

公告本

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：9312487

※ 申請日期：93.8.18

※IPC 分類：C12N 5/02 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

一種再選殖生產細胞之方法

METHOD FOR RECLONING PRODUCTION CELLS

## 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

德商百靈佳殷格翰製藥公司

BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA GMBH & CO. KG

代表人：(中文/英文)

漢茲 哈蒙

HAMMANN, HEINZ

狄特 勞汀

LAUDIEN, DIETER

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國殷格翰市D-55216賓格街173號

BINGER STRASSE 173 55216 INGELHEIM AM RHEIN, GERMANY

國 籍：(中文/英文)

德國 GERMANY

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 芭芭拉 伊恩克爾

ENENKEL, BARBARA

2. 猶庚 菲德爾

FIEDER, JUERGEN

3. 拉弗 歐圖

OTTO, RALF

4. 湯瑪斯 克利格

KRIEG, THOMAS

國 籍：(中文/英文)

1.-4. 均德國 GERMANY

#### 四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 德國；2003年08月19日；10338531.2

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於細胞培養技術之領域且涉及複製/選殖細胞之方法，較佳地是複製/選殖細胞株之方法，其在生物藥品生產上具有重要性。本發明亦關於使用藉由單個細胞沈積所獲得及所複製之細胞來製備蛋白之方法，且亦關於允許單個細胞複製之組合物。

### 【先前技術】

對於哺乳動物細胞中生物活性蛋白或治療性蛋白(所謂的生物製劑)之生物技術生產而言，對應之哺乳動物細胞係用對生物活性蛋白(或其亞單位)進行編碼之DNA來穩定轉染。在轉染過程後，通常獲得數以百萬的經過不同轉染的細胞。因此，預備有效生產細胞株之決定性步驟為細胞純系的選擇及複製，該等細胞純系一方面生長十分穩定且另一方面顯示治療性蛋白(產物形成等)之高單位生產率。由於存在上百萬種不同的產物表現之細胞，為能挑出生長強壯且亦產生高產物滴定度之適當候選物(單細胞純系)，關鍵係獨立分析高產出之複數個細胞且使用自動化操作。此種單細胞分離及轉種(subcultivation)之方法稱為選殖或再選殖。

例如藉由螢光活化之細胞分類法(FACS)，例如將治療性蛋白之表現與標記蛋白(marker protein)之表現相聯繫可選擇經轉染細胞。為此目的，例如水母依考瑞爾維多利亞(Aequorea victoria)、水母瑞尼拉萊尼福密斯(Renilla reniformis)之螢光蛋白及其變異體或其它物種，諸如例如非生物發光

有機體如香菇珊瑚(Discosoma sp.)、海葵(Anemonia sp.)、羽珊瑚(Clavularia sp.)及鈕扣珊瑚(Zoanthus sp.)之紅色、黃色、紫色、綠色之螢光蛋白或其變異體可與治療性蛋白一起在細胞中得以共同表現。根據單位生產率及細胞生長特徵，可自螢光強度得出結論。

然而，在無血清培養條件下之培養器皿中(例如在微量滴定盤之井中)單個沈積典型重組之生產細胞例如小鼠骨髓瘤(NS0)，倉鼠卵巢(CHO)，或倉鼠腎細胞(BHK)仍存在問題，尤其若彼等適於在無血清懸浮液培養物中生長，意即在與現代生產相關之細胞培養條件下時，且將其有效複製(再選殖)亦存在問題。若在無血清條件下之培養器皿內僅沈積少量細胞(例如少於5個細胞)，則根本不能複製該等細胞，或至少不能有效複製。吾人猜想此原因係缺乏細胞與細胞的接觸，較低細胞密度下較大營養/生長因子之要求及/或無擴散信號或極低濃度之擴散訊號以及調節因子。

先前技術中藉由受限稀釋法生產細胞純系可避免在上述重組生產細胞中進行無血清單細胞選殖的問題。在該種情況下，將最少5至10個細胞種至培養皿內無血清培養基中，然後藉由重複稀釋選殖使其更替繼代接種以獲得統計學上(in statistical terms)由基因相同之細胞組成之培養物(方法=受限稀釋)。一方面該再選殖方法係耗時的，且另一方面由於該方法基於統計學計算而非基於對單個沈積之基因上相同的細胞之實際培養，其通常導致基因不同之混合培養物。此等基因不同混合培養物相對於發酵及異種表現圖

譜，在基因上的特徵為有限的強固性(robustness)。

或者目前，生產相關細胞株之單細胞純系僅能藉由適合血清之黏附型細胞之單個沈積來產生。因此，Meng等人(2000)提出(例如)在含血清培養基中沈積單個的、黏附生長之CHO細胞的方法。然而，由Meng等人所描述的方法具有主要缺點：由於細胞之黏附，細胞自基質之費力的酶脫離(胰蛋白酶治療)可導致相當大的細胞損害及生長特徵與再選殖細胞生產率的改變。此外，相應所獲得之單個純系必須適於在懸浮液培養物中的無血清生長，其通常為一耗時操作且影響細胞生產率及產物品質。(關於此主題參照Kaufmann等人，2001；Mueller等人；1999)。

在培養黏附型生長細胞時，藉由使用營養細胞(亦稱為餵養細胞)可影響細胞生長特徵使其好轉，或對於某些類型之細胞而言可在細胞培養條件下將其首次複製。實例包括人類-小鼠或小鼠-小鼠之雜交瘤細胞(Hlinak等人1988, US 5,008,198)，初級角化細胞(Rheinwald及Green, 1975; WO 9954435)，幹細胞(Williams等人，1988)，及各種腫瘤細胞(Wee Eng Lim等人，2002; Rexroad等人，1997; Peng等人，1996; Grigoriev等人，1996; Sanchez等人，1991; Butcher等人，1988; Long等人，1986; Shneyour等人，1984; Pintus等人，1983; Brodin等人，1983)。餵養細胞通常為生長已化學上或物理上停止之細胞，其由於特殊的預處理已失去細胞分裂能力但平均仍存活約2至3週。在各種初級細胞之情況下，餵養細胞因此仍具有向培養基釋放促生長因子之

能力，且能因此促進非停止細胞之初始生長或甚至使該生長成為可能。為此目的，將餵養細胞以所謂的單層塗於培養皿中。然後，將該等待培養之黏附型生長細胞塗於餵養細胞之上或餵養細胞之間且於標準條件下培養。餵養細胞係藉由(例如)照射來製備或用絲裂黴素(mitomycin)C(胺丙(azirino)[2',3':3,4]吡咯並[1,2-a]吡啶-4,7-二酮,6-胺基-8-[[[(胺基羰基)氧]甲基]-1,1a,2,8,8a,8b-六氫-8a-甲氧基-5-甲基-, [1aR-(1a.α., 8.β., 8a.α., 8b.α.)]-(9Cl)(Butcher等人, 1988))處理來製備。諸如脾細胞、成纖維細胞、血細胞(Morgan, Darling; Kultur tierischer Zellen [culture of animal cells]. Spektrum Akademischer Verlag 1994, p. 115f)及巨噬細胞(Hlinak等人, 1987)之初級細胞已在餵養細胞系統中作了描述。關於雜交瘤細胞中抗體之生產，將餵養細胞之用途及基於FACS之細胞選擇加以描述。例如Hlinak等人(1987)描述在黏附生長之雜交瘤細胞(始於每一培養皿中的兩個(2)細胞)之再選殖中具有33至57%之再選殖效率。所使用的雜交瘤細胞為適於含血清培養基之黏附生長細胞。

當使用異種特別是用來產生生產細胞之人類餵養細胞時，存在受病原體諸如(例如)病毒、細菌或菌質(mycoplasmas)污染之相當大的風險。此外，所描述的許多(初級的)餵養細胞需要含血清培養基，其首先增加了污染之風險且其次缺點為已費力使之適於無血清生長之生產細胞必須再次適應。

當使用異種餵養細胞時，反選餵養細胞通常是必要的。

(例如)由於添加劑對培養基(抗生素，如G418)及/或不完全培養基(不存在次黃嘌呤、胸苷)的應用，所以生產細胞通常經受選擇壓力。該選擇壓力使選擇細胞成為可能，其已吸收且彙集相應的遺傳資訊例如用於重組蛋白。因此適於生產細胞生產之培養基嚴重影響餵養細胞之生長且其與其它不相容之生產培養基共同導致餵養細胞快速相繼地死亡。因此，餵養細胞之功能不再有保證。

### 【發明內容】

本發明之一目的係尋找一種有效再選殖之方法，其允許於無血清條件下及懸浮培養物中自少於5個細胞，較佳地自一(1)單細胞複製生產相關之哺乳動物細胞。詳言之，該目的係提供再選殖最初自倉鼠中所分離之CHO或BHK細胞及最初自小鼠中所分離之骨髓瘤細胞(例如NS0細胞)的相應方法。

