0.22 μ m PES 過濾器過濾並使用 Octet 裝置測量抗體效價。

【0219】如圖 4 所示，在 WT CHO 9E4 的 R138C 和 R346W DHODH 突變體以及 DHODH KO 選殖株上並未觀察到顯著的效應。另一方面，G202A 突變體能讓 WT CHO 9E4 細胞株得到公克級的抗體產量以及增進 DHODH KO2 和 KO19 選殖株的產量。

實例 6：使用本發明之表現系統製造蛋白

【0220】，使用本發明之表現系統製造不同類型的蛋白，尤其是使用在實例 3 中所接揭示的有效選殖株 CHO 9E4 KO2 和 KO19 上包括上文所揭示的 G202A 突變體的人類 DHODH cDNA，用以確認最終的產量至少係在等同先前技術之表現系統的範圍內，其中該先前技術係使用人類麩醯胺酸合成酶(GS)作為選擇標記。

【0221】製造下列蛋白：

- 脂解酶：
 - 使用單順反子 cDNA PLBL2-His，及
 - 使用選擇標記 hDHODH G202A 質體或 hGS 質體，
- 單株抗體(mAb-B)：
 - 使用編碼抗體之 VH 和 VL 鏈的雙順反子 cDNA，及
 - 使用選擇標記 hDHODH G202A 質體或 hGS 質體；
- 雙專一性抗體：

- 使用(i)編碼抗體之 VH 和 VL 鏈的單順反子 cDNA 或(ii)二個分別編碼抗體之 VH 和 VL 鏈的單順反子 cDNA，及
 - 使用選擇標記(i) hDHODH G202A 質體(就雙順反子 cDNA 而言)或(ii)二個 hDHODH G202A 質體或 hDHODH G202A 質體及 hGS 質體(就單順反子 cDNA 而言)；
- 三專一性抗體：
- 使用二個雙順反子 cDNAs，及
 - 使用選擇標記 hDHODH G202A 質體和 hGS 質體。

【0222】 FectoPRO®轉染的前一天，將細胞以 1.5×10^6 個細胞/mL 以添加 6 mM 麩醯胺酸和 5 mM 尿苷之 CD CHO 培養基稀釋。

【0223】 轉染當天，將細胞懸浮液以 1.1×10^6 個細胞/mL 以添加 6 mM L-麩醯胺酸和 5 mM 尿苷之 CD CHO 稀釋。將 FectoPRO®試劑渦漩震盪 5 秒及低速離心，之後以 25 μ L/試管加至空的 50 mL 試管中。在第二 50 mL 試管中，以 CD CHO 培養基稀釋 12.5 μ g 的 cDNA 並將稀釋過的 DNA 立即全部倒入純的 FectoPRO®試劑。立刻將溶液均質並培養 10 min。將 FectoPRO®/DNA 轉染混合物倒在細胞上並將培養物於 37°C、190 rpm 和 8% CO₂ 量下培養。

【0224】 轉染細胞後 24 小時，以 Invitrogen™ Countess™裝置計算細胞數。將全細胞培養物以 200g 離心 10 min。將團塊於下列所揭示的條件下以 2.5 mL 預熱過的生產培養基再懸浮。

【0225】 就包括 3 種或以上的亞單位之複合蛋白的情況下，再次使用上述的轉染法進行第二次轉染。

-就脂解酶單順反子載體(帶有組胺酸標籤(His-tag)之蛋白)

用於轉染的表現載體	細胞	選擇標記	轉染當日培養基	轉染後選擇性培養基
AVEC-30778	KO2	DHODH_G202A	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + Gln

pBH6450		GS	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX
AVEC-30778	KO19	DHODH_G202A	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + Gln
pBH6450		GS	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX
AVEC-30778	9E4WT	DHODH G202A	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + Gln + TNF
pBH6450		GS	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX

MSX : L-甲硫胺酸磺醯亞胺 ; Gln : 麩醯胺酸 ; Uri : 尿苷 ; TNF : 特立氟胺

-就單株抗體 mAb-B 雙順反子 VH 和 VL 載體 :

用於轉染的表現載體	細胞	選擇標記	轉染當日培養基	轉染後選擇性培養基
pVA4-00072	KO2	DHODH G202A	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + Gln
pVA4-00070		GS	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX
pVA4-00072	KO19	DHODH G202A	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + Gln
pVA4-00070		GS	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX
pVA4-00072	9E4WT	DHODH G202A	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + Gln +

				TNF
pVA4-00070		GS	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX

MSX: L-甲硫胺酸磺醯亞胺; Gln: 麩醯胺酸; Uri: 尿苷; TNF: 特立氟胺; FeedB: 市售饋料

-就雙專一性抗體雙順反子或二個單順反子 VH 和 VL 載體:

用於轉染的表現載體	細胞	選擇標記	轉染當日培養基	轉染後選擇性培養基
pVA4-00073/pVA4-00076	KO2	GS / DHODH G202A	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX
pVA4-00073/pVA4-00076	KO19	GS / DHODH G202A	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX
pVA4-00073/pVA4-00076	9E4WT	GS / DHODH G202A	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX/TNF
pVA4-00074/pVA4-00076	KO2	DHODH G202A/ DHODH G202A	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00074/pVA4-00076	KO19	DHODH G202A/ DHODH G202A	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00074/pVA4-00076	9E4WT	DHODH	CD CHO +	CD OPTiCHO +

		G202A/ DHODH G202A	Gln	FeedB + TNF
pVA4-00077	KO2	DHODH G202A	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00077	KO19	DHODH G202A	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB
pVA4-00077	9E4WT	DHODH G202A	CD CHO + Gln	CD OPToCHO + FeedB + TNF

MSX: L-甲硫胺酸磺醯亞胺; Gln: 麩醯胺酸; Uri: 尿苷; TNF: 特立氟胺; FeedB: 市售饋料

—就三專一性抗體雙順反子 VH 和 VL 載體:

轉染	細胞	選擇標 記	轉染當日 培養基	轉染後選擇性 培養基
pVA4-00080/pVA4-00081	KO2	GS / DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX
pVA4-00080/pVA4-00081	KO19	GS / DHODH	CD CHO + Uri + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX
pVA4-00080/pVA4-00081	9E4WT	GS / DHODH	CD CHO + Gln	CD OPTiCHO + FeedB + MSX/TNF

MSX: L-甲硫胺酸磺醯亞胺; Gln: 麩醯胺酸; Uri: 尿苷; TNF: 特立氟胺; FeedB: 市售饋料

【0226】轉染細胞後 72 小時，以 Invitrogen™ Countess™ 裝置計算細胞數，且因換成另外的培養基而蛋白產量提升。再者，在轉染後 3 和 7 天測量轉染細胞的存活率。

【0227】在轉染後第 14 天，將細胞於 25°C 以 200g 離心 10 min。將上清液經由 0.22 μm PES 過濾器過濾並使用 Octet 裝置測量蛋白效價。

【0228】得到下列蛋白。

a) 脂解酶

	在第 3 天 CHO 細胞的 存活率		在第 7 天 CHO 細胞的 存活率	
	活細胞 (10^6)	存活率 (%)	活細胞 (10^6)	存活率 (%)
脂解酶 DHODH_G202A KO2	4.2	90	5.7	94
脂解酶 GS KO2	2.5	80	5.9	80
脂解酶 DHODH_G202A KO19	4.4	92	5.9	80
脂解酶 GS KO19	2.3	77	5.3	85
脂解酶 DHODH_G202A 9E4	2.8	78	5.4	90
脂解酶 GS 9E4	3.5	76	5.9	93

【0229】在第 14 天脂解酶的產量係如圖 5 所示。

【0230】這些結果顯示，二種 KO DHODH 細胞株具有在缺乏特立氟胺選擇壓力下製造脂解酶的能力，其能降低對生產細胞的毒性。

【0231】再者，KO DHODH 細胞株能製造等同先前技術 GS 系統(在野生型 9E4 CHO 細胞中)範圍的脂解酶，亦即 25 ml 量級，1 g/l。

b) 單株抗體 *mAb-B*

	在第 3 天 CHO 細胞的 存活率		在第 7 天 CHO 細胞的 存活率	
	活細胞	存活率	活細胞	存活率

	(10 ⁶)	(%)	(10 ⁶)	(%)
mAb-B DHODH_G202A KO2	3.2	94	6.1	96
mAb-B GS KO2	1.7	74	4.7	88
mAb-B DHODH_G202A KO19	4.2	95	6.5	95
mAb-B GS KO19	1.9	73	4	85
mAb-B DHODH_G202A 9E4	1.5	72	4.5	90
mAb-B GS 9E4	2.3	76	5.3	96

【0232】 在第 14 天單株抗體 mAb-B 產量係如圖 6 所示。

【0233】 這些結果顯示，KO DHODH 細胞株在製造該特別抗體期間表現不同。實際上，即使二種細胞株比先前技術特立氟胺製造得到最佳的產量，但 KO19 選殖株得到比 KO2 選殖株明顯最佳的產量。

【0234】 在最佳的 KO 細胞株(KO19)中，抗體產量係在等同先前技術 GS 系統(在野生型 9E4 CHO 細胞中)的範圍內，25 ml 量級，大約 0.67 g/l。

【0235】 再者，觀察到使用 KO 細胞株生存率增加。

c) 雙專一性抗體

	在第 3 天 CHO 細胞 的存活率		在第 7 天 CHO 細胞的 存活率	
	活細胞	存活率	活細胞	存活率
	(10 ⁶)	(%)	(10 ⁶)	(%)
Bispe GS/DHODH_G202A KO2	2.4	80	5.3	91
Bispe GS/DHODH_G202A KO19	2.5	84	5.4	92
Bispe GS/DHODH_G202A 9E4	1.9	69	4.1	90
Bispe	1.5	84	4.5	94

DHODH_G202A/DHODH_G202A KO2				
Bispe DHODH_G202A/DHODH_G202A KO19	1.6	86	4.8	95
Bispe DHODH_G202A/DHODH_G202A 9E4	1.6	72	5.1	91
Bispe DHODH_G202A KO2	1.7	85	4.8	94
Bispe DHODH_G202A KO19	1.8	90	4.9	95
Bispe DHODH_G202A 9E4	1.5	68	4.5	91

