

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910179630.9

[51] Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 7/08 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101676388A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/00 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

[22] 申请日 2003.3.7

[21] 申请号 200910179630.9

分案原申请号 03810120.3

[30] 优先权

[32] 2002.3.8 [33] FR [31] 02/02945

[71] 申请人 维涡里斯公司

地址 法国罗赛

[72] 发明人 B·潘 F·格埃纳克斯

[74] 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司
代理人 程伟

权利要求书3页 说明书24页 附图5页

[54] 发明名称

用于生产目的物质的禽细胞系

[57] 摘要

本发明涉及一种生产禽细胞系的方法，包括生长因子、血清和/或饲养菌苔的逐步或完全撤消，以使所建立的细胞系为能在基础培养基中无限增殖的黏附性或非黏附性细胞。本发明还涉及源于所述细胞系的细胞，其特别利于目的物质的生产。

1. 一种禽干细胞系，其特征在于增殖和不分化的状态，其特征还在于，所述细胞系具有至少一种以下特征：

- 高的核质比，
- 内源性碱性磷酸酶活性，
- 内源性端粒酶活性，
- 与选自抗体 SSEA-1 或 EMA-1 的特定抗体的反应性。

2、根据权利要求 1 所述的禽干细胞系，其特征在于，所述细胞系具有下列特征：

- 高的核质比，
- 内源性端粒酶活性，
- 与选自抗体 SSEA-1 或 EMA-1 的特定抗体的反应性，
- 可选的，内源性碱性磷酸酶活性。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的禽干细胞系，其特征在于，所述禽干细胞系是胚胎来源的禽干细胞系。

4、根据权利要求 1 至 3 任一项所述的禽干细胞系，其特征在于，所述禽干细胞系能够在不含外源生长因子和细胞因子、血清和/或钝化饲养菌苔的基础培养基的体外培养中无限增殖。

5、根据权利要求 1 至 4 任一项所述的禽干细胞系，其特征在于，所述细胞复制活的或减毒病毒。

6、根据权利要求 1 至 5 任一项所述的禽干细胞系，其特征在于，所述细胞复制活的或减毒病毒，所述病毒选自：腺病毒、嗜肝 DNA 病毒、疱疹病毒、正粘病毒、乳头多瘤空泡病毒、副粘病毒、小 RNA 病毒、痘病毒、呼肠孤病毒或逆转录病毒的病毒。

7、根据权利要求1至6任一项所述的禽干细胞系，其特征在于，所述细胞复制活的或减毒病毒，所述病毒选自禽痘病毒家族，特别如鸡痘病毒、灯芯草雀痘病毒、八哥痘病毒、鸽痘病毒、鸚鵡痘病毒、鹤鹑痘病毒、麻雀痘病毒、欧椋鸟痘病毒或火鸡痘病毒。

8、根据权利要求1至6任一项所述的禽干细胞系，其特征在于，所述细胞复制活的或减毒病毒，所述病毒选自正粘病毒家族，特别是流感病毒，更特别是流感病毒A、流感病毒B或流感病毒C。

9、根据权利要求1至5任一项所述的禽干细胞系，其特征在于，所述细胞复制活的或减毒病毒，所述病毒选自副粘病毒家族，特别是麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、呼吸道病毒或肺病毒。

10、根据权利要求1至9任一项所述的禽干细胞系，其特征在于其经过遗传性修饰以生产目的物质，特别是目的多肽、抗体或减毒病毒。

11、根据权利要求1至10任一项所述的细胞系在生产用于人类或动物的活的、减毒的或灭活的疫苗中的用途。

12、根据权利要求1至10任一项所述的细胞系在生产目的多肽特别是抗体中的用途。

13、一种生产禽细胞系的方法，其特征在于它包括以下步骤：

a) 在含有使它们生长的所有因子和钝化的饲养菌苔的培养基中培养禽细胞，

b) 通过改变培养基传代以达到逐步或全部撤消所述因子、血清和/或饲养菌苔，

c) 建立能在不含外源生长因子、血清和/或钝化的饲养菌苔的基础培养基中增殖的黏附性或非黏附性细胞系。

14、根据权利要求13所述的方法，其特征在于它包括以下步骤：

- a) 在含有下述成份的培养基中培养禽胚胎干细胞
- 至少一种选自 SCF、IGF-1 或 bFGF 的生长因子和/或至少一种选自 LIF、IL-11、IL-6、IL-6R、CNTF、制瘤素或促心激素的细胞因子;
 - 钝化的 STO 细胞的饲养菌苔;
 - 浓度为 12-8% 的胎牛血清;
- b) 在至少大约二十次传代后,
- 通过逐步撤消所述生长因子和/或所述细胞因子而改变该培养基; 或
 - 通过逐步撤消饲养菌苔而改变该培养基; 或
 - 通过降低胎牛血清的浓度至 2% 的低浓度而改变该培养基;
- c) 建立能在不含外源生长因子、血清和/或钝化的饲养菌苔的基础培养基中增殖的黏附性或非黏附性细胞系。

15、一种禽干细胞系，其特征在于所述细胞是通过悬浮细胞获得的细胞，该悬浮细胞从受精卵的胚层盘中获得，细胞经修饰以延长其寿命或允许其更重要的生长密度或降低其对营养物的需求。

16、根据权利要求 15 所述的禽干细胞系，其复制痘病毒家族的病毒。

用于生产目的物质的禽细胞系

本申请是申请日为 2003 年 3 月 7 日，申请号为 03810120.3，发明名称为“用于生产目的物质的禽细胞系”的中国专利申请的分案申请。

技术领域

本发明涉及一种生产禽类细胞系，特别是禽干细胞的方法，包含逐步或全部撤消生长因子、血清和/或饲养菌苔。该自主建立的细胞系是能在基础培养基中无限增殖的黏附或非黏附性细胞。本发明还涉及源于特别利于生产疫苗和目的物质的细胞系的细胞。

背景技术

干细胞在体外培养时可区分为源于胚胎，胚胎的部分或甚至成体组织的细胞。表达干细胞被认为是源于胚胎或成体的多能性细胞，有自我更新的能力，且能产生特定的分化细胞。换句话说，干细胞是源于任何能在培养过程中无限分裂且产生与母细胞具有同样增殖和分化能力的子细胞的非癌细胞。这些分离细胞显示了特定的形态学和免疫细胞化学特征。也可以区分以下概念：

一胚胎干细胞(CES 细胞)，是从培养的全部或部分较早期胚胎(囊胚期)中获得的具有典型特征的干细胞。这些 CES 细胞在体外表现出干细胞的所有特性，体内，在对胚胎的形态发生及以任何形式被再植入无论何种胚胎时参与幼植体的移地发育中表现出独特的能力。

一体干细胞(SSC)，在体外培养时具有干细胞的全部特征，但与 CES 细胞不同，在植入胚胎后没有在体内形成生殖腺的潜力。他们仅是对胚胎中成体组织的形态发生有贡献。

与已经分化的起始细胞不同，干细胞没有显出易于鉴定特征的形态学分化状态(成纤维细胞，脂肪细胞，巨噬细胞，等)，但显出可被鉴定的增殖或非分化状态。这些状态导致细胞不同的行为，如体外的快速增殖，典型的形态学特征，不同分子标记的出现，对生长因子的

不同需求及对诱导分化的特定刺激的应答能力。它们对于复制衰老期，大部分已分化的起始细胞的临界时期并不敏感，包括如成纤维细胞。

为了在体外较长时期地维持禽干细胞，有必要观察如 Pain 等，1996；US6,114,168 和 EP787 180 中所述的特定培养和维持的条件。

在体外充分的培养基和生长因子条件下培养的起始细胞只能进行数次传代的增殖。该类细胞可从解离的组织或组织的部分直接获得。传代的次数高度依赖于所选动物种类，组织来源，供体器官的年龄，等。大多情形下，体外观察到细胞增殖逐步变缓，然后停止增殖。

该静息常与复制衰老相应，称为海弗利克极限。该静息被认为是真分子钟活动的结果，其中端粒的长度被认为是一种关键组分。端粒是位于染色体末端的重复序列。重复核苷酸结构变短是 DNA 半保留模式复制的结果。当控制在染色体末端添加重复序列的端粒酶缺乏时，随着端粒的大小，细胞到达一个非回复性的点，过该点时，一种至今未知的活化控制细胞周期相关基因的分子机制启动。细胞被认为阻断在 G1 分裂期且停止增殖。在细胞周期的负调控中涉及多种因素，如各种周期蛋白，特定激酶，RB 和 p53 蛋白，特定转录因子，如 E2F 和其他多种因子（mdm2，BTG，p21，等）。相反，端粒酶被看作是细胞永生化的中心因素，因为它维持端粒的长度且使细胞对于因连续分裂造成的丢失不敏感。

