

文章编号: 1004-0374(2013)09-0937-05

· 技术与应用 ·

提高哺乳动物细胞医用蛋白质产量方法的研究进展

王文强, 闫琦, 侯敢*, 黄迪南
(广东医学院生物化学与分子生物学教研室, 湛江 524023)

摘要: 近年来, 由于哺乳动物细胞具有对重组蛋白质进行正确折叠、装配和翻译后修饰的优点, 利用哺乳动物细胞生产医用蛋白质已成为生物制药产业的重要组成部分。但是利用哺乳动物细胞生产医用蛋白质的产量仍然相对较低, 因此, 如何提高哺乳动物细胞医用蛋白质产量成为了研究热点。本文仅对构建高效表达载体系统、筛选稳定高表达细胞株、优化转录及翻译过程、优化瞬时表达、改进培养工艺和抑制细胞凋亡等几方面的研究进展作一综述。

关键词: 哺乳动物细胞; 表达载体; 瞬时表达; 培养工艺; 细胞凋亡

中图分类号: Q952; TQ93 **文献标志码:** A

Research progress on the improvement methods of medical protein production in mammalian cells

WANG Wen-Qiang, YAN Qi, HOU Gan*, HUANG Di-Nan
(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: In recent years, because of the advantages of proper folding, assembling and the modification of post-translation for recombinant proteins, using mammalian cells to produce medical proteins has become an important part of biopharmaceutical industry. However, the yields of medical proteins in mammalian cells are still relatively low. Therefore, a hot research topic focuses on how to improve medical protein production in mammalian cells. In this review, we only summarized the recent achievements in methods for improving medical protein production in mammalian cells, including constructing high-level expression vector system, screening cell lines with stable and high expression, optimizing the transcription and translation, optimizing transient expression, improving culture biotechnology, and inhibiting cell apoptosis.

Key words: mammalian cells; expression vector; transient expression; culture technology; cell apoptosis

医用蛋白质药物因具有生理活性强、疗效显著、安全性高等优点日益受到人们的重视, 在过去的 20 多年, 已经有 200 多种医用蛋白质药物投入市场, 目前还有上百种医用蛋白质药物处于临床试验阶段^[1]。然而, 由于原核、酵母、植物和昆虫等表达系统与哺乳动物细胞表达系统的蛋白糖基化等修饰不完全相同, 所生产的医用蛋白质与天然蛋白质在理化性质等方面存在较大差异, 影响其应用, 所以利用哺乳动物细胞表达系统生产医用蛋白质成为现代医药领域的研究重点。目前市场上超过 50% 得到美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA) 许可的医用蛋白质药物均来自哺乳动物细胞

表达系统^[1], 主要包括中华仓鼠细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO)、人胚肾细胞 (human embryonic kidney cell, HEK-293)、幼鼠肾细胞 (baby hamster kidney cell, BHK) 等表达系统, 而且除抗凝血酶 (antithrombin, ATryn) 以外的重组糖蛋白药物全由哺乳动物细胞表达。但是随着市场需求的不断扩大, 对医用蛋白质药物的产能提出了更高的要求, 因此,

收稿日期: 2013-03-26; 修回日期: 2013-05-09

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2008B03030-1023)