【0236】 在第 14 天雙專一性抗體產量係如圖 7 所示。

【0237】 在所有試驗的案例中，雙專一性抗體製造並不如單專一性抗體有效率。然而，儘管製造此類的雙專一性抗體困難，但最佳的 KO 細胞株之產量係在等同先前技術 GS 系統(在野生型 9E4 CHO 細胞中)的範圍內，25 ml 量級，大約 0.145 g/l。

【0238】 再者，觀察到使用 KO 細胞株生存率增加。

d) 三專一性抗體

	在第 3 天 CHO 細胞 的存活率		在第 7 天 CHO 細胞的 存活率	
	活細胞 (10 ⁶)	存活率 (%)	活細胞 (10 ⁶)	存活率 (%)
Trispe GS/DHODH_G202A KO2	2.8	78	5.7	90
Trispe GS/DHODH_G202A KO19	3.7	86	5.9	95

Trispe GS/DHODH_G202A 9E4	2.2	67	4.6	90
------------------------------	-----	----	-----	----

【0239】 在第 14 天三專一性抗體產量係如圖 8 所示。

【0240】 在所有的條件下，二種 KO 細胞株得到等同先前技術選擇系統範圍內的結果，亦即出色的 0.5 g/l。

【0241】 本實例因此確定 KO DHODH CHO 選殖株適用於表現各種蛋白形式(蛋白、單株抗體、雙專一性抗體、三專一性抗體)。這些選殖株甚至可用於雙重轉染用以製造複合蛋白。

【符號說明】

【0242】 無

【生物材料寄存】

【0243】 無

序列表

- <110> 法商賽諾菲公司(SANOFI)
- <120> 含有新穎選擇標記的細胞株及其用於蛋白製造的用途
- <130> BET 18P4548
- <150> EP19305331.1
- <151> 2019-03-19
- <160> 45
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1188
- <212> DNA
- <213> 歐洲倉鼠(*Cricetus cricetus*)
- <400> 1
- | | |
|--|------|
| atggcttggc ggcagatgcg gaagagagcc ctggacgcc ctatcatcct gggaggcgga | 60 |
| ggcctgctgt tcaccttta cctgacagcc accggcgacg accacttcta cgccgagtac | 120 |
| ctgatgcctg ccctgcagag actgctggac cctgagctg cccaccggct ggccatcaga | 180 |
| ttacctccc tgggctgct gccagagcc acctccagg actccgacat gctggaagtg | 240 |
| cgggtgctgg gccacaagt cagaaacccc gtgggaatcg ccgctggctt cgacaagcac | 300 |
| ggcagaggctg tggacggcct gtacaagctg ggcttcggct tcgtggaagt gggctccgtg | 360 |
| acacccagc cccaggaagg caacccaga cctagagtgt tccggctgcc tgaggaccag | 420 |
| gccgtgatca acagatacgg cttcaactcc cacggcctgt ccgtggtgga acaccggctg | 480 |
| agagccagac agcagaagca gaacaagctg accgccgacg gcctgcccct gggcatcaat | 540 |
| ctgggcaaga acaagacctc cgaggacgct gccgccgact acgtggaagg cgtgcgagtg | 600 |
| ctgggacctc tggccgatta cctggtcgtg aacgtgtcct cccccaacac cgctggcctg | 660 |
| agaagcctgc agggaaaggc cgagctgaga aggctgctgg ccaaggctgt gcaggaacgg | 720 |
| gacgctctga agggcgccca gaaacctgcc gtgctcgtga agatcgcccc tgacctgacc | 780 |
| gcccaggaca aagaggatat cgcctccgtg gccagagagc tgggcatcga cggactgatc | 840 |
| gtgaccaaca ccaccgtgtc tcggcctacc ggactgcagg gcgctctgag atctgagatg | 900 |
| ggcggcctgt ctggcaagcc tctgaggac ctgtccacc agaccatcag agagatgtac | 960 |
| accctgacct agggccggat ccccatcatt ggagtggcgc gagtgtcctc tggccaggac | 1020 |
| gccctggaaa agatccaggc tggcgcctct ctggtgcagc tgtataccgc cctgaccttt | 1080 |

ctgggccctc ccgtaggtggt gcgagtgaag agagaactgg aagccctgct gaaagagcgg 1140
 ggcttcaaca ccgtagaccga ggccatcggc gctgaccaca gaagatga 1188

<210> 2

<211> 395

<212> PRT

<213> 歐洲倉鼠 (*Cricetus cricetus*)

<400> 2

Met Ala Trp Arg Gln Met Arg Lys Arg Ala Leu Asp Ala Ala Ile Ile
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Gly Gly Leu Leu Phe Thr Ser Tyr Leu Thr Ala Thr Gly
 20 25 30
 Asp Asp His Phe Tyr Ala Glu Tyr Leu Met Pro Ala Leu Gln Arg Leu
 35 40 45
 Leu Asp Pro Glu Ser Ala His Arg Leu Ala Ile Arg Phe Thr Ser Leu
 50 55 60
 Gly Leu Leu Pro Arg Ala Thr Phe Gln Asp Ser Asp Met Leu Glu Val
 65 70 75 80
 Arg Val Leu Gly His Lys Phe Arg Asn Pro Val Gly Ile Ala Ala Gly
 85 90 95
 Phe Asp Lys His Gly Glu Ala Val Asp Gly Leu Tyr Lys Leu Gly Phe
 100 105 110
 Gly Phe Val Glu Val Gly Ser Val Thr Pro Gln Pro Gln Glu Gly Asn
 115 120 125
 Pro Arg Pro Arg Val Phe Arg Leu Pro Glu Asp Gln Ala Val Ile Asn
 130 135 140
 Arg Tyr Gly Phe Asn Ser His Gly Leu Ser Val Val Glu His Arg Leu
 145 150 155 160
 Arg Ala Arg Gln Gln Lys Gln Asn Lys Leu Thr Ala Asp Gly Leu Pro
 165 170 175
 Leu Gly Ile Asn Leu Gly Lys Asn Lys Thr Ser Glu Asp Ala Ala Ala
 180 185 190
 Asp Tyr Val Glu Gly Val Arg Val Leu Gly Pro Leu Ala Asp Tyr Leu
 195 200 205
 Val Val Asn Val Ser Ser Pro Asn Thr Ala Gly Leu Arg Ser Leu Gln
 210 215 220
 Gly Lys Ala Glu Leu Arg Arg Leu Leu Ala Lys Val Leu Gln Glu Arg

225		230		235		240									
Asp	Ala	Leu	Lys	Gly	Ala	Gln	Lys	Pro	Ala	Val	Leu	Val	Lys	Ile	Ala
		245						250					255		
Pro	Asp	Leu	Thr	Ala	Gln	Asp	Lys	Glu	Asp	Ile	Ala	Ser	Val	Ala	Arg
		260						265					270		
Glu	Leu	Gly	Ile	Asp	Gly	Leu	Ile	Val	Thr	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Arg
		275						280					285		
Pro	Thr	Gly	Leu	Gln	Gly	Ala	Leu	Arg	Ser	Glu	Met	Gly	Gly	Leu	Ser
		290				295							300		
Gly	Lys	Pro	Leu	Arg	Asp	Leu	Ser	Thr	Gln	Thr	Ile	Arg	Glu	Met	Tyr
305				310							315				320
Thr	Leu	Thr	Gln	Gly	Arg	Ile	Pro	Ile	Ile	Gly	Val	Gly	Gly	Val	Ser
				325						330					335
Ser	Gly	Gln	Asp	Ala	Leu	Glu	Lys	Ile	Gln	Ala	Gly	Ala	Ser	Leu	Val
				340						345					350
Gln	Leu	Tyr	Thr	Ala	Leu	Thr	Phe	Leu	Gly	Pro	Pro	Val	Val	Val	Arg
				355				360							365
Val	Lys	Arg	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Lys	Glu	Arg	Gly	Phe	Asn	Thr
				370				375							380
Val	Thr	Glu	Ala	Ile	Gly	Ala	Asp	His	Arg	Arg					
385						390									395

<210> 3
 <211> 1188
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

atggccttggc	ggcacctgaa	gaagagggcc	caggacgccg	tgatcatcct	gggaggcgga	60
ggcctgctgt	tcgcctctta	cctgatggct	accggcgacg	agcggttcta	cgccgagcat	120
ctgatgccca	cactgcaggg	cctgctggac	cctgagctcg	cccatagact	ggccgtgcgg	180
ttcacctccc	tgggactgct	gcctagagcc	cggttccagg	actccgacat	gctggaagtg	240
cgggtgctgg	gccacaagtt	cagaaacccc	gtgggaatcg	ccgctggctt	cgacaagcac	300
ggcgaggctg	tggacggcct	gtacaagatg	ggcttcggct	tcgtggaaat	cggctccgtg	360
acccccaaagc	cccaggaagg	caaccccaga	cctcgggtgt	tcagactgcc	tgaggaccag	420
gctgtgatca	acagatacgg	cttcaactcc	cacggcctgt	ccgtggtgga	acaccggctg	480
agagccagac	agcagaagca	ggccaagctg	accgaggatg	gcctgcctct	gggagtgaac	540
ctgggcaaga	acaagacctc	cgtggacgcc	gccgaggatt	acgctgaagg	cgtgcgagtg	600

ctgggacccc tggctgatta cctggctcgtg aacgtgtcct cccccaacac cgctggcctg 660
 agatctctgc agggcaaggc cgagctgcgg agactgctga caaaggctgc gcaggaacgc 720
 gacggcctgc ggagagtgca tagacctgcc gtgctcgtga agatcgcccc cgacctgacc 780
 agccaggaca aagaggatat cgcctccgtc gtgaaagagc tgggcatcga cggactgac 840
 gtgaccaaca ccaccgtgtc taggcctgcc ggactgcagg gggctctgag atctgaaacc 900
 ggccggactgt cggcaagcc tctgagggat ctgtccaccc agaccatcag agagatgtac 960
 gcctgaccc agggccgggt gccaatcatt ggagtgggcg gagtgtcctc cggccaggat 1020
 gcctggaaa agatcagagc cggcgcttcc ctggtgcagc tgtacaccgc tctgacctt 1080
 tggggcctc cgtcgtggg caaagtgaag agagagctgg aagccctgct gaaagagcag 1140
 ggatttggcg gcgtgaccga tgccatcggc gctgaccaca gaagatga 1188

