

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
3. März 2005 (03.03.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/019442 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 5/02,  
5/10, C12P 21/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/009204

(22) Internationales Anmeldedatum:  
17. August 2004 (17.08.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
DE 103 38 531.2 19. August 2003 (19.08.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA GMBH  
& CO. KG** [DE/DE]; Binger Str. 173, 55216 Ingelheim  
(DE).

(72) Erfinder; und

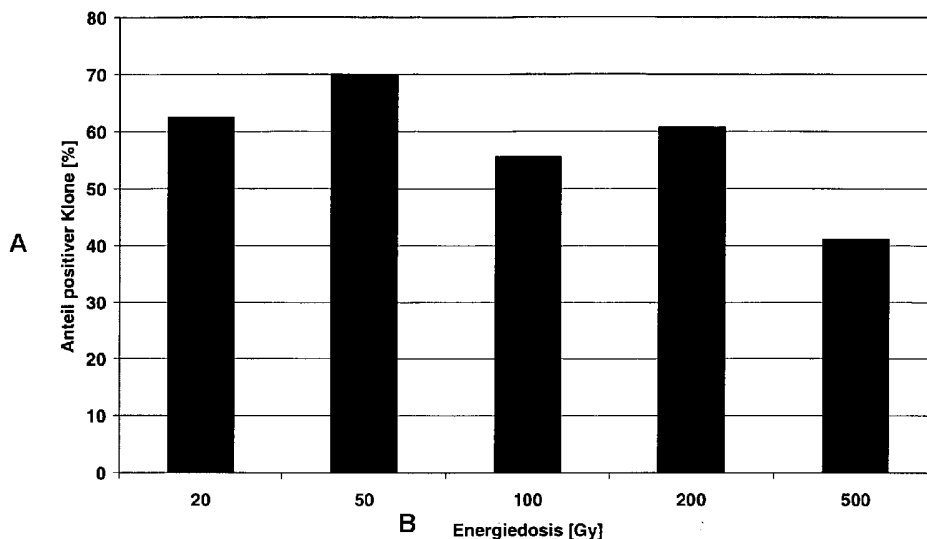
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ENENKEL, Bar-  
bara** [DE/DE]; Maelzerstr. 4, 88447 Warthausen (DE).  
**FIEDER, Jürgen** [DE/DE]; Mühlgartenweg 13, 89619  
Unterstadion (DE). **OTTO, Ralf** [DE/DE]; Lerchen-  
weg 11, 88422 Oggelshausen (DE). **KRIEG, Thomas**  
[DE/DE]; Ehingerstr. 47, 89155 Erbach (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR RECLONING PRODUCTION CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REKLONIERUNG VON PRODUKTIONSZELLEN



A. PROPORTION OF POSITIVE CLONES [ %]

B. ENERGY DOSE [GY]

(57) Abstract: The invention relates to a novel method for selecting clones and recloning mammal cells that are used in the production of biopharmaceuticals, preferably hamster or mouse myeloma cells, with a high degree of automation and throughput. The invention also relates to methods for depositing and multiplying individual cell clones of the corresponding cells, to methods for producing proteins using cells that are obtained and multiplied by means of individual cell deposition, and to compositions that enable individual cells to be multiplied.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/019442 A2



(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

---

(57) **Zusammenfassung:** Neues Verfahren zur Klonselektion und Reklonierung von Säugerzellen, die für die Produktion von Biopharmazeutika von Bedeutung sind, vorzugsweise von Hamster- oder Maus-Myeloma-Zellen, mit hohem Automatisierungsgrad und Durchsatz. Die Erfindung betrifft Verfahren zur Ablage und Vermehrung von Einzellzellklonen der entsprechenden Zellen. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von Proteinen unter Verwendung von Zellen, die mittels Einzelzellablage gewonnen und vermehrt wurden sowie Zusammensetzungen, die eine Vermehrung von Einzelzellen ermöglichen.

## Verfahren zur Reklonierung von Produktionszellen

### Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Zellkulturtechnologie und betrifft Verfahren zur Vermehrung/Klonierung von Zellen, vorzugsweise von Zelllinien, die für die Produktion von Biopharmazeutika von Bedeutung sind. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von Proteinen unter Verwendung von Zellen, die mittels Einzelzellablage gewonnen und vermehrt wurden sowie Zusammensetzungen, die eine Vermehrung von Einzelzellen ermöglichen.

### Hintergrund der Erfindung

Zur biotechnologischen Herstellung von biologisch aktiven bzw. therapeutischen Proteinen in Säugerzellen, sog. „Biopharmazeutika“, werden die entsprechenden Säugerzellen mit DNA stabil transfiziert, die für das jeweilige biologisch aktive Protein (oder seine Untereinheiten) kodiert. Nach dem Transfektionsprozess erhält man normalerweise einen Pool von Millionen unterschiedlich transfizierter Zellen. Daher liegt der entscheidende Schritt zur Herstellung effizienter Produktionszelllinien in der Selektion und Vermehrung von Zellklonen, die zum einen sehr stabil wachsen und zum anderen eine hohe spezifische Produktivität an therapeutischem Protein zeigen (Produktbildung etc.). Da Millionen unterschiedlicher produktexprimierender Zellen vorliegen, ist es entscheidend über hohen Durchsatz und Automatisierung eine Vielzahl von Zellen einzeln analysieren zu können, um geeignete Kandidaten (*Einzelzellklone*), die sowohl sehr robust wachsen als auch hohe Produkttiter liefern, aussortieren zu können. Diesen Vorgang der Einzelzellisolierung und Subkultivierung bezeichnet man auch als – *Klonierung* oder *Reklonierung*.

Die Selektion von transfizierten Zellen ist beispielsweise durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) möglich, indem die Expression des therapeutischen Proteins beispielsweise mit der Expression eines Markerproteins verknüpft wird. Hierzu

werden beispielsweise fluoreszierende Proteine und dessen Varianten von *Aequorea victoria*, *Renilla reniformis* oder anderen Spezies, wie zum Beispiel die rot, gelb, violett, grün fluoreszierenden Proteine oder deren Varianten von nicht-biolumineszierenden Organismen wie z.B. *Discosoma sp.*, *Anemonia sp.*, *Clavularia sp.*, *Zoanthus sp.* zusammen mit dem therapeutischen Protein in einer Zelle co-exprimiert. Über die Fluoreszenzintensität lassen sich Rückschlüsse auf die spezifische Produktivität und das Wachstumsverhalten der Zellen ziehen.

Es besteht jedoch die Schwierigkeit, typische rekombinante Produktionszellen wie Maus Myeloma- (NS0), Hamster Eierstock- (CHO), oder Hamster Nieren-Zellen (BHK), insbesondere wenn diese an das Wachstum in serumfreien Suspensionskulturen adaptiert sind, also unter modernen produktionsrelevanten Zellkulturbedingungen, einzeln in Kulturgefäße, beispielsweise in Vertiefungen von Mikrotiterplatten, unter serumfreien Kulturbedingungen abzulegen und effektiv zu vermehren (Reklonierung). Werden nur wenige Zellen, beispielsweise weniger als 5 Zellen in ein Kulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt, so lassen sich diese Zellen zumeist gar nicht oder zumindest nicht mehr effizient vermehren. Die Ursache hierfür wird in nicht vorhandenen Zell-Zell-Kontakten, einem größeren Nährstoff-/Wachstumsfaktorbedarf bei geringerer Zelldichte und/oder im Fehlen bzw. zu geringer Konzentration von diffusiblen Signal- und Konditionierungsfaktoren vermutet.

Im Stand der Technik wird das Problem der serumfreien Einzelzellklonierung bei den oben genannten rekombinanten Produktionszellen umgangen, indem Zellklone nach dem Verfahren der „limited dilution“ generiert werden. Hierbei werden minimal 5 bis 10 Zellen in serumfreiem Medium in einem Kulturgefäß ausgesät und anschließend durch wiederholte Verdünnungsklonierungen subpassagiert, um statistisch gesehen eine Kultur bestehend aus genetisch identischen Zellen zu erhalten (Verfahren = *limited dilution*). Diese Art der Reklonierung ist zum einen zeitintensiv und zum anderen führt sie zumeist zu genetisch heterogenen Mischkulturen, da das Verfahren auf einer statistischen Berechnung und nicht auf einer tatsächlichen Kultivierung von einzeln abgelegten genetisch identischen Zellen beruht. Diese heterogenen

Mischkulturen zeichnen sich in der Regel durch eine eingeschränkte Fermentationsrobustheit und ein heterologes Expressionsprofil aus.

Alternativ lassen sich derzeit Einzelzellklone produktionsrelevanter Zelllinien nur durch Einzelzellablage von serumadaptierten adhärennten Zellen generieren. So erwähnen Meng et al., (2000) beispielsweise ein Verfahren zur Einzelzellablage von adhärennt wachsenden CHO Zellen in serumhaltigen Medium. Die von Meng et al., beschriebene Methode bringt aber wesentliche Nachteile mit sich: Aufgrund der Adhärenz der Zellen kann es durch aufwendiges enzymatisches Ablösen der Zellen vom Untergrund (Trypsinbehandlung) zu erheblichen Zellschädigungen und Veränderungen im Wachstumsverhalten und bei der Produktivität der reklonierten Zellen kommen. Ferner müssen die entsprechend gewonnenen Einzelklone anschließend an das serumfreie Wachstum in Suspensionskultur adaptiert werden, was regelmäßig mit hohem Zeitaufwand sowie mit einer veränderten Produktivität der Zelle und Produktqualität verbunden ist (vgl. hierzu u.a. Kaufmann et al., 2001; Mueller et al., 1999).

Durch die Verwendung von Nährzellen, auch *feeder*-Zellen genannt, bei der Kultivierung adhärennt wachsender Zellen können die Wachstumseigenschaften von Zellen positiv beeinflusst bzw. einige Zelltypen überhaupt erst unter Zellkulturbedingungen vermehrt werden. Beispiele hierfür sind Mensch-Maus oder Maus-Maus-Hybridomazellen (Hlinak et al 1988, US 5,008,198), primäre Keratinozyten (Rheinwald and Green, 1975; WO954435), Stammzellen (Williams et al., 1988) und verschiedene Tumorzellen (Wee Eng Lim et al., 2002; Rexroad et al., 1997; Peng et al., 1996; Grigoriev et al., 1996; Sanchez et al., 1991; Butcher et al., 1988; Long et al., 1986; Shneyour et al., 1984; Pintus et al., 1983; Brodin et al., 1983). *Feeder*-Zellen sind zumeist chemisch oder physikalisch in ihrem Wachstum arretierte Zellen, die aufgrund einer speziellen Vorbehandlung ihre Fähigkeit zur Zellteilung eingestellt haben, ansonsten aber noch durchschnittlich für ca. 2 bis 3 Wochen vital sind. *Feeder*-Zellen sind somit weiterhin in der Lage wachstumsbegünstigende Faktoren in das Medium abzugeben und können somit das anfängliche Wachstum nicht arretierter Zellen begünstigen oder im Fall verschiedener primärer Zellen ermöglichen. Hierzu werden die *feeder*-Zellen als sog. „monolayer“ in einem

Kulturgefäß ausplattiert. Anschließend werden die zu kultivierenden adhären wachsenden Zellen auf bzw. zwischen die *feeder*-Zellen ausplattiert und unter Standardbedingungen kultiviert. *Feeder*-Zellen lassen sich beispielsweise durch Bestrahlung oder Behandlung mit Mitomycin C (Azirino[2',3':3,4]pyrrolo[1,2-a]indole-4,7-dione,6-amino-8-[[[(aminocarbonyl)oxy] methyl] -1,1a,2,8,8a,8b-hexahydro-8a-methoxy-5-methyl-, [1aR-(1a.alpha.,8.beta.,8a.alpha., 8b.alpha.)]- (9CI) (Butcher et al, 1988)) herstellen. Primärzellen wie Milzzellen, Fibroblasten, Blutzellen (Morgan, Darling; Kultur tierischer Zellen. Spektrum Akademischer Verlag 1994, S. 115f) und Makrophagen (Hlinak et al., 1987) sind in *Feeder*-Zellsystemen beschrieben worden. Im Zusammenhang mit der Produktion von Antikörpern in Hybridomazellen wurde die Verwendung von *feeder*-Zellen und FACS basierter Zellselektion beschrieben. Hlinak et al. (1987) beispielsweise beschreiben eine Reklonierungseffizienz von 33 bis 57% bei der Reklonierung von adhären wachsenden Hybridoma-Zellen ausgehend von zwei (2) Zellen pro Kulturgefäß. Bei den verwendeten Hybridoma-Zellen handelte es sich allerdings um adhären wachsende und an serumhaltiges Medium adaptierte Zellen.

Bei der Verwendung von heterologen, insbesondere von humanen *feeder*-Zellen für die Generierung von Produktionszellen besteht ein erhebliches Kontaminationsrisiko durch Krankheitserreger, wie beispielsweise Viren, Bakterien oder Mykoplasmen. Ferner benötigen viele der beschriebenen (primären) *feeder*-Zellen serumhaltiges Medium, was erstens die Kontaminationsgefahr erhöht und zweitens die Gefahr beinhaltet, dass aufwendig an serumfreies Wachstum adaptierte Produktionszellen re-adaptiert werden müssen.

Bei der Verwendung von heterologen *feeder*-Zellen bedarf es im Allgemeinen einer Gegenselektion der *feeder*-Zellen. Produktionszellen unterliegen in der Regel einem Selektionsdruck, z.B. durch die Verwendung von Medienzusätzen (Antibiotika wie G418) und/oder nicht komplette Medien (Fehlen von Hypoxanthin, Thymidin). Dieser Selektionsdruck erlaubt die Selektion von Zellen, die die entsprechende genetische Information für ein z.B. rekombinantes Protein aufgenommen und integriert haben. Das so entstandene, an die Produktionszelle angepasste Medium beeinflusst maßgeblich das Wachstum der *feeder*-Zellen und führt, verbunden mit dem auch

ansonsten nicht kompatiblen Produktionsmedium zu einem sehr schnellen Absterben der *feeder*-Zellen. Dadurch ist die Funktion der *feeder*-Zelle nicht mehr gewährleistet.

### Zusammenfassung der Erfindung

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war ein effizientes Reklonierungsverfahren zu finden, das, ausgehend von weniger als fünf Zellen, vorzugsweise von einer (1) Einzelzelle, eine Vermehrung produktionsrelevanter Säugerzellen unter serumfreien Bedingungen und in Suspensionskultur erlaubt. Im Besonderen bestand die Aufgabe darin, entsprechende Verfahren für die Reklonierung von ursprünglich aus Hamster isolierten CHO-, oder BHK-Zellen sowie für ursprünglich aus Maus isolierten Myeloma-Zellen, beispielsweise NS0-Zellen, bereitzustellen.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung war Zusammensetzungen zur Verfügung zu stellen, die eine Ausführung der entsprechenden Reklonierungsmethoden ermöglichen, insbesondere solche, die eine Reklonierung von Hamster- oder auch Maus-Myeloma-Zellen erlauben.

Diese Aufgaben werden durch die in den Patentansprüchen definierten erfindungsgemäßen Gegenstände gelöst, die gemäß einem Aspekt der Erfindung ein Verfahren zur Klonierung von Zellen betreffen, dadurch gekennzeichnet, dass weniger als fünf, vorzugsweise eine (1) oder (2) Säugierzelle(n), vorzugsweise Hamster oder Maus-Myeloma-Zellen, in Gegenwart von *feeder*-Zellen, vorzugsweise autologen Ursprungs, in einem Kulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt und unter serumfreien Bedingungen kultiviert und vermehrt werden. Ein besonderer Aspekt der Erfindung betrifft ein entsprechendes Verfahren für die Reklonierung von CHO- oder BHK-Zellen (Hamsterzellen) bzw. NS0-Zellen (Maus-Myeloma-Zellen), vorzugsweise wenn es sich bei den jeweiligen Zellen um solche handelt, die an serumfreies Wachstum in Suspensionskulturen adaptiert sind.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung von Hamsterzellen als *feeder*-Zellen für den Fall, dass es sich bei den entsprechend

abgelegten und zu klonierenden Säugerzellen ebenfalls um Hamsterzellen, insbesondere um CHO- oder BHK-Zellen handelt. Maus-Myeloma-Zellen werden vorzugsweise als *feeder*-Zellen verwendet, wenn es sich bei den entsprechend abgelegten und zu klonierenden Zellen um NS0-Zellen handelt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein entsprechendes Verfahren zur Reklonierung von CHO-, BHK oder auch NS0-Zellen, dass dadurch gekennzeichnet ist, dass CHO-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden wenn es sich bei den zu klonierenden Säugerzellen um CHO-Zellen handelt, dass BHK-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden wenn es sich bei den zu klonierenden Säugerzellen um BHK-Zellen handelt, u n d dass NS0-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden wenn es sich bei den zu klonierenden Säugerzellen um NS0-Zellen handelt.