*通信作者: E-mail: 414786515@qq.com; Tel: 13420147931

提高哺乳动物细胞医用蛋白质产量已经成为研究热点, 目前提高其产能主要有如下策略。

1 构建高效的表达载体系统

构建高效的表达载体系统是提高哺乳动物细胞医用蛋白质产量的首要策略, 也是目前制约医用蛋白质产业化的瓶颈。外源基因可以通过质粒载体转染或病毒载体感染的方式导入哺乳动物宿主细胞, 表达目的蛋白。传统质粒载体需要转染宿主细胞获得稳定表达, 耗时费力, 不利于医用蛋白质的大规模生产。目前, 病毒载体主要以杆状病毒载体和慢病毒载体最为常用。杆状病毒载体可以通过昆虫细胞大量制备病毒颗粒, 感染多种哺乳动物细胞, 并在合适的启动子控制下表达外源基因, 加上杆状病毒载体具备基因组大、操作性好、靶向性强、生物安全性高等优点, 已成为一项比较成熟、安全、经济、高效的蛋白质表达技术^[2], 被越来越多地应用于哺乳动物细胞生产多肽药物和疫苗等医用蛋白质的研制^[3]。截至到2011年, 已经有19种商品化的杆状病毒表达载体系统得到广泛应用^[4]。慢病毒载体因具有转导范围广、细胞毒性小、便于持久稳定表达等优点而被大量用于哺乳动物细胞生产医用蛋白质的研究, 如Addgene公司的pLenti PGK Hygro DEST、pLenti CMV/TO Puro DEST、pLKO.1-TRC cloning vector载体等。2011年, Bandaranayake等^[5]使用一种新型的慢病毒载体成功构建了一个快速高效生产活性重组蛋白质的哺乳动物细胞表达系统, 结果显示该系统更加适用于生物物理学与临床研究。一般来说, 人工构建的哺乳动物细胞表达载体为穿梭载体, 含有便于载体扩增和大量制备的原核序列, 如复制子和抗生素抗性基因等, 以及调控外源基因转录与翻译活性的启动子、增强子、终止子和 *polyA* 信号序列等真核生物表达序列。优化调节启动子、增强子及其相关转录调控元件有助于高效表达外源基因^[6], 如 *mCMV*、*hCMV*、*HEF-1 α* 、*c-fos* 等。2012年, You等^[7]使用一种新型杂合启动子的质粒载体, 促使神经胶质细胞源性神经营养因子转基因成功在猫神经祖细胞中持续稳定表达, 该方法避免了慢病毒载体可能激活癌基因或失活抑癌基因的风险, 同时也避免了使用质粒载体不能持续表达的缺点, 明显提高了外源基因的表达效率。

因此, 构建高效表达载体系统将成为未来提高哺乳动物细胞医用蛋白质产量的最重要方法。本课题组成功构建了端粒保护蛋白1 (protection of

telomeres 1, POT1) 启动子报告基因载体, 并瞬时转染6种不同的人肿瘤细胞, 通过双荧光素酶报告基因检测POT1启动子转录活性, 对POT1启动子的相关机制进行了初步探讨, 并试图进一步研究其生物学活性。

2 筛选高效稳定表达克隆

筛选高效稳定表达克隆是提高哺乳动物细胞医用蛋白质产量的另一重要策略。当前常用的筛选高效稳定表达克隆的体系主要有两类: 一类是基于氨甲喋呤 (methotrexate, MTX) 的二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 筛选体系^[8]; 另一类是基于甲硫氨酸亚砷 (methionine-S-sulfoxide, MSX) 的谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 筛选体系。DHFR筛选体系是用MTX处理细胞培养物让DHFR周围基因扩增, 进而筛选高产量的克隆, 在50 nmol/L~1 μ mol/L MTX浓度下, 目的基因的基因拷贝数可以提升 10^2 ~ 10^5 倍^[9]。GS筛选体系利用含有GS基因的载体转染受体细胞, 只有多拷贝GS基因的细胞才能在正常MSX浓度生长, 进而筛选出高表达细胞株。此外, GS筛选体系可以减少细胞氨的产生。但是上述两种筛选体系都存在耗时长和成本高等缺点, 不利于生物制药的产业化。2011年, Osterlehner等^[10]根据启动子甲基化与转基因拷贝数, 预测出早期不稳定表达的CHO细胞系, 为筛选稳定高表达细胞株创造了条件。2012年, Fan等^[11]成功地利用锌指核酸酶技术, 敲除亲代CHOK1SV细胞的内源性GS基因, 并以此细胞株作为亲代细胞大规模培养, 生产率提高了2~3倍。与此同时, 他们还发现运用此方法筛选某一指定单克隆抗体相似数量的高表达细胞株, 筛选效率提高了6倍。近年来, 许多新的技术也被用来筛选稳定高表达克隆, 如荧光融合标签结合荧光激活的细胞分选技术 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 的使用, 大大地简化和缩短了筛选流程^[12-13]。这些都为提高医用蛋白质产量的研究奠定了基础。