本發明之另一目的係提供一種組合物，該等組合物使進行相應再選殖方法成為可能，特定言之係提供彼等進行再選殖倉鼠或小鼠骨髓瘤細胞之組合物。

藉由根據本發明如申請專利範圍中所界定之目的可達成該等目標，根據本發明之一態樣，其係關於一種選殖細胞之方法，特徵為在較佳係自體來源之餵養細胞存在下將少於五個，較佳為一(1)或兩個(2)哺乳動物細胞，較佳為倉鼠或小鼠骨髓瘤細胞沈積於無血清條件下之培養容器中，且於無血清條件下培養及複製。在一特定態樣中，較佳係當細胞為彼等適於懸浮培養物中無血清生長之細胞時，本發

明係關於再選殖CHO或BHK細胞(倉鼠細胞)或NS0細胞(小鼠骨髓瘤細胞)之相應方法。

本發明之另一實施例係關於在已沈積且待選殖之哺乳動物細胞亦為倉鼠細胞時，特定言之為CHO或BHK細胞時，倉鼠細胞作為餵養細胞之用途。若該等已沈積且待選殖之細胞為NS0細胞時，則較佳地將小鼠骨髓瘤細胞用作餵養細胞。

在另一態樣中，本發明係關於再選殖CHO、BHK或NS0細胞之相應方法，其特徵在於若待選殖之哺乳動物細胞為CHO細胞時，則將CHO細胞用作餵養細胞，在於若待選殖之哺乳動物細胞為BHK細胞時，則將BHK細胞用作餵養細胞，及在於若待選殖之哺乳動物細胞為NS0細胞時，則將NS0細胞用作餵養細胞。

根據本發明之方法特徵為大於10%的良好再選殖效率，較佳大於20%，尤其對單個沈積之細胞而言。根據另一實施例，根據本發明之再選殖方法具有大於30%之再選殖效率，較佳大於40%，尤其較佳大於50%，更佳大於60%，甚至更佳大於70%，極更佳大於80%。

在此情況下，在再選殖單個沈積之CHO細胞時再選殖效率自10至大於65%係有效的，在再選殖單個沈積之BHK細胞時再選殖效率自10至大於50%係有效的，在再選殖單個沈積之NS0細胞時再選殖效率自10至大於45%係有效的。若每一培養皿中所沈積之細胞大於一個(1)，例如兩個、三個或四個，則討論中的細胞之再選殖效率高於對CHO、BHK

及NS0細胞再選殖之指定值。

在另一態樣中，本發明係關於再選殖哺乳動物細胞，特定言之為倉鼠或小鼠骨髓瘤細胞之相應方法，其中待選殖之細胞係在每毫升培養基中100至200,000之餵養細胞的存在下複製。

本發明亦關於在無血清非黏附生長哺乳動物細胞中生產蛋白，較佳係生產重組蛋白之方法，其中無血清非黏附生長細胞已根據本發明之選殖方法生長，特定言之在無血清條件下相應經選殖倉鼠或小鼠骨髓瘤細胞(諸如(例如)CHO、BHK或NS0細胞)中生產重組蛋白，包含步驟：

- a) 於無血清條件下，培養表現相關基因產物之哺乳動物細胞，其使得正在討論中之細胞得以複製；
- b) 在無血清條件下沈積少於5個，較佳地為1個或2個相應哺乳動物細胞於一個(1)細胞培養容器中；
- c) 在無血清條件下，自體餵養細胞存在時，複製相應沈積之細胞；
- d) 在無血清條件下，培養經複製的沈積細胞，在該條件下表現相關基因；及
- e) 自包含薄膜之細胞或自培養物上清液回收且純化藉由相關基因編碼之基因產物。

重組基因產物之表現亦要求用編碼相關基因產物之核酸轉染哺乳動物細胞。

哺乳動物細胞可(例如)人工分離或藉由基於FACS之細胞分類來分離，且可將其沈積於具有餵養細胞之培養容器

中。較佳地使用非黏附培養之餵養細胞。

本發明亦關於倉鼠細胞，較佳為CHO或BHK細胞及小鼠骨髓瘤細胞(較佳地為NS0類型)作為餵養細胞之基本用途。根據一較佳實施例，本發明係關於適於無血清培養條件之相應細胞的用途。

本發明亦關於一種組合物，其由無血清細胞培養基，少於五個可分裂之哺乳動物細胞及與該等可分裂之哺乳動物細胞自體同源之餵養細胞所組成。根據本發明之另一態樣，可分裂之哺乳動物細胞係作為懸浮培養物適於無血清生長之細胞。在一特定實施例中，組合物在培養基中僅含有一個(1)或兩個(2)可分裂之哺乳動物細胞。該等可分裂之哺乳動物細胞較佳地為倉鼠細胞例如CHO或BHK細胞，或小鼠骨髓瘤細胞，例如NS0細胞。

根據本發明之另一態樣，若可分裂之哺乳動物細胞為CHO細胞，則組合物含有倉鼠細胞，較佳為CHO細胞作為餵養細胞。若可分裂之哺乳動物細胞為BHK細胞，則組合物亦含有倉鼠細胞，但較佳為BHK細胞作為餵養細胞。若可分裂之哺乳動物細胞為小鼠骨髓瘤細胞，例如NS0細胞，則該組合物亦含有小鼠骨髓瘤細胞作為餵養細胞，且在NS0細胞之情況下，較佳地亦含有NS0細胞作為餵養細胞。

令吾人驚奇地是，已發現藉由使用懸浮之自體餵養細胞，單哺乳動物細胞，較佳為倉鼠或小鼠骨髓瘤細胞可沈積於無血清及/或無蛋白培養基中，且能生長於培養物中，且因此上述例如受限稀釋所致的再選殖中的不足或單克隆

細胞株對懸浮培養物中無血清生長之適應性可加以克服。

根據本發明之方法使得沈積相應哺乳動物細胞於無血清、無蛋白或化學上定義之生產培養基中成為可能，因此無需如通常所要求之對無血清或無蛋白生產培養基進行適應。其導致發展建立生產相關之細胞株的時間實質性縮短(約50%)。而且，單細胞沈積導致穩定、均質之細胞純系，其在生物製劑生產上具有關鍵重要的作用，不僅對於其在藥物許可中之管理要求而言。此外，使用自體餵養細胞進行與生產相關之CHO、BHK或NS0細胞之再選殖，例如使用倉鼠細胞，較佳地CHO或BHK細胞，或小鼠骨髓瘤細胞，較佳地NS0細胞，較使用人類細胞或稍遜特徵化之細胞具有相當低之受人類病原體污染的風險。

### 【實施方式】

在藉由以下無限制之例示性實施例對本發明進行更詳細的描述之前，應指出不定冠詞(例如"a"或"an")及定冠詞(即"the")的使用包括所討論的術語的單數與複數兩者，除非明確排除兩種形式中的一種且提到一特定形式(單數或複數)。因此，該術語"一個細胞(a cell)"自動也包括"複數個細胞"，除非明確規定其僅意謂單細胞。單數明確表示，例如，其中由(1)來補充"a"或"one"。

### 定義

術語"選殖/再選殖"(cloning/recloning, clone/reclone)與細胞培養相關聯，其表示一種可自原始細胞獲得同一細胞之細胞群的技術。因此術語"細胞選殖"或"單細胞選殖)表示

一種方法，其中單細胞可自具有不同基因型細胞之細胞庫中識別並分離，且然後將其複製以形成由複數個基因上相同之細胞所組成之細胞群。若細胞單個沈積(意即每一培養容器中僅沈積一個(1)細胞)且然後擴張形成同一細胞之細胞群，則該方法為"直接單細胞選殖"。若許多細胞同時沈積於培養容器中並擴張形成細胞群，且藉由重複稀釋(=受限稀釋)將其劃分為同一細胞之細胞群，則將此方法描述為"間接選殖"方法。

單純系為衍生自一個(1)單細胞之基因相同細胞。因此在下文中將由相同來源之同一細胞組成之細胞群稱為"單克隆細胞群(monoclonal cell population)"。若在培養相同來源之細胞期間基因組存在自發改變，例如突變及/或易位，則對本發明之目的來說仍認為該細胞群之單個細胞係同一細胞，且認為培養物係單克隆細胞群。比較而言，即使基因相同的起始細胞係以相同的核酸來轉染，但大量穩定的經轉染細胞(轉染子)並非為同系的細胞純系，意即它們不是單克隆細胞群。

術語"亞純系/繼代培養物(subculture)"係指細胞之不同代，其藉由分裂細胞之單個或多個通道自原始細胞或原始培養物來生產。例如，當將相同細胞或細胞培養物經許多代培養及複製時，使用單詞"亞純系/繼代培養物"。

"有效(effective或efficient)再選殖"意謂至少10%之選殖效率，較佳至少20%，更佳至少30%且極佳至少40%。根據本發明之一較佳實施例，術語有效再選殖意謂以至少50%

之效率來選殖，較佳至少60%，最佳至少70%且極佳至少80%。

術語"選殖效率"定義為經沈積後能形成較佳地具有大於50個細胞之活細胞群之細胞百分比。若(例如)在細胞分類之操作中，50個細胞分佈於50個培養容器上且若該等50個單個沈積細胞中之25個生長形成培養物，則選殖效率為50%(50個中之25個)。

