

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成21年5月28日 (2009.5.28)

【公表番号】特表2008-537681(P2008-537681A)

【公表日】平成20年9月25日 (2008.9.25)

【年通号数】公開・登録公報2008-038

【出願番号】特願2008-505892(P2008-505892)

【国際特許分類】

C 1 2 N 7/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/235 (2006.01)
 A 6 1 K 39/245 (2006.01)
 A 6 1 K 39/145 (2006.01)
 A 6 1 K 39/155 (2006.01)
 A 6 1 K 39/125 (2006.01)
 A 6 1 K 39/275 (2006.01)
 A 6 1 K 39/15 (2006.01)
 A 6 1 K 39/21 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2006.01)
 A 6 1 P 31/12 (2006.01)
 G 0 1 N 33/569 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 7/00
 A 6 1 K 39/235
 A 6 1 K 39/245
 A 6 1 K 39/145
 A 6 1 K 39/155
 A 6 1 K 39/125
 A 6 1 K 39/275
 A 6 1 K 39/15
 A 6 1 K 39/21
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 P 31/12
 G 0 1 N 33/569 Z

【手続補正書】

【提出日】平成21年4月10日 (2009.4.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鳥類胚性幹細胞においてウイルスを製造する方法であって、

該鳥類胚性幹細胞が、下記工程を含んでなる方法により確立されるものであり：

i) 鳥類胚性幹細胞の、それらの細胞の増殖を可能にするあらゆる因子を含む完全培養培地で、かつ、好ましくは不活性化し、動物血清を補給した、マウス繊維芽細胞のフィーダー層の存在下での単離、培養、および増殖；

ii) 前記因子、前記血清、および前記フィーダー層を段階的または完全除去するための

、前記培養培地を改変することによる継代；

iii) 外因性増殖因子、不活性化フィーダー層、および低レベルの血清（または血清なし）の不在下での基礎培地で増殖させることができる接着または非接着鳥類細胞株を確立すること；

該ウイルスが、アデノウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペスウイルス、オルソミクソウイルス、パポバウイルス、パラミクソウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、およびレトロウイルスからなる群から選択され、

該方法が、

a) 該鳥類胚性幹細胞を培養器内で、無血清培地 N° 1 中、懸濁状態で増殖させる工程；

b) 該細胞密度が少なくとも 150 万細胞 / ml であるときに、該細胞を該選択されたウイルスに感染させる工程；

c) 感染直前に、感染と同時に、または感染直後に、細胞培養物に無血清培地 N° 2 を添加する工程；および

d) ウイルス複製を可能にするために、感染細胞をさらに培養する工程；さらに

e) 所望により、該ウイルスを採取する工程

を含んでなる、方法。

【請求項 2】

無血清培地 N° 1 に、0.25 ~ 10 容量の無血清培地 N° 2 が加えられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記無血清培地 N° 1 および / または前記無血清培地 N° 2 に、アミノ酸、脂質、脂肪酸、コレステロール、炭水化物、非動物起源のタンパク質加水分解物、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも 1 つの成分が補給される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞に、アミノ酸、脂肪酸、炭水化物、非動物起源のタンパク質加水分解物、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも 1 つの成分を供給するさらなる工程を含んでなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記供給が工程 a) ~ d) 中に毎日生じる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記供給が工程 a) ~ d) 中に継続的に生じる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

アミノ酸がグルタミンであり、グルタミンの供給が、工程 a) ~ d) 中に行われ、前記培地中のグルタミン濃度が 0.5 mM ~ 5 mM の間、好ましくはおよそ 2 mM に維持される、請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

炭水化物が D - グルコースであり、D - グルコースの供給が、工程 b) ~ d) 中に行われ、前記培地中の D - グルコース濃度が、D - グルコースがおよそ 0.5 g / l ~ 25 g / l、好ましくはおよそ 2 g / l に維持される、請求項 3 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

非動物起源のタンパク質加水分解物が、細菌トリプトン、酵母トリプトン、植物加水分解物、またはそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 3 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記鳥類胚性幹細胞が、集塊細胞として懸濁状態で培養される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

工程 a) において、前記鳥類胚性幹細胞培養物の、1つの培養器から別の培養器への少なくとも1回の継代、好ましくは少なくとも総ての継代が、鳥類胚性幹細胞集塊を破壊することなく希釈により行われる、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

工程 a) において、前記鳥類胚性幹細胞培養物の、1つの培養器から別の培養器への少なくとも1回の継代、好ましくは少なくとも総ての継代が、細胞集塊を遠心分離および/または破壊する工程を含まない、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

工程 c) が、感染工程 b) 後、好ましくは工程 b) のおよそ1時間後、に行われる、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

感染工程 b) が、m . o . i (多重感染度) 約 $10 \sim 10^{-6}$ 、好ましくは約 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 、およびより好ましくは約 10^{-4} 、で行われる、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記ウイルスが、改変ワクシニア Ankaravirus (MVA) ウイルス、鶏痘ウイルス、カナリア痘ウイルス (すなわち、ALVAC)、ユキヒメドリ痘ウイルス、キュウカンチョウ痘ウイルス、鳩痘ウイルス、オウム科のボックスウイルス、ウズラ痘ウイルス、スズメ痘ウイルス、ムクドリ痘ウイルス、シチメンチョウ痘ウイルスからなる群の中から選択される天然ボックスウイルスまたは組換えボックスウイルスである、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記ウイルスが、ヒトインフルエンザウイルス、鳥類インフルエンザウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ウマインフルエンザウイルス、ネコインフルエンザウイルスの中から選択される、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

工程 b) における感染が、前記細胞密度がバッチ法またはフェドバッチ法において、少なくとも 400 万細胞 / ml、好ましくは 600 万細胞 / ml、である場合に行われる、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

工程 a)、b)、c)、および d) における無血清培養培地の pH が、 $6.5 \sim 7.8$ の範囲である、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

工程 d) が、採取前の2～10日間続く、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

細胞培養が、 $30 \sim 39$ の間を含む温度、好ましくはおよそ 37 で行われる、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

請求項1～20のいずれか一項に記載の方法により得られた、ウイルス。

【請求項22】

請求項21に記載のウイルスを、適切な場合にはその免疫応答を増強する物質と組み合わせる、ワクチン。

【請求項23】

前記ウイルスの単離タンパク質を含む、請求項22に記載のワクチン。

【請求項24】

請求項1～20のいずれか一項に記載の方法により得ることができ、かつ工程 d) において採取される感染前記鳥類胚性幹細胞を含んでなる、ワクチン。