3 优化转录水平、翻译水平及翻译后修饰水平

从根本上了解目的基因转录、翻译及翻译后修饰水平的分子机制是未来开发新型医用蛋白质和提高医用蛋白质产量的关键。目前常用的方法有以下几种。第一, 在载体上添加某些特定序列, 使表达载体整合到宿主细胞染色体后模拟高转录活性区, 高效表达目的基因。第二, 将含有定点重组位点的

选择标记基因整合到染色体高表达区域, 然后将目的基因载体与重组酶载体共转染到带有重组位点的细胞系, 在重组酶介导下表达载体整合入高转录活性区域。此外, 有研究利用该原理构建人工染色体表达载体^[14], 来避免基因表达沉默, 进而使重组蛋白质产量增加, 但是目前关于染色体水平调控基因表达的机制尚未清楚, 通过优化转录水平以提高医用蛋白质产量将成为一个新的研究热点。

蛋白的折叠与组装是产生具有功能蛋白质的重要阶段。然而, 相关功能调节蛋白是否参与该过程在很大程度上仍是未知, 目前只有很少部分内质网分子伴侣被人们所熟知, 如分子伴侣葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78/Bip)、蛋白质二硫键异构酶等。因此, 通过蛋白质基因的共表达作用来提高重组抗体产量仍然是一个棘手的问题。

糖基化是蛋白翻译后修饰水平的核心环节。众所周知, 哺乳动物细胞具有与人类相似的聚糖修饰位点。但是, 表达的糖基化结构与天然结构相比还存在着差异, 特别是位于末端的唾液酸往往缺失或错配, 一定程度上影响了目的蛋白质的生产效率和产品的生物活性。因此, 糖基化工程已成为增加哺乳动物细胞重组蛋白质产量和活性研究的热点^[15]。Wang 等^[16]采用表达典型糖蛋白促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 的重组 CHO 细胞共表达 *30Kc19* 基因和在培养基中添加 *30Kc19* 蛋白两种方法进行研究, 发现 EPO 产量和比生产速率均明显提高, 且相比之下 *30Kc19* 基因共表达方法更为有效; 同时采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 对 EPO 蛋白 N 糖苷键连接糖基的糖基结构、唾液酸和岩藻糖含量进行定量分析, 发现 *30Kc19* 基因的表达使 CHO 细胞合成的 EPO 糖基结构更加复杂, 且唾液酸和岩藻糖含量也更高, 表明 *30Kc19* 基因对提高 CHO 细胞的目的产物表达能力及其糖基化水平具有重要贡献, 共表达 *30Kc19* 基因可望成为未来提高哺乳动物细胞蛋白质产量及其糖基化品质的一种具有潜在应用价值的新途径。如今已经发现多种影响哺乳动物细胞蛋白质糖基化的因素, 如生物反应器、细胞类型、培养条件、营养元素、培养基等。然而, 影响蛋白质糖基化的具体机制还不太清楚, 通过糖基化工程提高蛋白质产量和活性依然任重道远。