就本發明之目的而言，術語"可分裂的/可擴大的"描述細胞/細胞群之無窮分裂的潛能，但至少經兩代，較佳地為4代。藉由<sup>[137]</sup>Cs或藉由絲裂黴素C處理，可減少或完全破壞該潛能。

術語"衍生物/後代"係指基因上可追溯到特定起始細胞的細胞，且其(例如)藉由繼代培養物形成(具有或不具選擇壓力)及/或藉由基因操作產生。相同細胞類型之細胞的再分離物亦包含於術語"衍生物/後代"中。因此(例如)，所有CHO細胞株為自中國灰鼠(*Cricetulus griseus*)(Puck等人，1958)中所分離之倉鼠卵巢細胞之衍生物/後代，不論它們是否係藉由次培養，再分離或基因操作而獲得。

術語"自體飼養細胞"意謂飼養細胞及在該飼養細胞存在下待培養之細胞二者分類學上衍生自相同來源。若(例如)待培養之細胞為倉鼠細胞(倉鼠亞科(subfamily Cricetinae))，較佳地為中國倉鼠(*Cricetulus*)或敘利亞倉鼠(*Mesocricetus*)屬之細胞，例如CHO或BHK細胞，則每一最初自該亞科分離之飼養細胞都係與倉鼠亞科之該等倉鼠細胞自體的飼養

細胞。根據一較佳實施例，術語"自體餵養細胞"意謂餵養細胞與待培養之細胞二者分類學上衍生自相同種類，或最初自相同種類(來自中國倉鼠或敘利亞倉鼠屬的細胞)中分離。若(例如)待培養之細胞為中國倉鼠或敘利亞倉鼠屬之倉鼠細胞，較佳為CHO或BHK細胞，則在本發明之意義上，每一最初自討論中的倉鼠屬所分離出的餵養細胞都為自體餵養細胞。根據另一較佳實施例，若餵養細胞與待培養之細胞來自相同物種，例如，中國灰鼠或敘利亞黃金鼠(*Mesocricetus auratus*)，則出現自體餵養細胞。根據一特定較佳實施例，若餵養細胞與待培養之細胞二者都來自相同物種且具有相同組織向性(例如，來自中國灰鼠之卵巢細胞--CHO細胞)則出現自體餵養細胞。根據一特定較佳實施例，若餵養細胞與待培養之細胞二者都培養衍生自同一原始細胞，例如若兩種細胞最初為CHO-DG-44細胞或該等細胞之後代，則餵養細胞為自體餵養細胞。根據另一較佳實施例，餵養細胞(例如)對抗生素賦予與待培養之細胞相同的抵抗力。當在選擇性試劑(例如抗生素)存在下進行細胞沈積時，此係特別有利的。

術語"無血清"意謂培養基及培養條件，其特徵為細胞在無動物及/或人類血清存在下生長，較佳在無任何自血清分離之蛋白存在下生長，較佳在無未重組生產之蛋白存在下生長。因此，術語"適於無血清條件之細胞"意謂彼等可在無動物或人類血清或血清蛋白存在下進行複製之細胞。

術語"無蛋白"表示不含任何動物蛋白之培養基；吾人認

為自細菌、酵母或真菌所分離之蛋白並非動物蛋白。

術語"化學上定義"描述了一種無血清，較佳亦為無蛋白之，且由化學上定義之物質組成的細胞培養基。因此化學上定義之培養基由主要的純單種物質之混合物組成。化學上定義的培養基之一實例為 Messrs Invitrogen 所生產的 CD-CHO 培養基 (Carlsbad, CA, US)。

表達"可在懸浮液中培養之細胞"係指適於在液體培養物("懸浮培養物")中生長之細胞，且其黏附於容器(例如細胞培養皿或燒瓶)表面之能力受到限制或已喪失。適於無血清生長及懸浮生長二者之細胞係指"適於無血清培養基之非黏附型細胞"。若飼養細胞係自該等培養物製備，則該等細胞符合(by)定義"適於無血清培養基之非黏附型飼養細胞"。

#### 發明描述

本發明係關於一種細胞選殖之方法，其特徵為在飼養細胞存在下於無血清條件下之培養容器中沈積少於五個，例如四個、三個、兩個或一個(1)哺乳動物細胞，較佳地為自體飼養細胞，且將其在無血清條件下培養及複製。根據一較佳實施例，本發明係關於選殖哺乳動物細胞之相應方法，其特徵為在無血清條件下每一培養容器沈積一個(1)或兩個哺乳動物細胞，且在自體飼養細胞存在下將其於無血清條件下培養。一較佳實施例係關於一種選殖單細胞之方法，其特徵為在自體飼養細胞存在下，於無血清條件下之培養容器中沈積一個(1)單哺乳動物細胞且將其於無血清條件下培養及複製。在另一較佳實施例中，待培養之沈積細

胞係生長於懸浮培養物中的細胞。

若每一培養容器中僅沈積一個(1)細胞且將其複製以形成細胞群，則每一單個生長細胞群為單克隆細胞群且該方法為直接單細胞選殖之方法。若每一培養容器中沈積及複製一個(1)以上單細胞，例如兩個、三個或四個細胞，則該等生長細胞群係所謂的混合純系。該等細胞群藉由直接單細胞選殖或藉由習知方法可轉換成所謂的統計上的單克隆的細胞群，例如藉由細胞群之重複稀釋(=受限稀釋)(例如參照Morgan, Kultur tierischer Zellen [culture of animal cells], 113及114頁，Spektrum Akademischer Verlag 1994)。

本發明所提供之方法可特別用於複製及選殖鼠亞科(subfamily Murinae)之哺乳動物細胞，例如小鼠(Mus)屬或倉鼠亞科，例如中國倉鼠或敘利亞倉鼠類及自其分離之細胞株，包括其後代/衍生物。尤其較佳的是該方法複製/選殖根據本發明之倉鼠細胞或小鼠骨髓瘤及自其中所衍生之穩定細胞株。因此，本發明係關於一種在餵養細胞存在下，較佳係自體餵養細胞存在下選殖細胞之方法，其特徵為待選殖之沈積哺乳動物細胞為倉鼠或小鼠骨髓瘤細胞。

根據一特定較佳實施例，根據本發明之方法為複製/選殖中國倉鼠屬(中國侏儒倉鼠)之倉鼠細胞及自該物種所分離之或衍生自該等分離細胞之穩定細胞株，例如CHO、CHO-K1、CHO-DUKX、CHO-DUKX B1或CHO-DG-44細胞，及該等細胞株之衍生物/後代。根據本發明，尤其較佳的係一種在自體餵養細胞存在下複製及選殖CHO-DG-44、

CHO-DUKX及CHO-K1，尤其為CHO-DG-44及CHO-DUKX細胞的方法。根據本發明使用該方法，自敘利亞黃金鼠(敘利亞倉鼠)的細胞及由此分離或由此衍生之穩定細胞株，例如BHK21或BHK TK<sup>-</sup>細胞及該等細胞株之衍生物/後代亦可藉由本文所描述之方法進行複製及選殖。因此，本發明較佳係關於一種複製及選殖CHO或BHK細胞及其衍生物/後代之方法，其特徵為在自體餵養細胞存在下，無血清條件下之培養容器中沈積少於五個，例如四個、三個、兩個或較佳僅一個(1)細胞，且於無血清條件下將其培養及複製。

此外，本發明係關於一種複製及尤其選殖小家鼠骨髓瘤細胞的方法，較佳自小鼠(*Mus musculus*)及由其中分離或衍生之穩定的細胞株，例如NS0及Sp2/0細胞及該等細胞株之衍生物/後代來進行。該方法之特徵亦在於在自體餵養細胞存在下，無血清條件下之培養容器中沈積該等細胞中之少於五個，例如四個、三個、兩個或較佳的僅一個(1)細胞，且於無血清條件下將其培養及複製。

根據本發明，可複製及選殖之倉鼠及小鼠細胞之額外實例在下表1中得到詳細說明。除了該等細胞/細胞株之衍生物及後代，其它哺乳動物，包括來自人類、小鼠、大鼠、猴子或非小鼠及倉鼠之齧齒動物的細胞株亦可根據本發明之方法來加以複製或選殖。

表 1 倉鼠及小鼠細胞株

| 細胞株                                                          | 登記號                                                      |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| NS0                                                          | ECACC No. 85110503<br>ATCC CRL1827<br>ATCC CRL2695, 2696 |
| Sp2/0Ag14                                                    | ATCC CRL1581                                             |
| BHK21                                                        | ATCC CCL10                                               |
| BHK TK <sup>-</sup>                                          | ECACC No. 85011423                                       |
| HaK                                                          | ATCC CCL15                                               |
| 225462.2 (BHK21衍生物)                                          | ATCC CRL8544                                             |
| CHO                                                          | ECACC No. 8505302                                        |
| CHO-K1                                                       | ATCC CCL61                                               |
| CHODUKX<br>(= CHO duk <sup>-</sup> , CHO/dhfr <sup>-</sup> ) | ATCC CRL9096                                             |
| CHODUKX B1                                                   | ATCC CRL9010                                             |
| CHODG44                                                      | Urlaub 等人, Cell 33[2], 405412, 1983                      |
| CHO Pro5                                                     | ATCC CRL1781                                             |
| V79                                                          | ATCC CCC93                                               |
| B14AF28G3                                                    | ATCC CCL14                                               |
| CHL                                                          | ECACC No. 87111906                                       |

