

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-5654

(P2020-5654A)

(43) 公開日 令和2年1月16日 (2020.1.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735 Z N A	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074	
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/0775	
C 1 2 N 5/0789 (2010.01)	C 1 2 N 5/0789	
C 1 2 N 5/0797 (2010.01)	C 1 2 N 5/0797	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-166881 (P2019-166881)	(71) 出願人	513000551
(22) 出願日	令和1年9月13日 (2019.9.13)		リジェネレイティブ リサーチ ファウン
(62) 分割の表示	特願2017-182684 (P2017-182684)		デーション
原出願日	平成23年7月1日 (2011.7.1)		アメリカ合衆国 1 2 1 4 4 ニューヨー
(31) 優先権主張番号	61/360, 741		ク州 レンセリア ディスカバリー ドラ
(32) 優先日	平成22年7月1日 (2010.7.1)	(74) 代理人	イヴ 1
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		100094569
		(74) 代理人	弁理士 田中 伸一郎
		(74) 代理人	100109070
			弁理士 須田 洋之
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100119013
1. T W E E N			弁理士 山崎 一夫
		(74) 代理人	100123777
			弁理士 市川 さつき

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 持続放出組成物を用いる未分化細胞培養方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は未分化哺乳動物細胞（例えば幹細胞及び前駆細胞）を培養する方法を提供される。

【解決手段】本発明の方法は、少なくとも1つの増殖因子を含む持続放出組成物の存在下で前記細胞をインキュベートする工程を含み、前記持続放出組成物は前記増殖因子を継続的に放出し、さらに持続的レベルの増殖因子の存在が細胞を未分化の状態で維持することを含む。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物の幹細胞又は前記細胞を培養して未分化状態で維持する方法であって、

(a) ヒト胚性幹細胞の培養物に、少なくとも1つの増殖因子を含むポリ(DL-ラクチドコグリコリド) (PLGA) 微小球を含み、前記増殖因子の濃度を、前記増殖因子を含む培養液の交換直後、及び微小球添加前の濃度 (開始濃度) の約80% - 100%濃度で少なくとも1日の期間維持されるように前記増殖因子を前記培養物に放出する持続放出組成物を添加する工程、および、

(b) 前記細胞が未分化状態で維持されるように、前記持続放出組成物を添加する工程を繰り返す工程、

を含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国仮特許出願61/360,741号 (2010年7月1日出願) (参照によりその全体が本明細書に含まれる) の優先権を主張する。

配列リストの参照

37 C.F.R. 1.821(c)にしたがい、配列リストは、本出願とともに“Sequence Listing.txt”と称されるASCIIによるテキストファイルとしてEFS-Webにより提出される。前記ファイルは2011年6月17日に作成され、サイズは12,983バイトである。“Sequence Listing.txt”と称される前述のファイルの内容は、参照によりその全体が本明細書に含まれる。

本発明は、未分化哺乳動物細胞 (例えば幹細胞及び前駆細胞) 培養のための改善された方法を提供する。本方法は、持続的レベルの少なくとも1つの増殖因子の存在下で細胞をインキュベートする工程を含む。前記増殖因子を継続的に放出する持続放出組成物を用いて、前記増殖因子の持続的レベルが維持され、持続的レベルの増殖因子の存在によって前記細胞が未分化の状態に維持され、生産される細胞の量及び／又は質が向上する。

【背景技術】

【0002】

幹細胞は、2つの特徴的な特性 (自己再生及び1つ以上の異なる細胞系列に分化する能力) を有する未分化細胞である。自己再生プロセスは、増殖および増大を可能にする幹細胞の自己複製を必要とし、ここで幹細胞は未分化状態を維持する。前駆細胞もまた、1つ以上の細胞系列に分化する能力を有する未分化細胞であるが、自己再生能力は限定的であるか又は全く存在しない。培養で維持されるとき、未分化細胞 (例えば幹細胞又は前駆細胞) は自発的に分化し、それによって所望の未分化細胞表現型を失うことがある。未分化幹細胞又は前駆細胞を維持するために自発的分化を最小限にする培養方法が必要である。