Die erfindungsgemäßen Verfahren zeichnen sich durch eine gute Reklonierungseffizienz von größer 10%, vorzugsweise von größer 20%, insbesondere für einzeln abgelegte Zellen aus. Nach einer weiteren Ausführungsform verfügen die erfindungsgemäßen Reklonierungsverfahren über eine Reklonierungseffizienz von größer 30%, vorzugsweise von größer 40%, besonders bevorzugt von größer 50%, weiter bevorzugt von größer 60%, noch weiter bevorzugt von größer 70%, noch weiter bevorzugt von größer 80%.

Vorliegend gelten Reklonierungseffizienzen von 10 bis größer 65% bei der Reklonierung einzeln abgelegter CHO-Zellen, von 10 bis größer 50% bei der Reklonierung einzeln abgelegter BHK-Zellen und von 10 bis größer 45% bei der Reklonierung einzeln abgelegter NS0-Zellen, als effizient. Werden mehr als eine (1) Zelle pro Kulturgefäß abgelegt, beispielsweise zwei, drei oder vier, so liegt die Reklonierungseffizienz für die jeweilige Zellen über den angegebenen Werten für die Reklonierung von CHO-, BHK- und NS0-Zellen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein entsprechendes Verfahren zur Reklonierung von Säugerzellen, insbesondere von Hamster oder Maus-Myeloma-Zellen, bei dem die zu klonierenden Zellen in Gegenwart von 100 bis 200.000 *feeder*-Zellen pro mL Medium vermehrt werden.



Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung von Proteinen, vorzugsweise von rekombinanten Proteinen, in serumfreien nicht adhärent wachsenden Säugerzellen, die nach einem der erfindungsgemäßen Klonierungsverfahren kultiviert wurden, insbesondere die Herstellung rekombinanter Proteine in entsprechend klonierten Hamster oder Maus-Myeloma-Zellen wie beispielsweise CHO-, BHK-, oder NS0-Zellen, unter serumfreien Bedingungen, enthaltend die Schritte

- a) Kultivierung von Säugerzellen, die ein Genprodukt von Interesse exprimieren, unter serumfreien Bedingungen, die eine Vermehrung der entsprechenden Zellen erlauben;
- b) Ablage von jeweils weniger als 5, vorzugsweise von ein (1) oder 2 der entsprechenden Säugerzellen in jeweils ein (1) Zellkulturgefäß unter serumfreien Bedingungen;
- c) Vermehrung der entsprechend abgelegten Zellen in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen unter serumfreien Bedingungen;
- d) Kultivierung der vermehrten zuvor abgelegten Zellen unter serumfreien Bedingungen, unter denen das Gen von Interesse exprimiert wird; und
- e) Gewinnung und Reinigung des Genprodukts, das von dem Protein von Interesse kodiert wird, aus den Zellen einschließlich der Membran oder aus dem Kulturüberstand.

Die Expression eines rekombinanten Genprodukts, erfordert zuvor noch die Transfektion der Säugerzellen mit einer Nukleinsäure, die für das Genprodukt von Interesse kodiert.

Die Säugerzellen lassen sich hierbei beispielsweise manuell oder durch FACS-basiertes Sortieren vereinzeln und jeweils in ein Zellkulturgefäß mit *feeder*-Zellen ablegen. Vorzugsweise werden nicht adhärent kultivierte *feeder*-Zellen verwendet.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die grundsätzliche Verwendung von Hamsterzellen, vorzugsweise CHO- oder BHK-Zellen sowie von Maus-Myeloma-Zellen, vorzugsweise des Typs NS0, als *feeder*-Zellen. Nach einer bevorzugten

Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung entsprechender Zellen, die an serumfreie Kulturbedingungen adaptiert sind.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen bestehend aus einem serumfreien Zellkulturmedium, weniger als fünf teilungsfähigen Säugerzellen und zu den teilungsfähigen Säugerzellen autologe *feeder*-Zellen. Nach einem weiteren Aspekt der Erfindung handelt es sich bei den teilungsfähigen Säugerzellen um Zellen, die an das serumfreie Wachstum als Suspensionskultur adaptiert sind. In einer besonderen Ausführungsform enthält die Zusammensetzung lediglich eine (1) oder zwei (2) in dem Kulturmedium teilungsfähige Säugerkelle(n). Vorzugsweise handelt es sich bei der/den teilungsfähigen Säugerkelle(n) um Hamsterzellen, wie beispielsweise CHO- oder BHK-Zellen, oder um Maus-Myeloma-Zellen, z.B. um NS0-Zellen.

Nach einem weiteren erfindungsgemäßen Aspekt enthält die Zusammensetzung Hamsterzellen, vorzugsweise CHO-Zellen als *feeder*-Zellen, wenn es sich bei der/den teilungsfähigen Säugerkelle(n) um CHO-Zellen handelt. Handelt es sich bei der/den teilungsfähigen Säugerkelle(n) um BHK-Zellen, so enthält die Zusammensetzung ebenfalls Hamsterzellen, vorzugsweise allerdings BHK-Zellen als *feeder*-Zellen. Handelt es sich bei der/den teilungsfähigen Säugerkelle(n) um Maus-Myeloma-Zellen, beispielsweise um NS0-Zellen, so enthält die Zusammensetzung ebenfalls Maus-Myeloma-Zellen als *feeder*-Zellen, im Fall von NS0-Zellen vorzugsweise ebenfalls NS0-Zellen als *feeder*-Zellen.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass durch Einsatz von suspendierten autologen *feeder*-Zellen, einzelne Säugerkellen, vorzugsweise Hamster- oder Maus-Myeloma-Zellen, in serum- und/oder proteinfreiem Medium abgelegt werden können und zu Kulturen heranwachsen und somit die oben genannten Nachteile bei der Reklonierung, beispielsweise durch *limited dilution*, oder die Adaption monoklonaler Zelllinien an das serumfreie Wachstum in Suspensionskultur überwunden werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Ablage entsprechender Säugerzellen in serumfreies, proteinfreies oder chemisch definiertes Produktionsmedium, so dass eine üblicherweise durchzuführende Adaption an serumfreies bzw. proteinfreies Produktionsmedium entfällt. Dies führt zu einer wesentlichen Verkürzung von Entwicklungszeiten (ca. 50%) bei der Etablierung von produktionsrelevanten Zelllinien. Ferner führt die Einzelzellablage zu stabilen, homogenen Zellklonen, was für die Produktion von Biopharmazeutika von wesentlicher Bedeutung ist, nicht zuletzt im Hinblick auf regulatorische Erfordernisse bei ihrer Zulassung als Arzneimittel. Darüber hinaus birgt die Verwendung autologer *feeder*-Zellen zur Reklonierung von produktionsrelevanten CHO-, BHK- oder NS0-Zellen, z.B. die Verwendung von Hamsterzellen, vorzugsweise von CHO- oder BHK-Zellen, bzw. Maus-Myeloma-Zellen, vorzugsweise NS0-Zellen, ein wesentlich geringeres Kontaminationsrisiko im Hinblick auf human-pathogene Krankheitserreger als die Verwendung humaner oder weniger gut charakterisierter Zellen.

#### Beschreibung der Abbildungen

**Abbildung 1** zeigt die Korrelation zwischen Energiedosis, die bei der Herstellung der *feeder*-Zellen eingesetzt wurde, und Klonierungseffizienz bei der Reklonierung von automatisiert abgelegten CHO-DG44 Einzelzellen. Die Zellablage erfolgte jeweils auf ca. 2000 inaktivierte autologe *feeder*-Zellen. Aus den Grafiken ist ersichtlich, dass mit der Energiedosis von 20-500 Gy bestrahlte *feeder*-Zellen noch ausreichend Faktoren in das Medium abgeben, so dass mehr als 65% der abgelegten Einzelklone bei 50 Gy zu Kolonien heranwachsen.

**Abbildung 2** zeigt die Produktivität von Antikörper-exprimierenden CHO-DG44 Kulturen, die durch limitierte Verdünnung (linke Spalte) oder Einzelzellablage (rechte Spalte) erhalten wurden. In der linken Spalte ist die Produktivität von jeweils 6 Kulturen dargestellt, die mittels limitierter Verdünnung erhalten wurden. In der rechten Hälfte ist die Produktivität von 6 Einzelklonen aus der automatisierten Einzelzellablage dargestellt. Zur Produktivitätsbestimmung wurden drei Parallelversuche pro Zellklon/Kultur durchgeführt. Im Gegensatz zur Klonierung

mittels „limitierter Verdünnung“ führte die Klonierung durch automatisierte Einzelklonablage zu einer wesentlich geringeren Streuung in der Produktivität. Die parallel kultivierten und aus einem Einzelklon abgeleiteten Subkulturen zeigen eine wesentlich höhere Homogenität im Hinblick auf ihre Produktivität im Vergleich zu den nach limitierter Verdünnung gewonnenen Subkulturen.

**Abbildung 3a** zeigt den Produkttiter von nach unterschiedlichen Kriterien sortierten und einzeln abgelegten CHO-DG44 Zellklonen. In der untersten Grafik A wurden Einzelzellen abgelegt, die lediglich dem Sortierungskriterium „lebende Zelle“ genügen. Dieses Kriterium wurde über die Forward-Side-Scatter-Auflastung im Flow Cytometer definiert. Eine Auswahl nach Fluoreszenz der Zellen erfolgte nicht. Dagegen wurde in der mittleren und oberen Grafik B und C zusätzlich zum Sortierungskriterium „lebende Zelle“ das Sortierungskriterium „Fluoreszenz der Zellen“ logisch verknüpft. Eine nähere Spezifikation des Sortierungskriteriums „Fluoreszenz der Zellen“ erfolgte weiterhin über die Fluoreszenzintensität. Hierzu wurden zum einen die Top-20% fluoreszierenden und zum anderen die Top-5% fluoreszierenden Zellklone einzeln abgelegt. An der Rechtsverschiebung des Histogramms C ist zu erkennen, dass der Anteil der hochexprimierenden Zellklone bei Verwendung des Kriteriums Top-5% fluoreszierende Zellen gegenüber den übrigen angewandten Sortierungskriterien bei A und B deutlich zunimmt.

**Abbildung 3b** basiert auf den in Abbildung 3a gezeigten Daten. Dargestellt ist die prozentuale Wahrscheinlichkeit, einen Produzent mit doppelter mittlerer Produktivität (=Hochproduzent) zu erhalten. An die Daten, die für alle lebenden Zellen erhalten wurden, wurde eine Normalverteilung angepasst und der mittlere Titer bestimmt. Aus der Verteilungsfunktion für die Normalverteilung wurde dann der Prozentsatz errechnet, bei welchem die über die Einzelzellablage erhaltene Zellklone den doppelten oder höheren Titer besitzen. Diese Prozentzahl wurde in Abbildung 3b aufgetragen. Aus der Grafik ist ersichtlich, dass die Wahrscheinlichkeit für einen Hochproduzenten bei zusätzlicher Verwendung des Kriteriums Top-5% im Vergleich zur alleinigen Verwendung des Kriteriums „lebende Zellen“ um mehr als das 20-fache zunimmt.

### Detaillierte Beschreibung der Erfindung und bevorzugte Ausführungsformen

Bevor die Erfindung nachfolgend anhand nicht-beschränkender Ausführungsbeispiele näher erläutert wird, sei darauf verwiesen, dass die Verwendung unbestimmter Artikel, beispielsweise „ein“ oder „eine“, sowie die bestimmter Artikel, wie „der“, „die“, „das“ Einzahl u n d Mehrzahl des entsprechenden Begriffs einschließen, es sei denn, dass eine der beiden Formen explizit ausgeschlossen und auf eine bestimmte Form (Einzahl, Mehrzahl) verwiesen wird. So schließt der Begriff „eine Zelle“ automatisch „mehrere Zellen“ mit ein, es sei denn es wird explizit darauf verwiesen, dass nur eine einzige Zelle gemeint ist. Einzahl ist beispielsweise dort explizit gemeint, wo „ein“ durch (1) ergänzt ist.

### Definitionen

Der Begriff „Klonierung/Reklonierung“, „klonieren/reklonieren“ meint im Zusammenhang mit Zellkultur eine Technik, mit deren Hilfe man eine Zellpopulation identischer Zellen aus einer Ursprungszelle erhalten kann. Der Ausdruck „Zellklonierung“ oder auch „Einzelzellklonierung“ meint somit ein Verfahren, bei dem aus einem Zellpool mit Zellen unterschiedlichen Genotyps einzelne Zellen identifiziert, isoliert und anschließend zu einer Zellpopulation bestehend aus einer Vielzahl genetisch identischer Zellen vermehrt werden. Werden die Zellen hierzu einzeln abgelegt, d.h. lediglich eine (1) Zelle pro Kulturgefäß, und anschließend zu einer Zellpopulation identischer Zellen expandiert, so handelt es sich bei dem Verfahren um eine „direkte Einzelzellklonierung“. Werden mehrere Zellen gleichzeitig in ein Kulturgefäß abgelegt, zu einer Zellpopulation expandiert und diese durch wiederholtes Verdünnen (= *limited dilution*) in Zellpopulationen identischer Zellen aufgeteilt, so beschreibt dies ein Verfahren der „indirekten Klonierung“.

Bei „Einzelklonen“ handelt es sich um genetisch identische Zellen, die von einer (1) einzigen Zelle abstammen. Eine Zellpopulation bestehend aus identischen Zellen gleicher Abstammung bezeichnet man folglich auch als „monoklonale Zellpopulation“. Kommt es während der Kultivierung von Zellen gleichen Ursprungs

zu spontanen Genomveränderungen, beispielsweise zu Mutationen und/oder Translokationen, so werden die einzelnen Zellen dieser Zellpopulation dennoch als identische Zellen im Sinne der vorliegenden Erfindung angesehen, und die Kultur als monoklonale Zellpopulation verstanden. Dagegen handelt es sich bei einem Pool an stabil transfizierten Zellen (Transfektanten) nicht um Zellklone gleicher Abstammung, also nicht um eine monoklonale Zellpopulation, auch wenn genetisch identische Ausgangszellen mit einer identischen Nukleinsäure transfiziert werden.

Der Begriff „Subklone/Subkulturen“ bezieht sich auf verschiedene Zellgenerationen, die ausgehend von einer Ursprungszelle/Ursprungskultur durch einfaches oder mehrfaches Passagieren der sich teilenden Zellen entstehen. Von „Subklonen/Subkulturen“ spricht man beispielsweise, wenn identische Zellen/Zellkulturen über mehrere Generationen kultiviert und vermehrt werden.

Unter einer „effektiven oder effizienten Reklonierung“ versteht man eine Klonierungseffizienz von zumindest 10%, vorzugsweise von zumindest 20%, weiter bevorzugt von zumindest 30% und noch weiter bevorzugt von zumindest 40%. Nach einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung versteht man unter einer effektiven Reklonierung eine Klonierung mit einer Effizienz von mindestens 50%, vorzugsweise von mindestens 60%, besonders bevorzugt von mindestens 70% und noch weiter bevorzugt von mindestens 80%.

Der Begriff „Klonierungseffizienz“ ist definiert als der Prozentsatz an Zellen, die nach der Ablage vitale Zellpopulationen von vorzugsweise mehr als 50 Zellen bilden können. Werden beispielsweise bei einer Zellsortierung 50 Zellen auf 50 Kulturgefäße verteilt und wachsen 25 dieser 50 einzeln abgelegten Zellen zu Kulturen heran, so beträgt die Klonierungseffizienz 50% (25 von 50).