<210> 4

<211> 395

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Met Ala Trp Arg His Leu Lys Lys Arg Ala Gln Asp Ala Val Ile Ile
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Gly Gly Leu Leu Phe Ala Ser Tyr Leu Met Ala Thr Gly
 20 25 30
 Asp Glu Arg Phe Tyr Ala Glu His Leu Met Pro Thr Leu Gln Gly Leu
 35 40 45
 Leu Asp Pro Glu Ser Ala His Arg Leu Ala Val Arg Phe Thr Ser Leu
 50 55 60
 Gly Leu Leu Pro Arg Ala Arg Phe Gln Asp Ser Asp Met Leu Glu Val
 65 70 75 80
 Arg Val Leu Gly His Lys Phe Arg Asn Pro Val Gly Ile Ala Ala Gly
 85 90 95
 Phe Asp Lys His Gly Glu Ala Val Asp Gly Leu Tyr Lys Met Gly Phe
 100 105 110
 Gly Phe Val Glu Ile Gly Ser Val Thr Pro Lys Pro Gln Glu Gly Asn
 115 120 125
 Pro Arg Pro Arg Val Phe Arg Leu Pro Glu Asp Gln Ala Val Ile Asn
 130 135 140
 Arg Tyr Gly Phe Asn Ser His Gly Leu Ser Val Val Glu His Arg Leu
 145 150 155 160
 Arg Ala Arg Gln Gln Lys Gln Ala Lys Leu Thr Glu Asp Gly Leu Pro

	165		170		175
Leu Gly Val Asn	Leu Gly Lys Asn Lys Thr Ser Val Asp Ala Ala Glu				
	180		185		190
Asp Tyr Ala Glu Gly Val Arg Val Leu Gly Pro Leu Ala Asp Tyr Leu					
	195		200		205
Val Val Asn Val Ser Ser Pro Asn Thr Ala Gly Leu Arg Ser Leu Gln					
	210		215		220
Gly Lys Ala Glu Leu Arg Arg Leu Leu Thr Lys Val Leu Gln Glu Arg					
225		230		235	240
Asp Gly Leu Arg Arg Val His Arg Pro Ala Val Leu Val Lys Ile Ala					
	245		250		255
Pro Asp Leu Thr Ser Gln Asp Lys Glu Asp Ile Ala Ser Val Val Lys					
	260		265		270
Glu Leu Gly Ile Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Thr Thr Val Ser Arg					
	275		280		285
Pro Ala Gly Leu Gln Gly Ala Leu Arg Ser Glu Thr Gly Gly Leu Ser					
	290		295		300
Gly Lys Pro Leu Arg Asp Leu Ser Thr Gln Thr Ile Arg Glu Met Tyr					
305		310		315	320
Ala Leu Thr Gln Gly Arg Val Pro Ile Ile Gly Val Gly Gly Val Ser					
	325		330		335
Ser Gly Gln Asp Ala Leu Glu Lys Ile Arg Ala Gly Ala Ser Leu Val					
	340		345		350
Gln Leu Tyr Thr Ala Leu Thr Phe Trp Gly Pro Pro Val Val Gly Lys					
	355		360		365
Val Lys Arg Glu Leu Glu Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gly Phe Gly Gly					
	370		375		380
Val Thr Asp Ala Ile Gly Ala Asp His Arg Arg					
385		390			395

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於產生 gRNA 的對應 DNA 片段

<400> 5
ggatgcagcc atcatccttg 20

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 1)

<400> 6
caccgggatg cagccatcat ccttg 25

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 1)

<400> 7
aaaaccaagg atgatggctg catcc 25

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 2)

<400> 8
caccgatgc agccatcatc cttgg 25

<210> 9
<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 2)

<400> 9

aaaacccaag gatgatggct gcatc

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 3)

<400> 10

caccggcagc catcatcctt ggggg

25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 3)

<400> 11

aaaaccccc aaggatgatg gctgc

25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 4)

<400> 12
caccggccat catccttggg ggagg 25

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 4)

<400> 13
aaaaccctcc cccaaggatg atggc 25

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 5)

<400> 14
caccggctat tcgcttcacg tccct 25

<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 5)

<400> 15
aaaacagga cgtgaagcga atagc 25

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 6)

<400> 16

caccggcctc tacaaactgg gcttt

25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 6)

<400> 17

aaaacaaagc ccagtttgta gaggc

25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 7)

<400> 18

caccgggctt tgggtttgtc gaggt

25

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 7)

<400> 19

aaaacacctc gacaaaccca aagcc

25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 8)

<400> 20

caccggctgg tctgaggagc ctaca

25

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 8)

<400> 21

aaaactgtag gctcctcaga ccagc

25

<210> 22

<211> 14437

<212> DNA

<213> 中國倉鼠 (*Cricetulus griseus*)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1992)..(2015)

<223> 質體 pBH6840 KO DHODH SEQ1 和 pBH6841 KO DHODH SEQ4 的標靶

<220>

<221> misc_feature
 <222> (2129)..(2147)
 <223> 質體 pBH6842 KO DHODH SEQ5 的標靶

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4015)..(4047)
 <223> 質體 pBH6843 KO DHODH SEQ7 的標靶

<400> 22

```

ccgagcccac attctccaat ggagtggagg cagaggcggg cccagtggca gaaggagcat      60
ggcgtggaga cagatgagag tgagtctgtt gcgggtgctt acgcttgttc ggaaaacagg      120
ttgggagtgg acgaggctgg gagattgaaa ggctggggcc cttgcagtgt gggctgcatg      180
tgtgctcagc taggggcatg caaaaagcaa gcgtgctggg cagaggctga gttgattgtg      240
agagatcgcg ggcttttttt ttttttttt tcttaactg agctagtatc gggcccctgt      300
gagcacatgg tggctagcat tatggaaagg atccagggcg gaatgaaata agacacgcag      360
ccacccttcc agataaagtg tggttagaat gggagtcccg tgcgaagagt ccgtagattg      420
tgtccctggc ttgggaaaga gtgcgcagat attgtttctt gacacgtgag aatttctccc      480
tccagaggag ggagaatgaa tacttggttt gctgtacagg caaatctgat cacatcctct      540
acttccttat ttagtggaca aatcccatta aaaatataat cactgattgt ggtgaggggt      600
tgtgctgtga catgggagct ggaaccgaac tctgcactta accactgaac catctccagc      660
cccaaatct gtattttggc tgacaccccc acatttctcc taccttactt taagaaatgc      720
tttctttta gtccaaaca gacctgtctt cctctacccc attctctggc ccttctcatt      780
ggcttcagcc acctagagat tccttctcca gctgcttctt cctcttttagc ttttgtgtct      840
ccttggaag tcaaccttag cctggaagga gcctcaagat ccttcatta cttatctctt      900
cgtgtcagtt ttcttgggtt tgtgtttaca tggccattaa tttctctctt cattagatag      960
attacacact tctgaaggac agggacctgg tgtggtttgc ttgcctttgg tgaaggattg     1020
aatgaatgca ttagccactt ggcatctggc agtgataatt atcaaaaagc attgtgagcc     1080
tcctttgaac tagggtagtg attctctacc cagagtgtga agctatgttt gtattacaac     1140
cacttttata ttatacacat aggacattc aggccagtaa cttttctagg tataatttta     1200
aaatatagac accatgtcct aactacagta taaaggagaa atgaaaacat gtatttcagt     1260
atgtagaagt cagaacacag ttcacctaca tagatggcca ggtgtttaag cctctattta     1320
gaagggtgtc gttggtatac aaacagcact gtataccctt tctggtgggg ttttaggaac     1380
agtgaccaag tcttagtaat gttttgtgca aactgtacaa ttgtccttaa attacaaggt     1440
atctttatth ctgtaaaagt caccctgtac atgtaaacca tgtggtttgtg tggatgaacta     1500
tagcttgctt cttgcctctc ctattatcct cagataatag gaagttttcc tcacataaat     1560
agcaatagca agtcaaacaca tcatacagta catagggaaa ctagtgtgtt agctttaatt     1620
aaagaagaat atigacagga ctgatttctc cacaccaaatt gtattagcat cattccctca     1680

```

ttaactagta	aaaattttcc	catgtgaccc	ctagggggca	gtactgcctg	tcttgaaaat	1740
tccctgcctg	gtccttagga	aaatattcag	ggctagaacc	catgtaagca	gtgtaggtac	1800
tgcacttacc	ttttagatg	tgtaatggg	caggatatga	agggggacag	tgtgagcagg	1860
gaaggactgt	cactttgtgt	agttgttatg	tcctctgggc	aggtgtgaag	ggtcaggaag	1920
ggtactgcag	gctggctga	tggggttccc	catggggcct	tttctctccc	ccactagaag	1980
cgggccctgg	atgcagccat	catccttggg	ggaggaggac	ttctcttcac	ctcttacctg	2040
acagccacgg	gcatgacca	tttctatgct	gaatatctga	tgccggcct	gcagaggctg	2100
ctagaccag	aatcagccca	cggctagct	attccttca	cgtccctggg	gctccttct	2160
cgagctacat	ttcaggactc	tgacatgctg	gtaggtcccc	cggtcacct	gtgttacatt	2220
tgtgtttgta	ggggaggta	catcctttag	cacttctgta	ttctctgct	gccactgggc	2280
ttttgaaaac	cagagctgca	ggttcacaag	cagctgggac	ctggagccca	gcccaggaa	2340
gggacttttc	ttctgtgta	cacctgtac	ttacagaaca	gcactcagca	tatagccggt	2400
gcttacagct	ttaatcctca	cagataacct	ttgaggagg	tcctatctca	tctccatcta	2460
caaatcagga	aactgaggta	cagactaagt	aagtgacttg	cccaaggta	cacagctggg	2520
aggtggcagg	accaggattc	aaacctatag	agtttgactc	cagtgtccaa	ccttggtcac	2580
tggcctgcct	tgtgagatc	cctctgctga	acaggaacat	cttctggagt	cattaagcag	2640
ctactggatg	caggggacag	ggtcagcagg	gaagggctgt	cactttaga	tactgtgtcc	2700
tctgtctgga	taggtgtgaa	gtctcagagt	gggtgctgca	gcctggcctg	atgggtccgt	2760
cctttcccc	catcagaagc	agacctggc	tgtagtcac	accctgaggg	gtggaggact	2820
taagtcttag	gcaacctcct	gccccagcca	catcagcca	caactcactc	ctgtggccca	2880
cctggcacca	tttataacag	agccagtgtg	gcccttctac	tgtctctctg	aatgctcccc	2940
ttttgagatg	ggcctaggtt	gtccaggttg	gtctcaaaact	tggggtccca	aatgatttca	3000
gaatctcagc	ttctgagta	agtgggatca	cacagtatgc	accactgtgc	gcagtgttcc	3060
ctgttccccg	atagccaggc	cggttgatac	tcttagcccc	attcaccttt	ctcggttttc	3120
taagtcttca	gttttctatc	atgacgagac	tctctgggg	gaggggatg	gctgggtgct	3180
tctggaatgc	ttggctgacc	cggctctctg	attgaccggt	ttaccataa	tctcaaagaa	3240
gcctgacatc	aacaccccag	gctctgtcac	acagccaggg	atgagaactg	gctttaggggt	3300
agcctcaagg	aaggcctgtt	ctagctgaac	ttctcgcctc	atggttatga	agtgtgtcgt	3360
gcacattttt	accttcttgg	tgtctattct	cgtctcctgt	ggattttgag	agcatgtagc	3420
tttccccttg	gggactggcc	tctaagagct	cactggcagc	accattgcct	gccagtgtcc	3480
accttcagc	tctccatggt	gccccatggc	tggcttcttg	acagttatgg	aggaagggcc	3540
agctagggct	tgtatgctag	gctggctaca	ggctacctca	aggctgggtga	caccaaggac	3600
tccttctcct	gcccaggttg	agtagatagg	aagatacaca	gtaattgtgc	aagacagcac	3660
ctgtctcctc	ttcacttgtg	gtgggacact	atctttctct	cccactgcc	ttgagacccc	3720
ctggtgacag	actccagcag	acatcagaag	cacctgcaga	atgctgatgc	agatagatac	3780
cccagggtgt	ccttctctcc	aaagatccct	atcttctggg	cccagtgatg	cttagcaagc	3840
tccaggggaa	ttcttataca	gtatgctggg	atccctgctg	tgagaaccac	ttggtatagc	3900
tgtttatacc	tctgacctgt	ctccttccca	ggaagtgaga	gtcctgggcc	ataaattccg	3960