未分化細胞 (例えば未分化状態の幹細胞及び／又は前駆細胞であるが、ただしこれらに限定されない) を未分化な状態で保持することは、例えば工業的又は医学的分野におけるそれらの使用にとって、例えば科学研究のため又は患者の細胞若しくは組織の損傷の修復のために必須である。なぜならば、これら細胞の主要な学術的及び治療的有用性は、均質な集団 (さらに増殖するか又は必要とされる成熟細胞に分化することができる) へと増大するそれらの能力に存在するからである。細胞培養でいったんそれらが自発的に分化すると、それら細胞は増殖性が低下し、さらに必要とされる種々の細胞タイプに分化する能力が低下する。したがって未分化幹細胞の均質な培養が強く希求されるが、研究者及び工業的目標は未だ達成されていない。

【0003】

未分化細胞 (例えば多様なタイプの幹細胞) を培養する従来の方法は、線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) を細胞培養に毎日又はそれより少ない頻度でデリバリーすることによって (“フィーディング”として知られている)、そのような自発的分化を最小限にすることを試みる。FGF2は、幹細胞の分化を阻害することによって幹細胞の自己再生を促進するこ

10

20

30

40

50

とが示された。しかしながらこの阻害は不完全で、幹細胞は徐々に分化する傾向にあり、そのために幹細胞培養の有用性が低下する。さらにまた、幹細胞（例えばES細胞）は、典型的にはマウス胚性線維芽細胞（MEF）フィーダー細胞上で増殖させる必要がある。これは取り除くことが所望される面倒な工程である。

ヒト胚性幹細胞（hESC）にとって、FGF2は、他の未分化細胞タイプと同様に未分化状態の維持のために必要であり、培養条件からFGF2を除くと分化が開始する（以下を参照されたい：Amit, M., et al. (2000) *Dev Biol.* 2, 271-78; Itskovitz-Eldor, J., et al. (2000) *Mol Med.* 2, 88-95; Xu, C., et al. (2001) *Nat Biotechnol.* 10, 971-74; Xu et al., 2005; Xu, R.H., et al. (2005) 3, 164-65; Ding, V., et al. (2006) *Biotechnol Lett.* 7, 491-95; Levenstein, M.E., et al. (2006) *Stem Cells* 3, 568-74; Ludwig, T.E., et al. (2006) *Nat Methods.* 8, 637-46; Bendall, S.C., et al. *Nature* 448, 1015-21)。FGF2はまた、神経幹細胞（NSC）及び未分化状態の神経前駆細胞の維持にも要求される（以下を参照されたい：Temple S. (1989). *Nature* 340:471-473; Vescovi, A.L., et al. (1993) *Neuron* 5, 951-56; Kilpatrick, T.J., and Bartlett, P.F. (1995) *J Neurosci.* 5, 3653-61; Temple, S., and Qian, X. (1995) *Neuron* 2, 249-52; Qian, X., et al. (1997) *Neuron* 1, 81-83; Ciccolini, F., and Svendsen, C.N. (1998) *J Neurosci.* 19, 7869-80; Vaccarino FM, et al. (1999) *Curr Top Dev Biol.* 46 179-00; Raballo R, et al. *J Neurosci.* 13, 5012-23)。NSCを培養する古くからの方法では、増殖因子（例えばFGF2）は3日目毎に1回補充されるだけである。しかしながら、これらの方法で培養されたNSCは、高い自発的分化率を有すると報告されている（Qian et al., 1997、上掲書）。 10 20

【0004】

増殖因子（例えばEGF2）は、hESC、NSC並びに他の幹細胞及び前駆細胞に直接的に働くか、及び／又はいくつかの方法では細胞培養のフィーダー細胞を刺激してFGF2及び他の増殖因子を産生させることによって間接的に働くと理解されている（Bendall, et al., 2007、上掲書）。しかしながら、FGF2及び他の増殖因子のレベルはこれらの培養で不安定で、頻繁に交換しなければならない。例えば、FGF2の半減期は、幹細胞及び前駆細胞の培養に典型的に用いられる条件下では24時間未満である（McKinnon et al., 1990, *Neuron.* 1990 Nov;5(5):603-14)。したがって、hESC培養を維持する標準的な方法は、活性なFGF2ポリペプチド及び／又は他の増殖因子の有効な量を維持するために、可溶性FGF2及び／又は他の増殖因子を毎日細胞にフィードすることを要求する（Fasano CA, et al. (2010) *Cell Stem Cell* 6, 336-47）。しかしながら骨が折れかつ多くの時間を要するプロセスにもかかわらず、FGF2及び／又は他の増殖因子を幹細胞及び前駆細胞に毎日フィードすることはなお以下の結果をもたらす：（1）フィード直後の数時間には非常に高レベルのFGF2及び次の日のフィード前の数時間には非常に低レベルのFGF2が存在し増殖因子レベルは顕著に変動し、さらに（2）FGF2を毎日フィードしない場合よりも速度は遅いが、hESCはやはり徐々に分化するので、有効性は限定的である。 30