Der Ausdruck „teilungsfähig/expandierbar“ im Sinne der vorliegenden Erfindung beschreibt das Potential einer Zelle/Zellpopulation sich endlos, zumindest aber über 2, vorzugsweise 4, Passagen teilen zu können. Dieses Potential kann beispielsweise durch Bestrahlung mit <sup>137</sup>Cs- oder durch Mitomycin C Behandlung reduziert oder gänzlich gestört werden.

Der Ausdruck „Derivat/Abkömmling“ bezieht sich auf Zellen, die genetisch auf eine bestimmte Ausgangszelle zurückzuführen sind und beispielsweise durch Subkultivierung (mit oder ohne Selektionsdruck) entstehen und/oder durch genetische Manipulation generiert werden. Re-Isolierungen von Zellen des gleichen Zelltyps sind ebenfalls von dem Ausdruck „Derivat/Abkömmling“ erfasst. So stellen beispielsweise alle CHO-Zelllinien Derivate/Abkömmlinge der von Puck et al., 1958 isolierten Hamstero-varzellen aus *Cricetulus griseus* dar, unabhängig ob sie durch Subkultivierung, Re-Isolierung oder genetische Manipulationen erhalten wurden.

Der Begriff „autologe feeder-Zelle“ meint, dass sowohl feeder-Zelle als auch die in Gegenwart dieser feeder-Zelle zu kultivierende Zelle taxonomisch dem gleichen Ursprung entstammen. Handelt es sich bei der zu kultivierenden Zelle beispielsweise um eine Hamsterzelle (Unterfamilie *Cricetinae*), vorzugsweise um eine Zelle der Gattung *Cricetulus* bzw. *Mesocricetus*, beispielsweise um eine CHO- bzw. BHK-Zelle, so stellt jede aus dieser Unterfamilie ursprünglich isolierte feeder-Zelle eine autologe feeder-Zelle zu diesen Hamsterzellen der Unterfamilie *Cricetinae* dar. Nach einer bevorzugten Ausführungsform meint der Begriff „autologe feeder-Zelle“, dass sowohl feeder-Zelle als auch die zu kultivierende Zelle taxonomisch der gleichen Gattung entstammen oder ursprünglich aus derselben Gattung isoliert wurden (Zelle aus *Cricetulus* bzw. *Mesocricetus*). Handelt es sich bei der zu kultivierenden Zelle beispielsweise um eine Hamsterzelle der Gattung *Cricetulus* bzw. *Mesocricetus*, vorzugsweise um eine CHO- bzw. eine BHK-Zelle, so stellt jede aus der jeweiligen Gattung ursprünglich isolierte feeder-Zelle eine autologe feeder-Zelle im Sinne dieser Erfindung dar. Nach einer weiter bevorzugten Ausführungsform liegt eine „autologe feeder-Zelle“ vor, sofern feeder-Zelle und die zu kultivierende Zelle der gleichen Art entstammen, beispielsweise *Cricetulus griseus* oder *Mesocricetus auratus*. Nach einer besonders bevorzugten Ausführungsform liegt eine „autologe feeder-Zelle“ vor, sofern feeder-Zelle und die zu kultivierende Zelle der gleichen Art entstammen und über den gleichen Gewebstypismus verfügen (z.B. Ovarzellen aus *Cricetulus griseus* – CHO-Zellen). Nach einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei einer feeder-Zelle um eine autologe feeder-Zelle, wenn sowohl feeder-Zelle als auch zu kultivierende Zelle der gleichen Basiszelle entstammen,

beispielsweise wenn es sich bei beiden Zellen ursprünglich um CHO-DG44 Zellen bzw. Abkömmlinge dieser Zelle handelt. Nach einer weiter bevorzugten Ausführungsform vermittelt die *feeder*-Zelle die selben Resistenzen, z.B. gegenüber Antibiotika, wie die zu kultivierende Zelle. Dies ist insbesondere von Vorteil, wenn die Zellablage in Gegenwart eines Selektionsmittels, z.B. eines Antibiotikums, erfolgt.

Der Begriff „serumfrei“ meint Kulturmedien wie auch Kultivierungsbedingungen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass Zellen in Abwesenheit von tierischem und/oder humanem Serum, vorzugsweise in Abwesenheit von jeglichen aus Serum isolierten Proteinen, vorzugsweise in Abwesenheit von nicht rekombinant gewonnenen Proteinen kultiviert werden. Folglich meint der Ausdruck „an serumfreie Bedingungen adaptierte Zellen“ solche Zellen, die in Abwesenheit von tierischem oder humanem Serum bzw. Serumproteinen vermehrt werden können.

Der Begriff „proteinfrei“ meint, dass das Kulturmedium keine tierischen Proteine enthält, wobei aus Bakterien, Hefen oder Pilzen isolierte Proteine nicht als tierische Proteine verstanden werden.

Der Begriff „chemisch definiert“ beschreibt ein Zellkulturmedium, welches serumfrei, vorzugsweise auch proteinfrei ist, und das aus chemisch definierten Substanzen besteht. Chemisch definierte Medien bestehen somit aus einer Mischung aus vorwiegend reinen Einzelsubstanzen. Ein Beispiel für ein chemisch definiertes Medien ist beispielsweise das CD-CHO-Medium der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, US).

Der Ausdruck „eine in Suspension kultivierbare Zelle“ bezieht sich auf Zellen, die an das Wachstum in flüssigen Kulturen („Suspensionskulturen“) adaptiert sind und deren Fähigkeit zu Adhäsion an Gefäßoberflächen, beispielsweise an Zellkulturschalen / -flaschen eingeschränkt bzw. verloren gegangen ist. Zellen, die sowohl an serumfreies Wachstum als auch an das Wachstum in Suspension adaptiert sind, werden als „an serumfreies Medium adaptierte und nicht adhärente Zellen“ bezeichnet. Stellt man aus solchen Kulturen *feeder*-Zellen her, so handelt es



sich definitionsgemäß bei diesen Zellen um „an serumfreies Medium adaptierte und nicht adhärente *feeder*-Zellen“.

### Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Klonierung von Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass weniger als fünf, beispielsweise vier, drei, zwei, oder eine (1) Säugierzelle(n) in Gegenwart von *feeder*-Zellen, vorzugsweise autologen *feeder*-Zellen, in einem Kulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt und unter serumfreien Bedingungen kultiviert und vermehrt werden (wird). Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein entsprechendes Verfahren zur Klonierung von Säugierzellen, dadurch gekennzeichnet, dass eine (1) oder zwei Säugierzelle(n) pro Kulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt und in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert wird (werden). Bei einer weiter bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um ein Verfahren zur Klonierung von Einzelzellen, dadurch gekennzeichnet, dass eine (1) einzelne Säugierzelle in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen in ein Kulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt, unter serumfreien Bedingungen kultiviert und vermehrt wird. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der abgelegten und zu kultivierenden Zelle jeweils um eine in Suspensionskultur wachsende Zelle.

Wird lediglich eine (1) Zelle pro Kulturgefäß abgelegt und zu einer Zellpopulation vermehrt, so handelt es sich bei jeder einzelnen heranwachsenden Zellpopulation um eine monoklonale Zellpopulation und bei dem Verfahren um ein Verfahren zur direkten Einzelzellklonierung. Werden mehr als eine (1) einzelne Zelle pro Kulturgefäß abgelegt und vermehrt, beispielsweise zwei, drei oder vier Zellen, so handelt es sich bei den heranwachsenden Zellpopulationen um sog. Mischklone. Diese können anschließend durch direkte Einzelzellklonierung oder auch nach herkömmlichen Verfahren, beispielsweise durch wiederholtes Ausverdünnen der Zellpopulationen (= *limited dilution*) in sog. statistische monoklonale Zellpopulationen überführt werden (siehe beispielsweise Morgan, Kultur tierischer Zellen, Seiten 113 und 114, Spektrum Akademischer Verlag 1994).

Mit den durch die vorliegende Erfindung bereitgestellten Verfahren lassen sich insbesondere Säugerzellen der Unterfamilie *Murinae*, beispielsweise der Gattung *Mus* oder der Unterfamilie *Cricetinae*, beispielsweise der Gattungen *Cricetulus* oder *Mesocricetus*, sowie aus diesen isolierte Zelllinien einschließlich ihrer Abkömmlinge/Derivate, vermehren und auch klonieren. Vorzugsweise eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Vermehrung/Klonierung von Hamsterzellen oder Maus-Myeloma-Zellen, sowie von hiervon abgeleiteten stabilen Zelllinien. Demnach betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Klonierung von Zellen in Gegenwart von *feeder*-Zellen vorzugsweise von autologen *feeder*-Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den entsprechend abgelegten und zu klonierenden Säugerzellen um Hamster- oder Maus-Myeloma-Zellen handelt.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform betreffen die erfindungsgemäßen Verfahren Methoden zur Vermehrung/Klonierung von Hamsterzellen der Gattung *Cricetulus* (Chinesischer Zwerghamster) sowie von aus dieser Gattung isolierten oder von den isolierten Zellen abgeleitete stabile Zelllinien, beispielsweise von CHO, CHO-K1, CHO-DUKX, CHO-DUKX B1 oder CHO-DG44 Zellen sowie von Derivaten/Abkömmlingen dieser Zelllinien. Besonders erfindungsgemäß ist ein Verfahren, bei dem CHO-DG44, CHO-DUKX, und CHO-K1, insbesondere CHO-DG44 und CHO-DUKX Zellen in Gegenwart autologer *feeder*-Zellen vermehrt und kloniert werden. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens lassen sich auch Zellen aus *Mesocricetus auratus* (Syrischer Goldhamster) sowie hieraus isolierte oder hiervon abgeleitete stabile Zelllinien, beispielsweise BHK21 oder BHK TK Zellen sowie Derivate/Abkömmlinge dieser Zelllinien, nach den hier beschriebenen Verfahren vermehren und auch klonieren. Folglich betrifft die vorliegende Erfindung vorzugsweise ein Verfahren zur Vermehrung und Klonierung von CHO- oder BHK-Zellen, sowie deren Derivate/Abkömmlinge, dadurch gekennzeichnet, dass weniger als fünf, beispielsweise vier, drei, zwei, oder vorzugsweise lediglich eine (1) Zelle(n) in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen in ein Kulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt und unter serumfreien Bedingungen kultiviert und vermehrt werden (wird).

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Vermehrung und insbesondere zur Klonierung von Maus-Myeloma-Zellen, vorzugsweise aus *Mus musculus* sowie aus diesen isolierte oder hiervon abgeleitete stabile Zelllinien, beispielsweise NS0 und Sp2/0 Zellen sowie Derivate/Abkömmlinge dieser Zelllinien. Auch dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass weniger als fünf, beispielsweise vier, drei, zwei, oder vorzugsweise lediglich eine (1) dieser Zellen in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen in ein Kulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt und unter serumfreien Bedingungen kultiviert und vermehrt werden (wird).

Weitere Beispiele für Hamster- und Mäusezellen, die erfindungsgemäß vermehrt und kloniert werden können, sind in der folgenden Tabelle 1 angegeben. Neben Derivaten und Abkömmlingen dieser Zellen/Zelllinien, können auch andere Säugerzellen, einschließlich Zelllinien von Mensch, Maus, Ratte, Affe, oder anderen Nagetieren als Maus oder Hamster nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren vermehrt oder kloniert werden.

Tabelle 1: Hamster- and Mäuse-Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Hinterlegungsnummer</u>
NS0	ECACC No. 85110503 ATCC CRL-1827 ATCC CRL-2695, 2696
Sp2/0-Ag14	ATCC CRL-1581
BHK21	ATCC CCL-10
BHK TK <sup>-</sup>	ECACC No. 85011423
HaK	ATCC CCL-15
2254-62.2 (BHK-21-Derivat)	ATCC CRL-8544
CHO	ECACC No. 8505302
CHO-K1	ATCC CCL-61
CHO-DUKX (= CHO duk <sup>-</sup> , CHO/dhfr <sup>-</sup> )	ATCC CRL-9096
CHO-DUKX B1	ATCC CRL-9010
CHO-DG44	Urlaub et al., Cell 33[2], 405-412, 1983
CHO Pro-5	ATCC CRL-1781
V79	ATCC CCC-93
B14AF28-G3	ATCC CCL-14
CHL	ECACC No. 87111906

Erfindungsgemäß werden die entsprechenden Säugerzellen vorzugsweise unter serumfreien Bedingungen etabliert, kultiviert und abgelegt. Gegebenenfalls erfolgen diese Schritte in Medien, die frei von tierischen Proteinen/Peptiden und/oder chemisch definiert sind. Beispiele für im Handel erhältliche Medien sind Ham's F12 (Sigma, Deisenhofen, DE), RPMI-1640 (Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma), Minimal Essential Medium (MEM; Sigma), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, Ca., USA), CHO-S-SFM-II (Invitrogen), serumfreies CHO-Medium (Sigma) und proteinfreies CHO-Medium (Sigma). Jedes dieser Medien kann gegebenenfalls mit verschiedenen Verbindungen ergänzt werden, z.B. Hormonen und/oder anderen Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin, Transferrin, epidermalem Wachstumsfaktor, Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor), Salzen (z.B. Natriumchlorid, Calcium, Magnesium, Phosphat), Puffern (z.B. HEPES), Nukleosiden (z.B. Adenosin, Thymidin), Glutamin, Glukose oder anderen äquivalenten Nährstoffen, Antibiotika und/oder Spurenelementen. Zur Selektion von genetisch modifizierten Zellen, die ein oder mehrere Selektionsmarkergene exprimieren, kann dem Medium ein oder mehrere geeignete Selektionsmittel, z.B. Antibiotika, zugefügt werden.

Bisher ist die Verwendung von *feeder*-Zellen zur Kultivierung von Zellen im Zusammenhang mit der Kultivierung adhärent wachsender Zellen beschrieben (z.B. Wee Eng Lim et al., 2002; Rexroad et al., 1997; Peng et al., 1996; Grigoriev et al., 1996; Sanchez et al., 1991; Butcher et al., 1988; Long et al., 1986; Shneyour et al., 1984; Pintus et al., 1983; Brodin et al., 1983. Hierbei werden adhärente *feeder*-Zellen in ein Kulturgefäß bzw. auf einen Träger als Einzelzellschicht (engl. *monolayer*) ausgelegt und die zu kultivierenden Zellen auf diesem *monolayer* kultiviert. Da die *feeder*-Zellen ihre Fähigkeit zum weiteren Wachstum verloren haben (entweder natürlicherweise oder durch künstliches Einwirken) können sich die zu kultivierenden Zellen vermehren ohne von den *feeder*-Zellen überwachsen zu werden. Hierbei sind sowohl *feeder*- als auch die zu kultivierenden Zellen adhärent wachsende Zellen.

Dem gegenüber ermöglicht die vorliegende Erfindung gemäß einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform die Vermehrung von in Suspension wachsenden Zellen, entweder unter Verwendung adhärenter autologer *feeder*-Zellen

oder nach einer weiter bevorzugten Ausführungsform unter Verwendung von ebenfalls in Suspension gehaltenen autologen *feeder*-Zellen. Die Verwendung von in Suspension gehaltenen autologen *feeder*-Zellen ist insbesondere bevorzugt, wenn sowohl die *feeder*-Zelle(n) als auch die zu kultivierende Zelle(n) der gleichen Basiszelle entstammen, beispielsweise wenn es sich bei beiden Zellen ursprünglich um Zellen handelt, die an das Wachstum in Suspension adaptiert worden sind. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Vermehrung/Klonierung der oben beschriebenen Säugerzellen, dadurch gekennzeichnet, dass die zu kultivierenden Zellen in Gegenwart von in Suspension gehaltenen autologen *feeder*-Zellen abgelegt, kultiviert und vermehrt werden. Besonders bevorzugt ist ein entsprechendes Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es sich bei der/den zu kultivierenden Zelle(n) um Zelle(n) handelt, die an das Wachstum in Suspension adaptiert sind. Weiter bevorzugt ist in diesem Zusammenhang ein entsprechendes Verfahren zur Vermehrung/Klonierung von Säugerzellen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellablage und die Zellvermehrung der abgelegten Säugerzellen in einer serumfreien und/oder proteinfreien und/oder chemisch definierten Suspensionskultur durchgeführt wird.