在发育的器官中及器官的生命期，仅一些细胞，包括某些淋巴细胞，显示出端粒酶的永久表达。这种活性也正是干细胞的一种特性，无论在成体（SSC）水平还是幼体发生水平。这种端粒酶活性的表达、维持表达及“唤醒的”表达的特征也是与体外维持生长细胞的永生特点相联系的。至今，许多癌细胞也检测出端粒酶活性呈阳性。该活性被认为是造成肿瘤细胞在体内具有不受控的增殖能力的原因。

所有情况下，端粒酶活性都是干细胞特征、生殖系谱系及细胞成为永生化的能力的极好标记。因而，使用两个标准：端粒酶活性和端粒长度。

在相对于许多实验室中流程和结果都已很有效而要全面而很简洁的建立过程中，细胞系的建立将按两种途径进行：一种由非诱导性的内在遗传性损伤导致的自发式建立，以及一种通过病毒，逆转录病毒

或其他方法如化学试剂, 辐射, UV (紫外线) 照射, 等诱导的触发式建立。在哺乳动物中, 例如, 啮齿类动物 (大鼠, 小鼠, 等) 细胞系的建立认为是非常容易的自发性的; 而另一方面, 不考虑组织来源的人细胞系建立的情形就很不相同 (Smith 和 Pereira-Smith, 1996)。

因此, 当非常想从上述禽干细胞中获得细胞系而用于在体外大量生产目的物质时, 问题就在于能否在经济的培养基中维持细胞培养而避免如细胞分化和衰老的障碍。

在禽类水平, 一般认为原代细胞的建立是罕见的, 甚至几乎不存在的事件。唯一值得注意的已公开的例外是 DF-1 细胞系, 通过永生化的得到的, 自发性的鸡成纤维细胞系 (Foster, 等, 1991; 专利 US5,672,485, ATCC No.CRL12203)。在该细胞系水平, 最近的文章提及观察到的去调控的首要组分 (Kim, 等, 2001a; Kim, 等, 2001b)。

在永生化的过程中, 第一个导致正在增殖的细胞到达海弗利克极限的步骤依细胞类型介于 10 和 50 传代数之间。然后第一个自发突变事件发生, 使细胞通过第一个静息期, 该事件常影响 p53 和 pRb 基因等。因而细胞继续增殖至第二个静息期出现, 该时期通常通过新的其他基因的突变和经常可被观察到的端粒酶激活所引发。

在禽类水平, 一般认为永生化的原代细胞的建立是几乎不存在的事件。相应地, 通过培养肿瘤细胞, 一般直接从肿瘤的活组织检查得到, 已获得大量细胞系。该体外获得事实上是体内某些基因损伤的结果, 这种损伤是造成肿瘤出现的原因。提供一个成纤维细胞系 SB-CEV-1 的例子, 是从动物的内脏肿瘤培养物中分离得到的 (ATCC No.CRL10497, US pn5,846,527)。通过大量存在的已被鉴定, 分离和在分子水平被特征鉴定的禽类病毒和逆转录病毒来达到这目的是非常便利的。由于它们直接或间接的行为常是致癌的 (病毒内在致癌蛋白的整合, 表达过程中转化内在基因的活化), 这些病毒引起肿瘤和损害; 因而从培养的动物器官中获得处于不同分化谱系的细胞系是可能的。体内分离的病毒和逆转录病毒在体外的用途已得到新的发展。这被认为是取之不尽的:

一成淋巴细胞系 DT40 和 DT95, 由禽白血病病毒 (ALV) 而获得, 其中 myc 位点被活化 (Baba 等, 1985, ATCC NO.CRL2111, CRL2112),

—火鸡成淋巴细胞系 MDTC-RP19, 用马立克氏病病毒建立(US No. 4,388,298, ATCC No.8135),

—成淋巴细胞系 ConA-C1, 用 REV 病毒(网状内皮病毒, ATCC No.12135, US No.5,691,200) 建立,

—骨髓单核细胞系 BM2, 用 MH2 病毒建立(Liu 等, 1977, US pn5,388,680),

—及用不同病毒获得的造血细胞系整个系列,

○ 促红细胞系 HD4 (6C2), 由 AEV 病毒获得

○ 单核细胞系 HD11 (Beug 等, 1979), 由 MC29 病毒获得

○ 粒细胞系 HD13 (Golay 等, 1988), 由 E26 病毒获得

○ 混合造血细胞系 IID57 (Metz 和 Graf, 1991), 也由 E26 病毒获得。

然而, 在此类转化方式中问题在于获得生产病毒和携带所用病毒和逆转录病毒活化基因组的细胞。这些活化和病毒性的存在是它们在工业应用上的阻遏, 作为目的病毒的复制支持物或用于在优化的安全条件下特定蛋白质的生产。

另外一种过表达致癌基因, 永生化的基因(腺病毒 E1A 基因, 多形瘤 SV40 “大 T” 基因, 等)或基因片段的方式也使得从已分化的原代细胞获得细胞系成为可能。这些组分可通过简单的能表达永生化的部分的载体转染而导入细胞, 但也可通过已经过遗传修饰而用于表达永生化的组分的病毒或逆转录病毒来导入。永生化组分的来源可以是禽类的或其他的, 病毒性的或其他的。事实上禽细胞的定向可与起始病毒相联系或可被修饰。顺便举个例子, 鸭成纤维细胞系 TDF-2A 即是通过导入一永生化的基因及抗细胞凋亡基因而获得(Guilhot 等, 1993, 专利 US6,255,108)。其他方法也已发展, 如 p53 的过表达(Foster 等, US pn5, 830, 723)。

另外, 相应于不同给药模式, 化学致癌物质对动物的直接作用也是可行的, 尤其, 获得

—QT6 和 QT35 细胞系, 为鹌鹑成纤维细胞(Moscovici 等, 1997, ATCC No.CRL1708),

—鸡肝细胞系 LMH (Kawaguchi 等, 1989, ATCC No.CRL2117),

—鸡成纤维细胞系 CHCC-OU2 (ATCC No.CRL12302, US pn 5,989,805)。

表达永生化事件理解为表示各种作用, 如:

—能诱导细胞生理上改变和/或突变的氧化, 热, 或化学应激作用,
—细胞生理中特定基因产物的作用, 如某些永生化基因 (致癌基因, 细胞周期基因, 抗细胞凋亡基因, 等),

—通过抑癌基因, 细胞凋亡基因, 肿瘤抑制基因, 抑裂殖基因的功能性重组或钝化的靶向性破坏, 导致细胞周期或细胞生理的功能性撤消,

—通过功能性静息对裂殖基因的控制, 等,

—射线作用 (UV, γ , X, 等),

—化学诱变剂的作用 (损伤 DNA 的物质, 类似生长因子的物质, 等),

—各种独立作用的联合作用。

发明内容中, 已发现生长因子、血清和/或饲养菌苔的撤消导致干细胞群体的分离, 尤其是体干细胞, 能在基础培养基中无限生长。

另外, 除了促红细胞干细胞, 大部分为非黏附性细胞, 由上述现有技术获得的大部分细胞 (成纤维细胞, 肝细胞, 等), 显示出黏附性表型。现今, 作为病毒复制支持物的细胞工业化用途, 倾向于非黏附性细胞。该表型在因减少操作而避免用于细胞解离的蛋白水解酶的使用及体外培养非黏附性细胞而达到的高密度方面都是有利的。

本发明描述了细胞系的生产, 能成为自发的非黏附性细胞及该非黏附性通过撤消饲养菌苔获得。由于在悬浮液中的生长, 这些细胞系非常适合于在生物反应器中生产目的物质的工业用途。

除了在基础培养基上生长的特点外, 发现这些细胞系允许某些病毒的复制, 产生比用目前的方法获得的等量甚至更高产量的病毒, 使得这些细胞系尤其利于疫苗的大量生产。

发明内容

因此, 一方面, 本发明涉及一种生产禽细胞系的方法, 其特征在于它包括以下 步骤来表示:

a) 在包含所有因子的培养基中培养禽细胞以使它们生长及饲养菌苔的钝化。

b) 通过改变培养基以获得逐步或全部去除所述因子、血清和/或饲养菌苔的培养基来传代，

c) 建立能在缺少外源性生长因子，血清和/或钝化的饲养菌苔的基础培养基中增殖的黏附性或非黏附性细胞系。

发明内容中，“细胞系的建立”的表示理解为维持细胞在体外相当长时期的培养。有利地，步骤c)中获得的细胞系来源的细胞能增殖至少50天，100天，150天，300天，或优选地至少600天。600天并不是一种时间限制，因为获得的细胞系在更长时间后依然存活。因此，这些细胞系被认为能在无外源生长因子，血清和/或钝化的饲养菌苔的基础培养基中无限增殖。“细胞系”的表示理解为任何能在体外培养中无限增殖且保持或多或少同样的形态学和表型特征的细胞群体。