【0005】

タンパク質薬を患者にデリバリーする、グリコール酸及び乳酸の生物適合性ポリエステル（“PLGA”）から調製した生物分解性“微小球”及び“ミリシリンダー”が公知であり、PLGAミリシリンダーカプセル被包化組換えヒトFGF2（“塩基性線維芽細胞増殖因子”又は“bFGF”としても知られている）は、そのような応用としてZhuら（*Nature Biotechnology* (2000) 18:52-57）が記載している。Olayeら（*European Cells and Materials* (2008) 16 (Suppl. 3):86）は、「PLGA微小球が胚性幹細胞を分化させる増殖因子の持続的デリバリーのために広範囲に用いられてきた」ことを教示し、PLGA微小球系土台を用いてある種の増殖因子（特にAsc、Dex及びTGF- β_1 ）をデリバリーし、ネズミ胚性幹細胞を骨芽細胞及び軟骨様細胞に分化させることができることを報告している。細胞培養のためのPVA系ポリマーコーティング及び水素粒子もまたそれぞれ以下に記載されている：Hemperly et al., 米国特許出願公開公報2004/0209361号、及びKeith et al., 米国特許出願公開公報2004/0209360号。これらのポリマーコーティング及び粒子は細胞粘着を促進し、さらに 40 50

“生物作用性分子”（例えば増殖因子）の徐放もまた提供し得る（同書）。より最近の刊行物は、細胞分化促進におけるFGF2の役割を強調し、例えば組織の再生及び創傷治癒のために、前記増殖因子の組織特異的デリバリーについてヒドロゲル、微小球などが考察されている。概論については以下を参照されたい：Yun et al., J. Tissue Eng. (Nov. 7, 2010) 2010:218142。以下もまた参照されたい：Macdonald et al., Biomacromolecules (Aug. 9, 2010) 11(8):2053-2059。したがって、幹細胞培養におけるそのような“持続放出”調製物の使用は、幹細胞分化のための増殖因子のデリバリーに限定されていた。未分化状態で細胞を維持するために増殖因子を持続放出すること（前記のような組成物又は別のものを用いる）はこれまで知られてなかったと思われる。したがって、幹細胞及び他の未分化細胞を培養し、さらにそのような細胞を未分化状態で維持するための改善方法が当業界ではなお所望されている。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、未分化哺乳動物細胞（例えば幹細胞及び前駆細胞）培養のための改善された方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

背景技術の項からの記載のとおり、未分化細胞（例えばESC、NSC及び他のタイプの未分化細胞（例えばRPESC、iPSC、SCSCなど））を培養するための組成物及び方法であって、それら細胞の自発的分化を軽減又は排除するものが明確に所望されている。さらにまた、未分化細胞の培養に従来必要とされている時間、労力及び出費を軽減する組成物及び方法もまた所望されている。これらの問題及び当業者にとって明瞭な他の問題も、本発明は少なくとも部分的に解決する。

20

したがって、ある特徴では、本発明は哺乳動物の幹細胞又は前駆細胞を培養する方法を提供し、前記方法は、少なくとも1日の期間にわたって安定な濃度範囲の少なくとも1つの増殖因子の存在下で前記幹細胞又は前駆細胞をインキュベートする工程を含む。ある種の実施態様では、増殖因子の安定な濃度範囲は、機械的手段を用いる増殖因子の持続的放出によって維持される。他の実施態様では、増殖因子の安定な濃度範囲は、持続放出組成物（例えば増殖因子を含むPLGA微小球）によって維持される。

30

【0008】

別の特徴では、本発明は哺乳動物の幹細胞又は前駆細胞を培養する方法を提供し、前記方法は、少なくとも1つの増殖因子を含む持続放出組成物の存在下で前記幹細胞又は前駆細胞をインキュベートする工程を含み、前記持続放出組成物は前記増殖因子を放出し、前記増殖因子の存在が細胞を未分化状態で維持する。ある種の実施態様では、放出される増殖因子は予め定めた濃度範囲内で維持される。