Die Anzahl der zu verwendeten autologen *feeder*-Zellen bei der Vermehrung/Klonierung von den hier beschriebenen Säugerzellen hängt grundsätzlich von der Natur der zu vermehrenden und zu klonierenden Säugerzelle ab und lässt sich durch einfache Titrationsversuche für jeden Zelltyp bestimmen. Die erfindungsgemäßen Verfahren zur Vermehrung/Klonierung von Säugerzellen werden beispielsweise in Gegenwart von zumindest mehr als 100 autologen *feeder*-Zellen pro mL Medium durchgeführt, vorzugsweise in Gegenwart von 100 bis 200.000 autologen *feeder*-Zellen pro mL Medium. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Vermehrung/Klonierung der Säugerzellen in Gegenwart von 500 bis 50.000 autologen *feeder*-Zellen pro mL Medium. Noch weiter bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Vermehrung/Klonierung der Säugerzellen in Gegenwart von 500 bis 10.000 autologen *feeder*-Zellen pro mL Medium, vorzugsweise in Gegenwart von 2.000 bis 10.000 autologer *feeder*-Zellen pro mL Medium durchgeführt wird.

Entsprechend der Definition des Begriffs „autologe *feeder*-Zelle“ betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Vermehrung/Klonierung von Säugerzellen, dadurch gekennzeichnet, dass Hamsterzellen, vorzugsweise der Unterfamilie *Cricetinae*, weiter bevorzugt der Gattungen *Cricetulus* oder *Mesocricetus*, als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den abgelegten und zu vermehrenden/klonierenden Säugerzellen um CHO- oder BHK-Zellen handelt und dass Maus-Myeloma-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den abgelegten und zu vermehrenden/klonierenden Säugerzellen um NS0-Zellen handelt. Weiter bevorzugt ist ein Verfahren zur Vermehrung/Klonierung von Säugerzellen, dadurch gekennzeichnet, dass CHO-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den abgelegten und zu vermehrenden/klonierenden Säugerzellen um CHO-Zellen handelt, dass BHK-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den abgelegten und zu vermehrenden/klonierenden Säugerzellen um BHK-Zellen handelt, und dass NS0-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den abgelegten und zu vermehrenden/klonierenden Säugerzellen um NS0-Zellen handelt.

Für den Fall, dass die abgelegten und zu kultivierenden Säugerzellen in Gegenwart eines Selektionsmittels kultiviert werden, eignet sich die Verwendung von autologen *feeder*-Zellen, die ebenfalls über das Resistenz vermittelnde Selektionsmarkergen verfügen, da somit ein schnelleres Absterben der *feeder*-Zellen in Gegenwart des Selektionsmittels verhindert werden kann. Demnach betrifft die vorliegende Erfindung auch Verfahren zur Klonierung von Zellen, insbesondere von den oben erwähnten Hamster oder Maus-Myeloma-Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass weniger als fünf, beispielsweise vier, drei, zwei, oder eine (1) dieser Säugierzelle(n) in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen, in einem Kulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt und unter serumfreien Bedingungen kultiviert und vermehrt werden (wird), wobei die autologen *feeder*-Zellen und die abgelegten Säugierzelle(n) jeweils über zumindest ein Selektionsmarkergen verfügen, welches eine Resistenz gegenüber einem Selektionsmittel vermittelt, und zumindest die Vermehrung der zu klonierenden Säugierzelle(n) unter serumfreien Bedingungen in Gegenwart des besagten Selektionsmittels erfolgt, gegenüber dem sowohl die *feeder*-Zelle als auch die zu klonierende Säugierzelle resistent ist.

Die autologen *feeder*-Zellen lassen sich beispielsweise durch Bestrahlung mit einer radioaktiven Strahlenquelle herstellen, zum Beispiel durch Bestrahlung mit dem Cäsium-Isotop  $^{137}\text{Cs}$ . Als vorteilhaft für die hier beschriebenen Verfahren zur Vermehrung/Klonierung von Säugerzellen in Gegenwart autologer *feeder*-Zellen ist die Bestrahlung mit einer Energiedosis zwischen 1 und 1.000 Gy. Besonders vorteilhaft ist hierbei die Verwendung einer Energiedosis zwischen 10 und 500 Gy, weiter vorteilhaft zwischen 20 und 200 Gy. Im Zusammenhang mit der Klonierung von CHO-Zellen hat sich gezeigt, dass die Verwendung von autologen *feeder*-Zellen, vorzugsweise CHO-Zellen, vorteilhaft ist und zu einer effizienten Klonierungseffizienz führt, die mit einer Energiedosis zwischen 1 und 500 Gy bestrahlt wurden. Besonders vorteilhaft erwies sich hierbei die Verwendung autologer *feeder*-Zellen die mit einer Energiedosis zwischen 20 und 100 Gy, vorzugsweise mit etwa 50 Gy bestrahlt wurden. Grundsätzlich lässt sich die optimale Energiedosis für jede Zelle experimentell ermitteln, indem *feeder*-Zellen mit unterschiedlichen Gesamtstrahlendosen behandelt werden, und analog zu der in den Ausführungsbeispielen beschriebenen Methode jeweils die Klonierungseffizienz in Abhängigkeit zur Strahlendosis bestimmt wird. Neben der Gammabestrahlung mit  $^{137}\text{Cs}$  und  $^{60}\text{Co}$  (Kobalt-Isotop 60) eignet sich beispielsweise auch eine Behandlung mit UV-Strahlung, Elektronenstrahlung, radioaktiver Strahlung, Neutronenstrahlung und Mikrowellenstrahlung.

Die *feeder*-Zellen lassen sich direkt oder nach Kryokonservierung, beispielsweise in flüssigen Stickstoff, bei einem der erfindungsgemäßen Verfahren zur Vermehrung/Klonierung von Säugerzellen einsetzen. Verfahren zur Kryokonservierung von Säugerzellen sind den Fachmann bekannt und beispielhaft in Freshney (Hers.), Animal Cell culture – a practical approach, IRL-Press 1986, Seiten 73 – 78 beschrieben, auf die hier inhaltlich Bezug genommen wird.

Die vorliegenden Verfahren eignen sich dazu, die abgelegten Säugerzellen bis zu einer Dichte von  $1 \times 10^5$  bis  $4 \times 10^6$  / mL Medium in dem Kulturgefäß zu vermehren, in dem sie ursprünglich abgelegt wurden. Vorzugsweise erfolgt eine erste

Passagierung bei einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  bis  $8 \times 10^5$  / mL Medium, insbesondere bei einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^5$  / mL Medium.

Die erfindungsgemäßen Verfahren zur Vermehrung/Klonierung der hier beschriebenen Säugerzellen zeichnen sich durch eine effiziente Reklonierungseffizienz aus, so dass die vorliegende Erfindung Verfahren zur Vermehrung/Reklonierung von Säugerzellen betrifft, dadurch gekennzeichnet, dass die Klonierungseffizienz zumindest 10%, vorzugsweise zumindest 20%, weiter bevorzugt zumindest 30% und noch weiter bevorzugt zumindest 40% beträgt. Nach einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Vermehrung/Reklonierung von Säugerzellen dadurch gekennzeichnet, dass die Reklonierungseffizienz mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60% und besonders bevorzugt mindestens 70% und noch weiter bevorzugt zumindest 80% beträgt.

Gemäß den hier beschriebenen Beispielen wurde für CHO-Zellen eine Reklonierungseffizienz einschließlich größer 65% erzielt. Dem gemäß betrifft die vorliegende Erfindung ebenfalls Verfahren zur Vermehrung/Reklonierung von CHO-Zellen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Reklonierungseffizienz bei der Reklonierung abgelegter CHO-Zellen 10 bis größer 65%, vorzugsweise größer 20%, besonders bevorzugt größer 30%, weiter bevorzugt größer 40%, noch weiter bevorzugt größer 50%, insbesondere größer 60% beträgt. Die vorliegende Erfindung betrifft allerdings auch Verfahren mit etwas geringeren Reklonierungseffizienzen für die jeweils angegebenen Zelltypen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung von einem oder mehreren Produkten (Polypeptiden, Proteinen, Nukleinsäuren, etc.), vorzugsweise von rekombinanten Produkten, in Zellen, die nach einem der oben beschriebenen Verfahren vermehrt/rekloniert werden. Voraussetzung ist, dass die jeweilige Zelle ein oder mehrere Gene von Interesse enthält, das/die für ein oder mehrere herzustellende Produkte kodiert. Vorzugsweise handelt es sich bei der entsprechenden Zelle um eine CHO-, BHK- oder NS0-Zelle sowie um



Derivate/Abkömmlinge dieser Zelllinien. Es kann sich hierbei allerdings auch um jede andere Zelle, z.B. um eine der in Tabelle 1 aufgelisteten Zellen, handeln.

Bei dem/den zu produzierenden Gen(en) von Interesse kann es sich um natürlicherweise in der Wirtszelle vorhandene Gene handeln oder aber auch um künstlich in die Zellen eingebrachte Gene. Per Definition wird jede Sequenz oder jedes Gen, das in eine Zelle eingebracht wird, in Bezug auf diese Zelle als „heterologe Sequenz“ oder „heterologes Gen“ bezeichnet, selbst dann, wenn die einzubringende Sequenz oder das einzubringende Gen identisch zu einer endogenen Sequenz oder einem endogenen Gen der Zelle ist. Beispielsweise ist ein Hamster-Aktingen, das in eine Hamster-Zelle eingebracht wird, per Definition ein heterologes Gen. Kodiert dieses heterologe Gen für ein Gen von Interesse, so spricht man auch von einem „heterologen Gen von Interesse“.

Ein heterologes Gen von Interesse kann auf verschiedene Weisen in die Zelle eingebracht werden, beispielsweise durch virale Transformation, Transfektion oder aber auch durch Mikroinjektion. Dabei kann das heterologe Gen von Interesse als lineare DNA in die Zelle eingebracht werden oder aber als Teil eines Expressionsvektors. Es sind eine Vielzahl von eukaryontischen Expressionsvektoren bekannt, die multiple Klonierungsstellen zur Einführung von einem oder mehreren heterologen Genen sowie deren Expression ermöglichen. Kommerzielle Anbieter sind unter anderem Firmen wie Stratagene, La Jolla, CA, USA; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Promega, Madison, WI, USA oder BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA. Die Transfektion der Zellen mit einer DNA oder einem Expressionsvektor, die/der für ein oder mehrere Gene von Interesse kodiert/kodieren, erfolgt nach üblichen Methoden, wie beispielhaft in Sambrook et al., 1989 oder Ausubel et al., 1994 beschrieben. Geeignete Transfektionsmethoden sind z.B. die Liposomen-vermittelte Transfektion, Calciumphosphat-Copräzipitation, Elektroporation, Polykationen (z.B. DEAE-Dextran)-vermittelte Transfektion, Protoplastenfusion, Mikroinjektion und virale Infektionen. Vorzugsweise wird eine stabile Transfektion durchgeführt, wobei die DNA-Moleküle entweder in das Genom der Wirtszelle oder ein artifizielles Chromosom/Minichromosom integriert werden oder in stabiler Weise episomal in der Wirtszelle enthalten sind. Die Transfektionsmethode, die die optimale

Transfektionsfrequenz und Expression von einem oder mehreren heterologen Genen von Interesse in der jeweiligen Zelle ermöglicht, ist dabei bevorzugt.

Das heterologe Gen von Interesse ist zumeist funktionell mit einen Promotor, der die Transkription des Gens von Interesse ermöglicht, sowie mit weiteren regulatorischen Elementen verknüpft, die eine Transkription und Translation (Expression) des Gens von Interesse ermöglichen oder in ihrer Effizienz steigern.

Als „Promotor“ wird eine Polynukleotidsequenz bezeichnet, die die Transkription der mit ihr funktionell verknüpften Gene oder Sequenzen ermöglicht und kontrolliert. Ein Promotor enthält Erkennungssequenzen für die Bindung der RNA-Polymerase und die Initiationsstelle der Transkription (Transkriptionsinitiationsstelle). Zur Expression einer gewünschten Sequenz in einem bestimmten Zelltyp oder einer Wirtszelle muss jeweils ein geeigneter, funktionaler Promotor gewählt werden. Der Fachmann kennt eine Vielzahl von Promotoren aus verschiedenen Quellen, einschließlich konstitutiver, induzierbarer und reprimierbarer Promotoren. Sie sind in Datenbanken, z.B. GenBank, hinterlegt und können als eigenständige oder innerhalb von Polynukleotidsequenzen klonierte Elemente von kommerziellen oder individuellen Quellen bezogen werden. In induzierbaren Promotoren kann die Aktivität des Promotors in Reaktion auf ein Signal reduziert oder verstärkt werden. Ein Beispiel für einen induzierbaren Promotor stellt der Tetracyclin (tet)-Promotor dar. Dieser enthält Tetracyclin-Operatorsequenzen (tetO), die durch ein Tetracyclin-reguliertes Transaktivatorprotein (tTA) induziert werden können. In der Anwesenheit von Tetracyclin wird die Bindung von tTA an tetO inhibiert. Beispiele für weitere induzierbare Promotoren sind der jun-, fos-, Metallothionin- und Hitzeschockpromotor (siehe auch Sambrook et al., 1989; Gossen et al., 1994). Unter den Promotoren, die für eine hohe Expression in Eukaryonten besonders gut geeignet sind, befinden sich der Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotor (WO 97/15664), der SV40 early Promotor, der Adenovirus major late Promotor, der Maus Metallothionin-I Promotor, die lange terminale Repeatregion des Rous Sarcoma Virus und der early Promotor des humanen Cytomegalie-Virus. Beispiele für andere heterologe Säugerpromotoren sind der/die Aktin-, Immunglobulin-, oder Hitzeschockpromotor(en).

Beispielsweise kann der Promotor mit Enhancer-Sequenzen funktionell verknüpft werden, um die Transkriptionsaktivität zu steigern. Hierzu können ein oder mehrere Enhancer und/oder mehrere Kopien einer Enhancer-Sequenz verwendet werden, beispielsweise ein CMV- oder SV40-Enhancer.

Mit dem Ausdruck „Enhancer“ wird eine Polynukleotidsequenz bezeichnet, die in *cis*-Lokalisierung auf die Aktivität eines Promotors einwirkt und so die Transkription eines mit diesem Promotor funktionell verknüpften Gens stimuliert. Im Gegensatz zu Promotoren ist die Wirkung der Enhancer positions- und orientierungsunabhängig und können somit vor oder hinter eine Transkriptionseinheit, innerhalb eines Introns oder selbst innerhalb der Kodierregion positioniert werden. Der Enhancer kann dabei sowohl in unmittelbarer Nähe der Transkriptionseinheit als auch in beträchtlichem Abstand zum Promotor lokalisiert sein. Auch eine physikalische und funktionelle Überlappung mit dem Promotor ist möglich. Dem Fachmann sind eine Vielzahl von Enhancern aus verschiedenen Quellen bekannt (und in Datenbanken wie GenBank hinterlegt, z.B. SV40 Enhancer, CMV Enhancer, Polyoma Enhancer, Adenovirus Enhancer) und als eigenständige oder innerhalb von Polynukleotidsequenzen klonierte Elemente verfügbar (z.B. bei ATCC hinterlegt oder aus kommerziellen und individuellen Quellen). Eine Vielzahl von Promotorsequenzen beinhalten auch Enhancersequenzen, wie z.B. der häufig verwendete CMV Promotor. Der humane CMV-Enhancer gehört dabei zu den stärksten bisher identifizierten Enhancern. Ein Beispiel für einen induzierbaren Enhancer ist der Metallothionein-Enhancer, der durch Glucocorticoide oder Schwermetalle stimuliert werden kann.

Grundsätzlich umfassen die regulatorischen Elemente Promotoren, Enhancer, Terminations- und Polyadenylierungssignale und weitere Expressionskontrollelemente. Für die verschiedenen Zelltypen sind sowohl induzierbare als auch konstitutive regulatorische Sequenzen bekannt. „Transkriptionsregulatorische Elemente“ umfassen gewöhnlich einen Promotor stromaufwärts von der zu exprimierenden Gensequenz, Transkriptionsinitiations- und -terminationsstellen sowie ein Polyadenylierungssignal.

