

【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19年10月4日(2007.10.4)

【公表番号】特表2007-502608(P2007-502608A)

【公表日】平成19年2月15日(2007.2.15)

【年通号数】公開・登録公報2007-006

【出願番号】特願2006-523593(P2006-523593)

【国際特許分類】

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

**C 1 2 N 5/06 (2006.01)**

**C 1 2 P 21/02 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 5/00 E

C 1 2 P 21/02 C

【手続補正書】

【提出日】平成19年8月16日(2007.8.16)

【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】

細胞のクローン化方法であって、血清フリー条件下、自家フィーダー細胞の存在下、培養容器に5個未満の哺乳類細胞を置き、血清フリー条件下で培養かつ複製することを特徴とする方法。

【請求項2】

血清フリー条件下、培養容器に1又は2個だけの哺乳類細胞を置き、血清フリー条件下、自家フィーダー細胞の存在下で培養かつ複製することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

血清フリー条件下、自家フィーダー細胞の存在下、培養容器に1個の単一哺乳類細胞を置き、血清フリー条件下で培養かつ複製することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項4】

対応して置かれた哺乳類細胞がハムスター又はマウスの骨髄腫細胞であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

対応して置かれたハムスター細胞がCHO又はBHK細胞であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

対応して置かれたマウス骨髄腫細胞がNS0細胞であることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

対応して置かれた哺乳類細胞を血清フリー懸濁培養で複製することを特徴とする請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

フィーダー細胞が、血清フリー培地に適応した非付着性培養細胞であることを特徴とす

る請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

対応して置かれた哺乳類細胞がCHO又はBHK細胞の場合、フィーダー細胞としてハムスター細胞を使用し、

対応して置かれた哺乳類細胞がNS0細胞の場合、フィーダー細胞としてマウス骨髄腫細胞を使用する

ことを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

対応して置かれた哺乳類細胞がCHO細胞の場合、フィーダー細胞としてCHO細胞を使用し、

対応して置かれた哺乳類細胞がBHK細胞の場合、フィーダー細胞としてBHK細胞を使用し、

対応して置かれた哺乳類細胞がNS0細胞の場合、フィーダー細胞としてNS0細胞を使用する

ことを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

対応して置かれた哺乳類細胞を、培地 1 ml 当たり 100 ~ 200,000 個のフィーダー細胞の存在下で複製することを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

対応して置かれた哺乳類細胞を、培地 1 ml 当たり  $4 \times 10^6$  個の細胞密度まで培養かつ複製することを特徴とする請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