4 优化瞬时表达系统

瞬时表达系统由于具有相对于稳定表达系统生产周期短、利于大规模生产、适于医用蛋白质的评估以及密码子的优化等优点, 现已成为哺乳动物细胞生产医用蛋白质研究的重要技术之一, 如利用 HEK-293 细胞、BHK 细胞、CHO 细胞等瞬时表达重组蛋白质。然而, 目前瞬时表达系统的单位产量和体积产量仍然无法与稳定表达系统相媲美, 因此, 优化瞬时表达系统, 提高重组蛋白质产量仍是研究的重点。最近, 瞬时表达系统有了些新的突破。2011 年, Zhao 等^[17]报道了一种利用哺乳动物细胞大规模瞬时表达重组蛋白的新方法, 结果显示重组蛋白质产量大大增加。2012 年, Hopkins 等^[18]通过改进转染方法来优化瞬时基因表达, 使哺乳动物细胞生产重组蛋白质更高效、成本更低。由此可见, 优化瞬时表达是提高哺乳动物细胞蛋白质产量的有效方法。虽然目前还没有瞬时表达医用蛋白质的报道, 但是随着大规模瞬时表达技术的不断优化, 以及产量的不断提高, 该技术必将广泛应用于医用蛋白质的规模化生产。

5 优化培养工艺

贴壁细胞培养是早期哺乳动物细胞的主要培养方式, 但是存在细胞成活率低、不便于大规模生产等缺点。因此, 为了提高重组蛋白质产量、降低成本, 目前绝大多数在生物反应器中进行的哺乳动物细胞培养都是采用悬浮式培养。然而, 让贴壁细胞适应悬浮培养需要特殊的培养基, 如今已开发出多种适于悬浮培养的培养基, 尤其是无血清培养基。血清培养基具有成分不明确、价格昂贵、存在潜在未知因子污染等缺点, 使培养过程难以控制, 不利于后续医用蛋白质的纯化。目前以 HEK-293 细胞无血清悬浮培养技术为核心的病毒载体高效生产技术, 不仅为病毒类产品工业化生产解决了规模问题, 也彻底改变了传统手工式和经验式的滚瓶生产方式, 显著提升了工业化生产过程的经济性。Bandaranayake 等^[5]使用无血清悬浮培养的人细胞株, 短期内获得了稳定高表达重组蛋白质, 如免疫受体、细胞因子和抗体等。Roding 等^[19]利用狗肾上皮细胞 (Madin-Darby canine kidney, MDCK) 研究发现, 只有适应无血清培养基的悬浮生长细胞能够明显影响 N-端糖基化, 进而影响血凝素的生产。尽管已经证明了使用无血清培养基可以促进细胞生

长,提高重组蛋白质产量,但由于血清被完全去除了造成了宿主细胞大量死亡,反而限制了重组蛋白质产量。因此,一种更为先进的化学限定级无血清细胞培养基正在被逐步推广,Rodrigues等^[20]研究发现,使用化学限定级的无血清培养基进行单克隆抗体生产明显优于普通细胞培养基以及完全无血清的培养基。

随着研究的不断深入,不少研究人员也在尝试利用一些添加剂或者减少培养基中某些特殊成分来提高哺乳动物细胞的重组蛋白质产量。2012年,Zhou等^[21]使用聚精氨酸多肽 IND-1 作为哺乳动物细胞培养的添加剂,发现使用 IND-1 后哺乳动物细胞系生长和生存能力超过 53 d 没有受到影响,并且重组人骨形态发生蛋白-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2) 的产量明显增加。众所周知,谷氨酰胺是大多数哺乳动物细胞培养基的一种基本成分,但是伴随细胞不断的消耗会产生一些氨类细胞毒性物质,影响细胞正常生长表达。Rajendra等^[22]研究发现,减少生长停滞的 CHO-DG44 细胞和 HEK-293E 细胞培养基中谷氨酰胺浓度可以使重组蛋白质的产量明显增加。

近年来,越来越多新型高通量生物反应器也开始应用于哺乳动物细胞表达重组蛋白质的研究。有数据显示,运用生物反应器培养哺乳动物细胞使单克隆抗体和抗体融合蛋白产量达到了 10~15 g/L^[23]。2011年,Zhou等^[24]开发了一种新型家蚕生物反应器,并且通过研究证实该反应器更加适于重组蛋白质大规模生产和临床研究。由此看来,随着新型培养基和生物反应器的研发应用,必将推动哺乳动物细胞医用蛋白质产业更快发展。