Der Ausdruck „Transkriptionsinitiationsstelle“ bezieht sich auf eine Nukleinsäure in dem Konstrukt, die der ersten Nukleinsäure entspricht, welche in das primäre Transkript, d.h. den mRNA-Precursor, inkorporiert wird. Die Transkriptionsinitiationsstelle kann mit den Promotorsequenzen überlappen.

Der Ausdruck „Transkriptionsterminationsstelle“ bezieht sich auf eine Nukleotidsequenz, die normalerweise am 3'-Ende des Gens von Interesse oder des zu transkribierenden Genabschnitts vorhanden ist und die den Abbruch der Transkription durch RNA-Polymerase bewirkt.

Das „Polyadenylierungssignal“ ist eine Signalsequenz, welche die Spaltung an einer spezifischen Stelle am 3'-Ende der eukaryontischen mRNA und den posttranskriptionellen Einbau einer Sequenz von etwa 100-200 Adeninnukleotiden (polyA-Schwanz) am gespaltenen 3'-Ende verursacht. Das Polyadenylierungssignal umfasst die Sequenz AATAAA etwa 10-30 Nukleotide stromaufwärts von der Spaltstelle sowie eine stromabwärts gelegene Sequenz. Es sind verschiedene Polyadenylierungselemente bekannt, z.B. tk polyA, SV40 late und early polyA oder BGH polyA (z.B. beschrieben in US 5,122,458).

„Translationsregulatorische Elemente“ umfassen eine Translationsinitiationsstelle (AUG), ein Stoppcodon und ein polyA-Signal für jedes zu exprimierende Polypeptid. Für eine optimale Expression kann es günstig sein, 5'- und/oder 3'-nichttranslatierte Bereiche der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz zu entfernen, hinzuzufügen oder zu ändern, um potentielle zusätzliche ungeeignete Translationsinitiationscodons oder andere Sequenzen, welche die Expression auf dem Niveau der Transkription oder Expression beeinträchtigen können, zu eliminieren. Um die Expression zu fördern, kann man alternativ ribosomale Konsensus-Bindungsstellen unmittelbar stromaufwärts vom Startcodon insertieren. Um ein sekretiertes Polypeptid zu produzieren, enthält das Gen von Interesse gewöhnlich eine Signalsequenz, welche für ein Signalvorläuferpeptid kodiert, die das synthetisierte Polypeptid zu und durch die ER-Membran transportiert. Die Signalsequenz befindet sich oft, jedoch nicht immer, am Aminoterminus des sekretierten Proteins und wird durch Signal-Peptidasen abgespalten, nachdem das Protein durch die ER-Membran geschleust

wurde. Die Gensequenz wird gewöhnlich, jedoch nicht notwendigerweise, eine eigene Signalsequenz enthalten. Wenn die native Signalsequenz nicht vorhanden ist, kann in bekannter Weise eine heterologe Signalsequenz eingeführt werden. Dem Fachmann sind zahlreiche solcher Signalsequenzen bekannt und in Sequenzdatenbanken wie GenBank und EMBL hinterlegt.

Genprodukte von Interesse können Proteine/Polypeptide umfassen, z.B. Antikörper, Enzyme, Cytokine, Lymphokine, Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren sowie deren Derivate bzw. Fragmente, sind aber nicht auf diese beschränkt. Im Allgemeinen sind alle Polypeptide bedeutsam, die als Agonisten oder Antagonisten wirken und/oder therapeutische oder diagnostische Anwendung finden können.

Der Ausdruck „Polypeptide“ wird für Aminosäuresequenzen oder Proteine verwendet und bezeichnet Polymere von Aminosäuren beliebiger Länge. Dieser Ausdruck schließt auch Proteine ein, die posttranslational durch Reaktionen wie beispielsweise Glykosylierung, Phosphorylierung, Acetylierung oder Proteinprozessierung modifiziert werden. Die Struktur des Polypeptids kann, z.B. durch Substitutionen, Deletionen oder Insertion von Aminosäuren, Fusion mit anderen Proteinen, unter Beibehaltung seiner biologischen Aktivität modifiziert werden.

Beispiele für Proteine sind Insulin; Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF-I oder IGF-II); humanes Wachstumshormon (hGH) und andere Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel VEGF, EGF, TGF, beispielsweise TGF-alpha und beta, einschließlich  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  und  $\beta 5$ ; Gewebefibrinogenaktivator (tPA); Erythropoietin (EPO); Thrombopoietin (TBO); Cytokine, beispielsweise Interleukine (IL) wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18; Interferon (IFN)-alpha, beta, gamma, omega oder tau; Tumornekrosefaktor (TNF) wie z.B. TNF-alpha, beta, gamma, CD40-Ligand, Apo-2-Ligand/TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, DcR3, OPG, Fas Ligand; G-CSF; GM-CSF; M-CSF; MCP-1 und VEGF. Weitere Beispiele sind Gerinnungsfaktoren wie Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, von Willebrands Faktor; Anti-Gerinnungsfaktoren wie Protein C; Enekephalinase; RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted); humanes Makrophagen Inflammatorisches Protein (MIP-1-alpha); (humanes) Serum Albumin,

Zell-Adhäsions-Moleküle, wie LFA-1, Mac-1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM, oder  $\alpha$ V/ $\beta$ 3 Integrin einschließlich  $\alpha$  oder  $\beta$ -Untereinheiten; Blutgruppen-Antigene; flk2/3-Rezeptor; OB-Rezeptor; mlp-Rezeptor; CTLA-4; Apo-2L-Rezeptoren wie zum Beispiel Apo-2; *Transforming Growth Factor* (TGF); CD-Proteine, T-Zell Rezeptoren; virale Antigene wie zum Beispiel das gp120 von HIV; Tumor assoziierte Antigene wie zum Beispiel HER2-, HER3- oder HER4-Rezeptor, Rheumatoid Faktoren, beispielsweise NGF- $\beta$  oder PDGF; Relaxin-A- oder -B-Kette; Gonadotropin; Gonadotropin-assoziiertes Peptid; Inhibin; Aktivin; ein cytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen (CTLA) oder Neurotrophin-Faktoren wie zum Beispiel BDNF, Neurotrophin-3, -4, -5 oder -6.

Weitere Beispiele sind monoklonale, polyklonale, multispezifische und einzelkettige (*single chain*) Antikörper und Fragmente davon, wie z.B. Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc und Fc'-Fragmente, leichte (L) und schwere (H) Immunglobulinketten und deren konstante, variable oder hypervariable Regionen sowie Fv- und Fd-Fragmente (Chamov et al., 1999). Die Antikörper können humanen oder nicht-humanen Ursprungs sein. Auch humanisierte und chimäre Antikörper kommen in Frage.

Fab-Fragmente (*Fragment antigen-binding* = Fab) bestehen aus den variablen Regionen beider Ketten, die durch die angrenzenden konstanten Regionen zusammengehalten werden. Sie können z.B. durch Behandlung mit einer Protease, wie beispielsweise Papain, aus konventionellen Antikörpern erzeugt werden oder aber auch durch DNA-Klonierung. Weitere Antikörperfragmente sind F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente, die durch proteolytischen Verdau mit Pepsin hergestellt werden können.

Durch Genklonierung können auch verkürzte Antikörperfragmente hergestellt werden, die nur aus den variablen Region der schweren (VH) und der leichten Kette (VL) bestehen. Diese werden als Fv-Fragmente (*Fragment variable* = Fragment des variablen Teils) bezeichnet. Da bei diesen Fv-Fragmenten die kovalente Verbindung über die Cysteinreste der konstanten Ketten nicht möglich ist, werden diese Fv-Fragmente oft anderweitig stabilisiert. Dazu werden die variablen Region der schweren und leichten Kette häufig mittels eines kurzen Peptidfragments von ca. 10 – 30 Aminosäuren, besonders bevorzugt 15 Aminosäuren, miteinander verknüpft.

Auf diese Weise entsteht eine einzelne Polypeptidkette, in der VH und VL durch einen Peptidlinker miteinander verbunden sind. Solche Antikörperfragmente werden auch als *single-chain* Fv-Fragment (scFv) bezeichnet. Beispiele von scFv-Antikörpern sind bekannt und beschrieben, siehe z.B. Huston et al. (1988).

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Strategien entwickelt um multimeres scFv-Derivate herzustellen. Die Intention besteht in der Erzeugung von rekombinanten Antikörpern mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften und verstärkter Bindungsavidität. Zur Erreichung der Multimerisierung der scFv-Fragmente werden diese als Fusionsproteine mit Multimerisierungsdomänen hergestellt. Als Multimerisierungsdomänen können dabei z.B. die CH3-Region eines IgGs oder Helixstrukturen („*coiled coil structure*“) wie die Leucin-Zipper-Domänen fungieren. In anderen Strategien wird die Interaktion zwischen den VH- und VL-Regionen des scFv-Fragments für eine Multimerisierung genutzt (z.B. Dia-, Tri- und Pentabodies).

Als „Diabody“ bezeichnet ein Fachmann ein bivalentes homodimeres scFv-Derivat. Die Verkürzung des Peptidlinkers im scFv-Moleküle auf 5 – 10 Aminosäuren resultiert in der Bildung von Homodimeren durch Überlagerung von VH/VL-Ketten. Die Diabodies können zusätzlich durch eingeführte Disulfidbrücken stabilisiert werden. Beispiele von Diabodies finden sich in der Literatur, z.B. bei Perisic et al. (1994).

Als „Minibody“ bezeichnet der Fachmann ein bivalentes, homodimeres scFv-Derivat. Es besteht aus einem Fusionsprotein, das die CH3-Region eines Immunglobulins, vorzugsweise IgG, besonders bevorzugt IgG1, als Dimerisierungsregion enthält. Diese verbindet die scFv-Fragmente über eine Hinge-Region, ebenfalls von IgG, und eine Linker-Region. Beispiele solcher Minibodies sind bei Hu et al. (1996) beschrieben.

Mit „Triabody“ bezeichnet der Fachmann ein trivalentes homotrimeres scFv-Derivat (Kortt et al., 1997). Die direkte Fusion von VH-VL ohne Verwendung einer Linkersequenz führt zur Ausbildung von Trimeren.

Bei den vom Fachmann als Mini-Antikörper bezeichneten Fragmenten, die eine bi-, tri- oder tetravalente Struktur haben, handelt es sich ebenfalls um Derivate von scFv-Fragmenten. Die Multimerisierung wird dabei über di-, tri- oder tetramere „coiled coil“-Strukturen erzielt (Pack et al., 1993 und 1995; Lovejoy et al., 1993).

Zur Selektion von transfizierten Zellen können diese zusätzlich mit einem oder mehreren Selektionsmarkergenen transfiziert werden. In der Literatur sind eine Vielzahl von Selektionsmarkergenen, einschließlich bifunktionaler (positiv/negativ) Marker, beschrieben (siehe z.B. WO 92/08796 und WO 94/28143). Beispiele für Selektionsmarker, die für gewöhnlich in eukaryontischen Zellen verwendet werden, beinhalten die Gene für Aminoglykosid-Phosphotransferase (APH), Hygromycin-Phosphotransferase (HYG), Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), Thymidinkinase (TK), Glutamin-Synthetase, Asparagin-Synthetase und Gene, die Resistenz gegenüber Neomycin (G418), Puromycin, Histidinol D, Bleomycin, Phleomycin und Zeocin vermitteln. Diese Gene können zusammen mit dem Gen von Interesse oder aber separat in die Zelle eingebracht werden. Vorzugsweise werden sie hierbei ebenfalls über Expressionsvektoren in die Zellen eingebracht. Entsprechend modifizierte Zellen können nun in Anwesenheit von einem oder mehreren geeigneten Selektionsmitteln kultiviert werden, die selektiv Zellen im Wachstum bevorzugen, die ein entsprechendes Selektionmarkergen enthalten und exprimieren.

Eine Selektion von transfizierten Zellen ist auch durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) möglich, beispielsweise über bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase, Zelloberflächenmarker oder fluoreszierende Proteine. Die fluoreszierenden Proteine ermöglichen darüber hinaus auch eine FACS-basierte Isolierung von einzelnen Säugerzellen. Entsprechend detektierte Zellen lassen sich automatisch als Einzelzelle oder zu mehreren Zellen, z.B. mit Hilfe eines Lasers, beispielsweise mit einem Argon-Laser (488nm) und beispielsweise mit einem mit einer Autoclone-Einheit bestückten Flow Cytometer (Coulter EPICS Altra, Beckman-Coulter, Miami, FL, USA), in Kulturgefäße ablegen. Nach einer bevorzugten Ausführungsform werden lediglich eine (1) einzelne oder höchstens zwei Zellen in ein mit autologen *feeder*-Zellen bestücktes Zellkulturgefäß auf diese Weise abgelegt. Besonders



vorteilhaft ist die entsprechende Ablage von jeweils nur einer (1) einzelnen Zelle. Darüber hinaus kann eine Sortierung über magnetische Beads erfolgen. Dazu erfolgt eine Markierung der Zellen über z.B. Antikörper, die an Magnetbeads gekoppelt sind. Dies erlaubt eine Sortierung von Zellen nach definierten Eigenschaften.

Besonders vorteilhaft ist die FACS-basierte Isolierung von Zellklonen, die nach einem der hier beschriebenen Verfahren abgelegt wurden und ein fluoreszierendes Protein und ein Gen von Interesse co-exprimieren. Vorzugsweise sind die Expression des fluoreszierenden Proteins und des Gens von Interesse funktionell miteinander verknüpft. Eine solche funktionelle Verknüpfung besteht beispielsweise, wenn sich beide Gene in einer engen räumlichen Anordnung befinden, so dass die Expressionsraten beider Gene miteinander korrelieren, beispielsweise nach transienter oder stabiler Transfektion einer Wirtszelle. Eine solche funktionelle Verknüpfung lässt sich auch beispielsweise durch die Verwendung von sog. IRES-Elementen (= *internal ribosome entry site*) oder durch RNA-Splicing erreichen, wobei beide Gene (Gen von Interesse und Gen des fluoreszierenden Proteins) als bicistronische mRNA synthetisiert werden. Auf diese Weise besteht eine direkte Korrelation zwischen der Expressionsrate des fluoreszierenden Proteins und des Gens von Interesse. Die entsprechenden Zellklone, die eine hohe Expression an fluoreszierendem Protein zeigen verfügen in Folge der funktionellen Verknüpfung auch über eine hohe Expressionsrate des Gens von Interesse.

Bei dem fluoreszierenden Protein kann es sich z.B. um ein grün, blaugrün, blau, gelb oder andersfarbig fluoreszierendes Protein handeln. Ein spezielles Beispiel ist das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* oder *Renilla reniformis* und daraus entwickelte Mutanten; siehe z.B. Bennet et al. (1998); Chalfie et al. (1994); WO 01/04306 und die dort zitierte Literatur. Weitere fluoreszierende Proteine und dafür kodierende Gene sind in WO 00/34318, WO 00/34326, WO 00/34526 und WO 01/27150 beschrieben, die durch Bezugnahme hierin inkorporiert werden. Bei diesen fluoreszierenden Proteinen handelt es sich um Fluorophore von nicht-biolumineszierenden Organismen der Spezies Anthozoa, beispielsweise von *Anemonia majano*, *Clavularia* sp., *Zoanthus* sp. I, *Zoanthus* sp. II, *Discosoma striata*, *Discosoma* sp. „red“, *Discosoma* sp. „green“, *Discosoma* sp. „Magenta“, *Anemonia*

*sulcata*. Die eingesetzten Fluoreszenzproteine können aus den Wildtyp-Proteinen, natürlichen oder gentechnologisch hergestellten Mutanten und –varianten, deren Fragmente, Derivate oder z.B. mit anderen Proteinen oder Peptiden fusionierte Varianten bestehen. Die eingebrachten Mutationen können dabei beispielsweise das Exzitations- oder Emissionsspektrum, die Chromophorenbildung, den Extinktionskoeffizienten oder die Stabilität des Proteins verändern. Durch Codon-Optimierung kann zudem die Expression in Säugerzellen oder anderen Spezies verbessert werden. Erfindungsgemäß kann das fluoreszierende Protein auch in Fusion mit einem Selektionsmarker, vorzugsweise mit einem amplifizierbaren Selektionsmarker wie beispielsweise der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), eingesetzt werden.