根据本发明细胞系来源的细胞为禽干细胞，尤其是禽体干细胞。

根据本发明的干细胞能用于获得分化的细胞系。事实上，这些干细胞具有多能性特点，就是说具有诱导入多种分化途径的潜能，能被各种特定标记表征。

这些细胞可以是前体细胞，对应于成体或胚胎组织中相对于干细胞而言的部分已分化的细胞，且能分裂和产生更多的分化细胞。“分化的细胞”的表示理解为任何成体或胚胎组织的特定细胞，具有特定的标记或执行特定的生理学功能。在本发明的另一特定方面，特别是细胞系建立过程中获得的特定分离物来源的特定分离物或克隆中，干细胞贡献于生殖系的形成是可能的。这种情况下，这些以细胞系建立的干细胞被认为是胚胎干细胞。

当然，上述提及的方法使得获得从建立的细胞系中获得的细胞来源的细胞克隆成为可能。这些克隆是在遗传学上与通过分裂来源的细胞等同的细胞。

在特定的实施方案中，本发明涉及一种上述定义的方法，其中所建立的细胞系是在缺少钝化饲养菌苔时增殖的黏附性干细胞。

在这一点上，在上述提及的方法中，步骤b)包括培养基组分的撤消（单撤消生长因子或单撤消血清或先生长因子后血清或相反，先血

清后生长因子)。

在另一实施方案中，本发明涉及一种上述定义的方法，其中其中所建立的细胞系是在无外源生长因子培养基的悬液中增殖的非黏附性干细胞。

在这一点上，在上述提及的方法中，步骤 b) 包括饲养菌苔的逐步或全部撤消，然后培养基其他组分的选择性撤消（生长因子和血清）。

在另一实施方案中，本发明涉及一种上述定义的方法，其中其中所建立的细胞系是在无血清的培养基悬液中增殖的非黏附性干细胞（无血清培养基）。

在另一实施方案中，本发明涉及一种上述定义的方法，其中其中所建立的细胞系是在无外源生长因子和血清的培养基悬液中增殖的非黏附性干细胞。

在另一选择中，步骤 b) 包括生长因子的逐步或全部撤消，随之为选择性的血清的逐步撤消。

在另一选择中，步骤 b) 包括生长因子和/或血清的逐步或全部撤消，随之为选择性的饲养菌苔的撤消。

另外，所建立的细胞系可以是在血清减少的培养基，特别是无血清培养基中增殖的细胞。表述血清减少理解为在整个时期的血清浓度的逐渐降低。该方法允许克隆的选择，其适应新的，渐渐苛刻的环境直到获得能在血清减少的培养基或彻底无血清的培养基中生长的稳定细胞系。

上述提及的方法还可以额外包含一步骤，其中，步骤 c) 获得的细胞在培养基中经过用于大规模生产的选择以获得适合意于人或动物治疗的疫苗生产的克隆。

本发明中相应的细胞具有至少一种以下特征：

- 高的核质比，
- 内源性碱性磷酸酶活性，
- 内源性端粒酶活性，
- 与选自抗体 SSEA-1 (TEC01)，SSEA-3，和 EMA-1 组的特定抗体的反应性。

优选地，本发明的细胞具有以上所有特征。

在另一方面，本发明涉及一种生产禽细胞系的方法，如上所述，步骤 c) 获得的细胞系来源的细胞为了在体外更好的利用而受到修饰，如更长生命时期或生长密度的延伸或选择性地更低的营养需求。

有利地，从建立的细胞系中来源的细胞受到修饰以生产目的物质，尤其是目的多肽，抗体，或减毒的病毒。所述细胞可通过本领域技术人员所能得到的技术进行修饰，尤其是同源的，直接的和/或条件性的重组 (Cre-lox 或 FLP-FRT 系统)，其通过任何载体，质粒，尤其是目的逆转录病毒的转化。

步骤 a) 中使用的培养基包括至少一种因子，选自细胞因子，尤其是 LIF, IL-11, IL-6, IL-6R, CNTF, 制瘤素和其他因子，如 SCF, IGF-1 和 bFGF。

另外，步骤 a) 中使用的钝化饲养菌苔优选地由成纤维细胞，包括作为细胞系建立的鼠成纤维细胞组成。这些成纤维细胞中，特别是 STO 细胞，其受到或没受到修饰或表达质粒的转染 (Pain 等, 1996)。该方法中，步骤 a) 所用细胞通过悬浮细胞获得，该悬浮细胞从包含至少一种细胞因子，b-FGF, 和 SCF 的培养基中受精卵的胚层盘中获得。所述细胞接种入饲养细胞的菌苔中，孵育，然后收集。

步骤 b) 包括步骤 a) 中加入培养基的每种生长因子的逐步撤消，尤其是细胞因子、b-FGF 和 SCF，包含在新的至少无一种所述因子的培养基中的一次传代，及重复进行各种连续的传代直至培养基无所有所述因子。逐步撤消的表示理解为培养基中逐个因子的去除。选择性地，可以进行剧烈和全部的撤消，就是说一下去除所有所述因子。因此，步骤 b) 中的撤消包含逐渐降低一种或多种因子的浓度或者直接无一种或多种因子的培养基或无所有所述因子的培养基中培养禽干细胞。

步骤 b) 也包括血清的撤消。在这点上，撤消是逐渐的，通过在每次传代时降低血清浓度，例如从 10% 过渡到 7.5%，然后 3.75% 和 2%，趋向于 0% (无血清培养基)。选择性地，可以进行更快的撤消。

步骤 b) 还包括饲养菌苔的撤消。饲养菌苔的撤消也是逐渐的，通过在每次传代时减少钝化的饲养细胞数目。选择性地，可进行更快的撤消。

当然，撤消的顺序可以变化。例如，可以先撤消生长因子后撤消饲养菌苔。

因此，另一方面，本发明涉及可从上面提及的方法获得的所建立的细胞系和细胞系来源的细胞，所述细胞能在无外源生长因子、血清和/或饲养菌苔的培养基中增殖至少 50 天，100 天，150 天，300 天，或优选地至少 600 天。

这些细胞系和从中来源的细胞能在基础培养基中增殖至少 50 天，100 天，150 天，300 天，或优选地至少 600 天，尤其在如补充了本领域技术人员常用的各种添加物的 DMEM, GMEM, HamF12 或 McCoy 培养基中。在添加物中，值得注意的是非必需氨基酸，维生素，和丙酮酸钠盐。

本发明还涉及来源于上面所述细胞系的细胞系和细胞，鉴定为禽干细胞，尤其是禽体干细胞或禽胚胎干细胞。

这些干细胞在缺少钝化的饲养菌苔中增殖时，是黏附性的。选择性地，这些干细胞是非黏附性的，且在上述基础培养基悬液中增殖。

这些细胞也鉴定为具有至少一种以下特征：

- 高的核质比，
- 内源性碱性磷酸酶活性，
- 内源性端粒酶活性，
- 与选自抗体 SSEA-1 (TEC01), SSEA-3, 和 EMA-1 组的特定抗体的反应性。

有利地，这些细胞受到遗传性修饰以用于目的物质的生产，尤其是目的多肽，抗体或减毒病毒。

所述细胞能支持例如活的或减毒病毒的复制，尤其是选自腺病毒，嗜肝 DNA 病毒，疱疹病毒，正粘病毒，乳头多瘤空泡病毒，副粘病毒，小 RNA 病毒，痘病毒呼肠孤病毒，逆转录病毒组的病毒。优选地，在这些细胞中复制的病毒属于正粘病毒家族，尤其是流感病毒，或副粘病毒家族，尤其是麻疹病毒，腮腺炎病毒，风疹病毒。

因此，本发明涉及如上所述细胞系，源于所述细胞系的细胞及由经过遗传修饰的细胞而获得的细胞系。优选地，本发明涉及如上所述方法的步骤 c) 来源的细胞系，鉴定为禽干细胞，其能在无外源生长因

子，减少血清或无血清和/或饲养菌苔的基础培养基中无限生长。

本发明的另一方面，步骤 c) 结束而获得的细胞可能受到了遗传修饰。

本发明还涉及细胞培养物，包括源于如上所述细胞系的细胞，尤其是禽干细胞或禽胚胎干细胞，以及无外源生长因子，减少血清或无血清和/或钝化的饲养菌苔的基础培养基。

在另一方面，本发明涉及所述细胞系和细胞在目的物质生产上的应用，尤其是治疗性目的蛋白，及活的或减毒病毒的复制上的应用，尤其是选自腺病毒，嗜肝 DNA 病毒，疱疹病毒，正粘病毒，乳头多瘤空泡病毒，副粘病毒，小 RNA 病毒，痘病毒，呼肠孤病毒，逆转录病毒组的病毒。