6 抑制细胞凋亡

当前哺乳动物细胞大规模培养生产医用蛋白质主要被细胞凋亡所阻碍,因此,抑制细胞凋亡是必不可少措施。目前,通过抑制哺乳动物细胞凋亡来提高蛋白质产量主要从两个方面着手:一方面通过改进培养工艺抑制哺乳动物细胞凋亡,主要包括优化细胞培养条件,开发新型无血清无蛋白培养基,发展新型高通量生物反应器等^[23-24];另一方面通过基因工程改造来抑制哺乳动物细胞凋亡,如表达抗凋亡基因、编码连锁凋亡抑制因子、过表达抗凋亡蛋白、抑制或敲除前凋亡基因等。Wang等^[16]报道了利用无血清培养的 CHO 细胞表达家蚕 *30Kc6* 基因可以显著抑制高渗透压诱导的细胞凋亡,并使抗

体的比生产速率提高了 1.3 倍,最终获得抗体的浓度达到对照组的 3.4 倍。然而,*30Kc6* 基因作用的机制尚未清楚,未来能否将它应用于重组细胞株工程改造尚不得而知。此外,Wu^[25]运用 RNA 干扰技术使凋亡基因表达沉默,结果显示重组蛋白质产量明显增加。

最近,研究人员尝试使用一些添加剂来抑制细胞凋亡,如吡咯烷二硫氨基甲酸酯 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)、caspase 抑制剂等。Duda等^[26]研究发现,减弱雄激素受体拮抗剂 2-羟基氟他胺时颗粒细胞凋亡,初步证明了 2-羟基氟他胺可能在抑制细胞凋亡中起作用。另外,自噬作用已被广泛用于抗细胞凋亡研究,通过调节自噬基因 Beclin-1 的表达水平干扰自噬通路,延迟自噬作用进而抑制细胞凋亡。雷帕霉素 (Rapamycin) 是自噬作用研究中常用的一种化学激活剂, Lee 和 Lee^[27]使用 Rapamycin 处理无血清悬浮培养的 CHO 细胞,发现细胞凋亡延迟,细胞生存能力提高,并且重组抗体产量明显增加。总之,引起细胞凋亡的具体机制尚未完全清楚,通过抑制细胞凋亡来提高医用蛋白质产量仍需进一步研究。

7 展望

随着对转录组学、蛋白组学、代谢组学等学科研究的不断深入,越来越多革命性的技术和方法被应用于提高哺乳动物细胞医用蛋白质产量,尤其通过构建高效表达载体系统、筛选稳定高表达细胞株、优化转录及翻译过程、优化瞬时表达、改进培养工艺和抑制细胞凋亡等有效策略,哺乳动物细胞医用蛋白质产量取得了一定的突破。然而,哺乳动物细胞医用蛋白质产量仍有待提高。目前,上述策略仍是努力研究的热点。同时,应该加大对染色体水平调控基因表达机制、蛋白质糖基化机制、细胞凋亡机制等方面的研究,进而从根本上解决医用蛋白质产能低的问题。还可以尝试将上述策略相融合的办法来提高哺乳动物细胞医用蛋白质产量。另外,应该加强对其他未知领域的探索,发掘提高蛋白质产量的新方法。相信通过诸多方法权衡,哺乳动物细胞医用蛋白质产量一定会取得更大的突破,哺乳动物细胞表达系统也一定会更广泛应用于医用蛋白质的规模化生产。

[参 考 文 献]