根據本發明，相應哺乳動物細胞係較佳於無血清條件下建立、培養及沈積。該等步驟視情況在不含動物蛋白/肽之培養基中及/或化學上定義之培養基中進行。市售培養基之實例包括漢姆 F12(Ham's F12)(Sigma, Deisenhofen, DE), RPMI 1640(Sigma)，達爾貝科經改質伊格培養基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(DMEM; Sigma)，最低必需培養基 (Minimal Essential Medium)(MEM; Sigma)，艾斯科夫經改質達爾貝科培養基 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)(IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), CHO-S-SFMII (Invitrogen)，無血清 CHO-培養基 (Sigma) 及無蛋白 CHO-培養基 (Sigma)。每一該等培養基可視情況用各種化合物來補充，例如激素及/或其它生長因子(例如胰島素、轉鐵蛋白、

表皮生長因子、胰島素樣生長因子)、鹽類(例如氯化鈉、鈣、鎂、磷酸鹽)、緩衝液(例如 HEPES)、核苷(例如腺苷、胸苷)、穀胺醯胺、葡萄糖或其它等價營養物、抗生素及/或微量元素。為選擇表現一或多個可選擇標記基因之基因上經改質細胞，可向培養基加入一或多種合適的選擇試劑，例如抗生素。

迄今為止，已描述餵養細胞用於培養細胞之用途與黏附生長細胞之培養相聯繫(例如 Wee Eng Lim 等人，2002; Rexroad 等人，1997; Peng 等人，1996; Grigoriev 等人，1996; Sanchez 等人，1991; Butcher 等人，1988; Long 等人，1986; Shneyour 等人，1984; Pintus 等人，1983; Brodin 等人，1983)。此處，將黏附餵養細胞陳列於培養容器中或作為細胞之單層(單層)放於載體上且待培養之細胞在此單層上生長。由於該等餵養細胞已喪失進一步生長之能力(自然生長或人工生長兩者中之任一者)，待培養之細胞可加以複製而不至於藉由餵養細胞生長過快。餵養細胞與待培養之細胞二者皆為黏附生長細胞。

作為對比，根據另一實施例本發明可使用黏附型自體餵養細胞來複製生長於懸浮液中的細胞，或在另一較佳實施例中本發明可使用保存於懸浮液中的自體餵養細胞來複製生長於懸浮液中的細胞。若該(等)餵養細胞及該(等)待培養之細胞兩者皆衍生自同一原始細胞，例如若兩種細胞最初係適於懸浮液生長之細胞，則使用懸浮液中所保存之自體餵養細胞尤其較佳。因此，本發明亦關於一種複製/選殖上

述哺乳動物細胞之方法，其特徵為在懸浮液中所保存的自體餵養細胞存在下沈積、培養及複製待培養之細胞。尤其較佳地係一相應方法，其特徵為該(等)待培養之細胞適於懸浮液中生長。就此而論，亦較佳地係複製/選殖哺乳動物細胞之相應方法，其特徵為細胞之沈積與經沈積哺乳動物細胞之複製係於無血清及/或無蛋白及/或化學上定義之懸浮培養物中進行。

用於複製/選殖本文所描述的哺乳動物細胞之自體餵養細胞之數量主要視哺乳動物細胞之本質而定，該哺乳動物細胞為待複製及待選殖之哺乳動物細胞且可藉由每一類型細胞之簡單滴定實驗來測定。根據本發明複製/選殖哺乳動物之方法(例如)在每毫升培養基中至少大於100個自體餵養細胞存在下進行，較佳在每毫升培養基中100至200,000個自體餵養細胞存在下進行。在另一較佳實施例中，複製/選殖哺乳動物細胞係在每毫升培養基中500至50,000個自體餵養細胞存在下進行。極佳地係一方法，其中複製/選殖哺乳動物細胞係在每毫升培養基中500至10,000個自體餵養細胞存在下進行，較佳在每毫升培養基中2,000至10,000個自體餵養細胞存在下進行。

按照術語"自體餵養細胞"之定義，本發明係關於複製/選殖哺乳動物細胞之方法，其特徵為：當待複製/選殖之經沈積哺乳動物細胞為CHO或BHK細胞時，將倉鼠細胞，較佳地為倉鼠亞科之細胞，更佳地為中國倉鼠或敘利亞倉鼠屬之細胞用作餵養細胞；且當待複製/選殖之經沈積哺乳動物

細胞為NS0細胞時，將小鼠骨髓瘤細胞用作餵養細胞。亦較佳的係一種複製/選殖哺乳動物細胞之方法，其特徵為：當待複製/選殖之經沈積哺乳動物細胞為CHO細胞時，將CHO細胞用作餵養細胞；當待複製/選殖之經沈積哺乳動物細胞為BHK細胞時，將BHK細胞用作餵養細胞；且當待複製/選殖之經沈積哺乳動物細胞為NS0細胞時，將NS0細胞用作餵養細胞。

若待培養之經沈積哺乳動物細胞係在選擇試劑存在下培養時，使用亦具有賦予抵抗力之選擇標記基因的自體餵養細胞係合適的，因為其能在選擇試劑存在下防止餵養細胞快速死亡。因此，本發明亦係關於選殖細胞，特定言之係上述倉鼠或小鼠骨髓瘤細胞之方法，其特徵為自體餵養細胞存在下，在無血清條件下之，在培養容器中沈積少於五個，例如四個、三個、兩個或一個(1)該等哺乳動物細胞，且無血清條件下將將其培養及複製，該等自體餵養細胞及該(等)經沈積哺乳動物細胞各自具有至少一種選擇標記基因，該基因對選擇試劑賦予抵抗力，且至少待選殖之哺乳動物的複製係在無血清條件下、該選擇試劑存在下進行，其中餵養細胞與待選殖之哺乳動物細胞兩者皆對該選擇試劑具有抵抗力。

自體餵養細胞可(例如)藉由輻射放射源之照射，例如藉由銫同位素 $^{137}\text{Cs}$ 之照射而來產生。以1與1,000 Gy之間的能量劑量來照射對在本文所述之自體餵養細胞存在下複製/選殖哺乳動物細胞的方法係有利的。特別有利的是使

用10與500 Gy之間的能量劑量，更有利的是20與200 Gy之間的能量劑量。與CHO細胞之選殖相聯繫，已發現自體餵養細胞，較佳CHO細胞之使用係有益的，且其導致在經1與500 Gy之間的能量劑量照射後選殖效率之高水平。已證明使用經20與100 Gy之間的能量劑量照射之自體餵養細胞特別有利，較佳經約50 Gy之能量劑量照射。理論上，藉由以輻射之不同總劑量來處理餵養細胞並藉由測定作為輻射劑量之函數的選殖效率可在實驗上測定每一細胞之最佳能量劑量，其類似於實例中所描述之方法。除了以 $^{137}\text{Cs}$ 及 $^{60}\text{Co}$ (鈷同位素60)之 $\gamma$ 輻射，使用例如UV輻射、電子輻射、放射性輻射、中子輻射及微波輻射亦合適的。

在根據本發明之複製/選殖哺乳動物細胞之方法之一中，餵養細胞可直接使用或經低溫貯藏(例如於液體氮中)後使用。低溫貯藏哺乳動物細胞之方法為此項技術中所知，且藉由Freshney(編者)，Animal Cell culture - a practical approach, IRL-Press 1986, 73-78頁之實例得以描述，其內容以引用的方式併入本文中。

該等方法適於在哺乳動物最初沈積的培養容器中，將所沈積的哺乳動物細胞複製高達 $1 \times 10^5$ 至 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 培養基之密度。較佳地第一次傳代發生於細胞密度 $2 \times 10^5$ 至 $8 \times 10^5/\text{ml}$ 之培養基時，較佳在細胞密度達 $2 \times 10^5$ 至 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 之培養基時發生。

本文所描述之根據本發明的複製/選殖哺乳動物細胞之方法的特徵為再選殖效率之高水平，其意謂本發明係關於

複製/再選殖哺乳動物細胞之方法，特徵為選殖效率為至少10%，較佳至少20%，更佳至少30%且極佳至少40%。根據一特定較佳實施例，本發明係關於複製/再選殖哺乳動物細胞之方法，特徵為再選殖效率為至少50%，較佳至少60%且尤其較佳至少70%且極佳至少80%。

根據本文所描述之實例，就CHO細胞而言可獲得(包括)65%以上之再選殖效率。因此，本發明亦關於複製/再選殖CHO細胞之方法，其特徵為再選殖沈積了的CHO細胞之再選殖效率為自10至高於65%，較佳高於20%，最佳高於30%，更佳地高於40%，極佳高於50%，尤其為高於60%。然而，本發明亦關於指定細胞類型具有稍低再選殖效率之方法。