优选地，如上所述的细胞系和细胞用于属于正粘病毒家族病毒的生产，尤其是流感病毒，及属于副粘病毒家族病毒的生产，尤其是麻疹病毒，腮腺炎病毒，风疹病毒。

用于支持活的或减毒病毒复制的这些细胞系和细胞也可以，导入完成病毒整个病毒性周期的必要组分，例如，在细胞表面病毒受体的过表达。

在说明书其余部分，参考文献将置于图的图例说明之后。

附图说明

图 1-3: 本发明细胞系的生长曲线（撤消血清（图 2）和撤消饲养菌苔（图 3））。

图 4: 显示禽干细胞典型形态学的照片

N: 细胞核, n: 核仁和 C: 细胞质

（S86N99 分离株，×40 放大率，照片用 Sony Cyber-shot 数码相机拍摄）

图 5: 显示黏附性的和在悬液中的禽干细胞碱性磷酸酶活性的照片
固定后（0.1% 甲醛/0.5% 戊二醛，4°C，30 分钟），细胞用 1×PBS 漂洗两次，37°C 在 NBT/BCIP（氮蓝四唑 0.375mg/ml，5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸 0.188mg/ml，0.1M Tris pH9.5，0.05M MgCl₂，0.1M NaCl）溶液中孵育 10 到 30 分钟。1×PBS 冲洗终止反应，然后拍照。

图 5A—例示了在黏附性细胞系 S86N45 p87 中内源性碱性磷酸酶活性的典型紫色，该细胞系在无饲养菌苔或生长因子中培养（×40 放大率，Sony Cyber-shot 数码相机）。

图 5B—例示了在悬浮液中维持 8 次传代的 EB14 细胞系中内源性碱性磷酸酶活性的典型紫色，该细胞系来源于 S86N45 细胞，在无饲养菌苔或生长因子的悬液中培养（×20 放大率，Sony Cyber-shot 数码相机）。

具体实施方式

实施例 1：使用的活材料的各种来源

细胞系的建立在很大程度上常与细胞材料的遗传本性相联系。因此，在啮齿类动物例子中，相应很少有遗传基础适用于胚胎干细胞 ES 细胞的生产，而常涉及近交系动物的概念。在禽类动物的情形下，由于历史性原因，很难获得近交系动物，由于有商业品系选择的来源，恰好可避免近交。鸡蛋是本发明中培养的细胞的起始来源。优选地，鸡蛋使用未孵育的，但是数小时的孵育对于获得胚胎发育的第一阶段可能是必需的。获得的细胞来源于不同的鸡品系。在所用的品系中，值得注意的有 S86N 品系，一株计划用于具有质量标签雏鸡的生产的商业品系，CNRs，计划用于具有质量标签雏鸡的生产的品系，Marens，一在遗传学上和表型上得到很好地鉴定的地方品系，White Leghorns，一多用于生产作为消耗的鸡蛋和实验室研究的参照系的品系，等。后面的品系中，各种来源都得到检测，包括某鸡蛋（叫做 Vola），其从 Lohmann（德国）的 White Leghorns 品系获得，作为在非常特定的健康安全条件下保存的“SPF”（无特定病原）鸡蛋。从各种品系获得大量细胞分离物，提示了方法的全面特征。

实施例 2：黏附性细胞的生产 and 建立

打开鸡蛋，打开时蛋黄与蛋清分离。胚胎从蛋黄直接或借助巴斯德移液管，或借助小的吸收性滤纸（Whatmann 3M 滤纸）而移除，预先借助穿孔器以穿孔环形式裁剪。穿孔的直径约 5mm。这些环在烘箱干热灭菌约 30 分钟。小的纸环置于蛋黄表面而居胚胎中间，其使得胚胎被纸环围起来。接着借助小剪刀裁剪，然后整个移除物置于陪替氏

培养皿中，装满 PBS 或生理盐水。由纸环带走的胚胎纯化于培养基中剩余的蛋黄和胚盘，因而无卵黄磷蛋白，用巴斯德移液管收集。

两种情形下，胚胎置于含有生理培养基的试管中（1×PBS，Tris 葡萄糖，培养基，等）。然后胚胎被机械解离，接种到设定的培养基中“饲养层”上。在为培养优选的条件中，对于以 MacCoy 培养基为基础培养基，添加起始浓度为 12-8% 的胎牛血清，1% 非必需氨基酸，1% 商业来源的维生素混合物，终浓度为 1mM 的丙酮酸钠盐，终浓度为 0.2mM 的 β -巯基乙醇，终浓度为 2.9mM 的谷氨酸，抗生素混合物包含终浓度为 10ng/ml 的庆大霉素，终浓度为 100U/ml 的青霉素和终浓度为 100 μ g/ml 的链霉素的培养基设定对照。细胞第一次传代后很快，不再向培养基加入抗生素混合物。很快的表示理解为通常在起始的 3-5 次传代后。也可加入核苷混合物，其制备如上所述（Pain 等，1996）。在同样条件下受检测的基础培养基中，得出相近结果的为 HamF12，GMEM 和 DMEM 培养基，后者加入终浓度为 8mg/L 的生物素。作为对照，MacCoy 培养基中生物素浓度为 0.2mg/L，HamF12 中为 0.0073mg/L 及商业化 DMEM 和 GMEM 培养基中为 0。

加入培养基的生长因子和细胞因子是优选的重组生长因子和细胞因子，包括终浓度为 1ng/ml 的鼠 SCF，终浓度为 1-5ng/ml 的 IGF-1，终浓度为 1ng/ml 的 CNTF，终浓度为 1ng/ml 的 IL-6，终浓度为 0.5ng/ml 至 1ng/ml 的可溶性 IL-6 受体。在一些实验中，首次传代时可加入一些其他的因子。例如在 3 或 10 代时，可加入终浓度为 1ng/ml 的 bFGF 和终浓度为 1ng/ml 的 IL-11。

在培养基中钝化的“饲养层”上进行接种，其由鼠成纤维细胞系，STO 细胞组成。在一些情况下，细胞用能在 STO 细胞中持续表达生长因子，如禽 SCF 的简单表达载体转染。因此，“饲养层”生产可溶性和/或结合在细胞质膜上的形式的生长因子。

在细胞直接起始接种如培养基后，依据观察的原始细胞的黏附率，培养基在第二天部分改变，然后在随后的天数部分或完全改变。依这种情形 4-7 天后，起始培养物被分离并转入新的培养皿，在同样的起始培养基钝化的饲养层上。3-5 次传代后，细胞在钝化的 STO 细胞饲养层上培养，其未转染或转染了编码抗抗生物质质的表达载体，如抗新

霉素，潮霉素，嘌呤霉素等的抗性基因。约 20 代后，细胞逐步减少生长因子和细胞因子。逐步撤消的表示理解为从培养基中逐个去除因子。因此，一次传代时，SCF 首先被完全去除，然后，2 次或 3 次传代后，去除 IGF-1。若细胞未显示出形态学的变化或平均增殖率的改变，则其他的因子，如 CNTF 和 IL-6 被去除。该撤消也可是快速的。这种情形中所有因子一起去除。细胞受到观察且若增殖率改变则只在数天后传代。后者解决方法通常是熟练应用的。

各种分离物因而获得且维持很长时期。很长时期的表示理解为数星期顺序的时期，至少 50 天，优选地大于 200-400 天的时期，在时间上无限制。观察到超过 600 天的时期。

不管所用的支持物，所有黏附性细胞都用蛋白裂解酶解离，如链霉蛋白酶，胶原蛋白酶，中性蛋白酶，胰蛋白酶，等。优选地，使用细菌性来源的蛋白裂解酶以避免任何潜在的动物来源的污染。这些细胞具有胚胎干细胞的特征，作为例子，如图 4 的照片等例示的特定形态学特征，小体积，大的细胞核质比，至少有一个清晰可见核仁的细胞核及非常少的细胞质。这些细胞可以通过以小的或紧或松的聚集体生长来鉴定。这些黏附性和非黏附性细胞对一些抗体显示出交叉反应，如上述 Pain 等，1996.及专利 US6,114,168 和 EP787 180 中提及的。内源性端粒酶活性也得到显示且是在这些细胞的“干”本性中的一种重要因素。

获得不同分离物的细胞且维持长的时期。

表 1 例示了这些分离物的一些特征

名称	种系	起始日期	“静息”	天数	传代数	子代数
A. S86 N16	Chicken S86N	26-01-2000	05-08-2001	559	207	692
WL3	Chicken WL	28-06-2000	09-08-2001	403	153	333
Valo4	Chicken Valo	26-09-2000	07-02-2002	401	135	317
S86N45	Chicken	29-01-2001	12-11-2001	287	118	329

