



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년09월21일  
 (11) 등록번호 10-1184572  
 (24) 등록일자 2012년09월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 5/07* (2010.01)  
 (21) 출원번호 10-2006-7003371  
 (22) 출원일자(국제) 2004년08월17일  
 심사청구일자 2009년08월14일  
 (85) 번역문제출일자 2006년02월17일  
 (65) 공개번호 10-2006-0065706  
 (43) 공개일자 2006년06월14일  
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2004/009204  
 (87) 국제공개번호 WO 2005/019442  
 국제공개일자 2005년03월03일  
 (30) 우선권주장  
 103 38 531.2 2003년08월19일 독일(DE)

- (56) 선행기술조사문헌  
 US05459058 A

전체 청구항 수 : 총 14 항

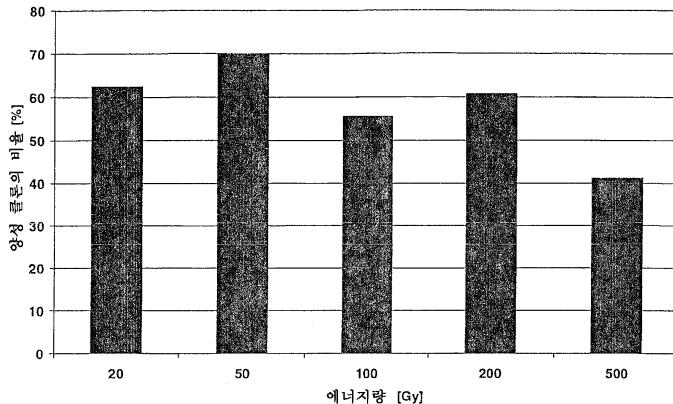
심사관 : 이효진

- (54) 발명의 명칭 생산 세포를 재클로닝하는 방법

**(57) 요 약**

본 발명은, 생물의약품의 제조에 사용되는 포유동물 세포, 바람직하게는 햄스터 또는 마우스 골수종 세포의 클론을, 고도의 자동화 및 생산량으로, 선별하고 재클로닝하는 신규 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상용하는 세포의 개별 세포 클론을 분주하고 복제하는 방법, 개별적인 세포 분주에 의해 수득되고 복제된 세포를 사용하여 단백질을 제조하는 방법, 및 개별 세포의 복제를 허용하는 조성물에 관한 것이다.

**대 표 도 - 도1**



(72) 발명자  
**오토 칼프**  
독일 88422 오겔스하우젠 레르헨벡 11

**크리그 토마스**  
독일 88444 웜멘도르프 라이첸바赫 벡 28

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

5개 미만의 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 세포를, 자가 피더 세포(autologous feeder cell)가 존재하고 무혈 청 조건인 배양 용기 내에 분주(depositing)하고, 무혈청 조건하에 배양하고 복제시키고,

이때, 상기 분주된 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 세포를 무혈청 혼탁 배양으로 복제하고,

상기 자가 피더 세포가 무혈청 배지에 적응되어진 비-부착 배양된 세포이고,

상기 분주된 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 세포의 상기 배양 및 복제의 재클로닝 효율이 10% 내지 70%임을 특징으로 하는, 세포의 클로닝 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 단지 1개 또는 2개의 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 세포(들)를 자가 피더 세포가 존재하고 무혈청 조건인 배양 용기 내에 분주하고, 무혈청 조건하에 배양하고 복제시킴을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 1개의 단일 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 세포를 자가 피더 세포가 존재하고 무혈청 조건인 배양 용기 내에 분주하고, 무혈청 조건하에 배양하고 복제시킴을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 분주된 햄스터 세포가 CHO 또는 BHK 세포임을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 분주된 마우스 골수종 세포가 NS0 세포임을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

삭제

### 청구항 8

삭제

### 청구항 9

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 분주된 햄스터 세포가 CHO 또는 BHK 세포인 경우에 햄스터 세포를 피더 세포로서 사용하고, 상기 분주된 마우스 골수종 세포가 NS0 세포인 경우에 마우스 골수종 세포를 피더 세포로서 사용함을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 10

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 분주된 햄스터 세포가 CHO 세포인 경우에 CHO 세포를 피더 세포로서 사용하고, 상기 분주된 햄스터 세포가 BHK 세포인 경우에 BHK 세포를 피더 세포로서 사용하고, 상기 분주된 마우스 골수종 세포가 NS0 세포인 경우에 NS0 세포를 피더 세포로서 사용함을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 11

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 분주된 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 세포를 배지(ml) 당

100 내지 200,000개 피더 세포의 존재 중에 복제시킴을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 분주된 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 세포를 배지(ml) 당  $4 \times 10^6$ 개의 세포 밀도 이하로 배양하고 복제시킴을 특징으로 하는 방법.

**청구항 13**

제5항에 있어서, 재클로닝 효율이, 상기 분주된 CHO 세포의 재클로닝 동안에 10% 내지 70%임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

무혈청 세포 배양 배지, 분열 능력을 가진 5개 미만의 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 세포, 및 분열 능력을 가진 상기 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 세포와 자가성인 피더 세포로 이루어진, 제1항에 따른 방법에 사용하기 위한 조성물.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 배양 배지 내에서 분열 능력을 가진 단지 1개 또는 2개의 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 세포(들)를 함유하는 조성물.

**청구항 35**

제33항 또는 제34항에 있어서, 분열 능력을 가진 햄스터 세포가 CHO 또는 BHK 세포인 경우에 햄스터 세포를 피더 세포로서 함유하고, 분열 능력을 가진 마우스 골수종 세포가 NSO 세포인 경우에 마우스 골수종 세포를 피더 세포로서 함유함을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 36**

제33항 또는 제34항에 있어서, 분열 능력을 가진 햄스터 세포가 CHO 세포인 경우에 CHO 세포를 피더 세포로서 함유하고, 분열 능력을 가진 햄스터 세포가 BHK 세포인 경우에 BHK 세포를 피더 세포로서 함유하고, 분열 능력을 가진 마우스 골수종 세포가 NSO 세포인 경우에 NSO 세포를 피더 세포로서 함유함을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 37**

삭제

**명세서****기술분야**

[0001] 본 발명은 세포 배양 기술 분야에 관한 것으로서, 생물의약품의 제조에 중요한 세포, 바람직하게는 세포주를 복제/클로닝하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 개개의 세포 분주(depositing)에 의해 수득되고 복제되어진 세포를 사용하여 단백질을 제조하는 방법, 및 개개의 세포의 복제를 허용하는 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002]

포유동물 세포 내에서 생물학적 활성 단백질 또는 치료학적 단백질, 소위 생물의약품의 생물공학적 제조를 위하여, 상응하는 포유동물 세포를 생물학적 활성 단백질 (또는 이의 아단위체)을 암호화하는 DNA로 안정하게 형질감염시킨다. 형질감염 공정 후, 상이하게 형질감염된 수많은 세포들의 수집물(pool)이 통상적으로 수득된다. 따라서, 효율적인 생산 세포주의 제조를 위한 중요한 단계는, 한편으론 매우 안정하게 성장하고 다른 한편으론 치료학적 단백질의 높은 비생산성(specific productivity) (생성물 형성 등)을 보이는 세포 클론의 선별 및 복제 단계이다. 수많은 상이한 생성물-발현 세포들이 있기 때문에, 매우 건강하게 성장하고 또한 높은 생성물 역가를 산출하는 적합한 후보물(단일 세포 클론)을 분류해내기 위하여, 자동화기기를 사용하여 고효율로 다수의 세포를 개별적으로 분석할 수 있는 것이 중요하다. 이러한 단일 세포 분리 및 계대배양의 과정은 클로닝 또는 재-클로닝으로서 알려졌다.

[0003]

형질감염된 세포는, 예를 들어 치료학적 단백의 발현과 마커 단백질의 발현을 연결시키는, 형광-활성화 세포 분류(FACS)에 의해 선별될 수 있다. 이를 위하여, 예를 들어 애퀴레아 빅토리아(*Aequorea victoria*), 레닐라 레니포미스(*Renilla reniformis*) 또는 기타 종의 형광 단백질 및 이의 변이체, 예를 들면 디스코소마 종(*Discosoma sp.*), 아네모니아 종(*Anemonia sp.*), 클라불라리아 종(*Clavularia sp.*), 조안투스 종(*Zoanthus sp.*)과 같은 비-생물발광성 유기체의 적색, 황색, 보라색, 녹색 형광 단백질 또는 이의 변이체가 치료학적 단백질과 함께 세포 내에서 공동-발현될 수 있다. 세포의 비생산성 및 성장 특징에 관하여, 형광 강도로 부터 결론을 유추할 수 있다.

[0004]

그러나, 마우스 골수종(NSO), 햄스터 난소(CHO) 또는 햄스터 신장 세포(BHK)와 같은 전형적인 재조합 생산 세포가 특히 무혈청 혈탁 배양물, 즉 현재 생산-관련 세포 배양 조건하에 개별적 배양 용기 내에서, 예를 들어 무혈청 배양 조건하의 미세역가 플레이트의 웰 내에서 성장되도록 적응된다면, 이러한 전형적인 재조합 생산 세포를 분주하고 이들을 효과적으로 복제(재클로닝)하는데 문제가 있다. 단지 소수의 세포, 예를 들면 5개 미만의 세포가 무혈청 조건하의 배양 용기 내에 분주된다면, 이들 세포들은 전혀 복제할 수 없거나, 적어도 효율적으로 복제할 수 없다. 이에 대한 이유는 세포-대-세포 접촉의 부재, 낮은 세포 밀도에서 더 많은 영양물/성장 인자의 요구 및/또는 확산가능한 시그널 및 조건화(conditioning) 인자의 부재 또는 매우 낮은 농도 때문인 것으로 추정된다.

[0005]

종래의 기술에서는, 상기한 재조합 생산 세포에 있어서 무혈청 단일 세포 클로닝의 문제는 제한 회석법에 의해 세포 클론을 생성시키는 방법으로 회피되었다. 이 경우에, 최소 5 대지 10개 세포를 배양 디쉬 내의 무혈청 배지 중에 시딩한 다음, 통계학적 관점에서, 유전학적으로 동일한 세포로 이루어진 배양물을 수득하기 위하여, 반복된 회석 클로닝에 의해 계대배양한다 (방법 = 제한 회석). 한편으론, 이러한 재클로닝 방법은 시간-소모적이고, 다른 한편으론 상기 방법이 통계학적 계산에 의한 것이지, 개별적으로 분주된 유전학적으로 동일한 세포의 실제 배양에 의한 것이 아니기 때문에, 유전학적으로 이종성인 혼합 배양물이 수득되는 것이 통상적이다. 이들 이종성 혼합 배양물은, 일반적으로, 발효 및 이종성 발현 측면에서 제한 견고성(robustness)을 특징으로 한다.

[0006]

다른 방법으로, 현재, 생산-관련 세포주의 단일 세포 클론은 혈청-적응된 부착 세포(serum-adapted adherent cell)를 개별적으로 분주함으로써 생성될 수 있을 뿐이다. 따라서, 멩 등(Meng et al., (2000))은, 예를 들어 혈청-함유 배지에서 부착 성장하는, 개개의 CHO 세포를 분주하는 방법을 거론한다. 그러나, 멩 등에 의해 기술된 방법에는 다음과 같은 중대한 단점이 있다: 세포의 부착 때문에, 기질로부터 세포를 효소에 의해 힘들게 분리 (트립신 처리)하는 경우에, 세포가 상당히 손상될 수 있고 재클로닝된 세포의 성장 특징 및 생산성에 변화가 생길 수 있다. 더구나, 그 다음, 상응하게 수득된 개개의 클론을 혈탁 배양 중의 무혈청 성장에 적응시켜야 하는데, 이는 통상적으로 시간-소모적 작업이고 세포의 생산성 및 생성물 품질에 영향을 미친다 [이 주제에 관하여, 특히 문헌(Kaufmann et al., 2001; Mueller et al., 1999) 참조].

[0007]

부착 성장 세포의 배양에서 피더 세포(feeder cell)로서 알려진 영양 세포를 사용함으로써, 세포의 성장 특징에 보다 좋게 영향을 주거나, 또는 일부 유형의 세포에 대하여는, 이들을 처음으로 세포 배양 조건하에 복제하는 것이 가능해졌다. 예로는 사람-마우스 또는 마우스-마우스 하이브리도마 세포 (Hlinak et al 1988, US 5,008,198), 초기 각질형성세포 (Rheinwald and Green, 1975; WO 9954435), 줄기 세포 (Williams et al., 1988) 및 각종 종양 세포 (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)가 포함된다. 통상적으로, 피더 세포(feeder cell)는 이의 성장이

화학적 또는 물리적으로 정지되고, 특별한 예비-처리의 결과로서 이의 세포 분열 능력은 상실되었으나, 평균 약 2 내지 3 주 동안 여전히 생명을 유지하는 세포이다. 따라서, 피더 세포는 성장-촉진 인자를 배지로 여전히 분비할 수 있으므로, 비-정지된 세포의 초기 성장을 촉진할 수 있거나, 각종 초기 세포(primary cell)의 경우에는 상기 성장을 가능하게 할 수도 있다. 이러한 목적을 위하여, 피더 세포를 배양 디쉬 내에 소위 단층으로 플레이팅한다. 이어서, 배양될 부착 성장 세포를 피더 세포 위에 또는 사이에 플레이팅하고, 표준 조건하에 배양한다. 피더 세포를, 예를 들어 방사선조사 또는 마이토신 C (아지리노[2',3':3,4]파롤로[1,2-a]인돌-4,7-디온, 6-아미노-8-[[[(아미노카보닐)옥시]메틸]-1,1a,2,8,8a,8b-헥사하이드로-8a-메톡시-5-메틸-, [1aR-(1a.알파., 8.베타., 8a.알파., 8b.알파.)]-(9C1) (Butcher et al., 1988))로 처리하여, 수득한다. 비장 세포, 섬유아세포, 혈액 세포와 같은 초기 세포 [참조 문헌: Morgan, Darling; Kultur tierischer Zellen [culture of animal cells]. Spektrum Akademischer Verlag 1994, p. 115f] 및 대식세포[참조 문헌: Hlinak et al., 1987]가 피더 세포 시스템에 기재되어있다. 하이브리도마 세포 내의 항체의 생성과 관련하여, 피더 세포 및 FACS-이용 세포 선별의 사용이 기재되어있다. 문헌[Hlinak et al. (1987)]에는, 예를 들어 배양 디쉬 당 2개의 세포로부터 출발하는 부착 성장 하이브리도마 세포의 재클로닝에서 33 내지 57%의 재클로닝 효율이 기재되어있다. 사용된 하이브리도마 세포는 혈청-함유 배지에 적응된 부착 성장 세포였다.