aaatccggta	gggattgctg	cgggatttga	caagcacggg	gaagctgtag	atggcctcta	4020
caaaactgggc	tttgggtttg	tcgaggtagg	aagtgtgact	ccccagcctc	aggaaggaaa	4080
ccccagaccc	agagtgttcc	gcctcccgga	ggaccaagct	gtcattaaca	ggtaggtggt	4140
ggctcaatgt	catagggaca	tctcctcccc	tgctgggac	tctgagatgg	aacctgtttt	4200
gtgcttttct	catatgatca	gtggacagtc	tgtcctttgg	gatagtcagg	agcacctttg	4260
aacacctgtt	gtgtactagg	cagctctcgc	cccaaccttg	ggaaacagct	gttaggattt	4320
taccaggtat	tcccactgag	gctctgagag	ctgggtctgg	ttgcaaagaa	cagcttggga	4380
aggcttgggc	tgttgggctt	cagtgtgagc	ttttttacat	tgttgctcta	ttgcctttgt	4440
ccaatgttgg	ctaacaggaa	tataatgac	tcacatgtaa	tttgaaatat	tctaattgat	4500
cattaaaaac	tagtgaactt	gataatacat	ttataattat	tatatattta	attattatga	4560
tttaattata	aacagtgtgt	tctaaagtca	ttttaacctg	cagtcaatgt	aaaaatcatt	4620
ggttaactat	cgctctcttt	ttattggttt	ccggctcccc	aatgccttta	cttctggttc	4680
ctctcacttg	gccagggctg	gtggccacaa	gcttcagcag	cgttgggtact	gtacaggtga	4740
cccttgcctt	caatgaacag	ggacatggta	ttcaaatgia	cagctgctct	taggaggaga	4800
atccttcgac	tgtatgaagc	cttgcggttt	gttgttctgt	atagttagta	taactgcaaa	4860
gggaagacct	tcgtactttt	tgctaggaga	tttttggaga	acctccttgt	ggggattttg	4920
gcaggcctgt	ggcagtgtct	cctactgtct	gtttcaggaa	actgatttac	aagtcataga	4980
tctttctgtt	acattacagg	cagggactga	tgtctttagg	actggccaga	caaaatactt	5040
gtgtttctga	tttggctgtt	acaagtgact	tcgggtctta	ggatgatggt	acttgggaca	5100
gggagtggtg	agggacaggc	acctgtgtct	ttgggcatgt	gcgaacttag	ccttcttgc	5160
catatacaca	gtgtgtgttc	agtataggca	tgctaacgga	tgggtattta	cacctgcaga	5220
cccacatgcc	acaatccatg	cagtgttgc	ctggctgcaa	gcaacaaagt	gatgtaacca	5280
gatctcattt	gttatcattc	ttgtcactag	cacaaaataa	ctgacagcag	gcagcttaag	5340
gaatggggtc	aggtattttg	gctcacagtt	tgaggggaca	cgccctccc	gtggcaggag	5400
cctgaggcag	agggtcactc	tgtacctaca	gtgaggaagc	agcaaggga	ggatgctggt	5460
gcttgggtct	ctttctccgt	cttgcctcagc	tggggtgtga	atccatggtg	ctgcccattg	5520
ttgcgggtgg	tcttccctgc	tccattcaac	cttcccagaa	acagtcttcc	agacacacaa	5580
caggtgtgtt	tccatgggtga	ctctaagtca	catctagtig	acaatgaagc	ataaccagtg	5640
gtgagagcat	ggaaatggtc	tcaggtacgt	tttccaaact	gccacctttt	aattccaccc	5700
cttacctgtg	ggtttatgtg	ctccaggtag	ggattcaaca	gccacgggct	ctcagtggtg	5760
gaacacaggc	tacgggccag	acagcagaag	cagaacaagc	tactgcagg	taactcagg	5820
tgttgtggga	gggacttact	aactctatta	caaagaaaca	tggggagggc	atgggattca	5880
gcaataagaa	acaaatgagc	aaacaattaa	aacccacag	aacaactcag	gggattgtcc	5940
agcttctacc	acagcctcaa	aggctcctaac	cagatggcat	aattcagcaa	aaccttctgt	6000
gtctctggca	tccatggaac	ctgaattgtg	tcttaactta	ggggcttgaa	gatcagcaga	6060
gagcatgtgt	ggagctaaga	tgcgccccga	gttcatcttc	ccacatccc	ccctgtctgt	6120
gtccttctgt	tcactgtgta	aatagtgtgt	attagttctg	gaagagctac	agaagagaat	6180
agagtgttca	cactcctgtc	cttccactca	ggggaccagc	tgtcctcaaa	tctcacttcg	6240

gaaacaacct	ttgcttttgg	tggattctca	tggagacgct	ccagtttgtc	ctctgtggtc	6300
tgcattggctc	tcigaagtgc	atthttgggt	caaageccctg	ggtggtggcc	cccctcccca	6360
tgtctccctg	tgtggcttct	gcagtccatg	gagatthttc	tcctttgcct	ctggaatgtc	6420
tttcaggagg	tcttagtctc	atthgatgtc	cccatagtgt	gacaattaag	ccaaggactt	6480
ctgcattttat	ttgaggagct	aaggaagaga	gggctgaagc	atthtgacgag	tttagagggt	6540
gggaacagga	aatgacaatg	tttaaaaaaa	cccctggttt	tgacggaacc	gggtctgcca	6600
gccctgtaga	accttgaaca	caatgtttgt	ggtttgtggc	gttctcctgc	ctcctgcctt	6660
ccgtttcttc	gttttaatgc	cttctgtggg	ctaggtttat	tgccattgtc	ctgtgtccac	6720
ccttcacctc	cattctgtgc	cctcacagtc	actggagtga	ggccaagttc	tgtgtctttg	6780
ccctgcctac	atgtgtctgc	tgacagctag	cagcctcata	gaaacttttc	atcagcacca	6840
tgccataggaa	ccctagtggg	tagaagagac	tgtgctttgt	gtaaagtgtg	gttcagcctt	6900
cctgactcca	gaactgtgac	tgtgggcagg	tgaccactaa	tgaaaggctc	agttgcctct	6960
tggaagccat	actctcaatc	cagtttactt	gtgctaaagc	ttacagtgat	cctggcttgc	7020
tgggtgctag	acttgaagct	ttgagacctt	gttctgtata	tagtctaatc	cctggctcca	7080
cccagcccac	ttaggaaatt	agttacacaa	atcttacttt	taagttgatg	accagaaga	7140
tgacgggttg	tgagagatgg	actgtgagaa	gggggctagc	aatacagtg	gggatgttgc	7200
ccgtgtcctc	cctggcctgg	tatgggtgag	ctgacttggg	gttctaggtc	tggttggatt	7260
ggcagatgga	cagcagcctg	ggcactgac	atactaggag	ttgtaagaaa	gttgagtgtg	7320
aataaagatg	aatccaggaa	actcctttct	gccaaagaga	acatgagtct	gaaagagcat	7380
ttttctagag	gcttggcctt	ttgagagtga	cagggggcag	gtgtgagtaa	ttacaccag	7440
gccccaggag	tgtcttgagg	ctacagagat	gtatcatcac	cctaattata	agttcttttc	7500
tcagagaaca	agaaaagatt	attacacact	tccatctact	ttttaggcat	gatagttgaa	7560
aacatttctc	agtgttttcc	tgtgtagctc	aggctggcct	cagacttaca	gcaatcctcc	7620
tgacagactaa	atthccatgt	gtggcctcca	gtgttttata	cttttgtttt	taatcatttc	7680
acatacagtc	ccttgaccaa	ggctcatgag	atthcaggtg	ttcttgctga	catgcccac	7740
aatacctgcc	tactctctct	ttgtttatct	ctcaaaccac	tgatctgtga	atatagcaag	7800
tgtcattggg	agtcatthta	ttgttacata	cttcaagaag	agcagtagta	tttgtttttt	7860
tccccatgtc	cctgatttgt	ctggactcag	atccttggcc	accatgcag	tcagtgttgg	7920
ggatgggttc	catctcatgg	attgggcctt	aaatacaatc	agattctggt	tggttactcc	7980
cgcagctttg	tgctactgtt	tcactagtgc	atccagggca	ggtcatcatt	gtagatcaaa	8040
agatgtgtag	cggggttggg	gtttaccttt	ctcctttggg	aacatgcaga	atacctccca	8100
gtaccatgga	caccaccaga	gggatgaagg	ctgtaggtag	gcaccagctc	gacttctccc	8160
tatttaataa	cttgtgtagg	tgttgccttt	agcaatagag	ccttgtcagt	tttcagagag	8220
caaccaatat	ccttgacaat	agcctgggtt	gtttgggtat	tctcatgggg	cccctttggc	8280
caacaacttc	tttgaagtc	tgggtcaaat	cttcaactaa	accatctggc	actgggcatt	8340
ttttggttgg	gaggctthta	tgactgtctc	tattthtacta	ggggttataa	gtttgtttac	8400
atthccttacc	cgatcttgat	ttactthtag	tagatggtat	gtatcaagaa	aattattcat	8460
ttattttcaa	ttttccattt	aggtagagta	taggtthttta	aaacacatcc	ctatgattct	8520