此外，本發明係關於在根據上述方法中之一種所複製/選殖之細胞內製備一或多種產物(多肽、蛋白、核酸等)之方法，較佳係製備重組產物之方法。先決條件為討論中的細胞含有一或多個相關基因，其對一或多種待製備之產物編碼。較佳地，所討論之細胞為CHO、BHK或NS0細胞及該等細胞株之衍生物/後代。然而，其亦可為任何其它細胞，例如，表1所列之細胞中之一種。

待生成之相關基因可為自然產生於宿主細胞中之基因，或其可為由人工導入細胞之基因。根據定義，每一導入細胞之序列或基因係稱作與該細胞相聯繫的"異種序列"或"異種基因"，即使待導入之序列或基因與該細胞之內源序列或內源基因相同。例如，導入倉鼠細胞中之倉鼠肌動蛋

白基因根據定義係稱為異種基因。若該異種基因對相關基因編碼，其亦稱為"相關之異種基因"。

藉由各種方法可將相關之異種基因導入細胞，例如藉由病毒轉化、轉染或顯微注射。相關之異種基因可作為線性或作為表現載體之部分導入細胞。大量真核表現載體係已知的，其對一或多個異種基因之插入及其表現提供多重選殖位點。商品供應商包括例如 Stratagene, La Jolla, CA, USA; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Promega, Madison, WI, USA or BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA。藉由如 Sambrook 等人，1989 或 Ausubel 等人，1994 中所描述的習知方法用對一或多個相關基因編碼之 DNA 或表現載體來轉染細胞。轉染之合適方法包括例如脂質體介導轉染、磷酸鈣共沈澱、電穿孔、聚陽離子(例如 DEAE 葡聚糖)介導之轉染、原生質體融合、顯微注射及病毒感染。較佳地，在進行穩定轉染時，DAN 分子組合成宿主細胞之基因組或人工染色體/微染色體二者中之任一者，或以穩定方式游離包含於宿主細胞中。產生最優轉染頻率及討論中之宿主細胞中的一或多個相關之異種基因之表現的轉染方法係較佳的。

相關之異種基因通常在功能上連接至能使相關基因轉錄之啟動子及其它調節因子，該等調節因子允許相關基因之轉錄與轉譯(表現)或增加其效率。

術語"啟動子"表示聚核苷酸序列，其能使或能控制功能上與其相連之基因或序列的轉錄。啟動子含有結合 RNA 聚合酶之識別序列及用於轉錄的起始位點(轉錄起始位點)。為

表現特定細胞類型或宿主細胞想要的序列，必須選擇合適的功能性啟動子。熟習此項技術者熟悉多種各種來源之啟動子，包括組成型啟動子、誘導型啟動子及抑制型啟動子。它們儲存於(例如)諸如核酸序列資料庫(GenBank)之資料庫中，且其作為獨立元素或作為於聚核苷酸序列內所選殖之元素可自商業或個人來源獲得。在誘導型啟動子中，啟動子對訊號作出反應的活性可減少或增加。誘導型啟動子之一實例為四環素(tet)啟動子。其含有四環素操作序列(tetO)，該等序列可藉由四環素所調節之反式激活蛋白(tTA)來誘導。在四環素存在下，tTA與tetO之結合被抑制。其它可誘導啟動子之實例為jun、fos、金屬硫蛋白及熱休克啟動子(亦參照 Sambrook 等人，1989；Gossen 等人；1994)。在尤其適合於真核細胞中高表現之啟動子中，存在(例如)倉鼠之ubiquitin/S27a啟動子(WO 97/15664)、SV 40早期啟動子、腺病毒主要晚期啟動子、勞氏肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)之長末端重複區域及人類細胞肥大病毒之早期啟動子。其它異種哺乳動物啟動子之實例為肌動蛋白、免疫球蛋白或熱休克啟動子。

例如啟動子可在功能上連接至增強子序列以增加轉錄活性。為此，可使用一或多個增強子及/或增強子序列之若干拷貝，例如CMV或SV40增強子。

術語增強子表示在順式(cis)位置上之聚核苷酸序列對啟動子活性起作用，且因此刺激功能上連接於該啟動子之基因的轉錄。與啟動子不同，增強子之作用與位置及方位無

關，且因此它們能定位於轉錄單位前或轉錄單位後，在內含子內或甚至編碼區內。增強子既可緊鄰轉錄單位亦可遠離啟動子。與啟動子之物理上或功能上之重疊亦係可能的。熟習此項技術者可自各種來源知曉大量增強子(且寄存於資料庫，例如核酸序列資料庫，如SV40增強子、CMV增強子、多瘤病毒增強子、腺病毒增強子)，該等增強子作為獨立元素或作為於聚核苷酸序列內所選殖之元素係可用的(例如儲存於ATCC或來自商業及個人來源)。大量啟動子序列亦含有增強子序列，例如常用的CMV啟動子。人類CMV增強子係迄今為止所確認的最強大的增強子之一。誘導型增強子之一實例為金屬硫蛋白增強子，其可由糖皮質激素或重金屬來刺激。

基本上，調節因子包括啟動子、增強子、終止及聚腺苷酸化訊號及其它表現控制因子。可誘導之序列與組成調節之序列兩者因各種細胞類型而為吾人熟知。"轉錄調節因子"通常包含位於待表現的基因序列之上游的啟動子、轉錄起始及終止位點及聚腺苷酸化訊號。

術語"轉錄起始位點"係指建構中之核酸，其對應於結合於初級轉錄物(意即mRNA前體)之第一個核酸。轉錄起始位點可與啟動子序列重疊。

術語"轉錄終止位點"係指通常位於相關基因或待轉錄基因段之3'-端的核苷酸序列，且其藉由RNA聚合酶使轉錄終止。

"聚腺苷酸化訊號"為訊號序列，其在真核mRNA之3'-端的

特定位點引起分裂，且引起約100-200腺嘌呤核苷(聚A尾)序列轉錄後結合於已分裂之3'-端。聚腺苷酸化訊號包含序列AATAAA，其位於分裂位點上游之約10-30個核苷酸處且包含位於下游之序列。各種聚腺苷酸化因子係熟知的，例如tk聚A，SV40早期及晚期聚A或BGH聚A(例如US 5,122,458中所述)。

"轉譯調節因子"包括轉譯起始位點(AUG)，終止密碼子及對於每一待表現之多肽的聚A訊號。對最優表現而言，為消除任何潛在地不合適的額外轉譯起始密碼子或消除在轉錄或表現水平上會影響表現之其它序列，移除、添加或改變待表現的核酸序列之5'-未轉譯區及/或3'-未轉譯區係可行的。為促進表現，或者可將核糖體一致的結合位點立即插入到起始密碼子之上游。為產生分泌之多肽，該相關基因通常含有編碼訊號前體肽之訊號序列，該訊號前體肽將合成之多肽運輸至且使其穿過ER膜。該訊號序列經常但非總是位於分泌蛋白之胺基末端且在該蛋白經由ER膜過濾後，藉由訊號肽酶可分裂該訊號序列。該基因序列通常但不一定含有其自身訊號序列。若原生訊號序列未出現，則可以已知之方式引入異種訊號序列。大量的該種訊號序列對熟習此項技術者係熟知的，且其儲存於序列資料庫中，例如核酸序列資料庫及EMBL。

相關之基因產物可包括蛋白/多肽，例如抗體、酶、細胞因子、淋巴因子、黏附型分子、受體及其衍生物或片斷，但並不限於此。一般地，所有充當促效劑或拮抗劑之多肽

具有治療或診斷之應用價值。

術語"多肽"用於胺基酸序列或蛋白，且其指任何長度之胺基酸的聚合體。該術語亦包括藉由反應(例如糖基化、磷酸化、乙醯化或蛋白處理)而轉譯後改質的蛋白。在保持多肽生物活性的同時，例如藉由取代、刪除或插入胺基酸及與其它蛋白融合可改質多肽之結構。

蛋白之實例為胰島素、胰島素樣生長因子(IGF-I或IGF-II)；人類生長激素(hGH)及其它生長因子，例如VEGF、EGF、TGF，例如TGF $\alpha$ 及 $\beta$ ，其包含 $\beta$ 1、 $\beta$ 2、 $\beta$ 3、 $\beta$ 4及 $\beta$ 5；纖溶酶原活化物(tPA)；促紅細胞生成素(EPO)；血小板生成素(TBO)；細胞因子，例如白細胞間介素(IL)如IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18；干擾素(IFN)- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\omega$ 或 $\tau$ ，腫瘤壞死因子(TNF)，例如TNF- $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\gamma$ ，CD40配位子，Apo2-配位子/TRAIL，DR4、DR5、DcR1、DcR2、DcR3、OPG、Fas配位子；GCSF；GMCSF；MCSF；MCP1及VEGF。其它實例為凝固因子，例如因子VII、因子VIII、因子IX、范溫韋伯氏(von Willebrand)因子；抗凝血因子，例如蛋白C；腦啡肽酶(enekephalinase)；RANTES(調節正常T細胞活化、表現及分泌)；人類巨噬細胞發炎蛋白(MIP-1- $\alpha$ )；(人類)血清白蛋白，細胞黏附型分子，例如包括 $\alpha$ 或 $\beta$ 亞單位之LFA1、Mac1、p150.95、VLA4、ICAM1、ICAM2、ICAM3、VCAM或 $\alpha$ V/ $\beta$ 3整合素(integrin)；血型抗原；flk2/3受體；OB受體；mlp受體；CTLA4；Apo2L受體，