[0008] 생산 세포를 생성하기 위하여 이종의, 특히 사람 피더 세포를 사용하는 경우에, 예를 들어 바이러스, 세균 또는 미코플라즘(mycoplasma)과 같은 병원체에 의해 오염될 위험이 상당하다. 또한, 기술된 (초기) 피더 세포의 대부분은 혈청-함유 배지를 요구하는데, 이는 첫째 오염 위험을 증가시키고, 둘째 힘들게 무혈청 성장에 적응시킨 생산 세포를 재-적응시켜야하는 단점을 가진다.

[0009] 이종성 피더 세포를 사용하는 경우에, 일반적으로 피더 세포를 역-선별할 필요가 있다. 일반적으로, 생산 세포는, 예를 들어 배지에 대한 침가제 (G418과 같은 항생제) 및/또는 불완전 배지(하이포크산틴, 티미딘의 부재)의 사용의 결과로서, 선별 압력에 처해진다. 이러한 선별 압력에 의해, 예를 들어 재조합 단백질에 대한 상응하는 유전 정보를 받아들여 통합한 세포를 선별할 수 있다. 이와 같이 제조된 생산 세포에 적응된 배지는 피더 세포의 성장에 부정적인 영향을 주며, 그 밖의 부적합한 생산 배지와 함께, 피더 세포의 매우 급속한 사멸을 초래한다. 결과로서, 피더 세포의 기능은 더 이상 보장되지 않는다.

#### 0010] 발명의 개요

[0011] 본 발명의 한 가지 목적은, 5개 미만의 세포, 바람직하게는 1개의 단일 세포로부터 출발하는 생산-관련 포유동물 세포가 무혈청 조건하에 혼탁 배양으로 복제될 수 있도록 허용하는 효율적인 재클로닝 방법을 모색하기 위한 것이다. 특히, 상기 목적은, 햄스터 기원의 분리된 CHO 또는 BHK 세포 및 마우스 기원의 분리된 골수종 세포, 예를 들어 NSO 세포를 재클로닝하기 위한 상응하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 상응하는 재클로닝 방법, 특히 햄스터 또는 마우스 골수종 세포의 재클로닝 방법을 수행할 수 있도록 하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 이를 목적은, 특히 청구범위에서 정의된 바와 같은 본 발명에 따른 대상을 수단으로 하여 달성되며, 본 발명의 일 양태에 따르면 이러한 수단은, 5개 미만, 바람직하게는 1개 또는 2개의 포유동물 세포(들), 바람직하게는 햄스터 또는 마우스 골수종 세포를 피더 세포, 바람직하게는 자가 기원의 피더 세포의 존재 중에 무혈청 조건하에 배양 용기 내에 분주하고, 무혈청 조건하에 배양하고 복제시킴을 특징으로 하는 세포의 클로닝 방법에 관한 것이다. 하나의 특정 양태로서, 본 발명은, 바람직하게는 세포가 혼탁 배양에서 무혈청 성장에 적응된 경우에, CHO 또는 BHK 세포 (햄스터 세포) 또는 NSO 세포 (마우스 골수종 세포)를 재클로닝하기 위한 상응하는 방법에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 태양은, 분주되고 클로닝될 포유동물 세포가 햄스터 세포, 특히 CHO 세포 또는 BHK 세포인 경우에, 피더 세포로서의 햄스터 세포의 용도에 관한 것이다. 분주되고 클로닝될 세포가 NSO 세포인 경우에, 마우스 골수종 세포를 피더 세포로서 사용하는 것이 바람직하다.

[0015] 또 다른 양태로서, 본 발명은, 클로닝될 포유동물 세포가 CHO 세포인 경우에 CHO 세포를 피더 세포로서 사용하고, 클로닝될 포유동물 세포가 BHK 세포인 경우에 BHK 세포를 피더 세포로서 사용하고, 클로닝될 포유동물 세포가 NSO 세포인 경우에 NSO 세포를 피더 세포로서 사용함을 특징으로 하는 CHO, BHK 또는 NSO 세포를 재클로닝하기 위한 상응하는 방법에 관한 것이다.

[0016] 본 발명에 따른 방법은, 특히 개별적으로 분주된 세포에 대하여 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상의 양호한 재

클로닝 효율을 특징으로 한다. 또 다른 태양에 따르면, 본 발명에 따른 재클로닝 방법은 30% 이상, 바람직하게는 40% 이상, 특히 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 60% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 70% 이상, 더 더욱 바람직하게는 80% 이상의 우수한 재클로닝 효율을 특징으로 한다.

[0017] 이 경우에, 개별적으로 분주된 CHO 세포의 재클로닝에서 10 내지 65% 이상의 재클로닝 효율, 개별적으로 분주된 BHK 세포의 재클로닝에서 10 내지 50% 이상의 재클로닝 효율, 및 개별적으로 분주된 NSO 세포의 재클로닝에서 10 내지 45% 이상의 재클로닝 효율이 효율적인 것으로 간주된다. 배양 디쉬당 1개 이상의 세포, 예를 들어 2개, 3개 또는 4개 세포가 분주된 경우에, 당해 목적하는 세포에 대한 재클로닝 효율은 CHO, BHK 및 NSO 세포의 재클로닝에 대해 특정된 값 이상이다.

[0018] 또 다른 양태로, 본 발명은, 클로닝될 세포가 배지 ml 당 100 내지 200,000개의 피더 세포의 존재 중에 복제되는, 포유동물 세포, 특히 햄스터 또는 마우스 골수종 세포를 재클로닝하기 위한 상응하는 방법에 관한 것이다.

[0019] 또한, 본 발명은, 본 발명에 따른 클로닝 방법 중의 하나에 의해 성장되어진, 무혈청의 비-부착 성장의 포유동물 세포 내에서 단백질, 바람직하게는 재조합 단백질을 제조하는 방법, 특히

[0020] a) 목적하는 유전자 산물을 발현하는 포유동물 세포를, 목적하는 세포의 복제를 허용하는 무혈청 조건하에서 배양하는 단계;

[0021] b) 5개 미만, 바람직하게는 1개 또는 2개의 상응하는 포유동물 세포를 무혈청 조건하에 1개의 세포 배양 용기 내에 분주하는 단계;

[0022] c) 상응하게 분주된 세포를 무혈청 조건하에 자가 피더 세포의 존재 중에 복제하는 단계;

[0023] d) 복제된 분주된 세포를, 목적하는 유전자가 발현되는 무혈청 조건하에 배양하는 단계; 및

[0024] e) 목적하는 유전자에 의해 암호화된 유전자 산물을, 막을 포함하는 세포로부터 또는 배양 상청액으로부터 회수하고 정제하는 단계

[0025] 를 포함하는, 무혈청 조건하에서 예를 들어 CHO, BHK 또는 NSO 세포와 같은 상응하게 클로닝된 햄스터 또는 마우스 골수종 세포 내에서 재조합 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0026] 또한, 재조합 유전자 산물의 발현은, 목적하는 유전자 산물을 암호화하는 핵산으로 포유동물 세포를 형질감염시키는 것이 요구된다.

[0027] 포유동물 세포는 예를 들어 수동으로 또는 FACS-이용 분류에 의해 분리되고, 피더 세포와 함께 세포 배양 용기 내에 분주된다. 바람직하게는, 비-부착 배양된 피더 세포가 사용된다.

[0028] 또한, 본 발명은 햄스터 세포, 바람직하게는 CHO 또는 BHK, 및 마우스 골수종 세포, 바람직하게는 NSO 유형을 피더 세포로서 기본적으로 사용하는 것에 관한 것이다. 바람직한 태양에 따르면, 본 발명은 무혈청 배양 조건에 적응된 상응하는 세포의 용도에 관한 것이다.

[0029] 또한, 본 발명은 무혈청 세포 배양 배지, 분열 능력을 가진 5개 미만의 포유동물 세포, 및 당해 분열가능한 포유동물 세포와 자가성인 피더 세포로 이루어진 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 분열 가능한 포유동물 세포는 혼탁 배양으로 무혈청 성장에 적응된 세포이다. 특정 태양으로, 상기 조성물은 상기 배양 배지에서 분열할 수 있는 단지 1개 또는 2개의 포유동물 세포를 함유한다. 분열가능한 포유동물 세포는 바람직하게는 햄스터 세포, 예를 들어 CHO 또는 BHK 세포, 또는 마우스 골수종 세포, 예를 들어 NSO 세포이다.

[0030] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 조성물은, 분열가능한 포유동물 세포(들)가 CHO 세포인 경우에, 햄스터 세포, 바람직하게는 CHO 세포를 피더 세포로서 함유한다. 분열가능한 포유동물 세포(들)가 BHK 세포인 경우에, 상기 조성물은 또한 햄스터 세포, 바람직하게는 BHK 세포를 피더 세포로서 함유한다. 분열가능한 포유동물 세포(들)가 마우스 골수종 세포, 예를 들어 NSO 세포인 경우에, 상기 조성물은 또한 마우스 골수종 세포를 피더 세포로서 함유하고, NSO 세포의 경우에, 바람직하게는 NSO 세포를 피더 세포로서 함유한다.

[0031] 놀랍게도, 혼탁된 자가 피더 세포를 사용함으로써, 단일 포유동물 세포, 바람직하게는 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 세포를 무혈청 배지 및/또는 단백질-부재 배지 내에 분주하여, 배양 성장시킬 수 있으므로, 예를 들어 제한 희석에 의한 재클로닝에 있어서, 또는 모노클로날 세포주를 혼탁 배양 중의 무혈청 성장에 적응시킴에 있어서 위에서 언급된 단점이 극복될 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0032] 본 발명에 따른 방법은, 상응하는 포유동물 세포를 무혈청, 단백질-부재 또는 화학적 합성 생산 배지 내에 세포를 분주할 수 있도록 함으로써, 통상적으로 요구되는 무혈청 또는 단백질-부재 생산 배지에의 적응을 수행할 필요가 없다. 이는 생산-관련 세포주를 확립하는데 있어서 개발 시간을 상당히 감축 (약 50%)시킨다. 게다가, 단일 세포의 분주는 안정한, 동종의 세포 클론을 유도하며, 이는 비록 의약품으로서 승인을 얻기 위한 규제 요건에 관한 것은 아니지만, 생물의약품의 제조에 있어서 결정적으로 중요하다. 또한, 생산-관련 CHO, BHK 또는 NSO 세포의 재클로닝을 위해 자가 피더 세포의 사용, 예를 들어 햄스터 세포, 바람직하게는 CHO 또는 BHK 세포, 또는 마우스 골수종 세포, 바람직하게는 NSO 세포의 사용이, 사람 세포 또는 덜 특성이 규명된 세포의 사용보다, 사람 병원체에 의한 감염 위험을 상당히 저하시킨다.

### 발명의 상세한 설명

[0037] 후술되는 비-제한적인 예시 태양에 의해 본 발명을 보다 상세히 설명하기 전에, 두 형태 중의 하나가 명백히 배제되고 특정 형(단수 또는 복수)을 언급하는 것이 아닌 한, 단수 어미 또는 복수 어미 및 지시어 즉 "당해" 또는 "상기"의 사용이 해당 용어의 단수 또는 복수 모두를 포함하는 것임이 강조되어야 한다. 따라서, 용어 "세포"는, 이것이 단일 세포만을 의미하는 것으로 명백히 기술되지 않는 한, 자동적으로 다수의 세포도 포함한다. 예를 들어, 단수 어미 또는 "하나"에 (1)이 부가되는 경우에는 명백히 단수를 의미한다.

### 정의

[0039] 세포 배양과 관련하여, 용어 "클로닝/재클로닝", "클론/재클론"은 동일한 세포의 세포 집단을 기원 세포로부터 수득할 수 있는 수법을 의미한다. 따라서, 용어 "세포 클로닝" 또는 단일 세포 클로닝"은 상이한 유전형의 세포를 가진 세포 수집물로부터 동정하고 분리한 다음, 복제하여, 유전학적으로 동일한 다수의 세포로 이루어진 세포 집단을 형성시키는 공정을 의미한다. 세포가 개별적으로, 즉 배양 용기 당 단지 1개로 분주된 다음, 증식되어 동일한 세포의 세포 집단을 형성하는 경우에, 당해 공정은 "직접 단일 세포 클로닝"이다. 다수의 세포가 동시에 배양 용기 내에 분주되고, 증식되어 세포 집단을 형성하고, 이것이 반복 회석 (= 제한 회석)에 의해 동일한 세포의 세포 집단으로 분할되는 경우에, 이 공정은 "간접 클로닝" 방법으로서 기술된다.

[0040] 단일 클론은 하나(1)의 단일 세포로부터 기원하는 유전학적으로 동일한 세포이다. 따라서, 동일한 기원의 동일한 세포로 이루어진 세포 집단은 이후 "모노클로날 세포 집단"으로서 지칭된다. 동일 기원 세포의 배양 동안에 계놈의 자연발생적 변화, 예를 들어 돌연변이 및/또는 전좌가 있는 경우에, 이러한 세포 집단의 개개 세포는 본 발명의 목적 하에서 여전히 동일한 세포인 것으로 간주되며, 당해 배양물은 모노클로날 세포 집단으로서 간주된다. 대조적으로, 안정하게 형질감염된 세포(형질감염체)의 수집물은, 유전학적으로 동일한 출발 세포가 동일한 핵산에 의해 형질감염된 경우일지라도, 동일한 계열의 세포 클론이 아니다. 즉, 이들은 모노클로날 세포 집단이 아니다.