ttggatttcc	ttggigtctg	ttggtatgic	actcttttca	tctctaattt	tgtaatttg	8580
gatctttcct	ctttgccttt	taattaattt	ggctaagggt	ttgtcaatct	tactggtttt	8640
ctcaaagaac	caactcttcg	tttcattgat	tctttgcatt	atthttgtct	gtttctatth	8700
cattgatttc	agccctgagt	ttgattatth	cctgccatct	actcctcctg	gggtgtgactt	8760
cttgtttgtc	tagagctttc	agggtgtgcta	gtatgaaatc	tctctaattt	atgtaggcac	8820
ttagtgtctac	ataaagttht	gggtttttgt	ttgttttga	cctatthttc	attcagtagt	8880
gagttgttca	gtttcagttg	ttcagtttcc	atgagtttgt	aagctttctg	ttgtttttgt	8940
agggtttgat	attcagctth	aatctgtggf	ggfatgatag	ggfattatth	cagttttctt	9000
gtatcttttg	agacttgcct	tatggcctag	tatattggta	gttttggaga	aagttccatg	9060
agggtgtgag	aagaaacgtt	ttgtgtttgg	gtgaaatgtt	ctataaatta	ggfccatttg	9120
gttttaacaca	tcatthtagct	ccatcatthc	ttgtttcagt	ttttgtctgg	atgacctgtc	9180
tattgtctgag	agtgggggag	tatcaaagta	tcccactatg	tgtgtgtgtg	tgcggagggg	9240
tcaatatgtg	atthaaagct	tagtagagtt	tctthtatga	acttggatgc	ctttgtgctt	9300
gggtgataga	gtthtagaat	ttcaatatcc	tcttgggtgg	ttttctcttt	gatgagtatg	9360
tagtttctct	ccctatctat	ctcttgatta	gatttgattt	gaaatctatt	ctgtcatata	9420
ttaaaatggc	ttcaccctat	tgttttcttg	tccatttgcct	tggaatatct	ttttccatcc	9480
ttttactctg	agggtgatatc	tatccttgat	gttaaagtat	gtttcttgg	ttcagttaaa	9540
gaatgaatcc	tatthttgaa	cccaatthtt	tagtctgtgt	cttattthatt	gggaaattga	9600
ggccactgat	atcagtgtht	gttgattcct	gttatattat	tgttatggcg	taggcccctt	9660
ccctthtgat	ttgctggctt	gagattatth	attcaggctg	aagtttctct	tgtagtacct	9720
tctatcaagc	tggatttght	gacagaaacc	acthaagtht	cattthattg	tagattgtca	9780
ttctthcttc	atctctgtga	ttaaatgtth	tgttggctat	agtagtctgg	gctggcatct	9840
gtggtagaat	gtctgcccag	gacctttgac	ttttagagtc	tcgattgaag	tcaggggtta	9900
ttctaataagg	tttgtctgcc	gttatatgtt	atctggctt	tctctattgt	ggctthttgt	9960
attctthctt	tgttctgtac	attctgttht	ttgattatta	tgtgttgtgg	ggaattthatt	10020
tttggcccag	tccgtttggf	gttctattht	tttcttatac	catgataggc	acttctctct	10080
ttaggttagg	taactthtca	tctgtgattt	tgttgaana	atthtctgtg	cctttgacct	10140
gggtthcttc	tctthttgct	atcccgttga	cttatagatt	tttgggtgtt	tcatagatc	10200
ctagatttcc	tggatgttht	gtgcccggat	tttgttttct	ttctthtttt	gtagattthaa	10260
cattthctth	gactgcagta	tcttgtctc	ctatcttgtc	ctcagtgcct	gagactctgt	10320
cttccatttc	ttgtatgatt	ttggtgaggc	ttgcttctaa	gatttctgtt	ctagttccta	10380
aattthtcat	ttccagctth	acctcaatth	gggtthtctt	tagcaattcc	atthctctct	10440
tcatgtgttg	aacaattht	ttcatthcat	tgcactgtth	gtgtthtcat	taatgggtth	10500
attcatatct	tctthtaggga	ccttgaacat	attcataata	gctattctga	gagccttgtc	10560
ttatgcttcc	ctgtattgca	tttctcggag	cctgctgtgg	tagggttgcct	gggctctagt	10620
ggagacatgt	cgttctggct	gttactgggt	ttttactctg	gtgtctaggc	gactgggtth	10680
gagaagattg	taattctagg	tgtctgatatc	tggcttgttt	tttgttgggg	tgatgttcag	10740
ttcttgggt	tctgttgcct	ccccctca	gggggggtgt	ggtaactgga	ttggttgcct	10800

ggtagggaat gcttctgaga tcctgccaga accctgccac tggcagtctt gggtagaaag 10860
 tgtttctagg tgttgggagc tgacactaat gattgaggat gggttagaag cagtgggtggc 10920
 gggagagtcc acaggaggag gagagctggg tgtgccacca gggctgcac agaggcctgg 10980
 gaatgagaac agagatgaag gtgaggcctc agcaggtagt ctgctacaag gttgggataa 11040
 ggctgggaga ttggaacttg gggacaggag ggagagtga gatcgcagac ccatccctg 11100
 gccagggtgg ggaagcctgg aggagaagat ctgtgtgatc tgctggaaat gggtcctta 11160
 gtaacttctt gaagtttctt tgattttgag gctgctgttg ggggtcccct gtatgccaag 11220
 catgtggtat atcactgaga tagaatctcc atagccctgc ttctttttg agactgggtc 11280
 tcatatcggc caggttggcc ttgaactagc tatgttgacc ttgaactttt ccttacctat 11340
 acctgagaac tgggattaca agtgcccatc acaccagct tcctattgtt tttgctttt 11400
 tcctagtatt taagcttctg gcttcccat taaaatttaa aagatgaaag gcttagtaca 11460
 cgggaagcat ccttgaaggt gcacacacti gccatataga gaggatgaag tggttctaag 11520
 tcatcaggca gcagcccag gatcagacag ttacattct ccatcatctg gttcagggga 11580
 gccccacctg tactctgaat gttgcctggg aaactgtggg gacacactct tgatatttac 11640
 agatgggctg cctctgggaa taaacctggg gaagaataag acttcggagg atgctgctgc 11700
 agactatgta gaggggtgtc gtgtcctggg ccccttggct gactacctgg tggatgaatgt 11760
 gtccagtccc aacctgctg gtctgaggag cctacaggga aaggctgagc tgcgccct 11820
 gctggccaag gtgtgtcatt acaccatcac atgcctgttg tccttactcc tttcattct 11880
 tcaggatgaag attcaggaca actgaggaga aactgttctt cacagctggc ctaggagccc 11940
 tcatcacaca tttccaagt accctctcat gtctcacagc cccggtcata cacaatagac 12000
 agttcactgc tttaaaacca caggcaagca gagcagagca ggcggggctc ccatgtatca 12060
 ctctgtcccc agaactgta atgctcagca ctgtgacac acctccttgt ttgtttcag 12120
 gaacaaaatc aaaaccttg agcagttatc tggcgggggg gtgcgggggt gggggaattg 12180
 ctgggtcttt agttgacctt aggtgaaaat gctggcctgc actgcggggc tatgggctgg 12240
 gtccccatct ctggcttctc aacctaggtg ctgcaggaga gggacgcttt gaaggagcg 12300
 cagaagccag cagtgtggt gaagatgcc cccgacctca cggcccagga caaggaggac 12360
 attgccagtg tggcgagaga ggtttgagtt ggggtggtcc agggcagggt ggggtagcc 12420
 ttcatctgcc actgctgctg ggataacaca gaaggcatg attggtgact tcctctgtgt 12480
 gaagtggaca gctggttgat tgtctgtcat tgtatagttc atctggtagc aaacagtgag 12540
 tttgaaaatg tgtttggtga gtcttttct tgcctctgat ctgtcttcat ccagaaagtc 12600
 tgaggcctgt gctagtctct gccagtctca cctgggactt agaatggtgt ctgtcccttt 12660
 ccagcttggt taaacaccag gcttctctgg ctaaaaaggt agtaggaaca cagtctgctg 12720
 ttctggactt cagtcttgtt ctactgtgta ctccctgaga tactcacaga cagcttgttc 12780
 taagggtcaa actctgtgta ggcactgtga tgggttcagc aggagatgct gctgtgtctt 12840
 cagcattgag aggctaattc tgatggcttc tccaatcaag atgtaggtga ggctgtgag 12900
 ggtcttgctc tgcagagctg gccctggcc tgggtgctgc ttcaatectc aaaagacagt 12960
 ttcttgagt acttcagatc catggcttaa ggctctttt ctgtcttgtg ctgcagctgg 13020
 gcattgatgg attaatgtc acaaacacca cagtgagctg cccgactggc ctccaaggtg 13080