例如 Apo2；轉化生長因子(TGF)；CD蛋白，T細胞受體；病毒抗原，例如 HIV之 gp120；與抗原相聯繫之腫瘤，例如 HER2、HER3 或 HER4 受體，類風濕因子，例如 NGF $\beta$  或 PDGF；鬆弛素-A或-B鏈；促性腺素(gonadotropin)；與促性腺素相聯繫之肽；抑制素；活化素；與細胞毒性T淋巴細胞相聯繫之抗原(CTLA)或神經營養因子，例如 BDNF、神經營養素-3、-4、-5或-6。

其它實例為單克隆的、多克隆的、多特異性(multispecific)及單鏈抗體及其片斷，例如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fc及Fc'片斷，輕(L)或重(H)免疫球蛋白鏈及其不變、可變或超變區以及 Fv與Fd片斷(Chamov等人，1999)。該等抗體可係人類或非人類來源。人源化抗體及嵌合抗體亦係可能的。

Fab片斷(片斷抗原結合=Fab)由兩條鏈之可變區組成，且兩鏈藉由相鄰恒定區固持在一起的。例如，藉由以蛋白酶(如木瓜蛋白酶)之處理或藉由DNA選殖可自習知抗體中生成該等Fab片斷。其他抗體片斷為F(ab')<sub>2</sub>片斷，其能藉由胃蛋白酶的蛋白水解消化產生。

藉由基因選殖，亦可製備僅由重鏈(VH)及輕鏈(VL)之可變區組成的縮短抗體片斷。此等片斷稱作Fv片斷(可變片斷=可變區之片斷)。由於在此等Fv片斷中不可能經由恒定鏈之半胱氨酸組進行共價結合，所以它們通常藉由某些其他方法得以穩定。為此目的，重鏈或輕鏈之可變區經常藉由約10至30個胺基酸短肽片斷連接在一起，較佳地約15個胺基酸。此產生單多肽鏈，其中VH及VL藉由肽連接體來連

接。該等抗體片斷亦稱為單鏈Fv片斷(scFv)。ScFv抗體之實例已熟知且得以描述，參照例如Huston等人，1988。

在過去，各種生產多聚scFv衍生物之策略已得到發展。其目的係以經改良的藥物動力特性及增加的結合親和性來生產重組抗體。為達成scFv片斷之多聚合，其作為具有多聚合域之融合蛋白而得以產生。該等多聚合域可為，例如IgG或螺旋結構("盤旋的線圈結構")之CH3區，例如亮胺酸拉鏈區。在其它策略中，scFv片斷之VH及VL區之間的交互作用用於多聚合(例如2聚體、3聚體及5聚體)。

此項技術中所用術語二聚體表示二價同型二聚scFv衍生物。藉由疊加VH/VL鏈將scFv分子中之肽連接體縮短至5至10個胺基酸導致了同型二聚體之形成。此外，藉由插入二硫橋(disulphite bridge)可穩定該等二聚體。文獻中可發現二聚體之實例，例如Perisic等人，1994。

用於此項技術中之術語小聚體(minibody)表示二價同型二聚scFv衍生物。其由融合蛋白組成，且該融合蛋白含有作為二聚作用區之免疫球蛋白之CH3區，較佳地為IgG，最佳地為IgG1。此藉由鉸鏈區、亦藉由IgG，及連接區可連接scFv片斷。Hu等人，1996描述了該等小聚體之實例。

此項技術中所用之術語三聚體表示三價同型三聚之scFv衍生物(Kortt等人，1997)。未使用連接體序列之VH-VL的直接融合導致三聚體之形成。

此項技術中稱作小抗體之具有二、三或四價結構的片斷亦係scFv片斷之衍生物。該多聚合藉由二、三或四聚螺旋

結構來達成。(Pack等人, 1993及1995; Lovejoy等人, 1993)。

為選擇轉染細胞, 此等可另外用一或多個可選擇之標記基因加以轉染。文獻中描述了大量可選擇之標記基因, 其包括雙功能(陽性/陰性)標記物(參照例如 WO 92/08796及 WO 94/28143)。通常用於真核細胞之可選擇的標記物實例包括: 用於胺基糖苷磷酸轉移酶(APH)、潮黴素磷酸轉移酶(HYG)、二氫葉酸還原酶(DHFR)、胸苷激酶(TK)、穀胺醯胺合成酶、天冬醯胺合成酶的基因及對新黴素賦予抵抗力之基因(G418)、嘌呤黴素(puromycin)、組胺醇D、博來黴素(bleomycin)、腐草黴素(phleomycin)及zeocin。該等基因可與相關基因一起引入細胞或獨立地引入細胞。較佳地亦藉由表現載體將其引入細胞。相應地經改良細胞可在一或多種適合之選擇劑存在下培養, 該等選擇劑選擇性地更青睞含有且表現相應可選擇之標記基因的生長細胞。

可例如使用細菌 $\beta$ -半乳糖苷酶、細胞表面標記物或螢光蛋白, 藉由螢光激活之細胞分類法來選擇轉染細胞。該等螢光蛋白亦使得單個哺乳動物細胞基於FACS分離。相應所偵測到的細胞作為單細胞或複數個細胞自動沈積在培養物中, 舉例而言, 使用激光器, 例如氬激光器(488 nm)及例如配備有自動選殖單元之流動細胞儀(Flow Cytometer)(Coulter EPICS Altra, Beckman-Coulter, Miami, FL, USA)。根據一較佳實施例, 以此方式僅有一個(1)或至多兩個細胞沈積於含有自體餵養細胞之細胞培養皿中。僅沈積一個(1)單個細胞沈積係特別有利的。此外, 可使用磁珠進行分類。

為此，例如使用與磁珠偶合之抗體將此等細胞進行標記。此方式使細胞根據其特性得以分類。

進行細胞純系之基於FACS分離係特別有利的，該等細胞純系根據本文所描述之方法中之一種得以沈積，且其共同表現螢光蛋白及相關基因。較佳地，螢光蛋白及相關基因之表現在功能上相互聯繫。該功能性連接由(例如)兩個緊密排列的基因組成，因此兩基因之表現率例如在宿主細胞之瞬時或穩定轉染後相互關聯。例如，藉由所謂的IRES因子(內部核糖體進入位點)或藉由RNA剪接可達成該功能性連接，合成該等兩基因(相關基因及螢光蛋白之基因)作為雙順反子mRNA。以此方式，在螢光蛋白表現率與相關基因表現率之間存在直接關聯。由於功能性連接，該顯示螢光蛋白之高表現的相應細胞純系亦具有相關基因之高表現率。

螢光蛋白可為，例如綠色、藍綠色、藍色、黃色或其他顏色之螢光蛋白。一特定實例為自依考瑞爾維多利亞或瑞尼拉萊尼福密斯所獲得之綠色螢光蛋白(GFP)，及自其所發展的突變體；例如參照Bennet等人，1998；Chalfie等人，1994；WO 01/04306及本文所引用之文獻。其他螢光蛋白及對其編碼之基因在WO 00/34318、WO 00/34326、WO 00/34526及WO 01/27150中得以描述，該等專利以引用的方式併入本文中。該等螢光蛋白為珊瑚蟲(Anthozoa)類之非生物發光有機體之螢光基團，例如Anemonia majano、羽珊瑚(Clavularia sp.)、鈕扣珊瑚(Zoanthus sp.)I、鈕扣珊瑚II、紋狀體(Discosoma striata)、香菇珊瑚(Discosoma sp.)"紅"、香

菇珊瑚"綠"、香菇珊瑚"洋紅"、皺析海葵(*Anemonia sulcata*)。所使用之螢光蛋白可由野生型(wild-type)蛋白、天然的或基因設計之突變體及變異體、片斷、其衍生物或變異體組成，該等衍生物或變異體例如已與其他蛋白或肽融合。所用之突變(例如)可改變激發光譜或發射光譜、發色團之形成、消光係數或蛋白穩定性。此外，藉由密碼子最優化可改良哺乳動物細胞或其他種類之表現。例如，根據本發明，螢光蛋白亦可用於與可選擇標記物之融合，較佳與可擴增可選擇的標記物融合，例如二氫葉酸還原酶(DHFR)。

該選擇步驟可於細胞群上進行或以已預先分類的細胞群/細胞純系來進行。每一細胞培養容器中可沈積一或多個，較佳一個(1)、兩個、三個或四個細胞。較佳地，該等細胞在自體餵養細胞存在下沈積於無血清培養基中，最佳沈積於化學上定義之培養基中。在該申請案的其它地方詳細討論了適合的培養基及根據本發明使用自體餵養細胞沈積細胞之方法。基本上，可進行兩個或兩個以上的分類步驟，且在獨立的分類步驟之間，在合適的培養基中作為庫(pool)經特別長的時間(例如約兩週)對細胞進行培養及複製。