[0041] 용어 "서브클론/계대배양물"은, 분열 세포의 1회 또는 수회 계대에 의해 기원 세포 또는 기원 배양물로부터 생성된 상이한 세대의 세포들을 의미한다. 예를 들어 동일한 세포 또는 세포 배양물이 수 세대에 걸쳐 배양되고 복제되는 경우에, "서브클론/계대배양물"이란 단어가 사용된다.

[0042] "효과적 또는 효율적 재클로닝"이란 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 40% 이상의 클로닝 효율을 의미한다. 본 발명의 특히 바람직한 태양에 따르면, 효과적인 재클로닝이란 용어는 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 80% 이상의 효율을 가진 클로닝을 의미한다.

[0043] 용어 "클로닝 효율"은, 분주 후 바람직하게는 50개 이상 세포의 살아있는 세포 집단을 형성할 수 있는 세포 %로서 정의된다. 예를 들어 세포 분류 작업에서 50개 세포가 50개 배양 용기에 두루 분포되고 이들 50개의 개별적으로 분주된 세포 중 25개가 성장하여 배양물을 형성하는 경우에, 클로닝 효율은 50%이다 (50개 중 25개).

[0044] 본 발명의 목적을 위하여, 용어 "분열가능/증식가능"은 적어도 2회, 바람직하게는 4회 계대 이상, 무한히 분열하는 세포/세포 집단의 잠재력을 기술하는 것이다. 이러한 잠재력은 예를 들어 <sup>[137]</sup>Cs의 조사 또는 마이토신 C 처리에 의해 감소되거나 완전히 파괴될 수 있다.

[0045] 용어 "유도체/후손"은 특정 출발 세포로 유전학적으로 역 추적될 수 있고, 예를 들어 (선별 압력의 존재 또는

부재하에) 계대배양에 의해 생성되고/되거나 유전자 조작에 의해 생성되는 세포를 의미한다. 동일한 세포 유형의 세포의 재분리는 또한 용어 "유도체/후손"에 포함된다. 따라서, 예를 들면 모든 CHO 세포주는, 이들이 계대배양, 재-분리 또는 유전자 조작에 의해 수득되었든 간에 상관없이, 문헌[Puck et al., 1958]에 의하면 크리세틀루스 그리세우스(*Cricetulus griseus*)로부터 분리된 햄스터 난소 세포의 유도체/후손이다.

[0046] 용어 "자가 피더 세포"는, 피더 세포 및 이러한 피더 세포의 존재 중에 배양되어질 세포 둘 모두가 분류학적으로 동일한 기원으로부터 유래된 것을 의미한다. 예를 들면, 배양될 세포가 햄스터 (아과 크리세티네 (*Cricetinae*)), 바람직하게는 크리세틀루스(*Cricetulus*) 또는 메소크리세투스(*Mesocricetus*) 속의 세포, 예를 들어 CHO 또는 BHK 세포인 경우에, 상기 아과 기원의 분리된 각 피더 세포는 이를 크리세티네 아과의 햄스터 세포에 자가성인 피더 세포이다. 바람직한 태양에 따르면, 용어 "자가 피더 세포"는 피더 세포 및 배양될 세포 둘 모두가 분류학적으로 동일한 속으로부터 유래되거나 동일한 속(크리세틀루스 또는 메소크리세투스로부터의 세포)으로부터 기원하는 분리된 것을 의미한다. 예를 들어, 배양될 세포가 크리세틀루스 또는 메소크리세투스 속의 햄스터 세포, 바람직하게는 CHO 또는 BHK 세포인 경우에, 해당 속 기원의 분리된 각 피더 세포는 본 발명의 관점에서 자가 피더 세포이다. 또 다른 바람직한 태양에 따르면, 피더 세포 및 배양될 세포가 동일한 종, 예를 들어 크리세틀루스 그리세우스(*Cricetulus griseus*) 또는 메소크리세투스 아우라투스(*Mesocricetus auratus*)로부터 기원하는 경우에 자가 피더 세포가 존재한다. 특히 바람직한 태양에 따르면, 피더 세포 및 배양될 세포 둘 모두가 동일한 종으로부터 기원하고 동일한 조직 향성 (예: 크리세틀루스 그리세우스로부터의 난소 세포 - CHO 세포)를 갖는 경우에, 자가 피더 세포가 존재한다. 특히 바람직한 태양에 따르면, 피더 세포 및 배양될 세포 둘 모두가 동일한 기본 세포로부터 기원하는 경우, 예를 들면 두 세포가 기원상 CHO-DG-44 세포이거나 이들 세포의 후손인 경우에, 피더 세포는 자가 피더 세포이다. 또 다른 바람직한 태양에 따르면, 피더 세포는, 배양될 세포와 마찬가지로, 예를 들면 항생제에 대한 동일한 내성을 부여한다. 이는, 세포 분주가 선별제, 예를 들어 항생제의 존재하에 수행되는 경우에 특히 유리하다.

[0047] 용어 "무혈청"은, 세포가 동물 및/또는 사람 혈청의 부재하에, 바람직하게는 혈청으로부터 분리된 모든 단백질의 부재하에, 바람직하게는 비-재조합적으로 생성된 단백질의 부재하에 성장함을 특징으로 하는 배양 배지 및 배양 조건을 의미한다. 따라서, 용어 "무혈청 조건에 적응된 세포"는 동물 또는 사람 혈청 또는 혈청 단백질의 부재하에 복제될 수 있는 세포를 의미한다.

[0048] 용어 "단백질-부재"는 배양 배지가 임의의 동물 단백질을 함유하지 않음을 의미하며; 세균, 효모 또는 진균으로부터 분리된 단백질은 동물 단백질로서 간주되지 않는다.

[0049] 용어 "화학적 합성"은 무혈청, 바람직하게는 또한 단백질-부재 상태이고, 화학적 합성 물질로 이루어진 세포 배양물을 기술하는 것이다. 따라서, 화학적 합성 배지는 현저하게 순수한 개개 물질의 혼합물로 이루어진다. 화학적 합성 배지의 일례는 제조원[Messrs Invitrogen (Carlsbad, CA, US)]에 의해 제조된 CD-CHO 배지이다.

[0050] "현탁 배양될 수 있는 세포"란 표현은, 액체 배양물 ("현탁 배양물") 중의 성장에 적응되고, 용기, 예를 들면 세포 배양 디쉬 또는 플라스크의 표면에 부착할 수 있는 능력이 제한되거나 상실된 세포를 의미한다. 무혈청 성장 및 현탁액 중의 성장 둘 모두에 적응된 세포는 "무혈청 배지에 적응된 비-부착 세포"로서 지칭된다. 피더 세포가 이러한 배양물로부터 수득된 경우에, 이들 세포는 "무혈청 배지에 적응된 비-부착 피더 세포"로 정의된다.

#### 발명의 설명

[0052] 본 발명은, 5개 미만, 예를 들어 4, 3, 2 또는 1개의 포유동물 세포(들)를 피더 세포가 존재하는 배양 용기, 바람직하게는 자가 피더 세포가 존재하는 무혈청 조건하의 배양 용기 내에 분주하고, 무혈청 조건하에 배양하고 복제시킴을 특징으로 하여, 세포를 클로닝하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 태양에 따르면, 본 발명은, 배양 용기 당 1개 또는 2개 포유동물 세포(들)를 무혈청 조건하에 분주하고 무혈청 조건하에 자가 피더 세포의 존재 중에 배양함을 특징으로 하여, 포유동물 세포를 클로닝하는 상응하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 태양은, 1개의 단일 포유동물 세포를 무혈청 조건하에 자가 피더 세포의 존재 중에 배양 용기 내에 분주하고, 무혈청 조건하에 배양하고 복제시킴을 특징으로 하여, 단일 세포를 클로닝하는 방법에 관한 것이다. 또 다른 바람직한 태양에서 배양될 분주된 세포는 현탁 배양에서 성장하는 세포이다.

[0053] 배양 용기마다 단지 1개의 세포만이 분주되고 복제되어 세포 집단을 형성한다면, 각 개개의 성장 세포 집단은 모노클로날 세포 집단이며 이러한 공정은 직접 단일 세포 클로닝 방법이다. 각 배양 용기 내에 1개 이상, 예를

들어 2, 3 또는 4개의 단일 세포가 분주되고 복제된다면, 성장 세포 집단은 소위 혼합 클론이다. 이후, 이들은 직접 단일 세포 클로닝에 의해 또는 통상의 방법, 예를 들어 세포 집단의 반복 희석 (= 제한 희석)에 의해 소위 통계상의 모노클로날 세포 집단으로 전환될 수 있다[참조 문헌: Morgan, Kultur tierischer Zellen [culture of animal cells], pages 113 and 114, Spektrum Akademischer Verlag 1994].

[0054] 본 발명에 의해 제공된 방법은, 예를 들어 무스(*Mus*) 속의 무리네(*Murinae*) 아과 또는 크리세틀리스(*Cricetulus*) 또는 메소크리세투스(*Mesocricetus*) 속의 크리세티네(*Cricetinae*) 아과의 포유동물 세포 및 이들의 후손/유도체를 포함하여 이들로부터 분리된 세포주를 복제하고 클로닝하는데 특히 사용될 수 있다. 특히 바람직한 방법은, 본 발명에 따른 햄스터 세포 또는 마우스 골수종 및 이로부터 유래된 안정한 세포주를 복제/클로닝하는 방법이다. 따라서, 본 발명은, 클로닝하과자 하는 분주된 포유동물 세포가 햄스터 또는 마우스 골수종 세포임을 특징으로 하는, 피더 세포, 바람직하게는 자가 피더 세포의 존재 중의 세포 클로닝 방법에 관한 것이다.

[0055] 특히 바람직한 태양에 따르면, 본 발명에 따른 방법은 크리세틀루스(*Cricetulus*) 속의 햄스터 (중국 드워프 햄스터(*Chinese dwarf hamster*)) 세포 및 상기 속으로부터 분리되거나 또는 분리된 세포로부터 유래된 안정한 세포주, 예를 들어 CHO, CHO-K1, CHO-DUKX, CHO-DUKX B1 또는 CHO-DG-44 세포 및 이들 세포주의 유도체/후손을 복제/클로닝하는 방법이다. 본 발명에 따른 특히 바람직한 방법은, CHO-DG-44, CHO-DUKX 및 CHO-K1, 특히 CHO-DG-44 및 CHO-DUKX 세포를 자가 피더 세포의 존재 중에 복제하고 클로닝하는 방법이다. 본 발명에 따른 방법을 사용하여, 메소크리세투스 아우라투스(*Mesocricetus auratus*)(시리안 햄스터(*Syrian hamster*))로부터의 세포 및 이로부터 분리되거나 유래된 안정한 세포주, 예를 들면 BHK21 또는 BHK TK<sup>-</sup> 세포 및 이들 세포주의 유도체/후손을 본원에 기재된 방법에 의해 복제하고 클로닝할 수 있다. 따라서, 바람직하게는, 본 발명은 5개 미만, 예를 들어 4, 3, 2 또는 바람직하게는 단지 1개의 세포(들)을 무혈청 조건하에 자가 피더 세포의 존재 중에 배양 용기 내에 분주하고 무혈청 조건하에 배양하고 복제시킴을 특징으로 하여, CHO 또는 BHK 세포 및 이의 유도체/후손을 복제하고 클로닝하는 방법에 관한 것이다.

[0056] 또한, 본 발명은 바람직하게는 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 기원의 마우수 골수종 세포 및 이로부터 분리되거나 유래된 안정한 세포주, 예를 들어 NSO 및 Sp2/0 세포 및 이들 세포주의 유도체/후손을 복제하고 특히 클로닝하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 또한 5개 미만, 예를 들어 4, 3, 2 또는 바람직하게는 단지 1개의 이들 세포를 무혈청 조건하에 피더 세포의 존재 중에 배양 용기 내에 분주하고 무혈청 조건하에 배양하고 복제시킴을 특징으로 한다.

[0057] 본 발명에 따라 복제되고 클로닝될 수 있는 햄스터 및 마우스 세포의 또 다른 예가 아래의 표 1에 상세히 기재되어있다. 이들 세포/세포주의 유도체 및 후손에 추가하여, 기타 포유동물 세포, 예를 들어 사람, 마우스, 래트, 원숭이, 또는 마우스와 햄스터 이외의 설치류를 본 발명에 따른 방법에 의해 복제하거나 클로닝할 수 있다.

## 표 1

햄스터 및 마우스 세포주

세포주	수탁 번호
NSO	ECACC No. 85110503 ATCC CRL1827 ATCC CRL2695, 2696
Sp2/0Ag14	ATCC CRL1581
BHK21	ATCC CCL10
BHK TK <sup>-</sup>	ECACC No. 85011423
HaK	ATCC CCL15
225462.2 (BHK21 유도체 )	ATCC CRL8544
CHO	ECACC No. 8505302
CHO-K1	ATCC CCL61
CHODUKX (= CHO duk, CHO/dhfr)	ATCC CRL9096
CHODUKX B1	ATCC CRL9010
CHODG44	Urlaub et al., Cell 33[2], 405412, 1983
CHO Pro5	ATCC CRL1781
V79	ATCC CCC93
B14AF28G3	ATCC CCL14
CHL	ECACC No. 87111906

[0058]

[0059]

본 발명에 따르면, 상응하는 포유동물 세포가 바람직하게는 무혈청 조건하에서 확립되고 배양되고 분주된다. 이를 단계는 임의로, 동물 단백질/펩티드가 부재하고/하거나 화학적 합성 배지 내에서 수행된다. 시판되는 배지의 예로는 Ham's F12 (Sigma, Deisenhofen, DE), RPMI-1640 (Sigma), 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM; Sigma), 최소 필수 배지 (MEM; Sigma), 이소코브 변형 둘베코 배지 (IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), CHO-S-SFMII (Invitrogen), 무혈청 CHO-배지 (Sigma) 및 단백질 부재 CHO-배지 (Sigma) 등이 있다. 각각의 이들 배지에는 임의로, 각종 화합물, 예를 들어 호르몬 및/또는 성장 인자 (예: 인슐린, 트랜스페린, 표피 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자), 염 (예: 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 인산염), 완충제 (예: HEPES), 뉴클레오시드 (예: 아데노신, 티미딘), 글루타민, 글루코스 또는 기타 동등 영양물, 항생제 및/또는 미량 원소가 보충될 수 있다. 하나 이상의 선별 마커 유전자를 발현하는 유전자 변형된 세포를 선별하기 위하여, 하나 이상의 적절한 선별제, 예를 들어 항생제를 배지에 첨가할 수 있다.