	S86N						
--	------	--	--	--	--	--	--

应当指出，术语“静息”并不对应于细胞增殖的结束，而是实验者对细胞培养的有意的静息。子代 n 的数目由公式 $X=2^n$ 或 X 为细胞的理论累积数目获得。该细胞数是有效的，因细胞可在每次传代和接种时计数。因此，整个培养历程是有效的。

实施例 3：细胞的传代

干细胞的一种特征，在特殊的体干细胞和胚胎干细胞中，就是它们在体外相当长时间内的增殖能力。为了繁殖和传代细胞，传代前几小时培养基被改换并且用新鲜的培养基替代。图 1 中的曲线例示了细胞生长和建立的示意图。

实施例 4：倍增时间和平均分裂时间

用培养建立的细胞系和上述实施例中提及的细胞系起始培养，可以计算出平均分裂时间。在所有获得的独立分离物中，连续传代过程中增殖速率缓慢增长，因此导致在建立细胞系过程中平均分裂时间的变化。在黏附阶段，细胞最初接种于一个非活化的饲养菌苔上，然后以每个 100mm 培养皿 $1-2 \times 10^6$ 个细胞的稳定起始接种密度定期传代。表 2 例示了 3 种已建立细胞系的倍增时间 (d) 和平均分裂时间 (MDT 以小时计) 作为培养时间的参数。发现在细胞系建立过程中倍增时间降低。

表 2:

细胞数/天数	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550
S86N16(d)	0.30	0.63	1.00	0.86	1.13	1.15	1.47	1.70	1.94	1.50	1.9
S86N16(MDT)	80	38	24	27.9	21.2	20.9	16.3	14.1	12.4	16	12.6
S86N45(d)	0.49	0.89	0.89	1.45	2.15	×	×	×	×	×	×
S86N45(MDT)	49	26.8	27	16.5	11.1	×	×	×	×	×	×
Valo4(d)	0.03	0.61	1.00	1.17	1.26	1.03*	1.08*	1.25*	×	×	×
Valo4(MDT)	>48	39.3	24	20.5	19	23.3	22.2	19.2	×	×	×

以天数计的时期内平均倍增时间 d 的建立由以下公式计算： $d = (1/\text{Log}2 \times (\text{Log}X2/X1)) \times 1 / (T2-T1)$ ，其中 $X2$ 和 $X1$ 分别是 $T2$ 和 $T1$ 时间内的细胞总数。该公式为在实施例 1 中子代数为 N 时用公式 $X=2^n$ 计算细胞数目的直接结果。平均分裂时间 (MDT) 为 d 除以 24 小时而获得的小时数。

*Valo 细胞系在没有饲养菌苔存在的塑料制品上建立细胞系的过程中进行传代。当细胞重新适应新的环境时，倍增时间先降低然后再增加。

实施例 5：对细胞系的增殖进行血清水平上的控制

在获得这些细胞系时，所用的培养基为常规培养基，由基础培养基 (DMEM, GMEM, HamF12, McCoy, 等) 补充入不同的添加物如非必需氨基酸，维生素，和丙酮酸钠盐组成。该复合培养基包含胎牛血清，为培养过程中的中心组分，甚至一些不同来源的组分，包括植物组分，可被逐步使用。提出一种控制和使细胞适应相对较低比例胎牛血清的方法。使得在低百分比血清的条件下 (例如在 S86N16 细胞系例子中血清比例为 2%) 维持细胞高增殖 (分裂时间 >1) 成为可能。

图 2 所示曲线例示了对给定细胞类型 S86N16 血清的相对减少量，倍增时间和平均分裂时间被计算出并显示在表 3 中。应当指出，平均分裂时间的增加是血清相对减少的一种影响。在上述条件下培养一段时间后仍然可观察到恢复期。这个时间保持低于 24 小时 ($d > 1$)，显示了即便在血清浓度为 2%，已经相当低时，细胞在工业时期的一种非常有利的增殖状态。为了提高这个时间和进一步优化培养条件，改进有关不同代谢物的利用应当被重视。

表 3:

生长条件	10%	7.5%	3.75%	2%
d	2.02	1.51	1.47	1.08
MDT	11.9	15.8	16.3	22.2

实施例是在 10% 条件下 p204 和 p179 代之间，7.5% 条件下 p198 和 p176 代之间，3.75% 条件下 p224 和 p201 代之间，以及 2% 条件下 p216 和 p199 代之间获得的。

实施例 6：除去细胞的饲养菌苔

在初始培养条件下，为了得到如前所述的胚胎干细胞，菌苔对于非活化的细胞来说显得是必需的。在一定数量的传代后，饲养菌苔显得不再是必需的。只有“培养处理的”塑料制品显得重要了。事实上，某些胚胎细胞的一种特征就是以黏附形式增殖。为了方便黏附细胞，所用的各种塑料制品材料被“培养”处理。在制造时他们经过增加塑料制品表面电荷的处理，这些电荷促进胞外基质的黏附。相反，未经处理的细胞培养塑料制品，常称为细菌学品质的塑料制品，是没有经过添加特定饲养菌苔的表面处理的。随之，细胞的黏附通常非常困难，或甚至是不可能的，或导致形态学及行为学的改变，通常是很激烈的。两种塑料制品品质的区别使得依靠在不同制品上接种而获得具有不同行为的细胞成为可能。逐步除去非活化“饲养层”的培养物使得在数次传代后，获得直接接种于“培养处理的”塑料制品的干细胞均一培养物成为可能。

图 3 中，以 S86N16 细胞系为例，显示了在非活化“饲养层”存在和缺少的条件下细胞维持的对比生长曲线。细胞的这种适应是进步的，使得不会失去原始维持在“饲养层”上细胞的干细胞特性。累进的衍生物因此而得到。在塑料制品上增殖的细胞的获得是撤消这个过程的一种实现。表 4 中，分裂时间显示了细胞对环境的敏感度。在逐步撤消血清的情况下，在所述条件下数次传代后，可获得一种对细胞具有恢复效应的适应性。

表 4:

生长条件	1.2	0.5	0.3	塑料制品
d	1.95	1.84	1.39	1.42
MDT	12.3	13	17.3	16.9

实施例是在 3 种条件下饲养细胞为 1.2×10^6 , 0.5×10^6 和 0.3×10^6 时 p154 和 p131 代之间及单有塑料制品的条件下 p161 和 p139 之间获得的。

实施例 7: 生长因子中除去细胞

在初始培养条件下，细胞因子的存在是必需的。可以图示性地区分两类家族的因子：细胞因子和营养因子。

此类细胞因子主要是通过通过与 gp130 蛋白相联系的受体起作用的细胞因子。因此，LIF, IL-11, IL-6, CNTF, 制瘤素和促心激素具有相似的作用模式，在对特定链的受体水平的招募以及与单体的或有时为异体的 gp130 蛋白间的结合。有些情况下，与可溶性受体的结合，尤其是所述的如 IL-6 和 CNTF 的受体形式，使得提高可见的增殖效应成为可能。已经显示至少添加一种此类细胞因子对于获得胚胎干细胞看来是必需的。

营养因子主要是 SCF, IGF-1 和 bFGF, 如前所述，在培养起始时经常被使用。它们对于获得和扩增细胞也是必需的。

通过逐步减少这些生长因子，数次传代后，可以获得不需要外加的生长因子而允许胚胎干细胞或体干细胞增殖的培养条件。用于鉴定这些细胞的不同标记对于没有生长因子维系的细胞通常是阳性的。

实施例 8：所用培养基的对比

接种于不同的培养基，细胞不能在同样的频率获得。对比培养基的组分使得鉴定其中一种特定组分变得困难。看上去更像是所有的组成使得细胞在生理上有进步。之前的培养基中，Ham F12 培养基，McCoy 培养基，DMEM 培养基及添加了生物素的 DMEM 培养基是值得注意的。以此类分离物起始，适应试验在这些不同的培养基上进行。

实施例 9：非黏附性细胞的建立

在干细胞的连续传代时，直接高密度接种于细菌性培养皿中，使得在数次传代后，获得从培养基上分离的，在悬浮液中以小而规则的聚集体增殖的胚胎细胞成为可能。这种增殖可以持续多代，仅通过稀释，机械分离而不使用蛋白水解酶。培养物的搅拌以常规进行，但不代表获得非黏附性细胞的区别性因素。就像黏附性细胞一样，这些细胞有干细胞的典型形态学特征，如，小体积，大的细胞核质比，至少有一个清晰可见核仁的细胞核及非常少的细胞质。这些细胞可以通过以小的或紧或松的聚集体生长来鉴定。这类非黏附性细胞对一些抗体显示出交叉反应，如上述 Pain 等，1996.中提及的。这类细胞也显示出内源性端粒酶活性为阳性（如实施例 10 中提及的 EB1, EB4 和 EB5 细胞）。在非黏附性阶段，细胞在不同培养基中显示出高的增长。起始的接种密度和非常有规律的新鲜培养基的供给使细胞达到可能超过 1