別の特徴では、本発明は幹細胞又は前駆細胞を培養する方法を提供し、前記方法は、線維芽細胞増殖因子2（FGF2）を含む持続放出組成物の存在下で幹細胞又は前駆細胞をインキュベートする工程を含み、前記持続放出組成物はFGF2を放出する。ある種の実施態様では、前記持続放出組成物は、幹細胞又は前駆細胞とのインキュベーション開始時に0.5%（w/v）の濃度でFGF2を含む。さらにまた、放出されるFGF2はあらかじめ定めた濃度範囲内で維持される。

40

さらに別の特徴では、本発明は未分化哺乳動物細胞を培養する方法を提供し、前記方法は、少なくとも1つの増殖因子を含む持続放出組成物の存在下で前記未分化哺乳動物細胞をインキュベートする工程を含み、前記持続放出組成物は前記増殖因子を放出し、放出される増殖因子は予め定めた濃度範囲内で維持され、放出される増殖因子の前記濃度範囲内の維持が細胞を未分化の状態に維持する。

【0009】

幹細胞若しくは前駆細胞又は未分化哺乳動物細胞を培養する上記方法のいずれにおいても、前記増殖因子の持続放出は、増殖因子の開始濃度の80%－100%、80%－95%、又は8

50

0%–90%の安定な濃度範囲で増殖因子の濃度を細胞培養で維持することができる。

幹細胞若しくは前駆細胞又は未分化哺乳動物細胞を培養する上記方法のいずれにおいても、前記持続放出組成物は、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、又は前記より長い、例えば2週間、3週間、4週間、5週間、又は前記より長い期間にわたって、少なくとも1つの増殖因子を放出することができる。

幹細胞若しくは前駆細胞又は未分化哺乳動物細胞を培養する上記方法のいずれにおいても、細胞は、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、又は前記より長い、例えば2週間、3週間、4週間、5週間、又は前記より長い期間にわたって未分化の状態に維持され得る。

幹細胞若しくは前駆細胞又は未分化哺乳動物細胞を培養する上記方法のいずれにおいても、持続放出組成物はポリ(DL-ラクチドコグリコリド)(PLGA)微小球である。ある種の実施態様では、PLGA微小球の濃度は、約5から約300ng/mLの範囲である。

【0010】

幹細胞若しくは前駆細胞又は未分化哺乳動物細胞を培養する上記方法のいずれにおいても、持続放出組成物はさらに、ヘパリン、硫酸デキストラン、 $Mg(OH)_2$ 、増殖因子と複合体を形成する多価陰イオン、及び／又はEDTAの1つ以上を含むことができる。ある種の実施態様では、持続放出組成物はさらに、1.0% (w/v) のヘパリン及び／又は1.0% (w/v) の硫酸デキストランを含む。他の実施態様では、FGF2に対するヘパリン又は硫酸デキストランの割合は約2:1である。さらに他の実施態様では、持続放出組成物はさらに、3% (w/v) の $Mg(OH)_2$ を含む。さらにまた他の実施態様では、持続放出組成物はさらに1mMのEDTAを含む。

幹細胞若しくは前駆細胞又は未分化哺乳動物細胞を培養する上記方法のいずれにおいても、幹細胞は、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞(induced-pluripotent stem cell)、神経幹細胞、網膜色素上皮幹細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、原外胚葉幹細胞又は癌幹細胞から成る群から選択される。ある種の実施態様では、幹細胞はヒト胚性幹細胞又は神経前駆細胞である。

幹細胞若しくは前駆細胞又は未分化哺乳動物細胞を培養する上記方法のいずれにおいても、持続放出組成物はさらに1つ以上の追加される増殖因子を含む。ある種の実施態様では、前記1つ以上の追加される増殖因子は、表皮成長因子(EGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、ソニックヘッジホッグ(Shh)、白血病阻害因子(LIF)及びWntタンパク質から成る群から選択される。

本発明の1つ以上の実施態様の詳細が添付の図面及び下記の記述で説明される。本発明の他の特徴、目的及び利点は、この記述及び図面並びに特許請求の範囲から明白であろう。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】図1Aは、10ng/mL EGF2を含む完全hESC培養液(“C'培養液+FGF2”)又は10ng/mL EGF2を含むMEF条件付け培養液(“MEF CM+FGF2”)にて、マウス胚線維芽細胞(MEF)上でhESCを培養してから5–6時間後の、培養開始濃度に対するFGF2濃度のパーセント(%)変化を示すグラフを含む。