[0060]

현재까지, 세포를 배양하기 위한 피더 세포의 사용은 부착 성장 세포의 배양과 관련하여 기술되었다[참조 문헌: 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]. 본원에서는, 부착 피더 세포가 배양 용기 내에 또는 운반체 상에 세포의 단일 층(단층)으로서 마련되며, 배양될 세포는 이 단층 상에서 성장된다. 피더 세포는 (천연적으로 또는 인공 수단에 의해) 추가 성장 능력을 상실하기 때문에, 배양될 세포는 피더 세포에 의해 과성장되지 않으면서 복제할 수 있다. 피더 세포 및 배양될 세포 둘 모두 부착 성장 세포이다.

[0061]

대조적으로, 또 다른 태양에 따르면, 본 발명은, 부착성 자가 피더 세포를 사용하거나 또는 또 다른 바람직한 태양으로 혼탁액 중에 유지되는 자가 피더 세포를 사용하여, 혼탁액 중에 성장하는 세포를 복제할 수 있다. 혼탁액 중에 유지되는 자가 피더 세포의 사용은, 피더 세포(들) 및 배양될 세포(들) 둘 모두가 동일한 기본 세포로부터 기원하는 경우, 예를 들면 두 세포 모두가 혼탁액 중의 성장에 적응된 기원 세포였던 경우에, 특히 바람직하다. 따라서, 본 발명은 또한 배양될 세포를 혼탁액 중에 유지된 자가 피더 세포의 존재 중에 분주하고, 배양하고, 복제시킴을 특징으로 하여, 위에서 기술된 포유동물 세포를 복제/클로닝하는 방법에 관한 것이다. 특히 바람직한 방법은, 배양될 세포(들)가 혼탁액 중의 성장에 적응된 세포(들)임을 특징으로 하는 상응하는 방법이다. 또한, 이와 관련하여, 세포의 분주 및 분주된 포유동물 세포의 복제를 무혈청 및/또는 단백질 부재 및/또는 화학적 합성 혼탁 배양물에서 수행함을 특징으로 하는, 포유동물 세포를 복제/클로닝하는 상응하는 방법이 바람직하다.

[0062]

본원에 기재된 포유동물 세포의 복제/클로닝에 사용될 자가 피더 세포의 수는 기본적으로, 복제되고 클로닝될 포유동물 세포의 특성에 따라 다르며, 각 유형의 세포에 대한 간단한 적정 실험에 의해 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 포유동물 세포의 복제/클로닝 방법은, 예를 들어 배지(ml) 당 적어도 100개 이상의 자가 피더 세포, 바람직하게는 배지(ml) 당 100 내지 200,000개의 자가 피더 세포의 존재 중에 수행된다. 또 다른 바람직한 태양에서, 포유동물 세포의 복제/클로닝은 배지(ml) 당 500 내지 50,000개의 자가 피더 세포의 존재 중에 수행된다. 보다 바람직한 방법은, 포유동물 세포의 복제/클로닝이 배지(ml) 당 500 내지 10,000개의 자가 피더 세포, 바람직하게는 배지(ml) 당 2,000 내지 10,000개의 자가 피더 세포의 존재 중에 수행되는 방법이다.

[0063]

용어 "자가 피더 세포"의 정의에 따르면, 본 발명은, 복제/클로닝하고자 하는 분주된 포유동물 세포가 CHO 또는 BHK 세포일 때, 햄스터 세포, 바람직하게는 크리세티네(*Cricetinae*) 아과, 보다 바람직하게는 크리세툴루스 (*Cricetus*) 또는 메소크리세투스(*Mesocricetus*) 속의 세포를 피더 세포로서 사용하고, 복제/클로닝하고자 하는 분주된 포유동물 세포가 NSO 세포일 때, 마우스 골수종 세포를 피더 세포로서 사용함을 특징으로 하는, 포유동물 세포의 복제/클로닝 방법에 관한 것이다. 또한, 복제/클로닝하고자 하는 분주된 포유동물 세포가 CHO 세포일 때 CHO 세포를 피더 세포로서 사용하고, 복제/클로닝하고자 하는 분주된 포유동물 세포가 BHK 세포일 때 BHK 세포를 피더 세포로서 사용하고, 복제/클로닝하고자 하는 분주된 포유동물 세포가 NSO 세포일 때 NSO 세포를 피더 세포로서 사용함을 특징으로 하는 포유동물 세포의 복제/클로닝 방법이 바람직하다.

[0064]

배양하고자 하는 분주된 포유동물 세포가 선별제의 존재하에서 배양되는 경우에, 내성을 부여하는 선별 마커 유전자를 또한 가진 자가 피더 세포를 사용하는 것이 적당한데, 이는 선별제의 존재하에서 피더 세포가 너무 급속하게 사멸되는 것을 방지할 수 있기 때문이다. 따라서, 본 발명은 또한, 5개 미만, 예를 들어 4, 3, 2 또는 1개의 이들 포유동물 세포를 무혈청 조건하에 자가 피더 세포의 존재 중에 배양 용기 내에 분주하고, 무혈청 조건하에 배양하고 복제시키고, 이때 자가 피더 세포 및 분주된 포유동물 세포(들)가 각각 선별제에 내성을 부여하는 하나 이상의 선별 마커 유전자를 가지며, 클로닝될 포유동물 세포(들)의 복제가 적어도 피더 세포 및 클로닝될 포유동물 세포 둘 모두가 내성을 갖는 선별제가 존재하는 무혈청 조건하에 일어남을 특징으로 하는, 세포,

특히 위에서 언급된 햄스터 또는 마우스 골수종 세포의 클로닝 방법에 관한 것이다.

[0065] 자가 피더 세포는, 예를 들어 방사선원을 조사함으로써, 예를 들면 세슘 동위원소  $^{137}\text{Cs}$ 를 조사함으로써 생성될 수 있다. 1 내지 1,000 Gy의 에너지량을 조사하는 것이 본원에 기재된 자가 피더 세포의 존재 중에 포유동물 세포를 복제/클로닝하는 방법에 유리하다. 10 내지 500 Gy, 보다 유리하게는 20 내지 200 Gy의 에너지량을 사용하는 것이 특히 유리하다. CHO 세포의 클로닝과 관련하여, 자가 피더 세포, 바람직하게는 CHO 세포의 사용이 유리하며 1 내지 500 Gy의 에너지량의 조사 후에 클로닝 효율의 수준이 높아진다는 것이 밝혀졌다. 20 내지 100 Gy, 바람직하게는 약 50 Gy의 에너지량을 조사한 자가 피더 세포를 사용하는 것이 특히 유리한 것으로 입증되었다. 이론적으로, 각 세포에 대한 최적 에너지량은, 실시예에 기재된 방법과 유사하게, 피더 세포를 상이한 총량의 조사량으로 처리하고 클로닝 효율을 조사량의 함수로서 결정하는 방법으로 실험을 통해 결정할 수 있다.  $^{137}\text{Cs}$  및  $^{60}\text{Co}$  (코발트 동위원소 60)를 이용한 감마선 조사에 추가하여, 예를 들어 UV 조사, 전자 조사, 방사선 조사, 중성자 조사 및 마이크로파 조사에 의한 처리도 또한 적합하다.

[0066] 본 발명에 따른 포유동물 세포의 복제/클로닝 방법에서, 피더 세포는 바로 사용되거나, 또는 예를 들어 액체 질소로 냉동보존한 후에 사용될 수 있다. 포유동물 세포를 냉동보존하는 방법은 당업계에 공지되었으며, 예를 들어 본원에 참조로서 인용된 문헌[Freshney (editor), Animal Cell culture a practical approach, IRL-Press 1986, pages 73 - 78]에 기재되어있다.

[0067] 본 발명의 방법은, 분주된 포유동물 세포를, 이들이 원래 분주되었던 배양 용기 내에서 배지(ml) 당  $1 \times 10^5$  내지  $4 \times 10^6$  개의 밀도 이하로 복제시키는데 적합하다. 바람직하게는, 제1 계대는 배지(ml) 당  $2 \times 10^5$  내지  $8 \times 10^5$  의 세포 밀도, 특히 배지(ml) 당  $2 \times 10^5$  내지  $5 \times 10^5$ 의 세포 밀도에서 일어난다.

[0068] 본원에 기재된 발명에 따른 포유동물 세포의 복제/클로닝 방법은 고 수준의 클로닝 효율을 특징으로 하는데, 이는 본 발명은 클로닝 효율이 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 40% 이상임을 특징으로 하는 포유동물 세포를 복제/재클로닝하는 방법에 관한 것이라는 것을 의미하는 것이다. 특히 바람직한 태양에 따르면, 본 발명은 재클로닝 효율이 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 특히 바람직하게는 70% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 80% 이상임을 특징으로 하는 포유동물 세포의 복제/재클로닝 방법에 관한 것이다.

[0069] 본원에 기재된 실시예에 따르면, 65% 이상의 재클로닝 효율이 CHO 세포에서 수득되었다. 따라서, 본 발명은, 분주된 CHO 세포의 재클로닝에서의 재클로닝 효율이 10 내지 65% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 가장 바람직하게는 30% 이상, 보다 바람직하게는 40% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 50% 이상, 특히 60% 이상임을 특징으로 하는 CHO 세포의 복제/재클로닝 방법에 관한 것이다. 그러나, 본 발명은 또한 특정 세포 유형에 대한 재클로닝 효율이 다소 낮은 방법에 관한 것이다.

[0070] 또한, 본 발명은 상기한 방법 중의 하나에 따라 복제/재클로닝된 세포 내에서 하나 이상의 생성물 (폴리펩티드, 단백질, 핵산 등)을 제조하는 방법에 관한 것이다. 전체조건은 해당 세포가 제조하고자 하는 하나 이상의 생성물을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 함유한다는 것이다. 바람직하게는, 해당 세포는 CHO, BHK 또는 NSO 세포 및 이들 세포주의 유도체/후손이다. 그러나, 이는 임의의 다른 세포, 예를 들면 표 1에 기재된 세포 중의 하나 일 수 있다.

[0071] 제조하고자 하는 목적하는 유전자(들)는 숙주 세포 내에 천연적으로 존재하는 유전자일 수 있거나 숙주 세포 내에 인공적으로 도입된 유전자일 수 있다. 세포 내로 도입된 각 서열 또는 유전자는, 정의에 의하면, 비록 도입된 서열 또는 유전자가 당해 세포의 내인성 서열 또는 내인성 유전자와 동일할지라도, 상기 세포와 관련하여 "이종성 서열" 또는 "이종성 유전자"로서 지칭된다. 예를 들면, 햄스터 세포 내로 도입된 햄스터 액틴 유전자는 정의에 의하면 이종성 유전자이다. 이러한 이종성 유전자가 목적하는 유전자를 암호화하는 경우에, 이는 "목적하는 이종성 유전자"로 지칭된다.

[0072] 목적하는 이종성 유전자는 각종 방법, 예를 들면 바이러스 형질전환, 형질감염 또는 미세주사에 의해 도입될 수 있다. 목적하는 이종성 유전자는 선형 DNA로서 또는 발현 벡터의 일부로서 세포 내로 도입될 수 있다. 하나 이상의 이종성 유전자의 삽입 및 이들의 발현을 위한 다중 클로닝 부위를 허용하는 수 많은 발현 벡터가 공지되어있다. 시판처로는 특히 다음의 회사가 예시될 수 있다: Stratagene (La Jolla, CA, USA); Invitrogen (Carlsbad, CA, USA); Promega (Madison, WI, USA) 또는 BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA). 하나 이상의 목적하는 유전자를 암호화하는 DNA 또는 발현 벡터에 의한 세포의 형질감염은 예를 들어 문헌

[Sambrook et al., 1989 or Ausubel et al., 1994]에 기재된 통상의 방법에 의해 수행된다. 형질감염의 적당한 방법에는 예를 들어 리포좀-매개된 형질감염, 인산칼슘 공동-침전, 전기천공, 다중양이온- (예: DEAE 텍스트란)-매개된 형질감염, 원형질체 융합, 미세주사 및 바이러스 감염 등이 있다. 바람직하게는, DNA 분자가 숙주 세포의 계놈 또는 인공 염색체/미니염색체 내에 통합되거나, 또는 숙주 세포 내에 안정한 방법으로 에피솜으로 함유되는 안정한 형질감염이 수행된다. 최적 형질감염 빈도 및 해당 숙주 세포에서 하나 이상의 목적하는 이종성 유전자의 발현을 제공하는 형질감염 방법이 바람직하다.

[0073] 통상적으로, 목적하는 이종성 유전자는, 목적하는 유전자의 전사를 가능케 하는 프로모터, 및 목적하는 유전자의 전사 및 해독 (발현)을 가능케 하거나 이의 효율을 증가시키는 기타 조절 요소에 기능적으로 연결된다.

[0074] 용어 "프로모터"는 이에 기능적으로 연결된 유전자 또는 서열의 전사를 가능케 하고 제어하는 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 프로모터는 RNA 폴리머라제 결합을 위한 인식 서열 및 전사를 위한 개시 부위(전사 개시 부위)를 함유한다. 특정 세포 유형 또는 숙주 세포 내에서 목적하는 서열을 발현시키기 위하여, 적당한 기능성 프로모터가 선택되어야 한다. 당업자는 다양한 기원의 각종 프로모터, 예를 들어 구성적, 유도성 및 억제성 프로모터를 잘 알 것이다. 이들은 예를 들어 GenBank와 같은 데이터뱅크에 기탁되어 있으며, 독립 요소로서 또는 시판원 또는 개인 공급원으로부터의 폴리뉴클레오티드 서열 내에 클로닝된 요소로서 수득될 수 있다. 유도성 프로모터에서, 당해 프로모터의 활성은 시그널에 반응하여 감소되거나 증가될 수 있다. 유도성 프로모터의 한 가지 예는 테트라사이클린(tet) 프로모터이다. 이는, 테트라사이클린(tetO)을 함유한다. 테트라사이클린의 존재하에, tetO에의 tTA의 결합은 억제된다. 다른 유도성 프로모터의 예로는 jun, fos, 메탈로티오네인 및 열 속크 프로모터가 있다 [참조 문헌: Sambrook et al., 1989; Gossen et al., 1994]. 진핵세포에서의 고 발현에 특히 적합한 프로모터 중에는, 예를 들면 햄스터의 유비퀴틴/S27a 프로모터 (WO 97/15664), SV 40 초기 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터, 로우스 사르코마(Rous Sarcoma) 바이러스의 장 말단 반복 영역 및 사람 사이토메갈로바이러스의 초기 프로모터가 있다. 기타 이종성 포유동물 프로모터의 예로는 액틴, 면역글로불린 또는 열 속크 프로모터(들)이 있다.