ctctgcgttc	tgagatggga	ggactgagcg	ggaagccact	ccgagatctg	tcgaccaga	13140
ccatccggga	gatgtacacc	ctcactcaag	gtaaggcttt	tttgtttgtt	tgtttgaggc	13200
aggattttctc	tgtttaacac	ctctggctgt	cctggaactc	acttggtaga	ccaggctggc	13260
ctggaactca	cagcttcctt	agtgctggga	ttaaaggcat	gtgccacat	tgcttgcta	13320
aggcaagact	tctttggaca	aatgtgaggt	cctggatctt	ccctcattca	ctgtgtttgc	13380
tgagaactct	ggttctgccc	tcatcggctg	tgtttgctgg	gactgaggcc	tgatggagcc	13440
ctgggtcttt	agccctcctt	tcccggcctt	gctatgtgct	tctctccagg	caggattccc	13500
attatcgggg	ttggtggtgt	gagcagtggg	caagatgcgc	tggagaagat	ccaggcaggg	13560
gcctccctgg	tcagctgtga	cacggccctc	accttcttgg	ggccaccctg	cggtggtcagg	13620
gtcaagcgtg	agctggaggg	acttctaaag	tgagttaggt	tcgatgcagc	tgagacgtag	13680
aaagtgacac	ttgtcatcag	tctattgtgt	actcccagag	ggccggaggg	aacactgagg	13740
gcatggtggg	acgatttctc	tgctgcagct	ttggccaagg	acaacagtg	ccagaggaat	13800
tcagaatgct	tctgaggcag	ggctcattac	aaggcaggac	ttgccacttg	cccaggggct	13860
gggcatggag	gatgaagtag	taatttaccat	tgactcagtg	tctggaagct	gcaggttata	13920
aagtcacttc	ccttcttgca	cagaaggcct	ggctgtacat	atgtgcaggg	gcctgggtga	13980
gggcagagta	gcagtgggtg	taaggtgtgt	tgggtgggac	ggtgtggtaa	gcggtgtgct	14040
catggtgagt	gtgggcttcc	ttaggacagg	ctatttgttt	tctgtccaga	gagcggggtt	14100
ttaacacagt	cacagaagcc	attggagcag	atcatcggag	gtgacggttc	ctgccagatg	14160
ccccatccag	aacgtgccca	ccaactcaag	caagccttgt	ggctgcatca	taagaggaag	14220
atctgtctca	agctatgtcc	cttgactgtg	tgacctggct	ggactgcata	agccagtcac	14280
ggttatcact	agacagtaaa	ggctttctct	aatgagacca	tgaactctac	agtcactttc	14340
tggatctaag	tcctgggatc	cctcagtatt	ataaggacat	tggctctttg	ggaggaaaaa	14400
tcatggagaa	aataaagcca	tttcaatctg	ttttcaa			14437

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於產生 gRNA 的對應 DNA 片段

<400> 23

caaggatgat ggctgcatcc

20

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 1')

<400> 24

ggatgcagcc atcatccttg gtttt

25

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 1')

<400> 25

caaggatgat ggctgcatcc cgggtg

25

<210> 26

<211> 395

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 DHODH G202A 的胺基酸序列

<400> 26

Met	Ala	Trp	Arg	His	Leu	Lys	Lys	Arg	Ala	Gln	Asp	Ala	Val	Ile	Ile
1				5					10					15	
Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Tyr	Leu	Met	Ala	Thr	Gly
				20				25					30		
Asp	Glu	Arg	Phe	Tyr	Ala	Glu	His	Leu	Met	Pro	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu
				35				40					45		
Leu	Asp	Pro	Glu	Ser	Ala	His	Arg	Leu	Ala	Val	Arg	Phe	Thr	Ser	Leu
				50				55					60		
Gly	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Arg	Phe	Gln	Asp	Ser	Asp	Met	Leu	Glu	Val
65					70					75					80

Arg Val Leu Gly His Lys Phe Arg Asn Pro Val Gly Ile Ala Ala Gly
 85 90 95
 Phe Asp Lys His Gly Glu Ala Val Asp Gly Leu Tyr Lys Met Gly Phe
 100 105 110
 Gly Phe Val Glu Ile Gly Ser Val Thr Pro Lys Pro Gln Glu Gly Asn
 115 120 125
 Pro Arg Pro Arg Val Phe Arg Leu Pro Glu Asp Gln Ala Val Ile Asn
 130 135 140
 Arg Tyr Gly Phe Asn Ser His Gly Leu Ser Val Val Glu His Arg Leu
 145 150 155 160
 Arg Ala Arg Gln Gln Lys Gln Ala Lys Leu Thr Glu Asp Gly Leu Pro
 165 170 175
 Leu Gly Val Asn Leu Gly Lys Asn Lys Thr Ser Val Asp Ala Ala Glu
 180 185 190
 Asp Tyr Ala Glu Gly Val Arg Val Leu Ala Pro Leu Ala Asp Tyr Leu
 195 200 205
 Val Val Asn Val Ser Ser Pro Asn Thr Ala Gly Leu Arg Ser Leu Gln
 210 215 220
 Gly Lys Ala Glu Leu Arg Arg Leu Leu Thr Lys Val Leu Gln Glu Arg
 225 230 235 240
 Asp Gly Leu Arg Arg Val His Arg Pro Ala Val Leu Val Lys Ile Ala
 245 250 255
 Pro Asp Leu Thr Ser Gln Asp Lys Glu Asp Ile Ala Ser Val Val Lys
 260 265 270
 Glu Leu Gly Ile Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Thr Thr Val Ser Arg
 275 280 285
 Pro Ala Gly Leu Gln Gly Ala Leu Arg Ser Glu Thr Gly Gly Leu Ser
 290 295 300
 Gly Lys Pro Leu Arg Asp Leu Ser Thr Gln Thr Ile Arg Glu Met Tyr
 305 310 315 320
 Ala Leu Thr Gln Gly Arg Val Pro Ile Ile Gly Val Gly Gly Val Ser
 325 330 335
 Ser Gly Gln Asp Ala Leu Glu Lys Ile Arg Ala Gly Ala Ser Leu Val
 340 345 350
 Gln Leu Tyr Thr Ala Leu Thr Phe Trp Gly Pro Pro Val Val Gly Lys
 355 360 365
 Val Lys Arg Glu Leu Glu Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gly Phe Gly Gly
 370 375 380

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 3')

<400> 30

cccccaagga tgatggctgc cgggtg

25

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 4')

<400> 31

gccatcatcc ttgggggagg gtttt

25

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 4')

<400> 32

cctcccccaa ggatgatggc cgggtg

25

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 5')

<400> 33
gctattcgct tcacgtccct gtttt 25

<210> 34
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 5')

<400> 34
agggacgtga agcgaatagc cgggtg 25

<210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 6')

<400> 35
gcctctacaa actgggcttt gtttt 25

<210> 36
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 6')

<400> 36
aaagcccagt ttgtagaggc cgggtg 25

<210> 37

<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 7')

<400> 37

ggctttgggt ttgtcgaggt gtttt

25

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 7')

<400> 38

acctcgacaa acccaaagcc cgggtg

25

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 8')

<400> 39

gctggtctga ggagcctaca gtttt

25

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於得到 gRNA 的寡核苷酸 (序列 8')

<400> 40

tgtaggctcc tcagaccagc cggcg

25

<210> 41

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 603 正義寡核苷酸

<400> 41

gttggccttc caatggctt

19

<210> 42

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 503 反義寡核苷酸

<400> 42

gttccttcac aaagat

16

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 包括標靶序列和 PAM 的序列

<400> 43

ggatgcagcc atcatccttg g

21

<210> 44

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 包括 CrispR 序列 n°1 的正義 DHODH 外顯子 2 序列區

<400> 44

gacgaaacac cgggatgcag ccatcatcct tggttttaga

40

<210> 45

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 包括 CrispR 序列 n°1 的反義 DHODH 外顯子 2 序列區

<400> 45

tctaaaacca aggatgatgg ctgcatcccg gtgtttcgtc

40

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種細胞株，其係包括部分或完全失活的內生性二氫乳清酸脫氫酶(DHODH)基因，其中該細胞株係選自中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株、HEK293、HKB11、PER-C6、HT1080、Jurkat、Daudi、Raji 及 CAP 細胞株。

【請求項2】根據請求項 1 之細胞株，其為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株。

【請求項3】根據請求項 1 或 2 之細胞株，其中該細胞株係藉由下列所製造

- 使細胞中的內生性 DHODH 基因失活，及
- 在適合產生其中內生性 DHODH 基因為部分或完全失活之細胞株的條件下，於包括尿苷的培養基中培養該細胞。

【請求項4】根據請求項 3 之細胞株，其中係藉由基因編輯法使該內生性 DHODH 基因失活。

【請求項5】根據請求項 4 之細胞株，其中編碼 DHODH 蛋白 N-端部分之部分 DHODH 基因係進行失活之目標。

【請求項6】根據請求項 4 之細胞株，其中係藉由 CRISPR-Cas9 法使該內生性 DHODH 基因失活。

【請求項7】根據請求項 6 之細胞株，其中該 CRISPR-Cas9 法包括使用單一引導 RNA (gRNA)，其中該 gRNA 係使用序列 CACCGCACCGGGATGCAGCCATCATCCTTG (SEQ ID NO: 6) 和 AAAACCAAGGATGATGGCTGCATCC (SEQ ID NO: 7)的寡核苷酸或使用序列 GGATGCAGCCATCATCCTTGGTTTT (SEQ ID NO: 24) 和 CAAGGATGATGGCTGCATCCCGGTG (SEQ ID NO: 25)的寡核苷酸所獲得。

【請求項8】根據請求項 3 之細胞株，其中該內生性 DHODH 基因之一或多個或全部等位基因為部分或完全失活的。

【請求項9】根據請求項 1 或 2 之細胞株，其用於生產重組蛋白，其中該細胞株包括適用於生產重組蛋白之表現載體，其中該表現載體包括編碼 DHODH 之序列。

【請求項10】 根據請求項 1 或 2 之細胞株，其中該細胞株進一步係包括包含編碼外生性哺乳動物 DHODH 之核苷酸序列和至少一用於表現重組蛋白之表現匣的表現載體，其中該外生性 DHODH 係包括與序列 SEQ ID NO: 2 或與序列 SEQ ID NO: 4 至少 60%相同之序列。

【請求項11】 根據請求項 10 之細胞株，其中該核苷酸序列係包括 SEQ ID NO: 1 之序列或 SEQ ID NO: 3 之序列。

【請求項12】 根據請求項 10 之細胞株，其中該重組蛋白為單株抗體。

【請求項13】 根據請求項 10 之細胞株，其中該表現載體係包括適用於選殖抗體輕鏈之第一表現匣和適用於選殖抗體重鏈之第二表現匣。

【請求項14】 一種表現系統，其係包括：

- (i) 根據請求項 1 至 8 中任一項之細胞株，及
- (ii) 包含編碼哺乳動物 DHODH 之核苷酸序列和至少一用於表現重組蛋白之表現匣的表現載體，其中該 DHODH 係包括與序列 SEQ ID NO: 2 或與序列 SEQ ID NO: 4 至少 60%相同之序列。