【図1B】図1Bは、10ng/mL EGF2を含む完全hESC培養液(“C'培養液+FGF2”)又は10ng/mL EGF2を含むMEF条件付け培養液(“MEF CM+FGF2”)にて、マトリゲル(MEF無し)上でhESCを培養してから5–6時間後の、培養開始濃度に対するFGF2濃度のパーセント(%)変化を示すグラフを含む。

【図2】図2は、FGF2含有PLGA微小球(“FGF2-微小球”)を0日目に添加し、又は添加せずに続いて培養液を10ng/mL EGF2を含む新しい完全培養液で交換して培養した細胞の培養液中のEGF2濃度の6時間後、1日目、2日目及び3日目のパーセント(%)変動を示すグラフである。パーセント(%)変動は、0日目のEGF2の開始濃度(培養液の交換直後、及び微小球添加前(FGF2-微小球グループの場合))に対するものである。

【図 3】図3は、可溶性FGF2、FGF2含有微小球（“ FGF2-微小球 ”）又は空の微小球で処理したヒトESCにおける処理後5日の SSEA-4 mRNA発現のパーセント（％）（可溶性FGF2処理グループに対するもの）を示すグラフである。

【図 4】図4は、可溶性FGF2、FGF2含有微小球（“ FGF2-微小球 ”）又は空の微小球（陰性コントロール）で処理したヒトESCにおける処理後5日の OCT4、ブラチュリー（Brachury）及びSOX17のmRNA発現のパーセント（可溶性FGF2処理グループに対するもの）を示すグラフである。

【図 5 A】図5Aは、毎日、0日目と続いて培養中3日目毎（“ 3日目毎 ”）、若しくは0日目（“ 1回 ”）に10ng/mLのFGF2をフィードしたWA-09 hESCの培養で、又は0日目（“ ビーズ1回 ”）若しくは0日と続いて培養中3日目毎（“ ビーズ3日目毎 ”）にFGF2含有PLGA微小球をフィードしたWA-09 hESCの培養で35日目にSSEA-1、SSEA-3及びSSEA-4タンパク質について陽性に染色された細胞のパーセントを示すグラフである。“*”は同じタンパク質について“毎日”のグループと比較して $p < 0.05$ であることを示し、さらに“#”は同じタンパク質について“3日目毎”のグループと比較して $p < 0.05$ であることを示す。図5Bは、0日目と続いて培養中3日目毎（“ 3日目毎 ”）若しくは0日目（“ 1回 ”）に10ng/mLのFGF2をフィードしたWA-09 hESCの培養で、又は0日目（“ ビーズ1回 ”）若しくは0日と続いて培養中3日目毎（“ ビーズ3日目毎 ”）にFGF2含有PLGA微小球をフィードしたWA-09 hESCの培養で14日目及び21日目に発現されるNANOG mRNAの倍数変化を示すグラフである。

【図 5 B】図5Bは、毎日、0日目と続いて培養中3日目毎（“ 3日目毎 ”）、若しくは0日目（“ 1回 ”）に10ng/mLのFGF2をフィードしたWA-09 hESC、又は0日目（“ ビーズ1回 ”）若しくは0日と続いて培養中3日目毎（“ ビーズ3日目 ”）にFGF2含有PLGA微小球をフィードしたWA-09 hESCにおける第14日目および第21日目のNANOGのmRNA発現を示すグラフである。

【図 6】図6は、MEF条件付け培養液及び可溶性FGF2又はFGF2含有微小球の存在下にてマトリゲル上で5日間培養したWA-09 hESCにおけるOct-4及びSox17のmRNA発現の倍数変化を示すグラフである。コントロールグループでは、10ng/mLの可溶性FGF2を毎日添加した（“毎日”）。FGF2含有PLGA微小球は、0日目に1回（“ ビーズ1回フィード ”）又は0日目及び2日目（“ ビーズ週に2回 ”）に培養に添加された。

【図 7 A】図7Aは、FGF2を毎日フィードして培養したhESC（“ FGF2毎日 ”）で、又は10ng/mLのFGF2を含む培養液にプレートした後再度のフィードを実施しなかったhESC（“ FGF2無し ”）で、7日目にSSEA-3又はSSEA-4タンパク質について陽性に染色された細胞のパーセント（％）を示すグラフである。図7Bは、以下の条件でさらに7日間培養した後、SSEA-3タンパク質について陽性に染色された“ FGF2毎日 ”又は“ FGF2無し ”グループの細胞のパーセントを示すグラフである：10ng/mLのFGF2を毎日（“毎日”）又はFGF2微小球を0日目に（“ 1回 ”）若しくは0日目と2日目に（“ ビーズ週に2回 ”）細胞にフィードした。