[0075] 예를 들면, 프로모터는 인핸서 서열에 기능적으로 연결되어 전사 활성이 증가될 수 있다. 이를 위하여, 하나 이상의 인핸서, 예를 들어 CMV 또는 SV40 인핸서 및/또는 인핸서 서열의 수 개의 복사체가 사용될 수 있다.

[0076] 용어 "인핸서"는 cis 위치에서 프로모터의 활성에 작용하여 이 프로모터에 기능적으로 연결된 유전자의 전사를 자극하는 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 프로모터와는 달리, 인핸서의 효과는 위치 및 배향과는 무관하므로, 이는 전사 단위의 앞 또는 뒤, 인트론 내 또는 심지어 암호 영역 내에 위치할 수 있다. 인핸서는 전사 단위에 바로 인접하여 위치할 수도 있고 또한 프로모터로 부터 상당한 거리를 두고 위치할 수도 있다. 또한, 이는 프로모터와 물리적 및 기능적으로 중첩될 수 있다. 당업자는 다양한 공급원으로부터의 수 많은 인핸서 (GenBank와 같은 데이터뱅크에 기탁된 인핸서, 예를 들어 SV40 인핸서, CMV 인핸서, 폴리오마 인핸서, 아데노바이러스 인핸서)에 대해 알고 있으며, 이러한 인핸서는 독립적 요소로서 또는 폴리뉴클레오티드 서열 (ATCC에 기탁되거나 시판원 또는 개인 공급원으로부터 제공) 내에 클로닝된 요소로서 구할 수 있다. 또한, 수 많은 프로모터 서열은 빈번하게 사용된 CMV 프로모터와 같은 인핸서 서열을 함유한다. 사람 CMV 인핸서는 지금까지 확인된 가장 강력한 인핸서 중의 하나이다. 유도성 인핸서의 한 가지 예는 글루코코르티코이드 또는 중금속에 의해 자극될 수 있는 메탈로티오네인 인핸서이다.

[0077] 기본적으로, 조절 요소는 프로모터, 인핸서, 종결 및 폴리아데닐화 시그널, 및 기타 발현 제어 요소를 포함한다. 유도성 및 구성적 조절 서열 둘 모두가 다양한 세포 유형에 대하여 공지되어있다. 일반적으로, "전사-조절 요소"는 발현될 유전자 서열 상류의 프로모터, 전사 개시 및 종결 부위 및 폴리아데닐화 시그널을 포함한다.

[0078] 용어 "전사 개시 부위"는 일차 전사체, 즉 mRNA 전구체 내에 도입된 제1 핵산에 상응하는, 작제물 중의 핵산을 의미한다. 전사 개시 부위는 프로모터 서열과 중첩될 수 있다.

[0079] 용어 "전사 종결 부위"는 목적하는 유전자 또는 전사될 유전자 부분의 3' 말단에 통상 위치하고 RNA 폴리머라제에 의한 전사의 종결을 초래하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다.

[0080] "폴리아데닐화 시그널"은 진핵생물 mRNA의 3' 말단에서 특정 부위를 절단하고, 약 100 내지 200개의 아데닌 뉴클레오티드의 서열 (폴리A 꼬리)을 절단된 3'-말단에 전사후 도입하는 시그널 서열이다. 폴리아데닐화 시그널은, 절단 부위 및 하류 위치 서열로부터 약 10 내지 30개 뉴클레오티드 상류에 서열 AATAAA를 포함한다. 다양

한 폴리아데닐화 요소, 예를 들면 tk 폴리A, SV40 후기 및 초기 폴리A 또는 BGH 폴리A (참조 문현 US 5,122,458)이 공지되어 있다.

[0081] "해독 조절 요소"는 발현될 각 폴리펩티드에 대한 해독 개시 부위 (AUG), 종결 코돈 및 폴리A 시그널을 포함한다. 최적 발현을 위해, 발현될 핵산 서열의 5'- 및/또는 3'-비해독 영역을 제거하거나 추가하거나 교체하여, 잠재적으로 적합하지 않은 모든 추가 해독 개시 코돈 또는 전사 또는 발현 수준에서 발현에 영향을 미칠 수 있는 기타 서열을 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 다른 방법으로서, 발현을 촉진하기 위하여, 리보솜 컨센서스 결합 부위를 출발 코돈의 바로 위 상류에 삽입할 수 있다. 분비된 폴리펩티드를 수득하기 위하여, 목적하는 유전자는, 합성된 폴리펩티드를 ER 막으로 및 ER 막을 통해 수송하는 시그널 전구체 웹티드를 암호화하는 시그널 서열을 함유하는 것이 통상적이다. 당해 시그널 서열은 분비된 단백질의 아미노 말단에 종종 위치하나 항상 그런 것은 아니며, 당해 단백질이 ER 막을 통해 여과된 후 시그널 웹티다제에 의해 절단된다. 당해 유전자 서열은 통상적으로 자신의 시그널 서열을 함유하지만 반드시 그렇지는 않다. 천연 시그널 서열이 존재하지 않는 경우에, 이종성 시그널 서열이 공지된 방법으로 도입될 수 있다. 이러한 종류의 수많은 시그널 서열이 당업자에게 공지되어 있으며 GenBank 및 EMBL와 같은 서열 데이터뱅크에 기록되어 있다.

[0082] 목적하는 유전자 산물에는 단백질/폴리펩티드, 예를 들어 항체, 효소, 사이토킨, 림포킨, 부착 분자, 수용체 및 이의 유도체 및 단편이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 효능제 또는 길항제로서 작용하고/하거나 치료학적 또는 진단학적 용도를 갖는 모든 폴리펩티드가 유용하다.

[0083] 용어 "폴리펩티드"는 아미노산 서열 또는 단백질에 대해 사용되는 것으로, 일정 길이의 아미노산의 중합체를 의미한다. 또한, 이 용어는 글리코실화, 포스포릴화, 아세틸화 또는 단백질 프로세싱과 같은 반응에 의해 해독후 변형되어진 단백질을 포함한다. 당해 폴리펩티드의 구조는, 이의 생물학적 활성을 보유하면서, 예를 들어 아미노산의 치환, 결실 또는 삽입 및 다른 단백질과의 융합에 의해 변형될 수 있다.

[0084] 단백질의 예로는 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 (IGF-I 또는 IGF-II); 사람 성장 호르몬 (hGH) 및 기타 성장 인자, 예를 들어 VEGF, EGF, TGF, 예컨대 TGF 알파 및 베타( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 및  $\beta$ 5 포함); 조직 플라스미노겐 활성인자 (tPA); 에리트로포이에틴 (EPO); 트롬보포이에틴 (TBO); 사이토킨, 예를 들어 인터루킨 (IL) (예: IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18); 인터페론 (IFN)-알파, -베타, -감마, -오메가 또는 -타우, 종양 괴사 인자 (TNF), 예를 들어 TNF-알파, -베타 또는 -감마, CD40-리간드, Apo2-리간드/TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, DcR3, OPG, Fas 리간드; GCSF; GM-CSF; MCSF; MCP1 및 VEGF가 있다. 기타 예로는 응고 인자, 예를 들면 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 혼 빌레브란트 인자; 항응고 인자, 예를 들면 단백질 C; 애네케팔리나제; RANTES (통상적으로 T-세포 발현 및 분비의 활성화에 관한 조절); 사람 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1-알파); (사람) 혈청 알부민, 세포 부착 분자, 예를 들면 LFA1, Mac1, p150.95, VLA4, ICAM1, ICAM2, ICAM3, VCAM, 또는  $\alpha$ V/ $\beta$ 3 인테그린 ( $\alpha$  또는  $\beta$  아단위 포함); 혈액 그룹 항원; f1k2/3 수용체; OB 수용체; m1p 수용체; CTLA4; Apo2L 수용체, 예를 들어 Apo2; 형질전환 성장 인자 (TGF); CD 단백질, T-세포 수용체; 바이러스 항원, 예를 들어 HIV의 gp120; 종양-관련 항원, 예를 들어 HER2, HER3 또는 HER4 수용체, 류마티스성 인자, 예를 들어 NGF  $\beta$  또는 PDGF; 릴랙신-A 또는 -B 쇄; 고나드로핀; 고나드로핀-관련 웹티드; 인히빈; 액티빈; 세포독성 T-임파구-관련 항원 (CTLA) 또는 뉴로토핀 인자, 예를 들어 BDNF, 뉴로토핀-3, -4, -5 또는 6이 있다.

[0085] 다른 예로는 모노클로날, 폴리클로날, 다중특이적 및 단일 쇄 항체 및 이의 단편, 예를 들어 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc 및 Fc' 단편, 경쇄 (L) 및 중쇄 (H) 면역글로불린 쇄 및 이의 불변, 가변 또는 초가변 영역뿐만 아니라, Fv 및 Fd 단편(Chamov et al., 1999)이 있다. 항체는 사람 또는 비-사람 기원일 수 있다. 사람화 항체 및 키메라 항체도 또한 가능하다.

[0086] Fab 단편 (단편 항원 결합 = Fab)은 인접 불변 영역에 의해 서로 결합된 두 쇄의 가변 영역으로 이루어진다. 이들은 예를 들어 파파인과 같은 프로테아제로 처리하거나 또는 DNA 클로닝에 의해 통상의 항체로 부터 제조될 수 있다. 기타 항체 단편으로는 웹신에 의한 단백질용해적 절단에 의해 생성될 수 있는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이 있다.

[0087] 유전자 클로닝에 의해, 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)의 가변 영역만으로 이루어진 단축된 항체 단편을 제조할 수 있다. 이들은 Fv 단편 (가변성 단편 = 가변부의 단편)으로서 알려져 있다. 불변 쇄의 시스테인을 통한 공유 결합이 이들 Fv 단편에서는 불가능하기 때문에, 이들은 종종 몇몇 다른 방법에 의해 안정화된다. 이러한 목적을 위하여, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역이 종종 약 10 내지 30개 아미노산, 바람직하게는 15개 아미노산의 짧은 웹티드

단편에 의해 서로 연결된다. 이에 의해 VH 및 VL이 펩티드 링커에 의해 서로 연결된 단일 폴리펩티드 쇄가 생성된다. 이러한 항체 단편은 또한 단일 쇄 Fv 단편 (scFv)으로서 지칭된다. scFv 항체의 예는 공지되어 있으며 문헌[Huston et al., 1988]에 기재되어 있다.

[0088] 지난 몇년 동안, 다량체 scFv 유도체를 제조하기 위한 다양한 전략이 개발되었다. 개선된 약력학 특성 및 증가된 결합력을 가진 재조합 항체를 제조하는 것이 목적이다. scFv 단편의 다량체화를 달성하기 위하여, 이들은 다량체화 도메인을 가진 융합 단백질로서 제조된다. 다량체화 도메인은 예를 들면 IgG의 CH3 영역 또는 나선 구조 ("감겨진 코일(coiled coil) 구조"), 예컨대 루이신 지퍼(Leucine Zipper) 도메인일 수 있다. 다른 전략으로, scFv 단편의 VH와 VL 영역 사이의 상호작용이 다량체화(예: 이원-, 삼원- 및 오원체)에 사용된다.

[0089] 용어 "이원체(diabody)"는 당업계에서 2가 동종이량체 scFv 유도체를 지칭하는데 사용된다. scFv 분자 내의 펩티드 링커를 5 내지 10개 아미노산으로 단축함으로써, VH/VL 쇄의 포개짐에 의한 동종이량체가 형성된다. 이원체는 삽입된 디설피트 브릿지에 의해 추가적으로 안정화될 수 있다. 이원체의 예는 문헌[Perisic et al., 1994]에서 찾아볼 수 있다.

[0090] 용어 "미니바디(minibody)"는 당업계에서 2가 동종이량체 scFv 유도체를 지칭하는데 사용된다. 이는 면역글로불린, 바람직하게는 IgG, 가장 바람직하게는 IgG1의 CH3 영역을 이량체화 영역으로서 함유하는 융합 단백질로 이루어진다. 이는 IgG의 힌지(hinge) 영역 및 링커 영역에 의해 scFv 단편을 연결시킨다. 이러한 미니바디의 예는 문헌[Hu et al., 1996]에 기재되어 있다.

[0091] 용어 "삼원체(triabody)"는 당업계에서 3가의 동종삼량체 scFv 유도체를 지칭하는데 사용된다[참조 문헌: Kortt et al., 1997]. 링커 서열을 사용하지 않고 VH-VL를 직접 융합시킴으로써, 삼량체가 형성된다.

[0092] 당업계에서 2가-, 3가- 또는 4가 구조를 갖는 미니 항체로서 알려진 단편은 또한 scFv 단편의 유도체이다. 다량체화는 이-, 삼- 또는 사량체의 감겨진 코일(coiled coil) 구조에 의해 달성된다[참조 문헌: Pack et al., 1993 and 1995; Lovejoy et al., 1993].