対応して置かれたCHO細胞の再クローン化の間、再クローン化効率が10%乃至65%より高く、

対応して置かれたBHK細胞の再クローン化の間、再クローン化効率が10%乃至50%より高く、

対応して置かれたNS0細胞の再クローン化の間、再クローン化効率が10%乃至45%より高い

ことを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

血清フリー条件下、哺乳類細胞内でタンパク質を生産する方法であって、

(a) 哺乳類細胞が、対象タンパク質をコードする対象遺伝子を含み；

(b) 前記哺乳類細胞の複製を許容する血清フリー条件下で該哺乳類細胞を成長させ；

(c) 血清フリー条件下、細胞培養容器に、各場合 5 個未満の前記哺乳類細胞を置き；

(d) 適切に置かれた哺乳類細胞を、血清フリー条件下、自家フィーダー細胞の存在下で複製し；

(e) 複製した細胞を、前記対象遺伝子が発現する血清フリー条件下で培養し；かつ

(f) 膜を含む前記細胞又は培養上清から遺伝子産物を単離して精製する；

ことを特徴とする方法。

【請求項 15】

血清フリー条件下、哺乳類細胞内で組換えタンパク質を調製する方法であって、

(a) 対象タンパク質をコードする対象遺伝子で哺乳類細胞をトランスフェクトし；

(b) このトランスフェクトされた細胞の複製を許容する血清フリー条件下で前記トランスフェクトされた哺乳類細胞を成長させ；

(c) 血清フリー条件下、自家フィーダー細胞のある細胞培養容器に、各場合 5 個未満の前記トランスフェクトされた哺乳類細胞を置き；

(d) 対応して置かれた細胞を、血清フリー条件下、自家フィーダー細胞の存在下で複製し；

(e) この複製された細胞を、前記対象遺伝子が発現する血清フリー条件下で成長させ；かつ

(f) 前記細胞又は培養上清から遺伝子産物を単離して精製する；  
ことを特徴とする方法。

【請求項 16】

前記ポイント(c)において、1個だけの単一哺乳類細胞を各細胞培養容器に置くことを特徴とする請求項14又は15記載の方法。

【請求項 17】

前記置かれた哺乳類細胞がさらに蛍光タンパク質をコードしており、かつ、この置かれた哺乳類細胞を血清フリー条件下、細胞培養容器に、FACSベースセルソーティングで置くことを特徴とする請求項14～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 18】

前記哺乳類細胞がハムスター又はマウスの骨髓腫細胞であることを特徴とする請求項14～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 19】

前記ハムスター細胞がCHO又はBHK細胞であることを特徴とする請求項18記載の方法。

【請求項 20】

前記マウス骨髓腫細胞がNSO細胞であることを特徴とする請求項19記載の方法。

【請求項 21】

前記フィーダー細胞が、血清フリー培地に適応した非付着性培養細胞であることを特徴とする請求項14～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 22】

前記哺乳類細胞がCHO又はBHK細胞の場合、フィーダー細胞としてハムスター細胞を使用し、前記哺乳類細胞がNSO細胞の場合、フィーダー細胞としてマウス骨髓腫細胞を使用することを特徴とする請求項14～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 23】

前記哺乳類細胞がCHO細胞の場合、フィーダー細胞としてCHO細胞を使用し、  
前記哺乳類細胞がBHK細胞の場合、フィーダー細胞としてBHK細胞を使用し、  
前記哺乳類細胞がNSO細胞の場合、フィーダー細胞としてNSO細胞を使用することを特徴とする請求項14～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 24】

ソートして置かれた哺乳類細胞を、培地1ml当たり100～200,000個のフィーダー細胞の存在下で複製することを特徴とする請求項14～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 25】

ソートして置かれた哺乳類細胞を、培地1ml当たり $4 \times 10^6$ 個の細胞密度まで培養することを特徴とする請求項14～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 26】

フィーダー細胞としてのハムスター細胞の使用。

【請求項 27】

前記ハムスター細胞を物理的又は化学的に不活性化することを特徴とする請求項26記載の使用。

【請求項 28】

前記ハムスター細胞が血清フリー条件に適応していることを特徴とする請求項26又は27記載の使用。

【請求項 29】

前記ハムスター細胞がCHO若しくはBHK細胞又はこれら細胞系の子孫/派生物であることを特徴とする請求項24～28のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 30】

フィーダー細胞としてのNSO細胞の使用。

【請求項 31】

前記NSO細胞を物理的又は化学的に不活性化することを特徴とする請求項30記載の使用。

**【請求項 3 2】**

前記NS0細胞が血清フリー条件に適応していることを特徴とする請求項 3 1 記載の使用。

**【請求項 3 3】**

血清フリー細胞培地と、5個未満の分裂可能な哺乳類細胞と、この分裂可能な哺乳類細胞に対して自家性であるフィーダー細胞とから成る組成物。

**【請求項 3 4】**

該組成物が、前記培地中に1又は2個だけの分裂可能な哺乳類細胞を含有する、請求項 3 3 記載の組成物。

**【請求項 3 5】**

前記分裂可能な哺乳類細胞がCHO又はBHK細胞の場合、該組成物はフィーダー細胞としてハムスター細胞を含有し、前記分裂可能な哺乳類細胞がNS0細胞の場合、該組成物はフィーダー細胞としてマウス骨髄腫細胞を含有することを特徴とする請求項 3 3 又は 3 4 記載の組成物。

**【請求項 3 6】**

前記分裂可能な哺乳類細胞がCHO細胞の場合、該組成物はフィーダー細胞としてCHO細胞を含有し、前記分裂可能な哺乳類細胞がBHK細胞の場合、該組成物はフィーダー細胞としてBHK細胞を含有し、前記分裂可能な哺乳類細胞がNS0細胞の場合、該組成物はフィーダー細胞としてNS0細胞を含有することを特徴とする請求項 3 3 又は 3 4 記載の組成物。