【図 7 B】図7Bは、以下の条件でさらに7日間培養した後、SSEA-3タンパク質について陽性に染色された“ FGF2毎日 ”又は“ FGF2無し ”グループの細胞のパーセントを示すグラフである：10ng/mLのFGF2を毎日（“毎日”）又はFGF2微小球を0日目に（“ 1回 ”）若しくは0日目と2日目に（“ ビーズ週に2回 ”）細胞にフィードした。

【図 8】図8は、処理から7日後のNSCで表示の処理グループにおける β -チューブリン又はネスチンを発現する細胞の数を示すグラフである。

【図 9】図9は、標準的方法にしたがって（“ 3日目毎 ”）又は8時間毎（“ 8時間毎 ”）にFGF2でNSCを処理してから6日後に、表示の処理グループでネスチン又は β -チューブリンを発現する細胞の数を示すグラフである。

【図 10】図10は、FGF2含有PLGA微小球の存在下で5日間培養した後のRPESCの写真である（倍率32x）。

【図 11】図11は、毎日可溶性FGF2を添加するか（上段パネル）、又はFGF2含有微小球を0日目及び3日目に添加して（下段パネル）、細胞をプレート及び培養してから9日後に撮影したiPSCの写真を含む（倍率20x）。

【発明を実施するための形態】

【0012】

I. 定義

本明細書で用いられる、“幹細胞”という用語は、有糸細胞分裂を介して自己を再生する能力を保持し、さらに多様な範囲の特殊化された細胞タイプに分化することができる細胞を指す。“幹細胞”という用語には、非限定的な例として神経幹細胞（NSC）、胚性幹細胞（ESC）、人工多能性幹細胞（iPSC）、造血幹細胞（HSC）、癌幹細胞（CSC）、脊髄幹細胞（CSC）、間葉幹細胞（MSC）、網膜色素上皮幹細胞（RPESC）及び原外胚葉幹細胞が含まれる。本明細書で用いられる、“胚性幹細胞（ESC）”という用語は、胚盤胞（初期胚）の内部細胞塊に由来する幹細胞を指す。ヒト胚は受精後4-5日で胚盤胞期（この時期には胚は50-150細胞から成る）に達する。

10

本明細書で用いられる“前駆細胞”という用語は、増殖し1つ以上の種々の細胞系列に分化する能力を有するが、自己再生の能力は全くないか又は限定的であると考えられる未分化細胞を指す。典型的には、幹細胞培養（例えばhESC培養又はNSC培養）は、幹細胞に加えていくつかの前駆細胞を含むであろう。いくつかの事例では、前駆細胞は幹細胞から誘導され、このプロセスの間に自己再生能力を失うが、1つ以上の種々の細胞系列に分化する能力は維持する。換言すれば、幹細胞は前駆細胞を生じることができる。

【0013】

本明細書で用いられる、“神経幹細胞”及び“神経前駆細胞（NPC）”という用語は、神経系細胞を生じることができる未分化細胞をいう。NSCは自己複製能力を有するが、NPCは、非常に限定的な自己再生能力を有するか又はその能力を全くもたないと考えられる。

20

本明細書で用いられる、“網膜色素上皮幹細胞（“RPESC”）”は、成人網膜色素上皮（RPE）から活性化される幹細胞である。

本明細書で用いられる、人工多能性幹細胞（“iPSC”）は、ES細胞の遺伝的特徴及び表現型的特徴の多くを発現する全能性幹細胞であり、分化した細胞（例えば体細胞）から誘導される。iPSCはES細胞と同じ肉眼的形態、増殖性特性を有し、ヌードマウス移植後に奇形腫を形成し、in vitroで3胚葉の全てに分化する能力を有する。主要因子（例えばレチン酸及び白血病阻害因子（LIF））に対するiPSCの応答もまたES細胞で観察されたものと同じである（例えば以下を参照されたい：Okita et al, 2007; Nature 448: 313-317）。