【請求項15】 根據請求項 14 之表現系統，其中該核苷酸序列係包括 SEQ ID NO: 1 之序列或 SEQ ID NO: 3 之序列。

【請求項16】 根據請求項 14 之表現系統，其中該重組蛋白為單株抗體。

【請求項17】 根據請求項 14 之表現系統，其中該表現載體係包括適用於選殖抗體輕鏈之第一表現匣和適用於選殖抗體重鏈之第二表現匣。

【請求項18】 一種套組，其係包括(i)根據請求項 9 至 13 中任一項之細胞株或根據請求項 14 至 17 中任一項之表現系統，以及(ii)無尿苷，尤其是進一步無 DHODH 抑制劑之培養基。

【請求項19】 一種活體外製造重組蛋白之方法，其係包括下列步驟：

- A) a1)提供根據請求項 9 至 13 中任一項之細胞株；
- 或
- a2)提供根據請求項 1 至 8 中任一項之細胞株，及

a2')將如請求項 14 至 17 中任一項所定義的表現載體導入步驟 a2)所提供的細胞株中；

或

a3)提供包括內生性 DHODH 基因之細胞株，其中該細胞株係選自中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株、HEK293、HKB11、PER-C6、HT1080、Jurkat、Daudi、Raji 及 CAP 細胞株，

a3')使步驟 a3)所提供的細胞株中內生性 DHODH 基因部分或完全失活，及 a3'')將如請求項 14 至 17 中任一項所定義的表現載體導入步驟 a3')所得到的包括部分或完全失活之內生性 DHODH 基因的細胞株中；

B) 於適合製造重組蛋白之條件下培養該細胞株；及

C) 分離及/或純化該重組蛋白。

【請求項20】 根據請求項 19 之方法，其中步驟 B)係在無尿苷，尤其是進一步無 DHODH 抑制劑的培養基中進行。

【請求項21】 根據請求項 19 或 20 之方法，其進一步係包括將該重組蛋白調配成醫藥組成物之步驟 D)。

【請求項22】 一種根據請求項 9 至 13 中任一項之細胞株用於製造重組蛋白之用途。

【請求項23】 根據請求項 22 之用途，其中該細胞株係與無尿苷，尤其是無 DHODH 抑制劑的培養基組合使用。

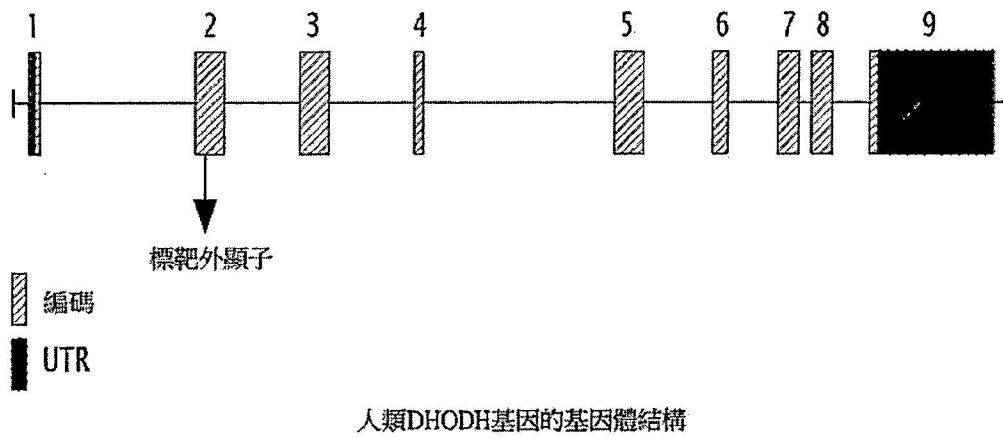
【請求項24】 一種根據請求項 14 至 17 中任一項之表現系統用於製造重組蛋白之用途。