[0093] 형질감염된 세포를 선별하기 위하여, 이들을 하나 이상의 선별가능 마커 유전자로 추가로 형질감염시킬 수 있다. 문헌에는 수많은 선별가능한 마커 유전자, 예를 들면 이중기능성 (양성/음성) 마커가 기재되어 있다[참조 문헌: WO 92/08796 및 WO 94/28143]. 진핵 세포에 통상적으로 사용되는 선별가능 마커의 예로는 아미노글리코시드 포스포트랜스퍼라제 (APH), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 (HYG), 디하이드로플레이트 리덕타제 (DHFR), 티미딘 키나제 (TK), 글루타민 신테타제, 아스파라긴 신테타제에 대한 유전자 및 네오마이신 (G418), 푸로마이신, 히스티디놀 D, 블레오마이신, 플레오마이신 및 제오마이신에 대해 내성을 부여하는 유전자가 포함된다. 이를 유전자는 목적하는 유전자와 함께 또는 별개로 세포 내에 도입될 수 있다. 바람직하게는, 이들은 또한 발현 벡터에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 상응하게 변형된 세포가 하나 이상의 적당한 선별제의 존재 하에서 배양될 수 있으며, 이러한 선별제는 상응하는 선별가능한 마커 유전자를 함유하고 발현하는 세포가 선택적으로 성장하도록 한다.

[0094] 또한, 형질감염된 세포를, 예를 들어 세균성 그-갈اكتоз이다제, 세포 표면 마커 또는 형광 단백질을 사용하여 형광-활성화 세포 분류(FACS)에 의해 선별할 수 있다. 또한, 형광 단백질은 개개의 포유동물 세포를 FACS에 의해 분리할 수 있도록 한다. 상응하게 검출된 세포는, 예를 들어 레이저 (예: 아르곤 레이저 (488nm))을 사용하여, 예를 들면 오토클론(Autoclone) 장치 (Coulter EPICS Altra, Beckman-Coulter, Miami, FL, USA)에 설치된 플로우 사이토미터(Flow Cytometer)에 의해 배양 용기 내에 단일 세포로서 또는 다수의 세포로서 자동적으로 분주될 수 있다. 바람직한 태양에 따르면, 단지 1개 또는 많아야 2개의 세포가 자가 피더 세포를 함유하는 세포 배양 디쉬 내에 상기 방법으로 분주된다. 단지 1개의 개별 세포만을 분주하는 것이 특히 유리하다. 추가로, 분류는 자기 비드를 사용하여 수행할 수 있다. 이를 위하여, 세포를 예를 들어 자기 비드에 결합된 항체를 사용하여 표지화시킨다. 이를 통해 세포를 특정 특성에 따라 분류할 수 있다.

[0095] 본원에 기재된 방법 중의 하나에 따라 분주되고 형광 단백질 및 목적하는 유전자를 공동-발현하는 세포 클론을 FACS에 의해 분리하는 것이 특히 유리하다. 바람직하게는, 형광 단백질 및 목적하는 유전자의 발현은 서로 기능적으로 연결된다. 이러한 기능적 연결은 예를 들어 서로 가까이 배열된 두 개의 유전자로 이루어지므로, 이러한 두 개의 유전자의 발현 속도는, 예를 들어 숙주 세포의 일시적 또는 안정한 형질감염 후, 서로 상관관계가 있다. 이러한 기능적 연결은 또한 예를 들어 소위 IRES 요소 (내부 리보솜 도입 부위)의 사용 또는 RNA 스플라이싱에 수득될 수 있으며, 이때 두 개의 유전자 (목적하는 유전자 및 형광 단백질의 유전자)는 2시스트론 (bicistronic) mRNA로서 합성된다. 이 경우에, 형광 단백질과 목적하는 유전자의 발현 속도 사이에는 직접적인

상관관계가 있다. 형광 단백질의 고 발현을 나타내는 상응하는 세포 클론은 또한 기능적 연결의 결과로서 목적하는 유전자의 고 발현 속도를 가진다.

[0096] 형광 단백질의 예로는 녹색, 청녹색, 청색, 황색 또는 기타 색의 형광 단백질이 있다. 하나의 구체적 예로는 애쿠레아 빅토리아(*Aequorea victoria*) 또는 레닐라 레니포미스(*Renilla reniformis*)로부터 수득된 녹색 형광 단백질 (GFP) 및 이로부터 개발된 돌연변이체가 있다[참조 문헌: Bennet et al., 1998; Chalfie et al., 1994; WO 01/04306 및 이들 문헌에 인용된 문헌]. 기타 형광 단백질 및 이들을 암호화하는 유전자는 본원에 참조로 인용된 문헌[WO 00/34318, WO 00/34326, WO 00/34526 및 WO 01/27150]에 기재되어있다. 이들 형광 단백질은 안토조아(*Anthozoa*) 종, 예를 들면 아네모니아 마자노(*Anemonia majano*), 클라불라리아 종(*Clavularia sp.*), 조안투스 종 I(*Zoanthus sp. I*), 조안투스 종 II(*Zoanthus sp. II*), 디스코소마 스트리아타(*Discosoma striata*), 디스코소마 종 "레드"(*Discosoma sp. "red"*), 디스코소마 종 "그린"(*Discosoma sp. "green"*), 디스코소마 종 "마젠타"(*Discosoma sp. "Magenta"*), 아네모니아 스콜카타(*Anemonia sulcata*)의 비-생물발광성 유기체의 형광단이다. 사용된 형광 단백질은 야생형 단백질, 천연 또는 유전자 조작된 돌연변이체 및 변이체, 및 이의 단편, 유도체 또는 예를 들어 다른 단백질 또는 웨პ티드와 융합되어진 변이체로 이루어질 수 있다. 사용된 돌연변이는 예를 들어 여기 또는 방출 스펙트럼, 발색단의 형성, 흡광 계수 또는 단백질의 안정성을 변화시킬 수 있다. 또한, 포유동물 세포 또는 기타 종에서의 발현은 코돈 최적화에 의해 향상될 수 있다. 본 발명에 따르면, 형광 단백질은 또한 선별 마커, 바람직하게는 중폭가능성 선별 마커, 예를 들어 디하이드로플레이트 리덕타제(DHFR)와 융합하여 사용할 수 있다.

[0097] 선별 단계는 세포 집단 상에서 또는 예비분류된 세포 집단/세포 클론을 이용하여 수행될 수 있다. 하나 이상의, 바람직하게는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 세포가 세포 배양 용기마다 분주될 수 있다. 바람직하게는, 세포는 자가 피더 세포의 존재하에, 무혈청 배지, 가장 바람직하게는 화학적 합성 배지 중에 분주될 수 있다. 자가 피더 세포를 사용하여 세포를 분주하기 위한 본 발명에 따른 적합한 배지 및 방법은 본 출원의 다른 곳에서 상세히 기술되었다. 기본적으로, 2 이상의 분류 단계가 수행될 수 있으며, 각각의 분류 단계 사이에, 특정 기간, 예컨대 약 2주에 걸쳐, 수집물로서, 적당한 배지에서 세포를 배양하고 복제한다.

[0098] 재클로닝된 세포 내에서 하나 이상의 목적하는 유전자 산물을 제조하기 위하여, 재클로닝된 세포를 무혈청 배양 배지에서, 목적하는 유전자의 발현을 허용하는 조건하에 혼탁 배양으로 성장시키는 것이 바람직하다. 예를 들어, 목적하는 유전자가 구성적 프로모터의 제어하에 있는 경우, 특별한 유도인자를 첨가할 필요가 없다. 목적하는 유전자의 발현이 예를 들어 유도성 프로모터의 제어하에 있는 경우에, 상응하는 유도인자를 세포 배양 배지에 충분히, 그러나 무독성 농도로 첨가해야 한다. 당해 세포는 수회 계대배양에 의해 원하는 대로 증식시킬 수 있고 적당한 세포 배양 용기로 옮길 수 있다. 유전자 산물(들)은 세포의 막-결합 생성물 또는 분비 생성물로서 제조된다.

[0099] 목적하는 생성물은 바람직하게는 분비된 유전자 산물로서 세포 배양 배지로부터 수득된다. 그러나, 단백질 또는 폴리펩티드가 분비 시그널 없이 발현되는 경우에, 유전자 산물은 또한 세포 용해물로부터 분리될 수 있다. 다른 재조합 단백질 또는 숙주 세포 단백질이 실질적으로 없는 순수한 균질한 생성물을 수득하기 위하여, 통상의 정제 공정을 수행한다. 우선적으로, 세포 및 세포 부산물을 배양 배지 또는 용해물로부터 자주 제거한다. 이어서, 목적하는 유전자 산물은, 면역친화성 및 이온 교환 칼럼 상에서의 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC 또는 Sephadex, 실리카 또는 양이온 교환 수지, 예를 들면 DEAE 상에서의 크로마토그래피에 의해 오염원인 가용성 단백질, 폴리펩티드 및 핵산로부터 분리될 수 있다. 재조합 숙주 세포에 의해 발현된 이종성 단백질을 정제하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며 문헌[Harris et al., 1995 and Scopes 1988]에 기재되어있다.

[0100] 따라서, 또 다른 양상으로, 본 발명은, (i) 포유동물 세포가 목적하는 단백질을 암호화하는 목적하는 유전자를 함유하며; (ii) 상기 포유동물 세포를 당해 포유동물 세포의 복제를 허용하는 무혈청 조건하에 성장시키며; (iii) 각 경우에 5개 미만, 바람직하게는 4개, 3개, 2개 또는 1개의 포유동물 세포(들)를 무혈청 조건하에 세포 배양 용기 내에 분주하고; (iv) 적당히 분주된 포유동물 세포를 무혈청 조건하에 자가 피더 세포의 존재 중에 복제시키고; (v) 복제된 세포를 목적하는 유전자가 발현되는 무혈청 조건하에 배양하고, (vi) 이어서, 유전자 산물을 세포 또는 배양 상청액으로부터 분리하고 정제함을 특징으로 하여, 무혈청 조건하에 포유동물 세포 내에서 하나 이상의 생성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법의 바람직한 태양에 따르면, 상기 항목 (iii)에서 단지 1개 또는 2개의 포유동물 세포만이 각 세포 배양 용기 내에 분주된다. 특히 바람직한 방법은 단지 1개의 단일 포유동물 세포만이 상기 항목 (iii)에서 분주되는 방법이다. 세포 분주는 수동이거나 또는 예를 들어 FACS-이용 세포 분류에 의해 자동화될 수 있다. 또 다른 바람직한 태양에 따르면, 포유동물 세포는 목적하는 유전자가 도입되어진 형질감염된 포유동물 세포이다. 따라서, 본 발명은 또한 상기한 방법의 단계 (i)

전에, 포유동물 세포를 적어도 목적하는 유전자를 암호화하는 핵산으로 형질감염시킴을 특징으로 하여, 재조합 유전자 산물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상응하는 포유동물 세포의 안정한 형질감염이 바람직하다.

[0101] 이미 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명은 또한 개개의 포유동물 세포의 FACS-이용에 의한 분류, 및 목적하는 단백질을 발현하는 단일 또는 다수의 포유동물 세포, 바람직하게는 5개 미만, 보다 바람직하게는 4개, 3개, 2개 또는 1개의 포유동물 세포(들)의 분주에 관한 것으로서, 이러한 세포 분류 및 세포 분주는, 바람직하게는, 포유동물 세포 내에서 공동-발현된 형광 단백질의 발현 속도의 함수로서 일어나며, 이때 형광 단백질의 발현은 목적하는 단백질의 발현과 기능적으로 연결된다. 따라서, 본 발명은 또한, i) 포유동물 세포를 목적하는 단백질을 암호화하는 유전자로 형질감염시키고; ii) 포유동물 세포를 형광 단백질을 암호화하는 유전자로 형질감염시키고, 형광 단백질을 암호화하는 유전자의 발현이 바람직하게는 목적하는 유전자의 발현과 기능적으로 연결되며; iii) 형질감염된 포유동물 세포를, 형질감염된 세포의 복제 및 적어도 형광 단백질의 발현을 허용하는 무혈청 조건하에 성장시키고; iv) 각 경우에 5개 미만, 바람직하게는 4개, 3개, 2개 또는 1개의 형질감염된 포유동물 세포(들)를, 형광 단백질의 발현 속도를 기초로 하는 FACS-이용 세포 분류를 수행한 후, 무혈청 조건하의 자가 피더 세포가 있는 세포 배양 용기 내에 분주하고; v) 상응하게 분주된 세포를 무혈청 조건하에 자가 피더 세포의 존재 중에 복제시키고; vi) 복제된 세포를 적어도 목적하는 유전자가 발현되는 무혈청 조건하에 성장시키고; vii) 이어서 (목적하는 유전자의) 유전자 산물을 세포 또는 배양 상청액으로부터 분리하고 정제함을 특징으로 하여, 무혈청 조건하에 포유동물 세포 내에서 재조합 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다. 특히 바람직한 태양에 따르면, 단계 iv)에서, 배양 용기당 단지 1개의 단일 세포만이 분주되고 복제된다.

[0102] 바람직하게는, 세포들 중 20%에 속하는 형광 단백질의 최고 발현 속도를 가지는 세포들만이 상기 iv) 항목에서 분류되어 진다. 실제로, 이는 형광 세포의 가장 밝은 20% (20% 최대 형광 세포)가 분류되어 진다는 것을 의미한다. 또 다른 바람직한 태양에 따르면, 세포 혼합물의 형광 세포 중 가장 밝은 5%, 바람직하게는 가장 밝은 3% 또는 가장 밝은 1%만이 분류되어 진다. 도 3a 및 3b에 도시된 바와 같이, 이는 목적하는 유전자의 비교적 고 발현 속도를 가진 세포 클론을 풍부하게 한다. 따라서, 단일 세포의 FACS-이용 분주는, 목적하는 유전자의 비교적 고 발현 속도를 가진 동종 세포 클론의 동정 및 복제를 가능케 하며, 이는 다시 추가적 최적화 단계 (예: 유전자 증폭)를 위한 출발점이 된다.