本明細書で用いられる、“間葉幹細胞（MSC）”は多能性幹細胞であり、多様な組織から誘導可能で、さらに多様な細胞タイプ（骨芽細胞（骨細胞）、軟骨細胞（軟骨の細胞）、及び脂肪細胞（脂肪の細胞）を含む）に分化可能で、自己再生能力を有する（以下を参照されたい：Pittinger et al. Science (1999) 284:143-7; Herzog (2003) Blood, 102: 3483-93）。MSCは、以下のリストのマーカーの発現を含む多数の表面マーカーによって特徴付けられている：CD29、CD44、CD73、CD105、CD106、CD166及びSTRO-1（以下を参照されたい：Xu et al, Cell Research (2007), 17:240-248; Simmons and Torok-Storb (1991) Blood, 78:55-62）。

30

【0014】

造血幹細胞（“HSC”）は多能性幹細胞であり、骨髓細胞に由来する全ての血液細胞タイプ（単球及びマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球/血小板、樹状突起細胞）及び類リンパ球系列（T-細胞、B-細胞、NK-細胞）を生じ、さらに自己再生能力を有する。マウス及びヒトHSCは種々のマーカーの組合せによって同定された。マウスHSCは典型的にはc-Kit及びSca-1を発現するが、成熟造血細胞系列のマーカーについては陰性である（Lin⁻）（以下を参照されたい：Challen et al., Cytometry A, 2009, 75:14-24）。ヒトHSCはCD34⁺ CD133⁺ Lin⁻の細胞と報告されている（以下を参照されたい：Hawley et al, 2006 Methods in Enzymol 419:149-179）。

40

本明細書で用いられる、“癌幹細胞（CSC）”は、具体的な癌サンプルで見出される全ての細胞タイプを生じる能力及び自己再生能力を有する癌細胞（典型的には腫瘍又は血液癌で見出される）である。これらの細胞は幹細胞の特性を有することが認められているので、‘腫瘍開始細胞’とも称される。典型的には癌幹細胞は由来組織の幹細胞のマーカーを共有する。したがって、白血病幹細胞はCD34⁺ CD38⁻と認定でき、乳癌幹細胞はCD24-CD

50

44+と認定できる（以下を参照されたい：Bonnet and Dick, Nature Medicine (1997) 3:730-737；Reya et al. (2001) 414:105-111；Kai et al. (2010) Breast cancer, 17:80-85；Gibson et al. Nature, 2010, 468:1095-9）。

【0015】

“増殖因子”という用語は、天然に存在する内因性または外因性タンパク質、又は組換えタンパク質であり、細胞（例えば幹細胞又は前駆細胞）の分化を阻害及び／又は刺激することができる。“増殖因子”という用語はまた、脂質、化学物質及び他の非タンパク質薬剤（例えば細胞分化を阻害及び／又は刺激する能力を有する小分子）を包含できる。ある種の実施態様では、“増殖因子”という用語は、例えば有効な量で幹細胞又は前駆細胞培養中に存在するとき、細胞分化を阻害又は刺激することができる任意のポリペプチド又は他の薬剤を指す。本発明の増殖因子ポリペプチドには、天然に存在するタンパク質及び組換えタンパク質の両方が含まれる（前記は培養される細胞にとって内因性でも外因性でもよい）。さらにまた、本発明の増殖因子は、合成タンパク質（例えば融合物又は他のタンパク質構築物）、又は天然に存在する増殖因子若しくは他のタンパク質から誘導されたアミノ酸配列の化学的改変物でもよい。そのような増殖因子を組み合わせて用い、例えば本発明の累積的又は相乗的作用を生じることができる。

【0016】

本発明で用いられる好ましい増殖因子は、“塩基性増殖因子（bFGF）”或いは“線維芽細胞増殖因子2（FGF2）”として公知である。bFGF及びFGF2という用語は同義語であり、完全長タンパク質又はその機能的に活性な任意のフラグメントを指す（前記は単離された天然に存在するFGF2型であっても組換え型であってもよい）。野生型FGF2の機能的特性（特に未分化状態で細胞を維持する能力）を保持する活性なフラグメント、変異型及び化学的改変物は、本発明の方法における使用が意図されている。増殖因子の安定化のための前記増殖因子の改変は例えば以下に詳細に記載されている：Caccia et al. (1992) European Journal of Biochemistry, 204: 649-655. Cacciaらは、システイン残基を化学的に改変した組換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子の安定化型を記載している。FGF2を安定化させる処方物もまた米国特許5,217,954号（Foster et al.）に記載されている。