$\times 10^6$ 每毫升的高密度。表 5 概括了一些分离物的主要特征（亲本细胞，制成悬液的原代细胞，在悬液中维持培养的天数，自发静息生长前所获得的传代数和子代数）。应当指出，制成悬液的传代细胞可从一种培养物到另一种而不同（见分离物 EB1 和 EB14），增殖效率也可不同（见分离物 EB3 和 EB14）。

表 5:

名称	亲本细胞	起始传代数	起始日期	天数	传代数	子代数
EB1	S86N16	p111	20-01-2001	184	41	120
EB3	S86N16	p118	23-01-2001	381	17	40
EB4	S86N45	p100	25-09-2001	44	17	40
EB5	S86N45	p100	25-09-2001	44	17	40
EB14	S86N45	p81	05-09-2002	70	24	65

应当指出，术语“起始日期”与被置于非黏附性条件下的细胞一致。

实施例 10：所建立细胞的鉴定

维持长时间培养的干细胞使用同样的如前所述的标准来鉴定（Pain 等，1996）。因此，可以定期检测内源性碱性磷酸酶活性，图 5 中照片例示了内源性端粒酶活性和与特定抗体如抗体 SSEA-1（TEC-01）和 EMA-1 的反应性。

在建立细胞中一个重要的标准就是端粒酶的存在。用 TRAP 检测试剂盒（端粒酶 PCR 酶联免疫反应，罗氏）对在培养物中维持的细胞进行各种不同的测验。在培养物中多次传代后，细胞被检测到呈阳性。因此，端粒酶活性在 S86N16 细胞，S86N45 细胞和以非黏附形式来源的 EB1，EB4 及 EB5 细胞中是可检测的（见表 6）。在原始培养物中维持的 CEFs（鸡胚胎成纤维细胞）细胞被认为是阴性的。值 $OD < 0.2$ 是试剂盒推荐的作为阴性阈值的临界值。所有分析以等量的 2000 个细胞进行。

表 6：不同细胞系在不同传代数时的端粒酶活性测定

细胞系	传代数	端粒酶 OD 值
S86N16	p12	1.7

	p29	2.8
	p185	0.97
	p204	0.95
S86N16 EB1	p134	1.1
S86N45	p50	0.87
	p58	1.1
	p66	0.96
	p94	1.2
S86N45 EB4	p112	1.4
S86N45 EB5	p112	0.94
CEF*	p4	0.07

实施例 11：细胞的转染和诱导

维持长时间生长的干细胞用不同的表达质粒转染。已显示禽类干细胞可被转染 (Pain 等, 1996)。特定地, 转染非黏附性细胞且多种筛选系统使得鉴定稳定转染的细胞成为可能 (细胞筛选, 限制性稀释, 等)。遗传修饰可以在干细胞的未分化阶段进行。一旦获得遗传修饰, 细胞就自发的或通过添加分化诱导剂而诱导分化。这儿, 可使用浓度为 10^{-8} - 10^{-6} 摩尔/升的视黄酸, 或终浓度为 1%-2% 的二甲基亚砷, 或浓度为 10^{-4} - 10^{-8} 摩尔/升的丁酸钠, 或终浓度为 1-5 μ g/ml 的佛波酯 (TPA, PMA, 等) 或脂多糖 (LPS)。在另一实施例中, 细胞能在悬液中形成胚胎样体, 该胚胎样体在细胞组建过程的解离或未解离后可黏附在塑料制品上。分化的细胞开始增殖, 但是长期增殖的能力非常有限。通过对影响到细胞增殖的基因靶向性修饰, 可以使得这些已分化细胞能长时间增殖。

实施例 12：细胞的感染

黏附性或非黏附性细胞可被不同的病毒和逆转录病毒包括禽类病毒及逆转录病毒感染。因此, 此类细胞可用作生产病毒材料的复制系统, 依赖该病毒材料可用于生产活的, 减毒的或钝化的人和兽类疫苗。在目的病毒中, 所提及的病毒科有腺病毒 (如, 人腺病毒 C, 禽腺病毒 A, 羊腺病毒 D, 火鸡腺病毒 B), 圆环病毒 (如, 鸡贫血病毒, CAV),

冠状病毒（如，禽传染性支气管炎病毒（IBV）），黄病毒（如，黄热病毒和丙型肝炎病毒），嗜肝 DNA 病毒（如，乙型肝炎病毒和禽嗜肝 DNA 病毒，如鸭嗜肝 DNA 病毒），疱疹病毒（如，禽疱疹病毒，HSV（单纯疱疹病毒）和人疱疹病毒 1、3、5 型），正粘病毒（如，流感病毒：流感病毒 A，流感病毒 B，流感病毒 C），乳头多瘤空泡病毒（如，多瘤病毒和非常特异的猴病毒 40），副粘病毒（如，麻疹病毒，腮腺炎病毒，风疹病毒及呼吸道病毒和肺病毒，如人呼吸道合胞病毒和次肺病毒，如禽肺病毒），小 RNA 病毒（如，脊髓灰质炎病毒，甲型肝炎病毒及脑心肌炎病毒和口蹄疫病毒），痘病毒（如，鸡痘病毒，禽痘病毒，包括金丝雀痘病毒，灯芯草雀痘病毒，八哥痘病毒，鸽痘病毒，鸚鵡痘病毒，鹤鹑痘病毒，麻雀痘病毒，欧椋鸟痘病毒，火鸡痘病毒），呼肠孤病毒（如，轮状病毒），逆转录病毒（如，ALV 禽白血病病毒， γ 逆转录病毒，如小鼠白血病病毒，慢病毒，如人免疫缺陷病毒 1、2 型）以及披膜病毒科，如风疹病毒属，特别如风疹病毒。

实施例 13：病毒感染非黏附性禽细胞系（EB1）的方案

细胞的扩增：

EB1 或 EB14 细胞接种入培养基，优选 MacCoy's 5A，HAMF12 或 DMEM 培养基，或任何其他的目的培养基，含 5% 血清，通常起始体积为 50 毫升，细胞浓度为 0.2×10^6 个/毫升。细胞在 39°C，二氧化碳浓度为 7.5% 条件下，通过搅拌维持生长。3-4 天内每天加入新鲜培养基，使细胞持续扩大至终体积为 100-250 毫升，密度为 $1-3 \times 10^6$ 个/毫升。

收集悬液中的细胞，以约 1,000 转/分离心 10 分钟。细胞团块以 20-50 毫升 $1 \times$ PBS（磷酸盐缓冲液）重悬。然后进行细胞计数，离心而成团的细胞以终浓度 $3-5 \times 10^6$ 个/毫升置于无血清培养基中。以此准备数管。

病毒的制备和感染：

已知滴度的病毒材料在 37°C 快速融解，以无血清培养基稀释至 $10 \times -1000 \times$ 于最终感染所需浓度的滴度。病毒依照不同类型，以 m.o.i（感染复数）为 0.01-0.5 感染细胞，包含向细胞团块加入介于 0.1 和 10 % 体积/体积的病毒悬液。病毒在优化的温度下孵育 1 小时，通常为 33

℃-37℃，再次离心，小心倒掉培养基。该步骤对于限制起始病毒在后续过程中的作用一般被认为是必要的。一种可能就是不用再次离心而直接用含血清培养基（5%血清）稀释细胞至终浓度为 $0.2-1 \times 10^6$ 个/毫升，然后再孵育。

收集上清和细胞:

孵育 2-4 天后，依照病毒动力学和某些病毒的潜在细胞病变效应，收集含细胞及细胞碎片的培养基。由于病毒的性质，只有细胞团块和上清是所需的，且含有病毒颗粒。收集的上清再次以 2,500 转/分离心 5-10 分钟，在纯化颗粒前于 -80℃ 保存。等量收集以进行滴定。细胞团块置于 5 毫升无血清培养基中，超声处理后以 2,500 转/分离心 5-10 分钟。获得的上清于 -80℃ 保存至纯化和等量滴定时。

在各种执行条件下比较病毒的感染和生产能力。

由于病毒的细胞病变效应，通常用噬菌斑技术进行滴定。

实施例 14: 病毒感染黏附性禽细胞系 (S86N45) 的方案

细胞的制备:

在感染进入 T150 培养瓶之前，细胞以 $0.03-0.06 \times 10^6$ 个/毫升的浓度接种入培养基培养 48 小时，优选 MacCoy's 5A, HAMF12 或 DMEM 培养基，或任何其他的目的培养基，含 5% 血清。在 39℃，二氧化碳浓度为 7.5% 条件下维持生长。

感染:

已知滴度的病毒材料在 37℃ 快速融解，以无血清培养基稀释至 $10 \times -1000 \times$ 于最终感染所需浓度的滴度。病毒依照不同类型，以 m.o.i (感染复数) 为 0.01-0.5 感染细胞，包含向细胞团块加入介于 0.1 和 10 % 体积/体积的病毒悬液。感染一般在最少的无血清培养基中进行 (每个 75cm^2 培养瓶中为 5-10 毫升)。

病毒在优化的温度下孵育 1 小时，通常为 33℃-37℃，培养瓶中加入 20 毫升 5% 的培养基。特定情形下，可用 PBS 冲洗细胞以除去可能附着在细胞上的病毒颗粒。在病毒引起细胞病变的情形下，感染后每天观察细胞以监控细胞噬菌斑，它指示感染的良好进程。

收集上清和细胞:

孵育 2-4 天后，依照病毒动力学和某些病毒的潜在细胞病变效应，

收集含细胞及细胞碎片的培养基。由于病毒的性质，只有细胞团块和上清是所需的，且含有病毒颗粒。收集的上清再次以 2,500 转/分离心 5-10 分钟，在纯化颗粒前于 -80℃ 保存。等量收集以进行滴定。细胞团块置于 5 毫升无血清培养基中，超声处理后以 2,500 转/分离心 5-10 分钟。获得的上清于 -80℃ 保存至纯化和等量滴定时。

在各种执行条件下比较病毒的感染和生产能力。

由于病毒的细胞病变效应，通常用噬菌斑技术进行滴定。

实施例 15: 在非黏附性禽干细胞 EB1 细胞系中重组禽痘病毒的复制

非黏附性干细胞 EB1 在 138 代时扩大，接着以感染复数 0.1 感染生产目的蛋白的禽痘病毒。感染后，细胞在控制箱中维持生长 4 天，期间感染持续进行。在溶胞作用后，为了监控上清和胞内病毒的滴度差异，从第 2 天起，以及接下来的两天，除去等分量的细胞。滴定以噬菌斑技术进行。

表 7 显示了获得的结果。结果表明，重组禽痘病毒在 EB1 干细胞中的复制是非常令人满意的。因此，从培养到感染的进程中感染滴度增强，在接种 4 天后达到最大值 7.2PFU/细胞 (PFU: 噬斑形成单位)。该滴度已至少与用同样的重组禽痘病毒感染原始鸡胚细胞所得到的病毒滴度相当。

该滴度可以用特定的培养条件和优化的程序来提高。

还应当指出，在更大规模的 3 升生物反应器中，至少可以获得同样的感染滴度。

表 7: 重组禽痘病毒在非黏附性 EB1 干细胞中的滴定动力学

取样 (感染后小时)	50 小时	74 小时	97 小时
细胞碎片 (Log PFU/ml)	6.40	6.37	5.99
上清 (Log PFU/ml)	5.56	5.8	6.29
总共 (Log PFU/ml)	5.78	5.94	6.31

PFU/cell	2.2	3.2	7.2
-----------------	------------	------------	------------

参考文献

Baba TW, Humphries EIL (1985). Formation of a transformed follicle is necessary but not sufficient for development of an avian leukosis virus-induced lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82:213-216.

Beug H, von Kirchbach A, Doderlein G, Conscience JF, Graf T. (1979). Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* 18:375-390.

Guilhot C, Benchaibi M, Flechon JE, Samarut J. (1993). The 12S adenoviral E1A protein immortalizes avian cells and interacts with the avian RB product. *Oncogene* 8:619-624

Kawaguchi T, Nomura K, Hirayama Y, Kitagama T. (1987). Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res* 1987 47:4460-4464.

Kim H, You S, Farris J, Foster LK, Foster DN. (2001). Post-transcriptional inactivation of p53 in immortalized chicken embryo fibroblast cells. *Oncogene* 20:3306-3310.

Kim H, You S, Kim IJ, Foster LK, Farris J, Ambady S, Ponce de Leon FA, Foster DN. (2001). Alternations in p53 and E2F-1 function common to immortalized chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* 20:2671-2682.

Liu JL, Klein PA, Moscovici MG, Moscovici C. (1992). Monoclonal antibodies recognizing normal and retrovirus-transformed chicken hematopoietic cells. *Virology* 189:583-591.

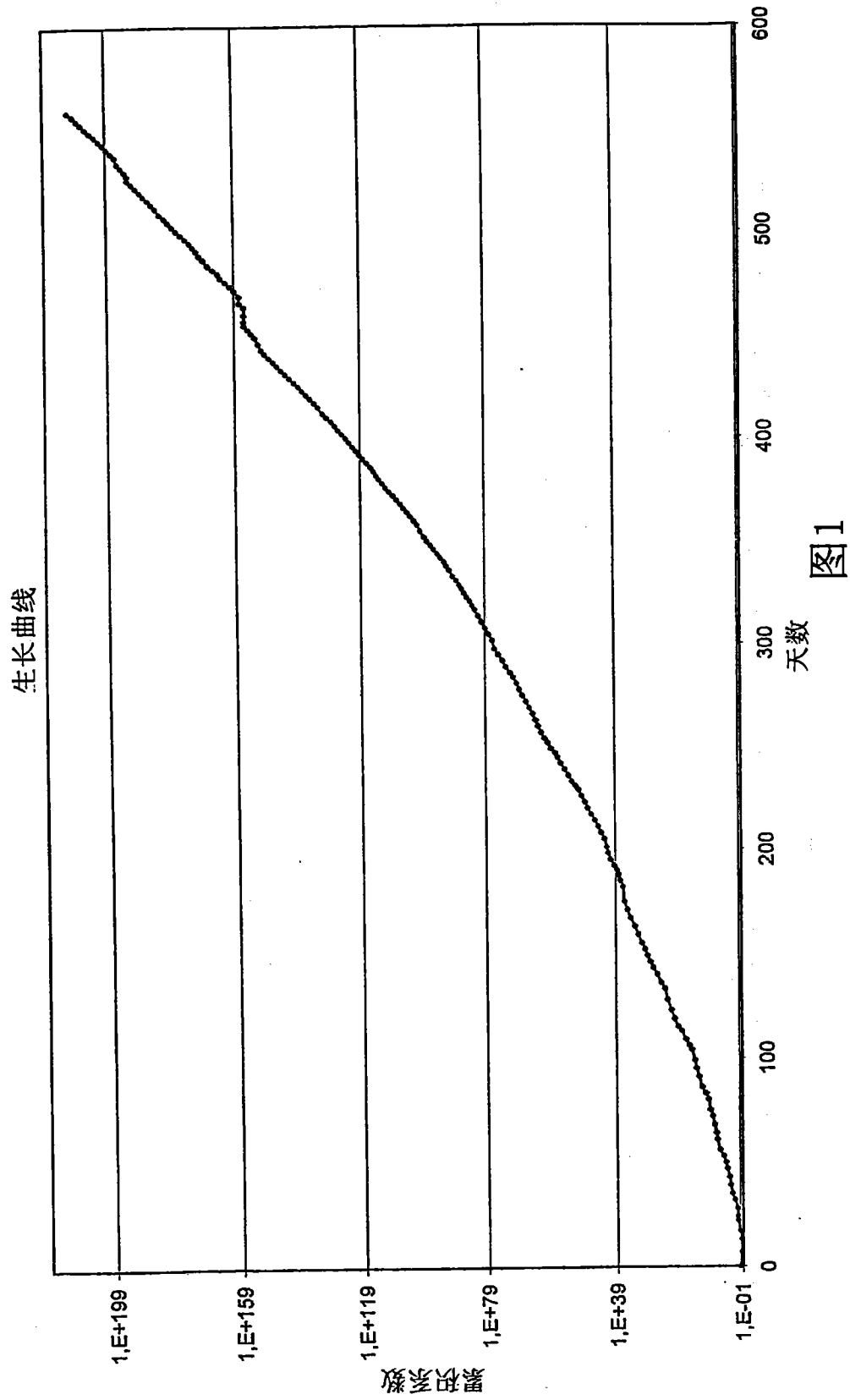
Moscovici C, Moscovici MG, Jimenez H, Lai MM, Hayman MJ, Vogt PK. (1977). Continuous tissue culture cell lines derived from chemically induced tumors of Japanese quail. *Cell* 11:95-103.

Pain B., Clark M.E., Shen M./ Nakazawa H., Sakurai M., Samarut J., Etches RJ. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122:2339-2348.

Pain B., Chenevier P., Samarut J. (1999). Chicken embryonic stem cells and transgenic strategied. *Cells Tissues Organs* 165:212-219.

Samarut J, Gazzolo L. (1982). Target cells infected by avian erythroblastosis virus differentiate and become transformed. *Cell* 28:921-929.

Smith JR and Pereira-Smith OM (1996). Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* 273,63-67.