Der Selektionsschritt kann an Zellpopulationen oder mit bereits vorsortierten Zellpopulationen/Zellklonen durchgeführt werden. Es können ein oder mehrere, vorzugsweise ein (1), zwei, drei oder vier Zellen pro Zellkulturgefäß abgelegt werden. Vorzugweise erfolgt die Zellablage in serumfreies Medium, besonders bevorzugt in chemisch definiertes Medium, in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen. Auf geeignete Medien sowie auf erfindungsgemäße Verfahren zur Zellablage unter Verwendung von autologen *feeder*-Zellen wird an anderen Stelle dieser Anmeldung im Detail eingegangen. Grundsätzlich können auch zwei oder mehr Sortierungsschritte durchgeführt werden, wobei zwischen den einzelnen Sortierungsschritten die Zellen über einen bestimmten Zeitraum, z.B. etwa zwei Wochen als Pools, in einem entsprechend geeigneten Medium kultiviert und vermehrt werden.

Zur Produktion eines oder mehrerer Genprodukte von Interesse in den reklonierten Zellen werden die reklonierten Zellen vorzugsweise in einem serumfreien Kulturmedium und in Suspensionskultur unter Bedingungen gezüchtet, die eine Expression des Gens von Interesse erlauben. Steht das Gen von Interesse beispielsweise unter der Kontrolle konstitutiver Promotoren, so ist eine Zugabe von speziellen Induktoren nicht erforderlich. Steht die Expression des Gens von Interesse beispielsweise unter der Kontrolle induzierbarer Promotoren, so ist dem Zellkulturmedium ein entsprechender Induktor in ausreichender aber nicht toxischer

Konzentration zuzugeben. Die Zellen können durch mehrfaches Subpassagieren beliebig expandiert und in entsprechend geeignete Zellkulturgefäße überführt werden. Die Produktion des/der Genprodukte erfolgt entweder als zelluläres, membrangebundenes oder als sekretorisches Produkt.

Das Produkt von Interesse wird vorzugsweise als sekretiertes Genprodukt aus dem Zellkulturmedium gewonnen. Bei Expression eines Proteins oder Polypeptids ohne Sekretionssignal kann das Genprodukt aber auch aus Zelllysaten isoliert werden. Um ein reines, homogenes Produkt zu erhalten, das im Wesentlichen frei ist von anderen rekombinanten Proteinen und Wirtszellproteinen, werden übliche Reinigungsschritte durchgeführt. Hierzu entfernt man häufig zunächst Zellen und Zelltrümmer aus dem Kulturmedium oder Lysat. Das gewünschte Genprodukt kann dann von kontaminierenden löslichen Proteinen, Polypeptiden und Nukleinsäuren befreit werden, z.B. durch Fraktionierung an Immunaффinitäts- und Ionenaustauschsäulen, Ethanolfällung, Umkehrphasen-HPLC oder Chromatographie an Sephadex, Silica oder Kationenaustauscherharzen wie DEAE. Methoden, die zur Aufreinigung eines von rekombinanten Wirtszellen exprimierten heterologen Proteins führen, sind dem Fachmann bekannt und sind in der Literatur beschrieben, z.B. bei Harris et al. (1995) und Scopes (1988).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dem zur Folge ein Verfahren zur Herstellung von einem oder mehreren Produkten in Säugerzellen unter serumfreien Bedingungen, dadurch gekennzeichnet, (i) dass Säugerzellen ein Gen von Interesse enthalten, das für ein Protein von Interesse kodiert; (ii) die Säugerzellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden, die eine Vermehrung der Säugerzellen erlauben; (iii) jeweils weniger als fünf, vorzugsweise vier, drei, zwei oder eine (1) dieser Säugierzelle(n) in ein Zellkulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt werden; (iv) die entsprechend abgelegten Säugerzellen in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen unter serumfreien Bedingungen vermehrt werden; (v) die vermehrten Zellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden, unter denen das Gen von Interesse exprimiert wird; und (vi) das Genprodukt anschließend aus den Zellen oder dem Kulturüberstand isoliert und gereinigt wird. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens wird/werden unter

Punkt (iii) lediglich eine (1) einzelne oder zwei (2) der Säugerzellen pro Zellkulturgefäß abgelegt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren bei dem lediglich eine (1) einzelne Säugerzelle unter Punkt (iii) abgelegt wird. Die Zellablage kann beispielsweise manuell oder automatisiert, beispielsweise über FACS-basierte Zellsortierung, erfolgen.

Nach einer weiter bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Säugerzelle um eine transfizierte Säugerzelle, in die das Gen von Interesse eingebracht wurde. Demnach betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Genprodukten, dadurch gekennzeichnet, dass die Säugerzellen vor Schritt (i) des oben beschriebenen Verfahrens mit einer Nukleinsäure transfiziert werden, die zumindest für ein Gen von Interesse kodiert. Bevorzugt ist hierbei die stabile Transfektion der entsprechenden Säugerzelle.

Wie oben erwähnt, betrifft die vorliegende Erfindung auch eine FACS-basierte Sortierung von einzelnen und Ablage von einzelnen oder mehreren Säugerzellen, vorzugsweise von weniger als 5, weiter bevorzugt von 4, 3, 2 oder 1 Säugerzelle(n), die ein Protein von Interesse exprimieren, wobei die Zellsortierung und Zellablage vorzugsweise in Abhängigkeit der Expressionsrate des in der Säugerzelle co-exprimierten fluoreszierenden Proteins erfolgt, dessen Expression mit der Expression des Proteins von Interesse funktionell verknüpft ist. Dem zur Folge betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins in Säugerzellen unter serumfreien Bedingungen, dadurch gekennzeichnet, dass i) die Säugerzellen mit einem Gen transfiziert werden, das für ein Protein von Interesse kodiert; ii) die Säugerzellen mit einem Gen transfiziert werden, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert, wobei die Expression des Gen, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert, vorzugsweise funktionell mit der Expression des Gens von Interesse verknüpft ist; iii) die transfizierten Säugerzellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden, die eine Vermehrung der transfizierten Zellen und die Expression zumindest des fluoreszierenden Proteins erlauben; iv) jeweils weniger als 5, vorzugsweise 4, 3, 2 oder 1 (eine) transfizierte Säugerzelle(n) in ein Zellkulturgefäß mit autologen *feeder*-Zellen nach FACS-basierter Zellsortierung unter serumfreien Bedingungen abgelegt werden, wobei die FACS-basierte Zellsortierung

auf der Grundlage der Expressionraten des fluoreszierenden Proteins erfolgt; v) die entsprechend abgelegten Zellen in Gegenwart der autologen *feeder*-Zellen unter serumfreien Bedingungen vermehrt werden; vi) die vermehrten Zellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden, unter denen zumindest das Gen von Interesse exprimiert wird; u n d vii) das Genprodukt (des Gens von Interesse) anschließend aus den Zellen oder dem Kulturüberstand isoliert und gereinigt wird. Nach einer besonders bevorzugten Ausführung wird unter Schritt iv) jeweils nur eine (1) einzelne Zelle pro Kulturgefäß abgelegt und vermehrt. Vorzugsweise werden nur die Zellen unter Punkt iv) heraussortiert die zu den 20% Zellen mit der höchsten Expressionsrate an fluoreszierendem Protein gehören. In der Praxis bedeutet dies, dass die hellsten 20% der fluoreszierenden Zellen heraussortiert werden (20% am stärksten fluoreszierenden Zellen). Nach einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden nur die hellsten 5%, vorzugsweise die hellsten 3%, oder auch nur die hellsten 1% der fluoreszierenden Zellen eines Zellgemisches heraussortiert. Wie die Abbildungen 3a und 3b zeigen, führt dies zu einer Anreicherung von Zellklonen mit einer vergleichbaren hohen Expressionsrate des Gens von Interesse. Durch die FACS-basierte Einzelzellablage lassen sich somit homogene Zellklone identifizieren und vermehren, die über eine vergleichbare hohe Expressionsrate an einem Gen von Interesse verfügen, die wiederum als Ausgangspunkt für weitere Optimierungsschritte stehen (z.B. Genamplifikation).

Weiter bevorzugt ist ein entsprechendes Verfahren zur Herstellung von einem oder mehreren rekombinanten Produkten in reklonierten Säugerzellen, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Säugerzellen um Hamster- oder Maus-Myeloma-Zelle handelt, vorzugsweise um CHO-, BHK-oder NS0-Zellen, sowie um Derivate/Abkömmlinge dieser Zelllinien. Eine weitere Ausführungsform dieses Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den *feeder*-Zellen um an serumfreies Medium adaptierte und um nicht adhärent kultivierte Zellen handelt. Weiter bevorzugt in Zusammenhang mit dem oben beschriebenen Herstellungsverfahren ist die Verwendung von Hamsterzellen als *feeder*-Zellen sofern es sich bei den/der abgelegten und zu vermehrenden/klonierenden Säugerzelle(n) um CHO- oder BHK-Zellen handelt, u n d die Verwendung von Maus-Myeloma-Zellen als *feeder*-Zellen, sofern es sich bei den/der abgelegten und zu

vermehrenden/klonierenden Säugierzelle(n) um NS0-Zellen handelt. Insbesondere bevorzugt ist ein entsprechendes Verfahren, dass dadurch gekennzeichnet ist, dass CHO-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den/der abgelegten und zu vermehrenden/klonierenden Säugierzelle(n) um CHO-Zellen handelt, dass BHK-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den/der abgelegten und zu vermehrenden/klonierenden Säugierzelle(n) um BHK-Zellen handelt und dass NS0-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den/der abgelegten und zu vermehrenden/klonierenden Säugierzelle(n) um NS0-Zellen handelt.

Die vorliegende Erfindung stellt erstmals Hamsterzellen und Maus-Myeloma-Zellen, vorzugsweise NS0-Zellen als *feeder*-Zellen zur Verfügung. Aus diesem Grund betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung einer Hamsterzelle oder einer Maus-Myeloma-Zelle des Typs NS0 als *feeder*-Zelle. Verfahren zur Herstellung entsprechender *feeder*-Zellen sind in den Ausführungsbeispielen näher beschrieben. Die entsprechenden Hamster- oder Maus-Myeloma-*feeder*-Zellen lassen sich grundsätzlich durch dem Fachmann bekannte chemische oder physikalische Verfahren, beispielsweise durch Behandlung mit Mitomycin C (Azirino[2',3':3,4]pyrrolo[1,2-a]indole-4,7-dione,6-amino-8-[[[(aminocarbonyl)oxy]methyl]-1,1a,2,8,8a,8b-hexahydro-8a-methoxy-5-methyl-, [1aR-(1a.alpha., 8.beta., 8a.alpha., 8b.alpha.)]- (9Cl) (Butcher et al, 1988)) oder durch Bestrahlung mit <sup>137</sup>Cs herstellen. Nach einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung von daher die Verwendung von chemisch oder physikalisch inaktivierten *feeder*-Zellen. Der Begriff „inaktiviert“ meint in diesem Zusammenhang, dass die Zellen in ihrer Teilungsfähigkeit eingeschränkt sind, vorzugsweise diese verloren haben, darüber hinaus aber noch vital sind. Dies meint, dass die Zellen noch Stoffwechselaktivitäten wie beispielsweise die Synthese und Sekretion von Wachstumsfaktoren für einen bestimmten Zeitraum aufweisen, vorzugsweise zumindest für ein bis zwei Wochen nach Inaktivierung. Nach einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den entsprechenden *feeder*-Zellen um *feeder*-Zellen die an serumfreie Kulturbedingungen adaptiert sind. Nach einer weiter bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den *feeder*-Zellen um CHO-, BHK- oder NS0-Zellen sowie um Abkömmlinge/Derivate dieser Zelllinien.

Darüber hinaus lassen sich alle in dieser Anmeldung erwähnten Zellen nach entsprechender Inaktivierung als *feeder*-Zellen verwenden.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen bestehend aus einem serumfreien Zellkulturmedium, weniger als fünf teilungsfähigen Säugerzellen, vorzugsweise aus vier, drei, zwei oder einer (1) teilungsfähigen Säugerkelle(n) und *feeder*-Zellen, die zu den teilungsfähigen Säugerzellen autolog sind. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthält die entsprechende Zusammensetzung lediglich (1) eine oder zwei teilungsfähige Säugerzellen. Nach einer weiter bevorzugten Ausführungsform enthält die entsprechende Zusammensetzung lediglich eine (1) einzelne teilungsfähige Säugerkelle.

Weiter bevorzugte Zusammensetzungen enthalten als *feeder*-Zellen Hamsterzellen, vorzugsweise der Unterfamilie *Cricetinae*, besonders bevorzugt der Gattung *Cricetulus* bzw. *Mesocricetus*, wenn es sich bei der/den teilungsfähigen Säugerkelle(n) um CHO- bzw. um BHK-Zellen oder um Derivate/Abkömmlinge hiervon handelt. Darüber hinaus enthält eine andere bevorzugte Zusammensetzung als *feeder*-Zellen Mauszellen, vorzugsweise der Unterfamilie *Murinae*, besonders bevorzugt der Gattung *Mus*, wenn es sich bei der/den teilungsfähigen Säugerkelle(n) um Maus-Hybridoma-Zellen, vorzugsweise um NS0-Zellen oder um Derivate/Abkömmlinge hiervon handelt. Besonders bevorzugte Zusammensetzungen sind dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung CHO-Zellen als *feeder*-Zellen enthält, wenn es sich bei der/den teilungsfähigen Säugerkelle(n) um CHO-Zellen handelt, dass die Zusammensetzung BHK-Zellen als *feeder*-Zellen enthält, wenn es sich bei der/den teilungsfähigen Säugerkelle(n) um BHK-Zellen handelt, und dass die Zusammensetzung NS0-Zellen als *feeder*-Zellen enthält, wenn es sich bei der/den teilungsfähigen Säugerkelle(n) um NS0-Zellen handelt.

Grundsätzlich sind auch solche Zusammensetzungen erfindungsgemäß, die es erlauben weniger als 5, vorzugsweise 4, 3, 2, oder 1 produktionsrelevante Hamsterzelle(n), wie beispielsweise CHO- oder BHK-Zelle(n) sowie produktionsrelevante Maus-Myeloma-Zellen, wie beispielsweise NS0-Zelle(n) in

Gegenwart von *feeder*-Zellen aus Säugern unter serumfreien Bedingungen abzulegen und zu vermehren.

Beispiele für serumfreie, proteinfreie oder chemisch definierte Medien stellen beispielsweise die im Handel erhältlichen Medien Ham's F12 (Sigma, Deisenhofen, DE), RPMI-1640 (Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma), Minimal Essential Medium (MEM; Sigma), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, Ca., USA), CHO-S-SFMII (Invitrogen), serumfreies CHO-Medium (Sigma) und proteinfreies CHO-Medium (Sigma) dar. Jedes dieser Medien kann gegebenenfalls mit verschiedenen Verbindungen ergänzt werden, z.B. Hormonen und/oder anderen Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin, Transferrin, epidermale Wachstumsfaktor, Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor), Salzen (z.B. Natriumchlorid, Calcium, Magnesium, Phosphat), Puffern (z.B. HEPES), Nukleosiden (z.B. Adenosin, Thymidin), Glutamin, Glukose oder anderen äquivalenten Nährstoffen, Antibiotika und/oder Spurenelementen. Handelt es sich bei den vermehrungsfähigen Zellen um rekombinante Zellen, die einen oder mehrere Selektionsmarker exprimieren, so kann dem Medium auch ein oder mehrere geeignete Selektionsmittel, z.B. Antibiotika zugefügt werden.