[0103] 포유동물 세포가 햄스터 또는 마우스 골수종 세포, 바람직하게는 CHO, BHK 또는 NSO 세포, 및 이를 세포주의 유도체/후손임을 특징으로 하여, 하나 이상의 재조합 생성물을 재클로닝된 포유동물 세포 내에서 제조하는 상응하는 방법이 또한 바람직하다. 상기 방법의 또 다른 태양은, 피더 세포가 무혈청 배지에 적응되고 비-부착 배양된 세포임을 특징으로 한다. 또한, 상기 제조 방법과 관련하여, 복제/클로닝하고자 하는 분주된 포유동물 세포(들)가 CHO 또는 BHK 세포인 경우에 햄스터 세포를 피더 세포로서 사용하고, 복제/클로닝하고자 하는 분주된 포유동물 세포(들)가 NSO 세포인 경우에 마우스 골수종 세포를 피더 세포로서 사용하는 것이 바람직하다. 특히 바람직한 방법은, 복제/클로닝하고자 하는 분주된 포유동물 세포(들)가 CHO 세포인 경우에 CHO 세포를 피더 세포로서 사용하고, 복제/클로닝하고자 하는 분주된 포유동물 세포(들)가 BHK 세포인 경우에 BHK 세포를 피더 세포로서 사용하고, 복제/클로닝하고자 하는 분주된 포유동물 세포(들)가 NSO 세포인 경우에 NSO 세포를 피더 세포로서 사용함을 특징으로 한다.

[0104] 본 발명은 처음으로 햄스터 세포 및 마우스 골수종 세포, 바람직하게는 NSO 세포를 피더 세포로서 제공한다. 이러한 이유 때문에, 본 발명은 또한 햄스터 세포 또는 NSO 유형의 마우스 골수종 세포의 피더 세포로서의 용도에 관한 것이다. 상응하는 피더 세포의 제조 방법은 실시예에 보다 상세히 기재되어 있다. 상응하는 햄스터 또는 마우스 골수종 피더 세포는 이론적으로는 당업자에게 공지된 화학적 또는 물리적 방법을 사용하여, 예를 들면 마이토신 C (아지리노[2',3':3,4]페롤로[1,2-a]인돌-4,7-디온, 6-아미노-8-[(아미노카보닐)옥시]메틸]-1,1a,2,8,8a,8b-헥사하이드로-8a-메톡시-5-메틸,[1aR-(1a.알파.,8.베타.,8a.알파.,8b.알파.)]-(9C1) (Butcher et al, 1988))로 처리하거나, <sup>137</sup>Cs를 조사하는 방법으로 제조한다. 따라서, 바람직한 태양에 따르면, 본 발명은 화학적으로 또는 물리적으로 불활성화된 피더 세포의 용도에 관한 것이다. 본원과 관련하여, 용어 "불활성화"란, 세포가 분열 능력 면에서 제한되고, 바람직하게는 분열 능력을 상실하지만 여전히 생명을 유지하는 것을 의미한다. 이는, 세포가, 예를 들면 불활성화 후 특정 기간 동안, 바람직하게는 1 내지 2 주 이상 동안 성장 인자의 합성 및 분비와 같은 대사 활성을 여전히 유지하는 것을 의미한다. 바람직한 태양에 따르면, 상응하는 피더 세포는 무혈청 배양 조건에 적응된 피더 세포이다. 본 발명의 보다 더욱 바람직한 태양에 따르면, 피더 세포는 CHO, BHK 또는 NSO 세포 및 이들 세포주의 후손/유도체이다. 또한, 본 출원에서 언급된 모든 세포는 적절히 불활성화된 후 피더 세포로서 사용될 수 있다.

[0105] 추가로, 본 발명은, 무혈청 세포 배양 배지, 분열 능력을 가진 5개 미만의 포유동물 세포, 바람직하게는 분열 능력을 가진 4개, 3개, 2개 또는 1개의 포유동물 세포(들), 및 분열 능력을 가진 당해 포유동물 세포와는 차가 성인 피더 세포로 이루어진 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 바람직한 태양에 따르면, 상응하는 조성물은 분열 능력을 가진 단지 1개 또는 2개의 포유동물 세포를 함유한다. 또 다른 바람직한 태양에 따르면, 상응하는 조성물은 분열 능력을 가진 단지 1개의 포유동물 세포를 함유한다.

[0106] 그 밖의 바람직한 조성물은, 분열 능력을 가진 포유동물 세포(들)가 CHO 또는 BHK 세포 또는 이의 유도체/후손인 경우에, 피더 세포로서 햄스터 세포, 바람직하게는 크리세티네(*Cricetinae*) 아과, 가장 바람직하게는 크리셋루스(*Cricetulus*) 또는 메소크리세투스(*Mesocricetus*) 속의 햄스터 세포를 함유한다. 또한, 또 다른 바람직한 조성물은, 분열 능력을 가진 포유동물 세포(들)가 마우스 하이브리도마 세포, 바람직하게는 NSO 세포 또는 이의 유도체/후손인 경우에, 피더 세포로서 마우스 세포, 바람직하게는 무리네(*Murinae*) 아과, 가장 바람직하게는 무스(*Mus*) 속의 마우스 세포를 함유한다. 특히 바람직한 조성물은, 분열 능력을 가진 포유동물 세포(들)가 CHO 세포인 경우에 당해 조성물이 CHO 세포를 피더 세포로서 함유하고, 분열 능력을 가진 포유동물 세포(들)가 BHK 세포인 경우에 당해 조성물이 BHK세포를 피더 세포로서 함유하고, 분열 능력을 가진 포유동물 세포(들)가 NSO 세포인 경우에 당해 조성물이 NSO 세포를 피더 세포로서 함유함을 특징으로 한다.

[0107] 이론상, 본 발명은, 5개 미만, 바람직하게는 4개, 3개, 2개 또는 1개의 생산-관련 햄스터 세포(들), 예를 들면 CHO 또는 BHK 세포(들), 및 생산-관련 마우스 골수종 세포, 예를 들면 NSO 세포(들)를 무혈청 조건하에 포유동물 기원의 피더 세포의 존재 중에 분주시키고 복제시킬 수 있는 조성물에 관한 것이다.

[0108] 무혈청, 단백질-부재 또는 화학적 합성 배지의 예로는 시판 배지 Ham's F12 (Sigma, Deisenhofen, DE), RPMI 1640 (Sigma), 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM; Sigma), 최소 필수 배지 (MEM; Sigma), 이스코브 변형 둘베코 배지 (IMDM; Sigma), CDCHO (Invitrogen, Carlsbad, Ca., USA), CHO-S-SFMII (Invitrogen), 무혈청 CHO 배지 (Sigma) 및 단백질-부재 CHO 배지 (Sigma) 등이 있다. 각각의 이들 배지에는, 경우에 따라, 각종 화합물, 예를 들어 호르몬 및/또는 기타 성장 인자 (예: 인슐린, 트랜스페린, 표피 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자), 염(염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 인산염), 완충제 (예: HEPES), 뉴클레오시드 (예: 아데노신, 티미딘), 글루타민, 글루코스 또는 기타 동등 영양물, 항생제 및/또는 미량 원소가 보충될 수 있다. 복제가능 세포가 하나 이상의 선별 마커를 발현하는 재조합 세포인 경우에, 항생제와 같은 하나 이상의 적합한 선별제가 또한 배지에 첨가될 수 있다.

### 실 시 예

[0109] 약어

[0110] ATCC 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션

[0111] BHK 베이비 햄스터 신장

[0112]  $^{60}\text{Co}$  코발트 동위원소 60

[0113]  $^{137}\text{Cs}$  세슘 동위원소 137

[0114] CHO 중국 햄스터 난소

[0115] CMV 사이토메갈로바이러스

[0116] DE 독일

[0117] DEAE 디에틸아미노에틸

[0118] DMSO 디메틸설폐시드

[0119] DNA 데옥시리보핵산

[0120] FACS 형광-활성화 세포 분류기

[0121] FITC 플루오레스세인 이소티오시아네이트

[0122]	Gy	그레이
[0123]	HBSS	헹크스 균염 용액
[0124]	HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
[0125]	mRNA	전령 리보핵산
[0126]	NSO	마우스 하이브리도마 세포
[0127]	polyA	폴리아데닐화 서열
[0128]	Sp2/0	마우스 하이브리도마 세포
[0129]	SV40	원숭이 바이러스 제40번

### [0130] 방법

#### [0131] 1. 세포 배양

[0132] 세포 CHO-DG44/dhfr<sup>-/-</sup> (Urlaub et al., 1983)를, 습한 대기 및 5% CO<sub>2</sub>하에, 37°C에서 세포 배양 플라스크 내, 하이포크산틴 및 티미딘이 보충된 무혈청 CHO-S-SFMII 배지 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) 중에서 혼탁 세포로서 영구적으로 배양하였다. 세포 계수 및 생존능력을, CEDEX 세포 계수기 (Innovatis, DE)를 사용하거나 트리판 블루 염색에 의해 측정한 다음, 세포를 1 내지 3 x10<sup>5</sup>/mL의 농도로 시딩하고, 2 내지 3일 마다 계대하였다. 단일 세포 클로닝을 위하여, 형광 단백질 (예: 존안투스 종(*Zoanthus sp.*)으로부터의 ZS-Green) 또는 형광 단백질 및 사람 또는 사람화 모노클로날 항체를 발현하는 재조합체 CHO-DG44/dhfr<sup>-/-</sup>를 사용하였다. 클로닝된 재조합 세포를 이들 세포와 유사하게 배양하였다. 사용된 배지는 하이포크산틴 및 티미딘이 함유되지 않은 CHO-S-SFMII 배지 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE)이었다.

[0133] BHK 세포를, 5% CO<sub>2</sub> 하의 습한 대기 중의 37°C에서 세포 배양 플라스크 내, 무혈청 Opti Pro SFM 배지 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) 중에서 혼탁 세포로서 영구적으로 배양할 수 있다. 세포 계수 및 생존능력을, CEDEX 세포 계수기 (Innovatis, DE)를 사용하거나 트리판 블루 염색에 의해 측정한 다음, 세포를 1 내지 3 x10<sup>5</sup>/mL의 농도로 시팅하고, 2 내지 3일 마다 계대할 수 있다. 클로닝된 세포를 BHK 세포와 유사하게 배양한다.

[0134] NSO 세포를, 습한 대기 및 5% CO<sub>2</sub>하에, 37°C에서 세포 배양 플라스크 내, 동물 성분 부재 배지인 무혈청 하이브리도마 배지 (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA) 중에서 혼탁 세포로서 영구적으로 배양할 수 있다. 세포 계수 및 생존능력을, CEDEX 세포 계수기 (Innovatis, DE)를 사용하거나 트리판 블루 염색에 의해 측정한 다음, 세포를 1 내지 3 x10<sup>5</sup>/mL의 농도로 시팅하고, 2 내지 3일 마다 계대할 수 있다. 클로닝된 세포를 NSO 세포와 유사하게 배양한다. 동물 성분 부재 배지인 하이브리도마 배지 (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA)가 배지로서 사용된다.

#### [0135] 2. 방사선조사에 의한 피더 세포의 제조

[0136] 혈청- 및 단백질-부재하에 성장하는 혼탁된 CHO 기본 세포 (비-형질감염된 세포)를 10 분 동안 180g에서 원심분리시키고, 세포 농도를 HBSS(헹크스 균염 용액) 중의 1 x 10<sup>6</sup>/mL로 조정하였다. 이어서, 당해 세포를, 4Gy/분의 에너지량 출력의 방사성 조사원 (Cs137 발산기, Gammacell 2000, Messrs Molsgaard Medical A/S, Denmark)로 조사하였다. 5분 내지 125분의 조사 시간으로 20 내지 500 Gy의 에너지량이 수득되었다. 조사 후, 당해 세포에 특이적인 CHO-S-SFMII 배지 내, 96-웰 미세역가 플레이트 중에 약 200개 세포/웰(=배양 용기)의 비율로 세포를 시팅하고, 항온배양 캠버 대기하에서 약 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 중에 보관하였다. 상기 공정을 BHK 또는 NSO 세포를 사용하여 동일하게 수행하였으며, 이때 피더 세포는 당해 세포에 특이적인 배지 내에 보관하거나 시팅하였다.

[0137]

## 3. 피더 세포의 냉동보존

[0139]

상기와 같이 생성된 피더 세포를  $-150^{\circ}\text{C}$  이하에서 냉동보존할 수 있다. 냉동보존은 프로그램가능한 냉동기 (Consarctic BV25, Consarctic, Schollkrüppen, DE)를 사용하여 해당 세포 배양 배지 내에서 수행한다. 10% (v/v) DMSO를 당해 배지에 냉동보존제로서 첨가한다.  $0^{\circ}\text{C}$ 에서  $-20^{\circ}\text{C}$  사이의 냉동 속도는  $1^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 이고, 이후 온도는  $0.4^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 으로 추가로 강화된다. 일단 냉동이 완료되면, 피더 세포를 기체상의 액체 질소 내에 냉동보존한다.

[0140]

## 4. 자동화 세포 분주

[0141]

세포 (단일 또는 다수)의 자동 분주를, 오토클론(autoclone) 장치를 사용하여 아르곤 레이저( $488\text{nm}$ ) (Coulter EPICS Altra (Messrs Beckman-Coulter, Miami, FL, USA)가 설치된 플로우 사이토미터(Flow Cytometer)로 수행한다. 당해 세포를 지수 성장기 동안 원심분리하고, HBSS 중에 넣어, 1 내지  $1.5 \times 10^7/\text{ml}$ 의 세포 농도를 수득한다. 이후, 당해 세포들을 "Hypersort Option"을 사용하여 산란된 빛 내의 세포들의 위치에 따라 8000 내지 12000개 세포/초의 속도로 분류한다. 다른 방법으로, 형광 단백질을 발현하는 세포들을, 세포내 발현된 형광 단백질과 관련하여 이의 형광 강도에 따라 분류할 수 있다. 당해 세포를, 피더 세포를 함유하는 96-웰 미세역 가 플레이트 내에 단독으로 분주한다. 예를 들어, BHK 세포를 OptiPro SFM 배지 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) 내에 분주한다. 분류된 NS0 세포를 예를 들어 동물 성분 부재 배지인 하이브리도마 배지 (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA) 내에 분주한다.

[0142]

CHO 세포의 분류시, 당해 세포를 CHO-S-SFM-II (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) 내에 분주하였다. 사람 또는 사람화 모노클로날 항체 및 조안투스 종(*Zoanthus sp.*) 기원의 ZS 그린을 공동-발현하는 재조합 CHO-DG-44 세포를 분주하였다. 세포 분류를  $488\text{nm}$ 에서 아르곤 레이저를 사용하여 상기한 바와 같이 수행하였다.