生长曲线 S86 N 16 (血清减少)

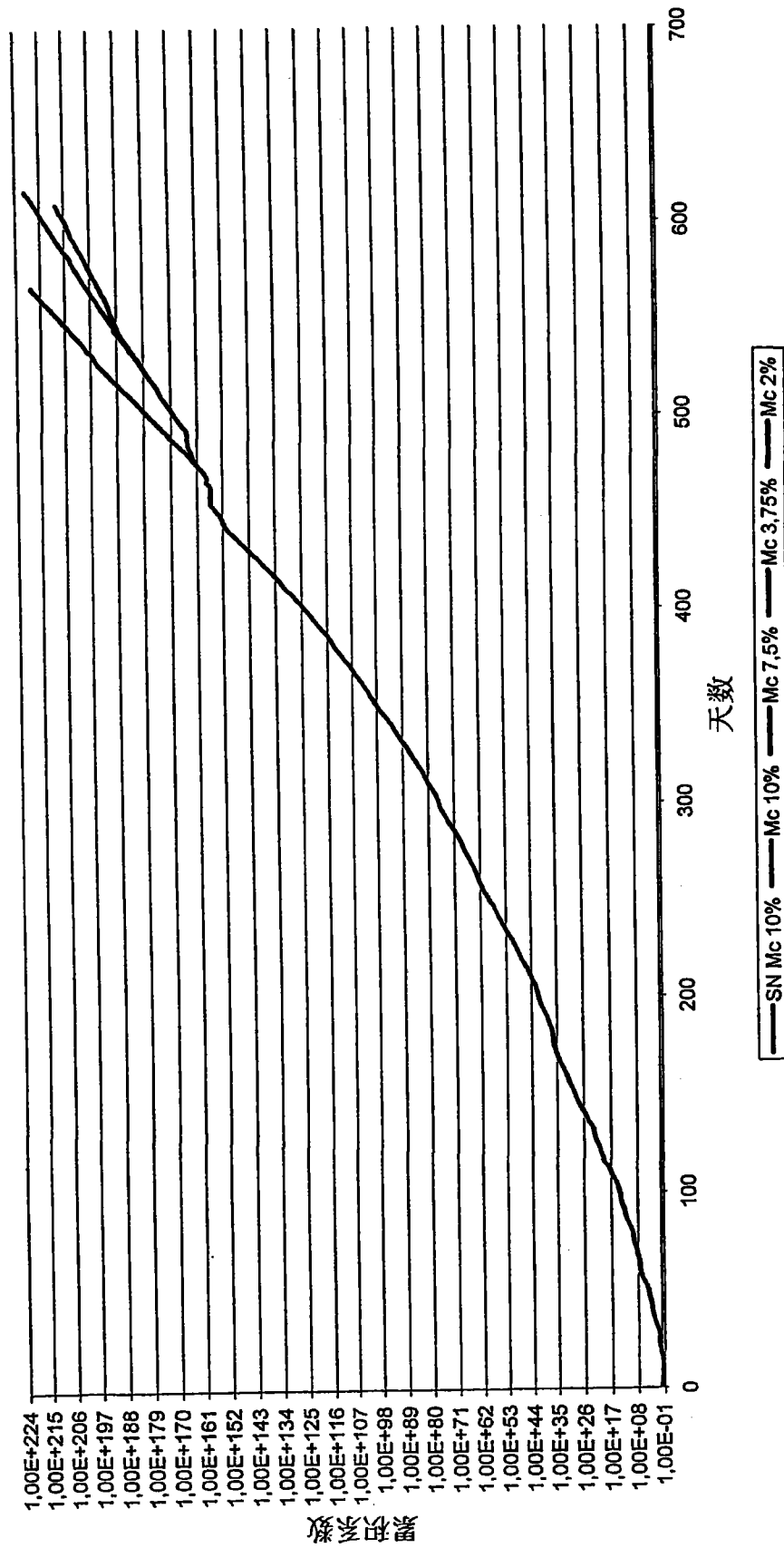


图2

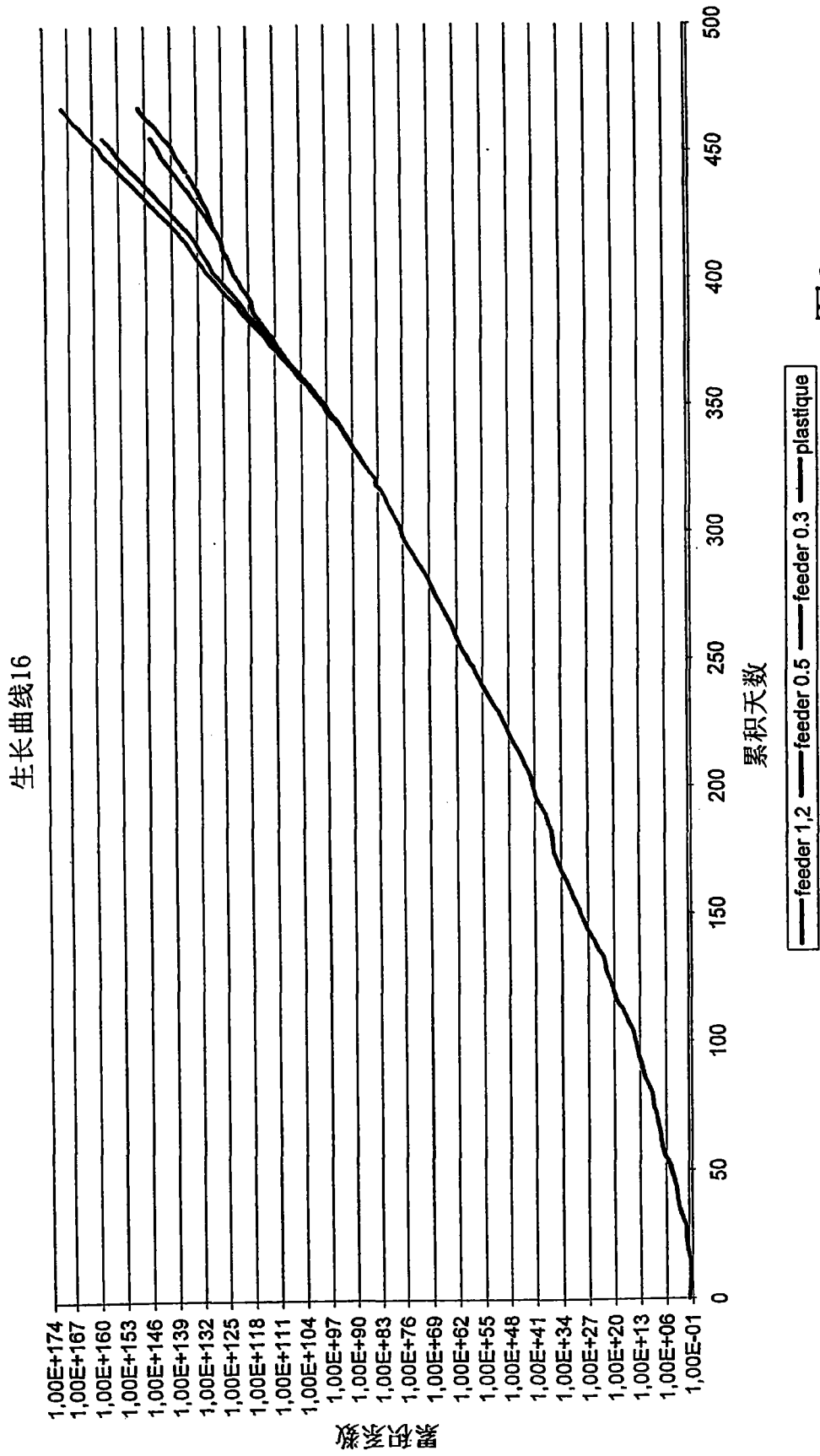


图 3



图4



图5A

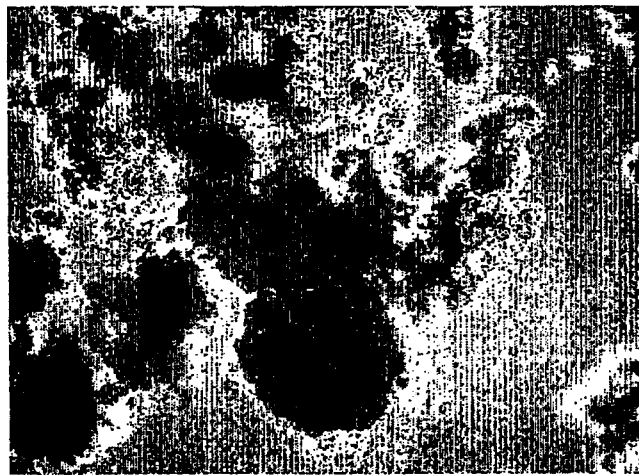


图5B