## BEISPIELE

### Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection
BHK	Baby Hamster Kidney
<sup>60</sup> Co	Kobalt Isotop 60
<sup>137</sup> Cs	Cäsium Isotop 137
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMV	Cytomegalievirus
DE	Deutschland
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Gy	Gray



HBSS	Hank's balanced salt solution
HPLC	High performance liquid chromatography
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NS0	Maus-Hybridoma-Zelle
polyA	Polyadenylierungssequenz
Sp2/0	Maus-Hybridoma-Zelle
SV40	Simian Virus No.40

## Methoden

### *1. Kultivierung der Zellen*

Die Zellen CHO-DG44/dhfr<sup>-/-</sup> (Urlaub et al., 1983) wurden permanent als Suspensionszellen in serum-freiem und mit Hypoxanthin und Thymidin supplementiertem CHO-S-SFMII Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) in Zellkulturflaschen bei 37°C in feuchter Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellzahlen sowie die Viabilität wurden mit einem CEDEX Cell Counter (Innovatis, DE) oder durch Trypanblau-Färbung bestimmt und die Zellen dann in einer Konzentration von 1 – 3 x10<sup>5</sup>/mL eingesät und alle 2 – 3 Tage passagiert. Für die Einzelzellklonierung wurden rekombinante CHO-DG44/dhfr<sup>-/-</sup> verwendet, die ein fluoreszentes Protein (beispielsweise ZS-Green aus *Zoanthus sp.*) bzw. ein fluoreszentes Protein und einen humanen bzw. einen humanisierten monoklonalen Antikörper exprimieren. Die Kultivierung klonierter rekombinanter Zellen erfolgte analog zu diesen Zellen. Als Medium wurde ebenfalls CHO-S-SFM-II Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) ohne Hypoxanthin und Thymidin verwendet.

Die Zellen BHK lassen sich permanent als Suspensionszellen in serum-freiem Opti Pro SFM Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) in Zellkulturflaschen bei 37°C in feuchter Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> kultivieren. Die Zellzahlen sowie die Viabilität kann mit einem CEDEX Cell Counter (Innovatis, DE) oder durch Trypanblau-Färbung bestimmt werden, wobei die Zellen dann in einer Konzentration von 1 – 3 x10<sup>5</sup>/mL eingesät und alle 2 – 3 Tage passagiert werden. Die Kultivierung klonierter Zellen erfolgt analog den BHK-Zellen.

Die Zellen NS0 lassen sich permanent als Suspensionszellen in serum-freiem Hybridoma Medium, Animal component free Medium (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA) in Zellkulturflaschen bei 37°C in feuchter Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> kultivieren. Die

Zellzahlen sowie die Viabilität kann mit einem CEDEX Cell Counter (Innovatis, DE) oder durch Trypanblau-Färbung bestimmt werden und die Zellen werden dann in einer Konzentration von  $1 - 3 \times 10^5/\text{mL}$  eingesät und alle 2 – 3 Tage passagiert. Die Kultivierung klonierter Zellen erfolgt analog den Zellen NS0. Als Medium wird Hybridoma Medium, Animal component free Medium (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA) verwendet.

## *2. Herstellung von feeder-Zellen durch Bestrahlung*

Serum- und proteinfrei wachsende suspendierte CHO-Grundzellen (nicht transfizierte Zellen), wurden bei 180g für 10 Minuten abzentrifugiert und auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6/\text{mL}$  in HBSS (Hank's balanced salt solution) eingestellt. Danach erfolgte die Bestrahlung der Zellen mit einer radioaktiven Bestrahlungsquelle (Cs137-Strahler, Gammacell 2000, Fa. Molsgaard Medical A/S, Dänemark) mit einer Energiedosisleistung von 4Gy/min. Mit einer Bestrahlungszeit zwischen 5min und 125min ergab sich eine Energiedosis zwischen 20 und 500 Gy. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit ca. 2000 Zellen/well (= Kulturgefäß) in 96-Loch-Mikrotiterplatten in dem für die Zelle spezifischen CHO-S-SFMII Medium eingesät und bei ca. 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Brutraumatmosphäre gelagert. Das Verfahren wird entsprechend mit BHK- und NS0-Zellen durchgeführt, wobei die *feeder*-Zellen in dem jeweils für die Zellen spezifischen Medium gehalten/ingesät werden.

## *3. Kryokonservierung von feeder-Zellen*

Die entsprechend hergestellten *feeder*-Zellen können bei unter – 150°C kryokonserviert werden. Die Kryokonservierung wird mit Hilfe eines programmierbarem Einfriergerät im jeweiligen Zellkulturmedium durchgeführt (Consarctic BV-25, Consarctic, Schöllkrippen, DE). Als Kryoprotektant wird den Medien 10% (v/v) DMSO zugesetzt. Die Einfrierrate zwischen 0°C und –20°C beträgt 1°C/min, anschließend erfolgt die weitere Temperaturabsenkung mit 0.4°C/min. Nach erfolgtem Einfrierprozess werden die *feeder*-Zellen in der Gasphase in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

## *4. Automatisierte Zellablage*

Die automatische Zellablage (Einzel- oder Mehrzellablage) wird mit einem mit Argon-Laser (488nm) bestückten Flow Cytometer (Coulter EPICS Altra (Fa. Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) mittels Autoclone-Einheit durchgeführt. Die Zellen werden hierbei in der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert und auf eine Zellkonzentration von  $1 - 1,5 \times 10^7/\text{mL}$  in HBSS aufgenommen. Anschließend werden die Zellen mit der „Hypersort-Option“ mit einer Geschwindigkeit von 8000-12000 Zellen/Sekunde nach ihrer Lage im Streulicht sortiert. Zellen, die ein Fluoreszenzprotein exprimieren, lassen sich alternativ gemäß ihrer Fluoreszenzintensität in Bezug auf das intrazellulär exprimierte Fluoreszenzprotein sortieren. Die Zellen werden jeweils einzeln in mit *feeder*-Zellen bestückten 96-Loch Mikrotiterplatten abgelegt. Die Ablage von BHK-Zellen erfolgt beispielsweise in OptiPro SFM Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE). Die sortierten NS0-Zellen werden beispielhaft in Hybridoma Medium, Animal component free Medium (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA) abgelegt.

Bei der Sortierung von CHO-Zellen erfolgte die Zellablage in CHO-S-SFM-II (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE). Abgelegt wurde eine rekombinante CHO-DG-44-Zelle, die einen humanen bzw. einen humanisierten monoklonalen Antikörper sowie das ZS-Green aus *Zoanthus sp.* co-exprimierte. Die Zellsortierung erfolgte wie oben beschrieben mit einem Argon-Laser bei 488nm.

##### *5. Bestimmung der Produktivität rekombinant exprimierter Genprodukte (für die verwendeten mAk-exprimierenden CHO-DG-44)*

Die Quantifizierung der Antikörpertiter in den Überständen von stabil transfizierten CHO-DG44 Zellen, die einen humanen bzw. humanisierten monoklonalen Antikörper exprimieren, erfolgte mittels ELISA nach Standardprotokollen (Ausubel et al., 1994, updated), wobei zum einen ein Ziege anti-Human IgG Fc-Fragment (Dianova, Hamburg, DE) und zum anderen ein AP-konjugierter Ziege anti Human Kappa light chain Antikörper (Sigma) eingesetzt wurde. Als Standard diente der gereinigte Antikörper. Die Produktivitäten (pg/Zelle/Tag) wurden nach der Formel  $\text{pg}/((\text{Ct}-\text{Co}) \cdot t / \ln(\text{Ct}-\text{Co}))$  berechnet, wobei Co und Ct die Zellzahl bei Aussaat bzw. Ernte und t die Kultivierungsdauer angibt.

**Beispiel 1:** Einfluss der Energiedosis bei der Herstellung der *feeder*-Zellen auf die Reklonierungseffizienz von CHO-DG-44 Zellen

Um den Einfluss der Energiedosis bei der Herstellung der *feeder*-Zellen auf die Reklonierungseffizienz zu untersuchen, wurden die CHO-DG-44 Zellen wie unter Methoden „Kultivierung der Zellen“ beschrieben kultiviert. Die Herstellung der *feeder*-Zellen erfolgte wie in Methoden „Herstellung von *feeder*-Zellen durch Bestrahlung“ beschrieben mit einer Energiedosis von jeweils 20 Gy, 50 Gy, 100 Gy, 200 Gy und 500 Gy. Nach der Bestrahlung wurden die *feeder*-Zellen in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit einer Zellzahl von ca. 2000 Zellen/well eingesät und in Brutraumatmosphäre gelagert. Im Anschluss erfolgte eine automatisierte Einzelablage mit einer rekombinanten CHO-DG-44 Zelle, die ein fluoreszentes Protein exprimiert, wie unter Methoden „Automatisierte Einzelzellablage“ beschrieben. Hierbei wurde pro Well jeweils eine (1) einzelne Zelle zu den *feeder*-Zellen abgelegt. Als Zielgröße für die Reklonierungseffizienz diente die Anzahl der positiven Wells, d.h. die Wells, in denen sich Klone befanden die nach einer Inkubationszeit von drei Wochen zu einer Zellpopulation heranwuchsen. Die erzielten Reklonierungseffizienzen lagen zwischen 40 und 70% für die Reklonierung von rekombinanten CHO-DG-44 Zellen (vgl. Figur 1).

**Beispiel 2:** Homogenität der Reklonierung von Antikörper-exprimierenden CHO-DG-44 Zellen

Zum Vergleich der Homogenität der Zellklone wurden rekombinante Antikörper-exprimierende CHO-DG-44 Zellen zum einen nach der Standardmethode „Limited dilution“ abgelegt und kloniert und zum andern mittels der hier beschriebenen Einzelzellablage in Gegenwart autologer *feeder*-Zellen abgelegt und kloniert (vgl. Figur 2). Dazu wurden jeweils 6 Zellpools von transfizierten Antikörper-exprimierenden CHO-DG-44 Zellen nach der Limited-dilution-Methode und parallel nach der automatisierten Einzelzellablage, wie unter „Kultivierung der Zellen“ beschrieben, kultiviert und anschließend wie unter „Automatisierte Einzelzellablage“ beschrieben rekloniert. Die daraus entstanden Klone wurden wie unter „Kultivierung der Zellen“ beschrieben kultiviert und über die Dauer von drei Passagen der

Produkttiternach der Methode „Bestimmung der Produktivität rekombinant exprimierter Genprodukte“ bestimmt. Der aus diesen drei Passagen resultierende Mittelwert wurde zur Erstellung der Grafik herangezogen.

**Beispiel 3:** Hochdurchsatzverfahren zur Generierung von Hochtiter-Zellklonen durch Kombination der Expression fluoreszierender Proteinen mit FACS basiertem Zellsortieren und FACS basierter Einzelzellablage

Durch Transfektion von CHO DG44-Zellen mit einem Expressionsvektor, der die bicistronische Expression eines Produktgens (rekombinanter Antikörper) und eines fluoreszierenden Proteins (ZS-Green aus *Zoanthus sp.*) kodiert, wurden Zellpools erhalten, die sowohl den Antikörper als auch das fluoreszierende Protein co-exprimieren. Diese Zellpools wurden nach der bereits beschriebenen Methode in Gegenwart autologer CHO DG44-Feederzellen einzeln in Mikrotiterplatten abgelegt und kultiviert. Die Ablage der Klone wurde mittels drei unterschiedlicher Kriterien durchgeführt.

- A.) Ablage aller lebenden Zellen
- B.) Ablage der 20% am stärksten fluoreszierenden Zellen
- C.) Ablage der 5% am stärksten fluoreszierenden Zellen

Die erhaltenen Klone wurden danach in eine 24-well-Makrotiterplatte überführt und drei Passagen wie unter „Kultivierung der Zellen“ beschrieben, kultiviert. Am Ende jeder Passage wurde der Titer des Antikörpers im Überstand nach der Methode „Bestimmung der Produktivität rekombinant exprimierter Genprodukte“ bestimmt. Der aus diesen drei Passagen resultierende Mittelwert wurde zur Erstellung der Grafik herangezogen. Hierzu wurden die Anzahl der erhaltenen Klone über definierte Titerklassen aufgetragen und einer Normalverteilung angepasst.

## LITERATUR

- Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in molecular biology*. New York : Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. **1994** (updated)
- Bennett, R.P. et al., *BioTechniques* **1998**, 24, 478 - 482
- Brodin et al., *Journal of Immunological Methods*, **1988**, 2, 245-251
- Butcher et al., *Journal of Immunological Methods*, **1988**, 107, 245-251

- Chalfie, M. et al., *Science* **1994**, 263, 802 - 805
- Chamov, S.M. et al., *Antibody Fusion Proteins*, Wiley-Liss Inc., **1999**
- Freshney RI, (eds.), *Animal cell culture: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford **1986**
- Gossen, M. et al., *Curr Opi Biotech* **1994**, 5, 516 - 520
- Grigoriev et al., *Analytical Biochemistry*, **1996**, 236, 250-254
- Harris et al., *Protein Purification : A Practical Approach*, Pickwood and Hames, eds., IRL Press, Oxford, **1995**
- Hlinak A. et al., *Folia Biologica (Praha)* **1987**, 34, 105.117
- Hu, S. et al., *Cancer Res.* **1996**, 56 (13), 3055 - 3061
- Huston, C. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**, 85 (16), 5879 - 5883
- Kaufmann H. et al., *Biotechnology and Bioengineering* 2001, 72, 592-602
- Kortt, A.A. et al., *Protein Engineering* **1997**, 10 (4), 423 - 433
- Long et al., *Journal of Immunological Methods*, **1986**, 86, 89-93
- Lovejoy, B. et al., *Science* **1993**, 259, 1288 - 1293
- Meng YG., et al., *Gene* **2000**, 242, 201-207
- Morgan (eds.), *Kultur tierischer Zellen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1994**
- Mueller et al., *Biotechnology and Bioengineering* **1999**, 65, 529-532
- Pack, P. et al., *Biotechnology* **1993**, 11, 1271 - 1277
- Pack, P. et al., *J Mol Biol* **1995**, 246 (11), 28 - 34
- Peng et al., *Biotechnology and Bioengineering*, **1996**, 50, 479-492
- Perisic, O. et al., *Structure* **1994**, 2, 1217 - 1226
- Pintus et al., *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 61, 195-200
- Puck, TT et al., *J Exp Med* **1958**, 108, 945 - 956
- Rexroad et al., *Molecular Reproduction and Development*, **1997**, 48, 238-245
- Rheinwald, JG and Green, *Cell* **1975**, 6, 331-344
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, **1989**
- Sanchez et al., *Journal of Immunological Methods*, **1991**, 145, 193-197
- Scopes, R., *Protein Purification*, Springer Verlag, **1988**
- Shapiro, *Practical Flow Cytometry*, **1995**, John Wiley and Sons, Inc., New York, 3<sup>rd</sup>. edition
- Shneyour et al., *Plant Science Letters*, **1984**, 33, 293-302
- Strick-Marchand et al., *Mechanisms of Development*, **2003**, 120, 89-98
- Urlaub, G. et al., *Cell* **1983**, 33, 405 - 412

Wee Eng Lim et al., *Proteomics* **2002**, 2, 1187-1203

Williams RL., et al., *Nature* **1988**, 336, 684-687

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Klonierung von Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass weniger als 5 Säugerzellen in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen in einem Kulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt und unter serumfreien Bedingungen kultiviert und vermehrt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass lediglich eine (1) oder zwei (2) Säugierzelle(n) in einem Kulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt und in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert und vermehrt wird (werden).
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine (1) einzelne Säugierzelle in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen in einem Kulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt und unter serumfreien Bedingungen kultiviert und vermehrt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den entsprechend abgelegten Säugerzellen um Hamster- oder Maus-Myeloma-Zellen handelt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den entsprechend abgelegten Hamsterzellen um CHO- oder BHK-Zellen handelt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den entsprechend abgelegten Maus-Myeloma-Zellen um NS0-Zellen handelt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die entsprechend abgelegten Säugerzellen in einer serumfreien Suspensionskultur vermehrt werden.



8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den *feeder*-Zellen um an serumfreies Medium adaptierte und um nicht adhärent kultivierte Zellen handelt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass Hamsterzellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den entsprechend abgelegten Säugerzellen um CHO- oder BHK-Zellen handelt und dass Maus-Myeloma-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den entsprechend abgelegten Säugerzellen um NS0-Zellen handelt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass CHO-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den entsprechend abgelegten Säugerzellen um eine CHO-Zellen handelt, dass BHK-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den entsprechend abgelegten Säugerzellen um BHK-Zellen handelt, und dass NS0-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den entsprechend abgelegten Säugerzellen um NS0-Zellen handelt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die entsprechend abgelegten Säugerzellen in Gegenwart von 100 bis 200.000 *feeder*-Zellen pro mL Medium vermehrt werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die entsprechend abgelegten Säugerzellen bis zu einer Dichte von  $4 \times 10^6$  Zellen / mL Medium kultiviert und vermehrt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Reklonierungseffizienz bei der Reklonierung entsprechend abgelegter CHO-Zellen 10 bis größer 65%, bei der Reklonierung der entsprechend abgelegter BHK-Zellen 10 bis größer 50% und bei der Reklonierung der entsprechend abgelegter NS0-Zellen 10 bis größer 45% beträgt.