為在經再選殖細胞中生產一或多種相關基因產物，該等經再選殖細胞較佳在允許相關基因表現的條件下生長於無血清培養基中及懸浮培養物中。若(例如)相關基因在組成型啟動子之控制下，則不需要添加特殊誘導物。若相關基因之表現在誘導型啟動子之控制下，則(例如)必須以足夠但無

毒性之濃度將相應誘導物加入細胞培養基中。該等細胞可藉由多次繼代接種(subpassage)如所希望之進行擴充，且能轉移至合適的細胞培養容器中。該(等)基因產物為細胞產物、膜結合產物或分泌產物中之任一種。

相關產物可較佳地自細胞培養基中作為分泌之基因產物而獲得。然而，若蛋白或多肽未表現分泌訊號，該基因產物亦可自細胞溶解產物中分離。為獲得大體上不含其它重組蛋白及宿主細胞蛋白之純均質產物，進行習知之純化程序。首先，自培養基或溶解產物中頻繁移除細胞及細胞殘骸。然後，所希望之基因產物可自污染的可溶性蛋白、多肽及核酸中釋放出來，例如藉由免疫親和力及離子交換管柱之分餾、乙醇沈澱、逆相HPLC或葡聚糖凝膠(Sephadex)、矽石或陽離子交換樹脂(例如DEAE)之層析。重組宿主細胞所表現之異種蛋白的純化方法對熟悉此項技術者係熟知的且在文獻中得以描述，例如Harris等人，1995及Scopes 1988。

在另一態樣中，本發明因此係關於一種在無血清條件下於哺乳動物細胞中製備一或多種產物之方法，其特徵在於(i)哺乳動物細胞含有編碼相關蛋白之相關基因；(ii)哺乳動物細胞於允許複製該等哺乳動物細胞之無血清條件下生長；(iii)在無血清條件下之培養容器中，每一情況下沈積少於五個，較佳四個、三個、兩個或一個(1)哺乳動物細胞；(iv)在無血清條件下，自體餵養細胞存在下，複製該等適當沈積之哺乳動物細胞；(v)在相關基因得以表現之無血清條件下培養已複製的細胞；且(vi)然後自細胞或培養物上清液

分離基因產物，並純化之。根據該方法之一較佳實施例，在步驟(iii)之每一細胞培養容器中僅沈積一個(1)或兩個(2)哺乳動物細胞。尤其較佳係在步驟(iii)中僅有一個(1)單哺乳動物細胞沈積的方法。該細胞沈積可為手動地或自動地，例如使用基於FACS之細胞分類。根據另一較佳實施例，該哺乳動物細胞係其中引入了相關基因之經轉染哺乳動物細胞。因此，本發明亦關於一種製備重組基因產物之方法，其特徵為：在上述方法步驟(i)之前，以至少編碼相關基因之核酸來轉染該等哺乳動物細胞。相應哺乳動物細胞之穩定轉染較佳。

如已提及的，本發明亦關於單個哺乳動物細胞之基於FACS分類及單或多個哺乳動物細胞之沈積，較佳地少於5個，更佳地4個、3個、2個或1個表現相關蛋白之哺乳動物細胞，該細胞分類及細胞沈積較佳地作為哺乳動物細胞中所共同表現之螢光蛋白表現率之函數而發生，哺乳動物細胞之表現在功能上(functionally)與相關蛋白之表現相聯繫。因此，本發明亦關於在無血清條件下哺乳動物細胞中生產重組蛋白之方法，其特徵在於i)用編碼相關蛋白之基因來轉染哺乳動物細胞；ii)用編碼螢光蛋白的基因來轉染哺乳動物細胞，編碼螢光蛋白的基因之表現較佳地在功能上與相關基因之表現相關；iii)經轉染哺乳動物細胞於允許複製經轉染細胞及表現至少螢光蛋白的無血清條件下生長；iv)基於FACS分類後，每一情況下將少於5個，較佳地4、3、2或1(一)個經轉染哺乳動物細胞在無血清條件下沈積於具

有自體餵養細胞之細胞培養容器中，以螢光蛋白之表現率為基礎進行基於FACS之細胞分類；v)在自體餵養細胞存在下無血清條件下，複製相應經沈積細胞；vi)將該等已複製的細胞生長於至少表現相關基因之無血清條件下；且vii)然後自細胞或培養物上清液分離該(相關基因之)基因產物，並純化該基因產物。根據一特定較佳實施例，步驟iv)之每一培養容器中僅有一個(1)單體細胞沈積及複製。

較佳地，在步驟iv)中，僅分類選出該等細胞，其屬於具有螢光蛋白最高表現率之20%的細胞。實務上，此意謂分類選出20%之最亮螢光細胞(20%最具螢光性之細胞)。根據另一較佳實施例，細胞混合物中僅5%最亮螢光細胞，較佳3%最亮螢光細胞，或僅1%最亮螢光細胞被分類選出。如圖3a及3b所示，其導致具有相當高表現率之相關基因的細胞純系富集。因此單細胞之基於FACS之沈積能識別及複製具有相當高表現率之相關基因的均質細胞純系，該均質細胞純系又形成進一步優化步驟(例如基因擴增)之起點。

亦較佳地係一種在經再選殖哺乳動物細胞中生產一或多種重組產物之相應方法，其特徵為：哺乳動物細胞為倉鼠或小鼠骨髓瘤細胞，較佳地為CHO、BHK或NS0細胞及該等細胞株之衍生物/後代。該方法之另一實施例特徵為：餵養細胞適於無血清培養基，且為非黏附培養之細胞。與上述生產方法相聯繫亦較佳的是，若待複製/選殖之沈積了的哺乳動物細胞為CHO或BHK細胞，則將倉鼠細胞用作餵養細胞；且若待複製/選殖的沈積了的哺乳動物細胞為NS0細

胞，則將小鼠骨髓瘤細胞用作餵養細胞。尤其較佳地為一種方法，其特徵在於若待複製/選殖之經沈積哺乳動物細胞為CHO細胞，則將CHO細胞用作餵養細胞；若待複製/選殖之經沈積哺乳動物細胞為BHK細胞，則將BHK細胞用作餵養細胞；且若待複製/選殖之經沈積哺乳動物細胞為NS0細胞，則將NS0細胞用作餵養細胞。

本發明首次提供倉鼠細胞及小鼠骨髓瘤細胞，較佳地為NS0細胞作為餵養細胞。因此本發明亦關於NS0類型之倉鼠細胞或小鼠骨髓瘤細胞作為餵養細胞之用途。實例中極為詳細地描述了製備相應餵養細胞之方法。使用技術熟練者熟知之化學或物理方法可在理論上製備相應倉鼠或小鼠骨髓瘤餵養細胞，例如藉由用絲裂黴素C(胺丙[2',3':3,4]吡咯並[1,2-a]吡啶-4,7-二酮,6-胺基-8-[[[(胺基羰基)氧]甲基]-1,1a,2,8,8a,8b-六氫-8a-甲氧基-5-甲基-, [1aR-(1a.α., 8.β., 8a.α., 8b.α.)]-(9Cl)(Butcher等人, 1988))或用<sup>137</sup>Cs照射來處理。根據一較佳實施例，本發明因此係關於化學上或物理上不活化之餵養細胞。術語"不活化"在此上下文中意謂該等細胞在分裂能力上受到限制且較佳的喪失該能力但仍保持生命力。其意謂該等細胞仍保持新稱代謝活性(例如合成及分泌生長因子)一定時期，較佳歷時不活化後至少一至兩週。根據一較佳實施例，該相應餵養細胞為適於無血清培養條件之餵養細胞。根據本發明之一極佳實施例，該等餵養細胞為CHO、BHK或NS0細胞及此等細胞株之後代/衍生物。此外，在適當不活化後，該申請案所提及之所有細胞

可用作餵養細胞。

此外，本發明係關於由無血清細胞培養基、少於五個可分裂之哺乳動物細胞(較佳地四個、三個、兩個或一個(1)可分裂之哺乳動物細胞)及與該等可分裂之哺乳動物細胞自體同源的餵養細胞所組成之組合物。根據本發明之一較佳實施例，相應組合物含有一個(1)或兩個可分裂之哺乳動物細胞。根據另一較佳實施例，相應組合物僅含有一個(1)可分裂之哺乳動物細胞。

若可分裂之哺乳動物細胞為CHO或BHK細胞或其衍生物/後代，則其它較佳組合物含有倉鼠細胞，較佳為倉鼠亞科，最佳為小鼠類作為餵養細胞。此外，若可分裂之哺乳動物細胞為小鼠雜交瘤細胞，較佳地為NS0細胞或其衍生物/後代，則另一較佳組合物含有小鼠細胞，較佳為鼠亞科，最佳為小鼠屬作為餵養細胞。尤其較佳組合物之特徵為：若可分裂之哺乳動物細胞為CHO細胞，則該組合物含有CHO細胞作為餵養細胞；若可分裂之哺乳動物細胞為BHK細胞，則該組合物含有BHK細胞作為餵養細胞；且若可分裂之哺乳動物細胞為NS0細胞，則該組合物含有NS0細胞作為餵養細胞。