[0143]

5. 재조합에 의해 발현된 유전자 산물의 생산성 측정 (*mAb*-발현 CHO-DGH-44 사용 경우)

[0144]

안정하게 형질감염된, 사람 또는 사람화 모노클로날 항체를 발현하는 CHO-DG-44 세포로부터의 상청액 중의 항체 역가를, 한편으론 염소 항-사람 IgG Fc 단편 (Dianova, Hamburg, DE)을, 다른 한편으론 AP-접합된 염소 항-사람 카파 경쇄 항체 (Sigma)를 사용하여, 표준 방법 (Ausubel et al., 1994, updated)에 따라 ELISA에 의해 정량하였다. 정제된 항체를 표준물로서 사용하였다. 생산성 ( $\text{pg}/\text{세포}/\text{일}$ )을 공식  $\text{pg}/((\text{CtCo}) \text{ t} / \ln(\text{CtCo}))$  (여기서, Co 및 Ct는 시딩 또는 수거 시의 세포 계수이고, t는 배양 시간이다)에 따라 계산하였다.

[0145]

## 실시예 1: 피더 세포의 생성 동안의 에너지량이 CHO-DG-44 세포의 재클로닝 효율에 미치는 영향

[0146]

피더 세포의 생성 동안의 에너지량이 재클로닝 효율에 미치는 영향을 검토하기 위하여, CHO-DG-44 세포를 상기 방법 "세포 배양" 편에 기재된 바와 같이 성장시켰다. 피더 세포를, 상기 방법 "방사선조사에 의한 피더 세포의 제조" 편에 기재된 바와 같이, 20 Gy, 50 Gy, 100 Gy, 200 Gy 및 500 Gy의 에너지량을 사용하여 제조하였다. 방사선조사 후, 피더 세포를 96-웰 미세역 가 플레이트 내에 약 2000개 세포/웰의 세포 수로 시딩하고, 항온배양 챔버 대기하에 보관하였다. 이후, 단일 세포의 자동화 분주를, 형광 단백질을 발현하는 CHO-DG-44 세포를 사용하여, 상기 방법 "자동화 단일 세포 분주" 편에 기술된 바와 같이 수행하였다. 1개의 개별 세포를 각 웰 내의 피더 세포 상에 분주하였다. 재클로닝 효율의 목표 값은 양성 웰, 즉 3주의 항온배양 기간 후 성장하여 세포 집단을 형성한 클론이 존재하는 웰의 수이었다. 달성된 재클로닝 효율은, 재조합 CHO-DG-44 세포의 재클로닝의 경우에는, 40 내지 70%이였다 (도 1 참조).

[0147]

## 실시예 2: 항체-발현 CHO-DG-44 세포의 재클로닝의 균일성

[0148]

세포 클론의 균일성을 비교하기 위하여, 재조합 항체-발현 CHO-DG-44 세포를, 한편으론 표준 "제한 희석" 방법에 의해 분주하고 클로닝하고, 다른 한편으론 자가 피더 세포의 존재하에 분원에 기재된 단일 세포 분주 방법에 의해 분주하고 클로닝하였다 (도 2 참조). 이를 위하여, 형질감염된 항체-발현 CHO-DG-44 세포의 6개의 세

포 수집물을 제한 희석 방법에 의해 배양하였고, 병행하여, "세포 배양" 편에 기재된 바와 같이 자동화 단일 세포 분주한 다음, "자동화 단일 세포 분주" 편에 기재된 바와 같이 재클로닝하였다. 이와 같이 생성된 클론을 "세포 배양" 편에 기재된 바와 같이 배양하고, 생성물 역가를 상기 "제조합에 의해 발현된 유전자 산물의 생산성 측정" 방법을 사용하여 3회 계대 과정에 걸쳐 측정하였다. 이들 3회 계대로부터 수득된 평균치를 사용하여 그래프를 작성하였다.

[0149] **실시예 3:** 형광 단백질의 발현과 FACS-이용 세포 분류 및 FACS-이용 단일 세포 분주를 조합한, 고-역가 세포 클론을 생성시키는 고 효율 방법

[0150] 생성물 유전자 (제조합 항체) 및 형광 단백질 (조안투스 종(*Zoanthus sp.*) 기원의 ZS 그린)의 2시스템론 (bicistronic) 발현을 암호화하는 발현 벡터로 CHO DG44 세포를 형질감염시킴으로써, 항체 및 형광 단백질 둘 모두를 공동-발현하는 세포 수집물을 수득하였다. 이들 세포 수집물을, 상기 방법을 사용하여, 자가 CHO DG44 피더 세포가 존재하는 미세역가 플레이트 내에 개별적으로 분주하고 배양하였다. 클론의 분주를 3개의 상이한 기준을 사용하여 수행하였다.

A.) 모든 살아있는 세포의 분주

B.) 최강 20% 형광 세포의 분주

C.) 최강 5% 형광 세포의 분주

[0154] 이어서, 수득된 클론을 24-웰 거대역가(macrotitre plate)로 옮기고, "세포 배양" 편에 기재된 바와 같이 3회 계대 동안 배양하였다. 각 계대의 말엽에, 상청액 중의 항체의 역가를 "제조합에 의해 발현된 유전자 산물의 생산성 측정" 편에 기재된 방법에 의해 측정하였다. 이들 3회 계대로부터 수득된 평균 값을 사용하여 그래프를 작성하였다. 이를 위하여, 정의된 범주 상에서 수득된 클론의 수를 플롯팅하고 정규 분포에 합치시켰다.

[0155]

## 참조 문헌

- 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 Opin 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**

[0156]

- 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

## 도면의 간단한 설명

[0033]

도 1은 피더 세포의 생산에 사용된 에너지량과 자동적으로 분주된 단일 CHO-DG-44 세포의 클로닝에서의 클로닝 효율 사이의 상관관계를 도시한다. 세포는 각 경우에 약 2000개 불활성 자가 피더 세포 상에 분주된다. 그 래프는, 20 내지 500 Gy의 에너지량이 조사된 피더 세포가 여전히 충분한 인자를 배지 중에 방출하여, 50 Gy에서 분주된 단일 클론의 65% 이상이 클로니로 성장할 수 있다는 것을 보여준다.

[0034]

도 2는 제한 희석 (좌측 칼럼) 또는 단일 세포 분주(우측 칼럼)에 의해 수득된, 항체-발현 CHO-DG-44의 생산성

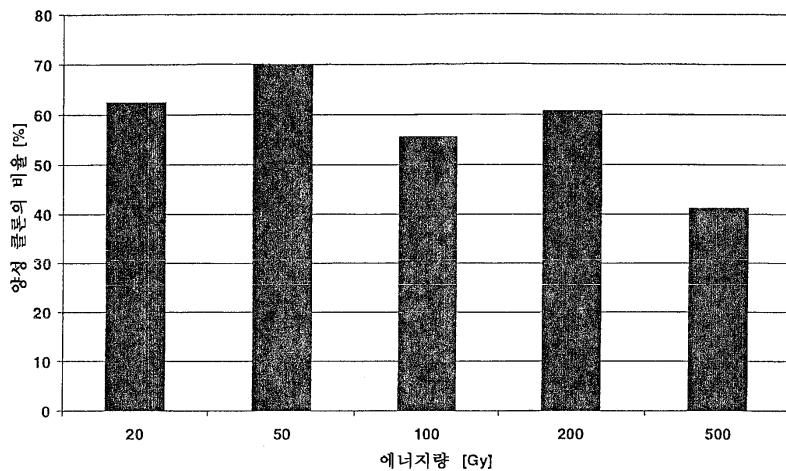
을 도시한다. 좌측 칼럼은 제한 희석에 의해 수득된 6개 배양물의 생산성을 보여준다. 우측은 자동화된 단일 세포 분주으로부터의 6개 단일 클론의 생산성을 보여준다. 생산성을 결정하기 위하여, 3개의 대비 실험을 세포 클론/배양물 당 수행하였다. 제한 희석에 의한 클로닝과는 달리, 단일 클론의 자동화 분주에 의한 클로닝은 생산성의 변동을 상당히 저하시켰다. 단일 클론으로부터 유래된 대비 배양된 계대배양물은, 제한 희석에 의해 수득된 계대배양물에 비해, 생산성 면에서 상당히 더 높은 균일성을 나타낸다.

[0035] 도 3a는 다양한 기준에 따라 분류되고 개별적으로 분주된 CHO-DG44 세포 클론의 생성물 역가를 도시한다. 맨 밑 그래프에서, 분류 기준 "살아있는 세포"만을 총족시키는 단일 세포가 분주되었다. 이 기준은 플로오 사이토미터(Flow Cytometer)에서 포워드-사이드-스캐터(Forward-Side-Scatter) 기록을 사용하여 정의되었다. 당해 세포는 형광에 의해서는 선별되지 않는다. 다른 한편으로, 가운데 및 맨 위 그래프 B 및 C에서, 분류 기준 "세포의 형광"은 추가로 분류 기준 "살아있는 세포"에 논리상 연결되어진다. 분류 기준 "세포의 형광"은 또한 형광 강도에 의해 추가로 정의된다. 이를 위하여, 한편으로 상위 20% 형광 세포 클론을, 다른 한편으로 상위 5% 형광 세포 클론을 개별적으로 분주하였다. 히스토그램 C에서 우측으로의 이동은, 상위 5% 형광 세포의 기준을 사용할 때 고-발현 세포 클론의 비율은, A 및 B에 사용된 다른 분류 기준에 비해, 현저히 증가한다는 것을 보여준다.

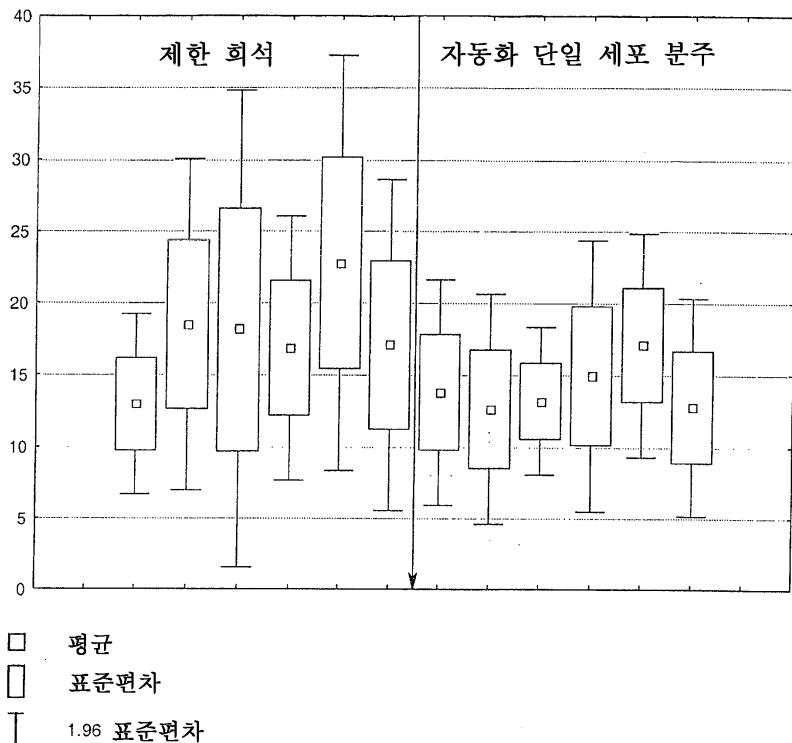
[0036] 도 3b는 도 3a에 제시된 데이터를 토대로 한 것이다. 두 배의 평균 생산성을 가진 생산자 (= 고 생산자)를 수득할 확률 %가 도시되어 있다. 정규 분포는 모든 살아있는 세포에 대해 수득된 데이터와 합치하였고, 평균 역가가 측정되었다. 이어서, 개개의 세포 분주에 의해 수득된 세포 클론이 두 배 이상의 역가를 가질 때의 %가 정규 분포에 대한 분포 함수로부터 산출되었다. 이러한 %는 도 3b에 도시된다. 당해 그래프는, 상위 5% 기준을 추가로 사용할 때 고 생산자의 확률이, 기준 "살아있는 세포"를 독립적으로 사용하는 경우에 비해, 20배 증가한다는 것을 보여준다.

## 도면

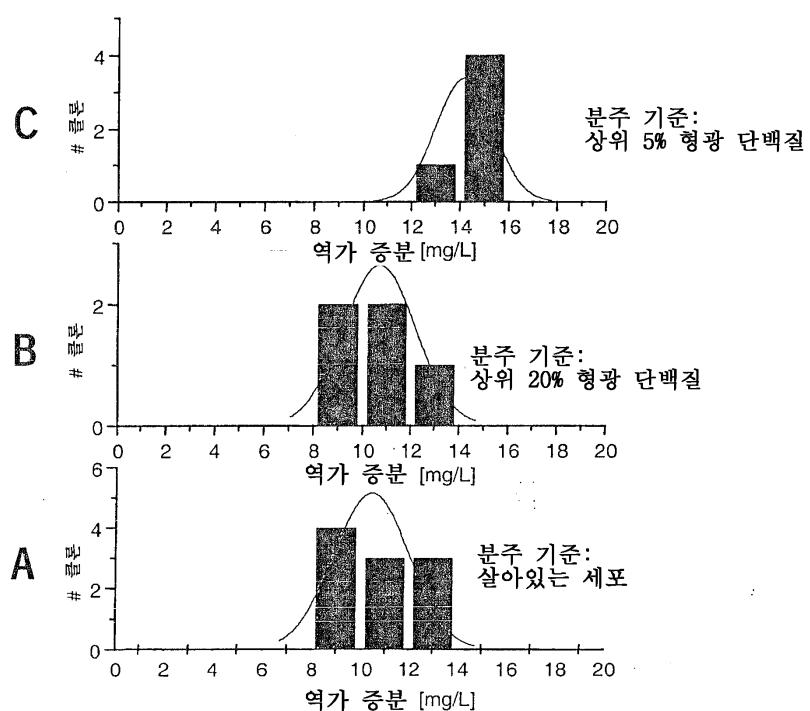
### 도면1



도면2



도면3a



도면3b