14. Verfahren zur Herstellung eines Proteins in Säugerzellen unter serumfreien Bedingungen, dadurch gekennzeichnet,

- a) dass Säugerzellen ein Gen von Interesse enthalten, das für ein Protein von Interesse kodiert;
- b) die Säugerzellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden, die eine Vermehrung der Säugerzellen erlauben;
- c) jeweils weniger als fünf, vorzugsweise vier, drei, zwei oder eine (1) dieser Säugerzelle(n) in ein Zellkulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt werden;
- d) die entsprechend abgelegten Säugerzellen in Gegenwart von autologen *feeder*-Zellen unter serumfreien Bedingungen vermehrt werden;
- e) die vermehrten Zellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden, unter denen das Gen von Interesse exprimiert wird; und
- f) das Genprodukt anschließend aus den Zellen einschließlich der Membran oder dem Kulturüberstand isoliert und gereinigt wird.

15. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins in Säugerzellen unter serumfreien Bedingungen, dadurch gekennzeichnet,

- a) dass Säugerzellen mit einem Gen transfiziert werden, das für ein Protein von Interesse kodiert;
- b) die transfizierten Säugerzellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden, die eine Vermehrung der transfizierten Zellen erlauben;
- c) jeweils weniger als 5, vorzugsweise 4, 3, 2 oder 1 transfizierte Säugerzellen in ein Zellkulturgefäß mit autologen *feeder*-Zellen unter serumfreien Bedingungen abgelegt werden;
- d) die entsprechend abgelegten Zellen in Gegenwart der autologen *feeder*-Zellen unter serumfreien Bedingungen vermehrt werden;
- e) die vermehrten Zellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden, unter denen das Gen von Interesse exprimiert wird; und
- f) das Genprodukt anschließend aus den Zellen oder dem Kulturüberstand isoliert und gereinigt wird.

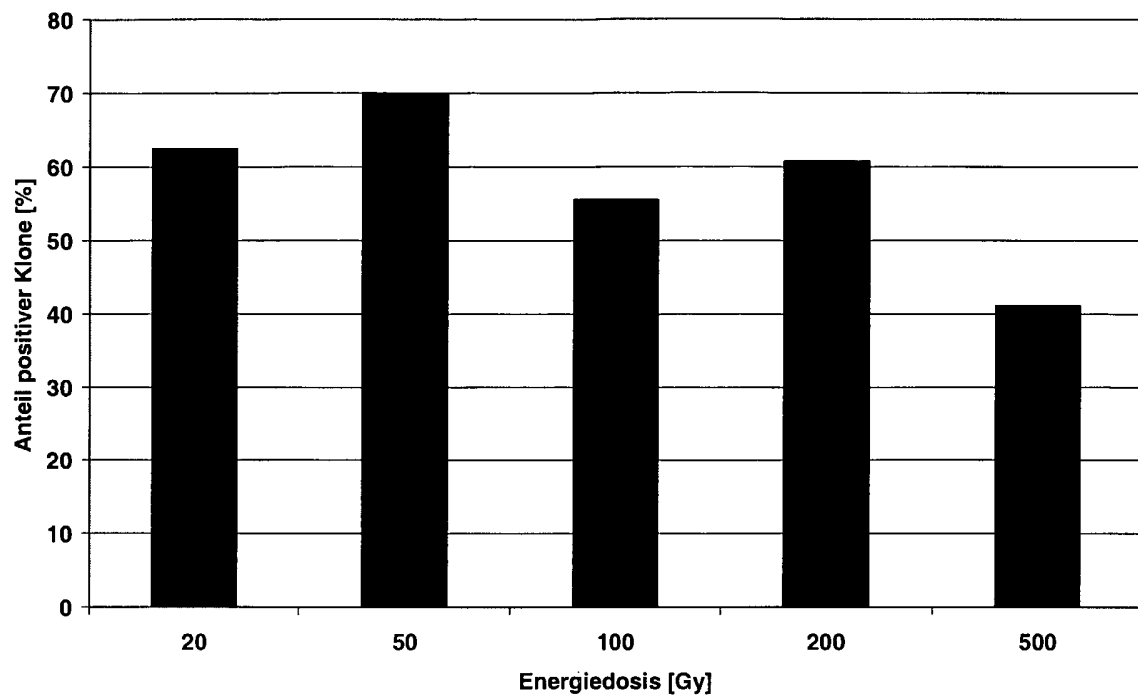
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass unter Punkt c) lediglich eine (1) einzelne Säugerzelle pro Zellkulturgefäß abgelegt wird.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die abgelegte Säugerzelle zusätzlich für ein fluoreszentes Protein kodiert und die abgelegten Säugerzellen mittels FACS-basierter Zellsortierung in ein Zellkulturgefäß unter serumfreien Bedingungen abgelegt werden.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Säugerzellen um Hamster- oder Maus-Myeloma-Zellen handelt.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Hamsterzellen um CHO- oder BHK-Zellen handelt.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Maus-Myeloma-Zellen um eine NS0-Zelle handelt.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den *feeder*-Zellen um an serumfreies Medium adaptierte und um nicht adhärent kultivierte Zellen handelt.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass Hamsterzellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den Säugerzellen um CHO- oder BHK-Zellen handelt, u n d dass Maus-Myeloma-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei der/den Säugerzelle(n) um NS0-Zellen handelt.
23. Verfahren nach Anspruch 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass CHO-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den Säugerzellen um CHO-Zellen handelt, dass BHK-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den Säugerzellen um BHK-Zellen handelt u n d dass NS0-Zellen als *feeder*-Zellen verwendet werden, wenn es sich bei den Säugerzellen um NS0-Zellen handelt.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die sortierte(n) und abgelegte(n) Säugierzelle(n) in Gegenwart von 100 bis 200.000 *feeder*-Zellen pro mL Medium vermehrt wird (werden).
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die sortierte(n) und abgelegte(n) Säugierzelle(n) bis zu einer Zelldichte von  $4 \times 10^6$  Zellen / mL Medium kultiviert wird (werden).
26. Verwendung einer Hamsterzelle als *feeder*-Zelle.
27. Verwendung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Hamsterzelle physikalisch oder chemisch inaktiviert wird.
28. Verwendung nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Hamsterzelle an serumfreie Kulturbedingungen adaptiert ist.
29. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Hamsterzelle um eine CHO oder BHK-Zelle, oder um Abkömmlinge/Derivate dieser Zelllinien handelt.
30. Verwendung einer NS0 Zelle als *feeder*-Zelle.
31. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass die NS0-Zelle physikalisch oder chemisch inaktiviert wird.
32. Verwendung nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die NS0-Zelle an serumfreie Kulturbedingungen adaptiert ist.
33. Zusammensetzung bestehend aus einem serumfreien Zellkulturmedium, weniger als fünf teilungsfähigen Säugierzellen und zu den teilungsfähigen Säugierzellen autologe *feeder*-Zellen.

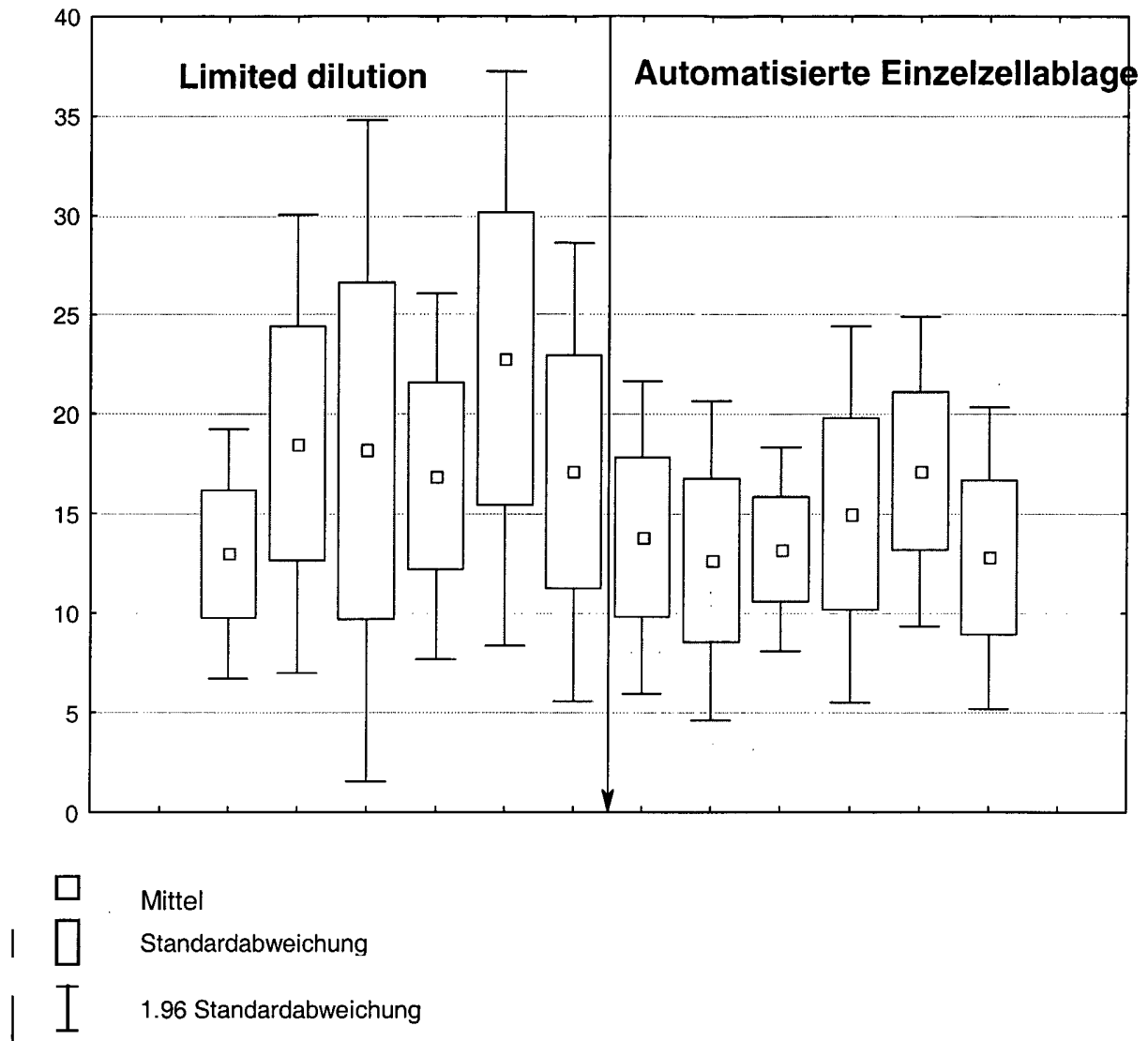
34. Zusammensetzung nach Anspruch 33, wobei die Zusammensetzung lediglich eine oder zwei in dem Kulturmedium teilungsfähige Säugierzelle(n) enthält.
35. Zusammensetzung nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung Hamsterzellen als *feeder*-Zellen enthält, wenn es sich bei der/den teilungsfähigen Säugierzelle(n) um CHO- oder BHK-Zellen handelt und dass die Zusammensetzung Maus-Myeloma-Zellen als *feeder*-Zellen enthält, wenn es sich bei der/den teilungsfähigen Säugierzelle(n) um NS0-Zellen handelt.
36. Zusammensetzung nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung CHO-Zellen als *feeder*-Zellen enthält, wenn es sich bei der/den teilungsfähigen Säugierzelle(n) um CHO-Zellen handelt, dass die Zusammensetzung BHK-Zellen als *feeder*-Zellen enthält, wenn es sich bei der/den teilungsfähigen Säugierzelle(n) um BHK-Zellen handelt, und dass die Zusammensetzung NS0-Zellen als *feeder*-Zellen enthält, wenn es sich bei der/den teilungsfähigen Säugierzelle(n) um NS0-Zellen handelt.

1/4

Figur 1

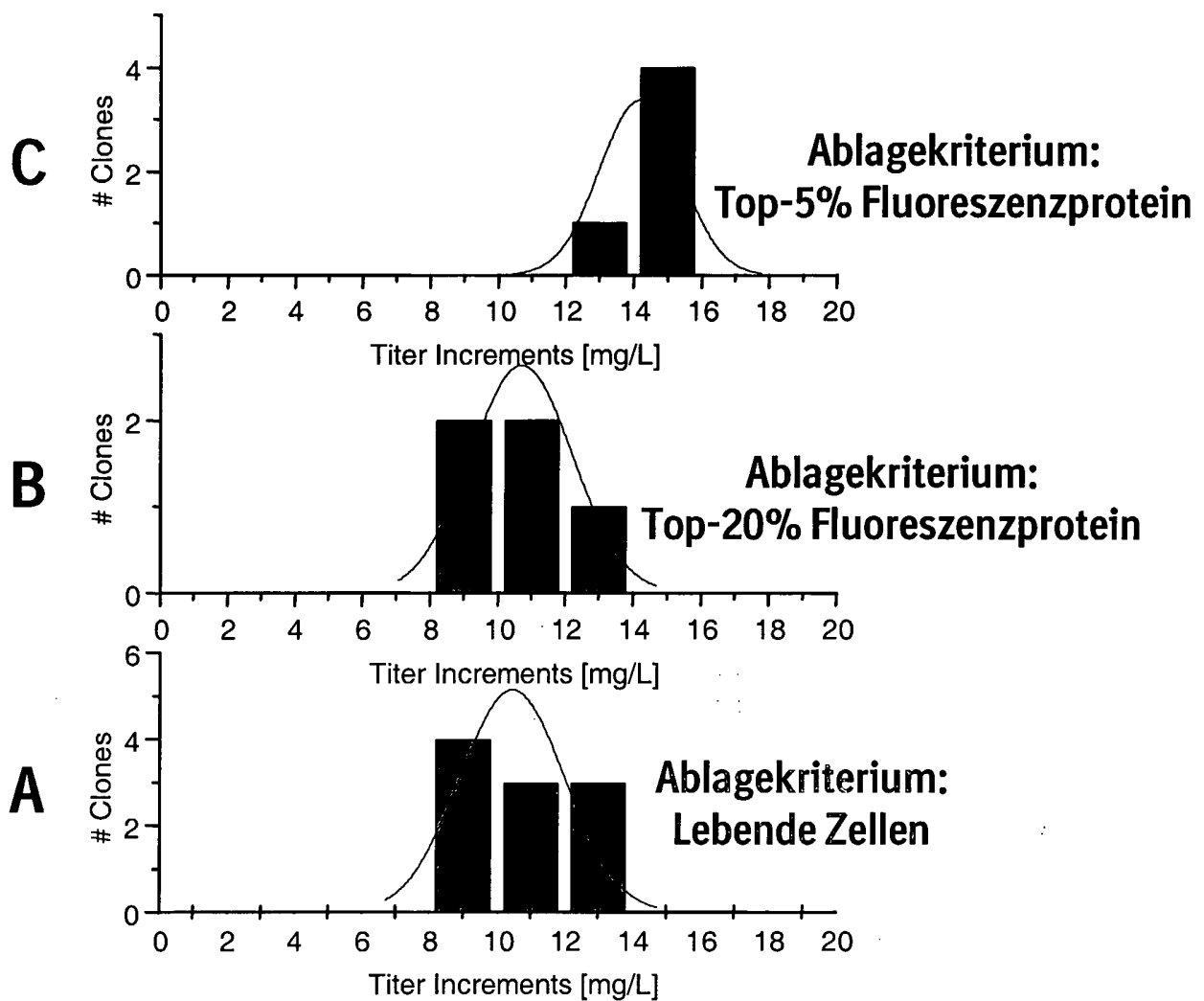


Figur 2



3/4

Figur 3a





Figur 3b