理論上，本發明亦關於如下之該等組合物，其在來自哺乳動物之餵養細胞存在下使少於5個，較佳地為4個、3個、2個或1個生產相關之倉鼠細胞(例如CHO或BHK細胞)及生產相關之小鼠骨髓瘤細胞(例如NS0細胞)於無血清條件下沈積及複製。

無血清、無蛋白或化學上定義之培養基之實例包括(例如)市售培養基漢姆F12(Sigma, Deisenhofen, DE)、RPMI 1640(Sigma)、達爾貝科經改質伊格培養基(DMEM; Sigma), 最低必需培養基(MEM; Sigma), 艾斯科夫經改質達爾貝科培養基(IMDM; Sigma), CDCHO(Invitrogen, Carlsbad, Ca., USA), CHO-S-SFMII(Invitrogen), 無血清CHO培養基(Sigma)及無蛋白CHO培養基(Sigma)。必要時, 能以各種化合物來補充此等培養基, 例如激素及/或其它生長因子(例如胰島素、轉鐵蛋白、表皮生長因子、胰島素樣生長因子)、鹽類(例如氯化鈉、鈣、鎂、磷酸鹽)、緩衝液(例如HEPES), 核苷(例如腺苷、胸苷)、穀胺醯胺、葡萄糖或其它等價營養物、抗生素及/或微量元素。若該等可複製之細胞係表現一或多種可選擇標記物之重組細胞, 則亦可向培養基加入一或多種適合之選擇試劑, 例如抗生素。

#### 實例

#### 縮寫

|                   |                                               |
|-------------------|-----------------------------------------------|
| ATCC              | 美國細胞培養暨儲存中心(American Type Culture Collection) |
| BHK               | 幼倉鼠腎                                          |
| $^{60}\text{Co}$  | 鈷同位素60                                        |
| $^{137}\text{Cs}$ | 銫同位素137                                       |
| CHO               | 中國倉鼠卵巢                                        |
| CMV               | 細胞肥大病毒                                        |
| DE                | 德國                                            |

|       |                |
|-------|----------------|
| DEAE  | 二乙胺乙基          |
| DMSO  | 二甲亞砜           |
| DNA   | 脫氧核糖核酸         |
| FACS  | 螢光激活之細胞分類器     |
| FITC  | 異硫氰酸螢光素        |
| Gy    | 戈瑞(Gray)       |
| HBSS  | 漢克(Hank)氏平衡鹽溶液 |
| HPLC  | 高效液相層析法        |
| mRNA  | 信使核糖核酸         |
| NS0   | 小鼠雜交瘤細胞        |
| polyA | 聚腺苷酸化序列        |
| Sp2/0 | 小鼠雜交瘤細胞        |
| SV40  | 猿猴病毒No.40      |

## 方法

### 1.細胞培養

在37°C、潮濕空氣及5%之CO<sub>2</sub>下，細胞培養瓶中，將細胞CHO-DG44/dhfr<sup>-/-</sup>(Urlaub等人，1983)作為懸浮細胞長久培養於無血清CHO-S-SFMII培養基(Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE)中，該培養基用次黃嘌呤及胸苷來補充。用CEDEX細胞計數器(Innovatis, DE)或藉由台盼藍(trypan blue)染色來測定細胞數目及存活期，然後於1-3×10<sup>5</sup>/mL之濃度中種植細胞，且每隔2-3天將其傳代。就單細胞選殖而言，使用重組細胞CHO-DG44/dhfr<sup>-/-</sup>，其表現螢光蛋白(例如來自紐扣珊瑚之ZS-綠)或螢光蛋白及人類或人源化單克

隆抗體。類似於此等細胞來培養經選殖的重組細胞。所用之培養基仍為不含次黃嘌呤與胸苷的CHO-S-SFMII培養基 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE)。

在37°C、潮濕空氣且5%之CO<sub>2</sub>下，細胞培養瓶中，將BHK細胞作為懸浮細胞長久培養於無血清Opti Pro SFM培養基 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE)中。用CEDEX細胞計數器 (Innovatis, DE)或藉由台盼藍染色來測定細胞數目及存活期，然後於 $1-3 \times 10^5/\text{mL}$ 之濃度中種植細胞，且每隔2-3天傳代該等細胞。類似於BHK細胞來培養經選殖之細胞。

在37°C、潮濕空氣且5%之CO<sub>2</sub>下，細胞培養瓶中，將NS0細胞作為懸浮細胞長久培養於無血清雜交瘤細胞培養基、不含動物組份之培養基中 (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA)。用CEDEX細胞計數器 (Innovatis, DE)或藉由台盼藍染色來測定細胞數目及存活期，然後於 $1-3 \times 10^5/\text{mL}$ 之濃度中種植細胞，且每隔2-3天對其操作。類似於NS0細胞來培養經選殖之細胞。將雜交瘤細胞培養基、不含動物組份之培養基 (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA)用作培養基。

## 2.藉由照射製備餵養細胞

將無血清及無蛋白生長之懸浮CHO原始細胞(未經轉染細胞)以180 g離心10分鐘，且將其調節至於HBSS(漢克氏平衡鹽溶液)中 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 之細胞濃度。

然後以4 Gy/min之能量劑量輸出使用放射輻射源(Cs<sup>137</sup>輻射體，Gammacell 2000, Messrs Molsgaard Medical A/S, 丹麥)來照射該等細胞。使用介於5分鐘與125分鐘之間的照

射時間，能獲得介於20與500 Gy之間的能量劑量。照射後，以約200個細胞/井(=培養容器)之速率將該等細胞種至對該細胞具有特異性之CHO-S-SFMII培養基之96井微量滴定盤中，且儲存於37°C及培育箱空氣中5%CO<sub>2</sub>下。以同樣的方式用BHK及NS0細胞來進行該過程，將餵養細胞保存或種植於對該等細胞具有特異性之培養基中。

### 3. 餵養細胞之低溫貯藏

將由此所生產之餵養細胞在低於-150°C下低溫貯藏。使用程式化冷凍器(Consarctic BV25, Consarctic, Schölkrippen, DE)，在討論中的細胞培養基中進行低溫貯藏。將10% (v/v) DMSO作為防凍劑加入培養基中。0°C與-20°C之間的冷凍速率為1°C/min，然後以0.4°C/min之冷凍速率將溫度進一步降低。一旦冷凍完成，則該等餵養細胞以氣相低溫貯藏於液態氮中。

### 4. 自動細胞沈積

使用自動選殖單元，用配備有氬激光器(488 nm)(Coulter EPICS Altra, Messrs Beckman-Coulter, Miami, FL, USA)之流動細胞儀進行細胞(單個地或多個地)之自動沈積。在指數生長期將該等細胞離心並在HBSS中將細胞溶解至 $1-1.5 \times 10^7$ /ml之細胞濃度。然後使用"超分類選擇"(Hypersort Option)根據該等細胞在散射光中的位置，以8000-12000個細胞/秒之速率來將其分類。或者，根據其關於細胞內所表現之螢光蛋白的螢光強度可分類出表現螢光蛋白之細胞。將該等細胞單個地沈積於含有餵養細胞之96井微量滴定盤

中。將 BHK 細胞 (例如) 沈積於 OptiPro SFM 培養基中 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE)。將分類出的 NS0 細胞沈積於 (例如) 雜交瘤細胞培養基、不含動物組份之培養基中 (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA)。

分類 CHO 細胞時，將其沈積於 CHO-S-SFM-II (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) 中。將重組 CHO-DG-44 細胞加以沈積，其與來自紐扣珊瑚之 ZS-綠共同表現人類或人源化單克隆抗體。在 488 nm 使用氬激光器如上所述進行細胞分類。

#### 5. 經重組表現之基因產物 (用於 mAb-表現所用之 CHO-DGH-44) 之生產率的測定

一方面使用山羊抗人類 IgG Fc 片斷 (Dianova, Hamburg, DE) 且另一方面使用與 AP 結合之山羊抗人類  $\kappa$  光鏈抗體 ( $\delta$ )，根據標準方法 (Ausubel 等人, 1994, 最新版) 藉由 ELISA 來量化來自經穩定轉染 CHO-DG-44 細胞之上清液中的抗體滴定度，該等細胞表現人類或人源化單克隆抗體。經純化抗體係用作標準物。根據公式  $pg / ((CtCo) t / \ln (CtCo))$  來計算生產率 (pg/細胞/天)，其中 Co 及 Ct 給出播種或收穫之細胞計數且 t 表示培養時間。

#### 實例 1: 生產餵養細胞期間能量劑量對 CHO-DG-44 細胞之再選殖效率之影響

為調查生產餵養細胞期間能量劑量對再選殖效率之影響，如 "細胞培養" 方法所述生長 CHO-DG-44 細胞。如方法 "藉由照射製備餵養細胞" 中所述，以能量劑量 20 Gy、50 Gy、100 Gy、200 Gy 及 500 Gy 製備餵養細胞。照射後，以