【請求項25】 根據請求項 24 之用途，其中該表現系統係與無尿苷，尤其是無 DHODH 抑制劑的培養基組合使用。

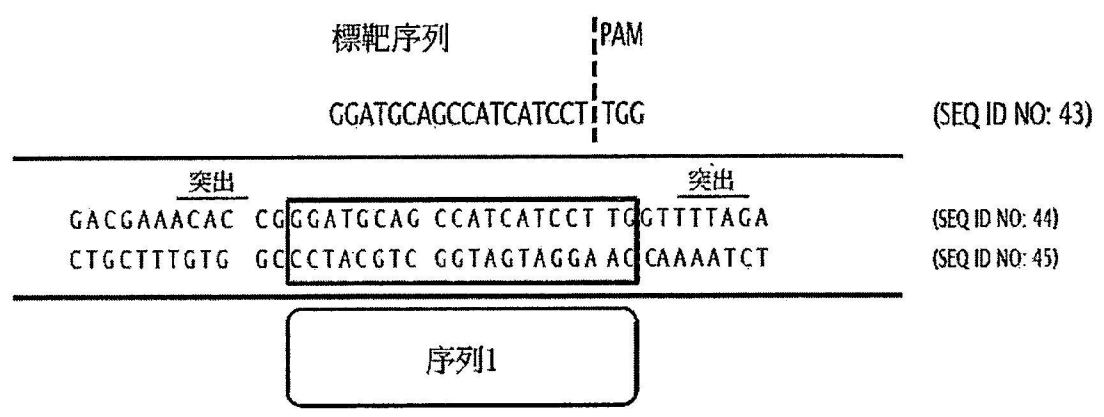
【請求項26】 一種根據請求項 18 之套組用於製造重組蛋白之用途。

【請求項27】 根據請求項 26 之用途，其中該套組係與無尿苷，尤其是無 DHODH 抑制劑的培養基組合使用。

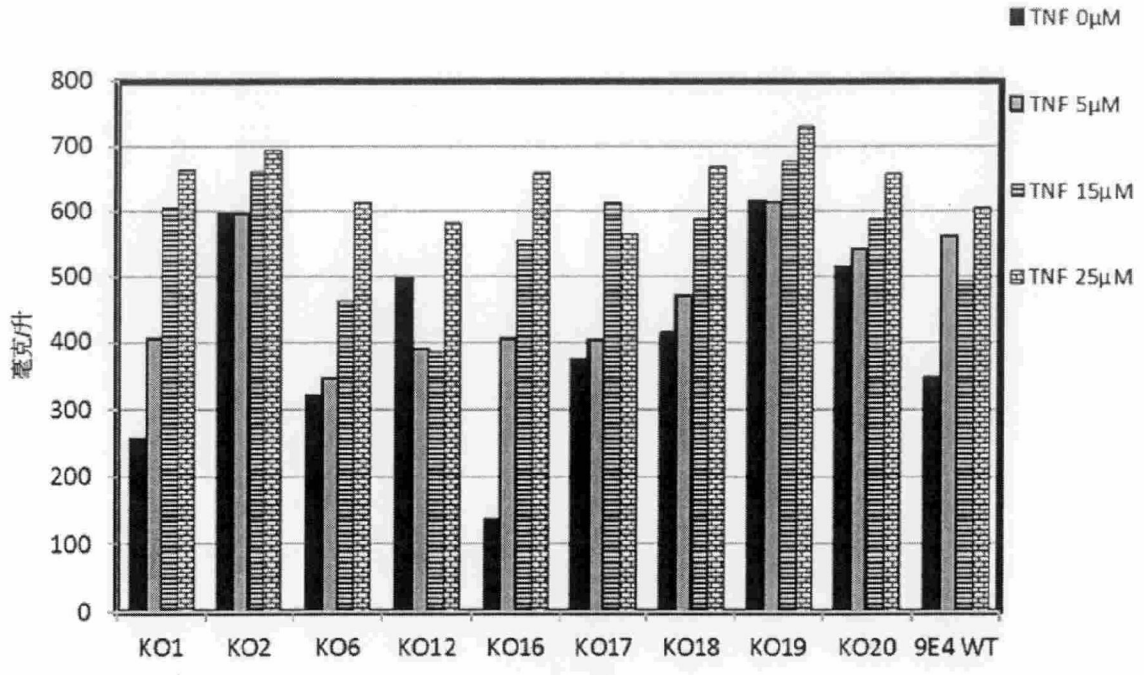
【發明圖式】



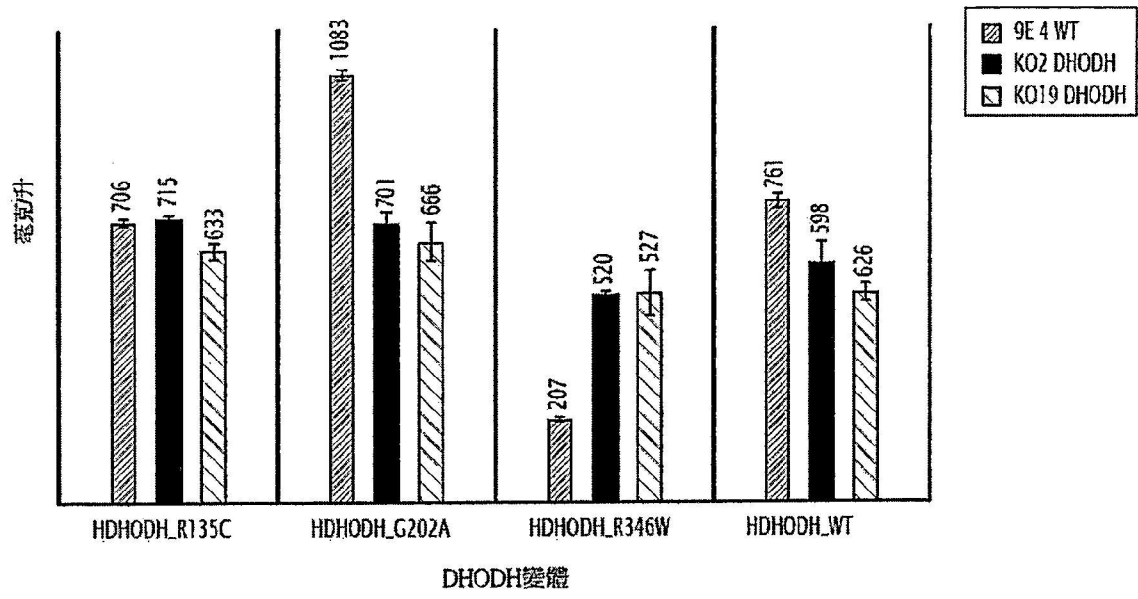
【圖1】



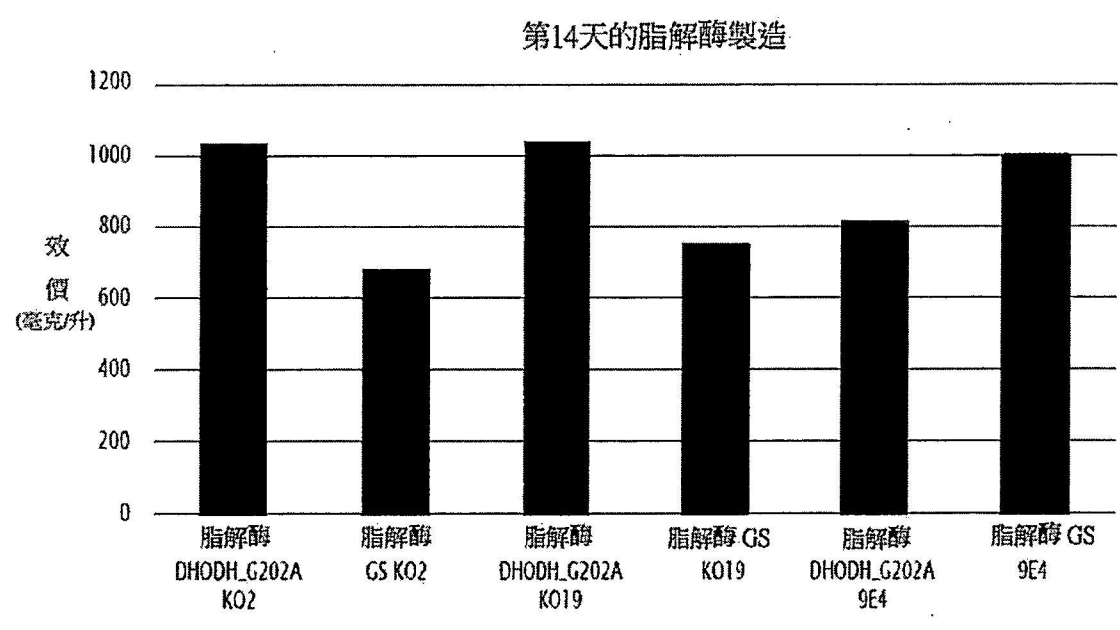
【圖2】



【圖3】

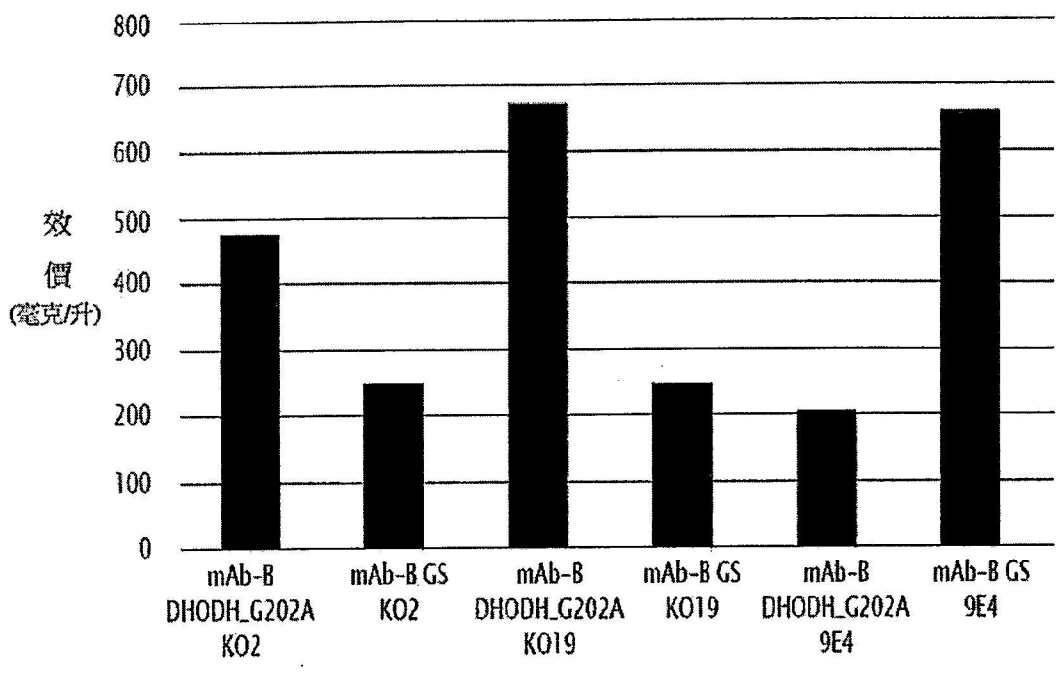


【圖4】

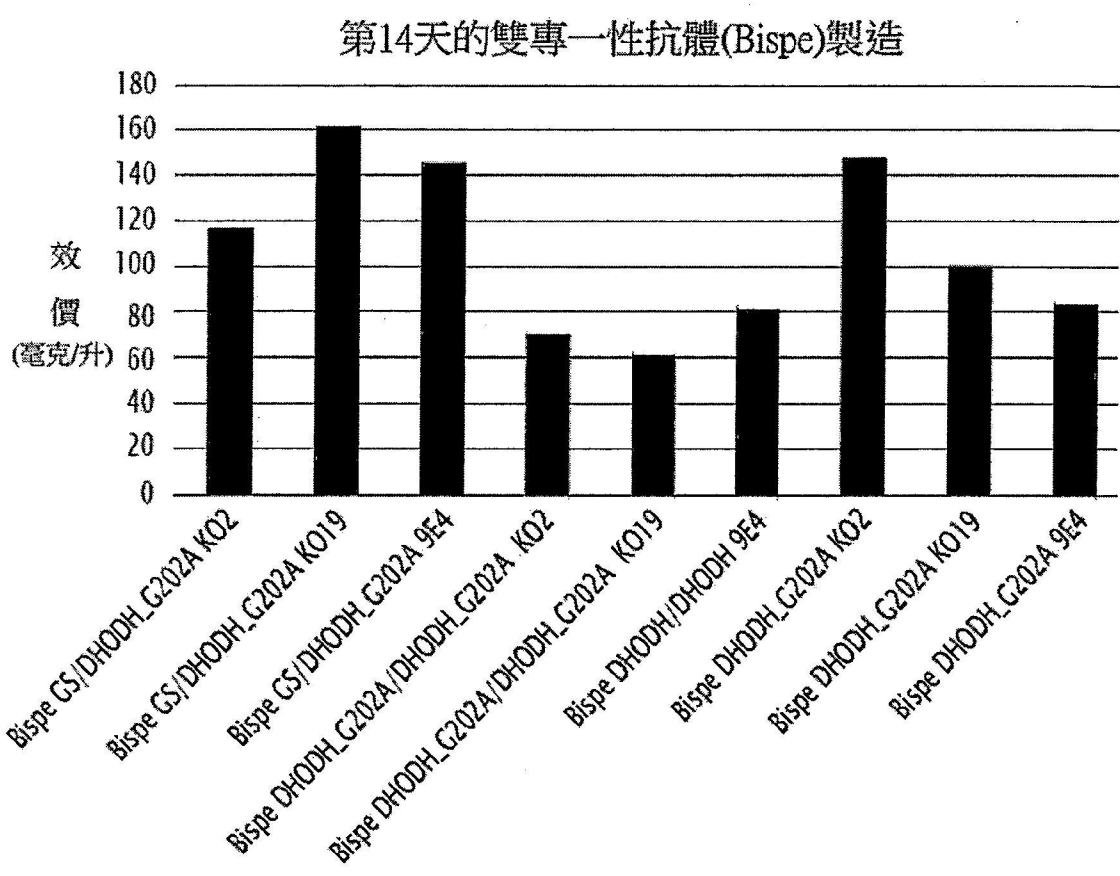


【圖5】

第14天的mAb-B製造

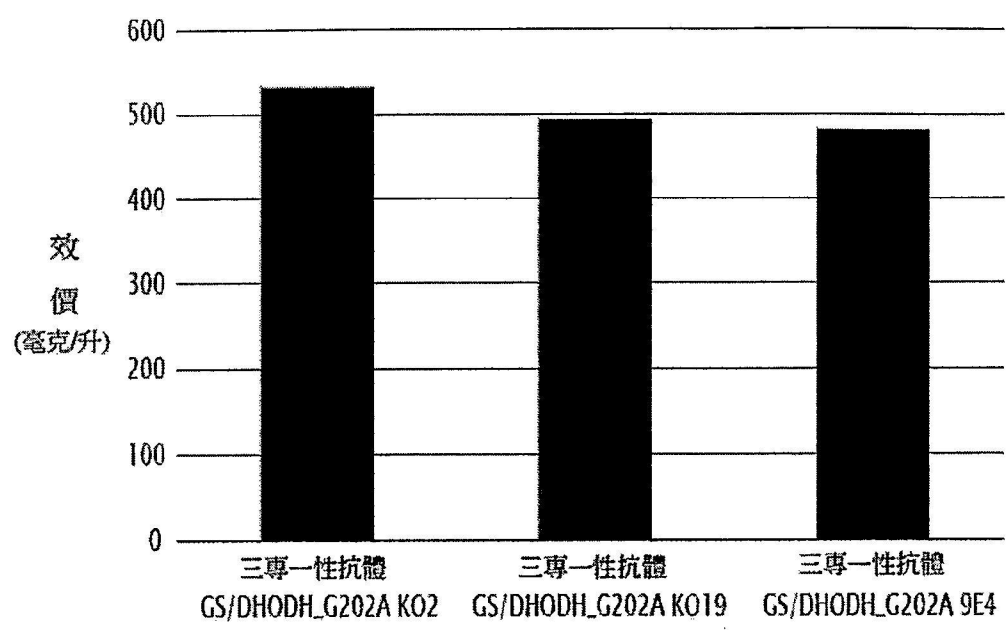


【圖6】



【圖7】

第14天的三專一性抗體(Trispe)製造



【圖8】