- [1] Zhu J. Mammalian cell protein expression for biophar-

- maceutical production. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 1158-70
- [2] Aucoin MG, Mena JA, Kamen AA. Bioprocessing of baculovirus vectors: a review. *Curr Gene Therapy*, 2010, 10(3): 174-86
- [3] Madhan S, Prabakaran M, Kwang J. Baculovirus as vaccine vectors. *Curr Gene Therapy*, 2010, 10(3): 201-13
- [4] Lin SY, Chen GY, Hu YC. Recent patents on the baculovirus systems. *Recent Patents Biotechnol*, 2011, 5(1): 1-11
- [5] Bandaranayake AD, Correnti C, Ryu BY, et al. Daedalus: a robust, turnkey platform for rapid production of decigram quantities of active recombinant proteins in human cell lines using novel lentiviral vectors. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21): e143
- [6] Xu ZL, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, et al. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*, 2001, 272(1-2): 149-56
- [7] You XJ, Yang J, Gu P, et al. Feline neural progenitor cells II: use of novel plasmid vector and hybrid promoter to drive expression of glial cell line-derived neurotrophic factor transgene. *Stem Cell Int*, 2012, 2012: 1-9
- [8] Ng SK. Generation of high-expressing cells by methotrexate amplification of destabilized dihydrofolate reductase selection marker. *Methods Mol Biol*, 2012, 801: 161-72
- [9] Cacciatore JJ, Chasin LA, Leonard EF. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnol Ad*, 2010, 28(6): 673-81
- [10] Osterlechner A, Simmeth S, Gopfert U. Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(11): 2670-81
- [11] Fan L, Kadura I, Krebs LE, et al. Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(4): 1007-15
- [12] Oberbek A, Matasci M, Hacker DL, et al. Generation of stable, high-producing CHO cell lines by lentiviral vector-mediated gene transfer in serum-free suspension culture. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(3): 600-10
- [13] Browne SM, Al-Rubeai M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol*, 2007, 25(9): 425-32
- [14] Blaas L, Musteanu M, Grabner B, et al. The use of bacterial artificial chromosomes for recombinant protein production in mammalian cell lines. *Methods Mol Biol*, 2012, 824: 581-93
- [15] Lim Y, Wong NS, Lee YY, et al. Engineering mammalian cells in bioprocessing - current achievements and future perspectives. *Biotechnol Appl Biochem*, 2010, 55(4): 175-89
- [16] Wang Z, Park JH, Park HH, et al. Enhancement of therapeutic monoclonal antibody production in CHO cells using *30Kc6* gene. *Process Biochem*, 2010, 45(12): 1852-6
- [17] Zhao Y, Bishop B, Clay JE, et al. Automation of large scale transient protein expression in mammalian cells. *J Struct Biol*, 2011, 175(2): 209-15
- [18] Hopkins RF, Wall VE, Esposito D. Optimizing transient recombinant protein expression in mammalian cells. *Methods Mol Biol*, 2012, 801: 251-68
- [19] Rodig JV, Rapp E, Bohne J, et al. Impact of cultivation conditions on N-glycosylation of influenza virus A hemagglutinin produced in MDCK cell culture. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(6): 1691-703
- [20] Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, et al. Advances and drawbacks of the adaptation to serum-free culture of CHO-K1 cells for monoclonal antibody production. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169(4): 1279-91
- [21] Zhou AJ, Clokie CM, Peel SA. Polyarginine peptide IND-1 enhances recombinant human bone morphogenetic protein-2 yield in mammalian cells. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(2): 221-30
- [22] Rajendra Y, Kiseljak D, Baldi L, et al. Reduced glutamine concentration improves protein production in growth-arrested CHO-DG44 and HEK-293E cells. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(4): 619-26
- [23] Huang YM, Hu W, Rustandi E, et al. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol Prog*, 2010, 26(5): 1400-10
- [24] Zhou Y, Chen H, Li X, et al. Production of recombinant human DNA polymerase δ in a *Bombyx mori* bioreactor. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22224
- [25] Wu SC. RNA interference technology to improve recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(4): 417-22
- [26] Duda M, Durlej M, Knet M, et al. Does 2-hydroxyflutamide inhibit apoptosis in porcine granulosa cells - an *in vitro* study. *J Reprod Devel*, 2012, 58(4): 438-44
- [27] Lee JS, Lee GM. Rapamycin treatment inhibits CHO cell death in a serum-free suspension culture by autophagy induction. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(12): 3093-102