【0017】

本明細書で用いられる、“変異体”及び“変異”という用語は、遺伝物質（例えばDNA）における任意の検出可能な変化、又はそのような変化の任意のプロセス、メカニズム若しくは結果を指す。前記は、遺伝子の変異（遺伝子の構造（例えばDNA配列）が変更される）、任意の変異プロセスから生じる任意の遺伝子又はDNA、及び改変遺伝子又はDNA配列によって発現される任意の発現生成物（例えばタンパク質又は酵素）を含む。本明細書で用いられる、“変異させる”という用語は、変異体又は変異をもたらすプロセスを指す。本発明で用いることができるFGF2ポリペプチドの例示的配列は当業界で公知であり、例えばGenBank(商標)データベースから入手できる。例示的なヒトFGF2ポリペプチドのアミノ酸配列は、GenBank(商標)アクセッション番号NP_001997（配列番号：1）により入手できるが、一方、例示的マウスFGF2ポリペプチドのアミノ酸配列は、GenBank(商標)アクセッション番号AAP92385（配列番号：3）により入手できる。これらヒト及びマウスFGF2ポリペプチド配列をコードする例示的核酸配列はまた、それぞれGenBank(商標)アクセッション番号NM_002006（配列番号：2）及びNM_008006（配列番号：4）により入手できる。

【0018】

本発明で用いることができるFGF2ポリペプチドはまた、市場の供給源、例えばR&D Systems (Minneapolis, MN)；Peprotech (Rocky Hill, NJ)；Becton Dickinson (San Jose, California)；Invitrogen (Carlsbad, CA)から入手できる。組換えFGF2はまた、組換えタンパク質の製造のために当業界で公知の任意の適切な発現系を用いて細胞で発現させることができる。組換え体及び／又は天然に存在するFGF2は、当業界で公知の任意の適切な技術を用いて単離できる。

本明細書で用いられる、“単離された”という用語は、当該物質が通常見出される環境から取り出されることを意味する。したがって、単離された生物学的物質は、細胞性成分

(すなわち、前記物質がその中で見出され又は生成された細胞の成分)が除去されていることがある。単離された核酸分子には、例えばPCR生成物、単離mRNA、cDNA、又は制限フラグメントが含まれる。単離核酸分子にはまた、例えばプラスミド、コスミド、人工染色体などに挿入された配列が含まれる。単離核酸分子は、好ましくは前記核酸分子がその中に見出された遺伝子から切り出されてあるか、より好ましくは非調節配列、非コード配列、又は当該遺伝子内に存在するときに当該核酸分子の上流若しくは下流に位置する他の遺伝子とはもはや結合していない。単離されたタンパク質は、前記タンパク質が細胞内で結合していた他のタンパク質又は核酸又はその両方と、または前記が膜結合タンパク質である場合は細胞膜と結合していることがある。

【0019】

“発現する”及び“発現”という用語は、対応する遺伝子又はDNA配列の転写及び翻訳に必要とされる細胞性機能を活性化させることによって、遺伝子又はDNA配列内の情報を現出させること、例えば非コード(翻訳されない)RNA又はタンパク質を生成させることを意味する。DNA配列は、細胞内で又は細胞によって発現されて、“発現生成物”(例えばRNA又はタンパク質)を形成する。発現生成物それ自体(例えば生じたRNA又はタンパク質)はまた、細胞によって“発現された”ということができる。“発現系”という用語は、例えばベクターによって運ばれ宿主細胞に導入された外来DNA(“発現構築物”)によってコードされるタンパク質を発現させる、宿主細胞及び適切な条件下で適合性を有するベクターを意味する。“発現構築物”とは、その発現が所望される標的核酸配列を含む核酸配列を意味する(前記標的配列は、選択した宿主細胞内での標的核酸配列の適切な転写及び翻訳を提供する発現制御配列エレメントと作動できるように結合されている)。そのような配列エレメントには、プロモーター及びポリアダニル化シグナルが含まれ得る。“発現構築物”はさらに“ベクター配列”を含むことができる。“ベクター配列”とは、当業界で確立された任意のいくつかの核酸配列を意味し、前記は、発現構築物のクローニング及び増殖を促進するために本発明の組換えDNA技術で有用であり、プラスミド、コスミド、ファージベクター、ウイルスベクター及び酵母人工染色体を含む(ただし前記に限定されない)。“作動できるように結合される”とは、標的核酸配列及び1つ以上の発現制御配列(例えばプロモーター)が、標的核酸配列によってコードされるポリペプチドの宿主細胞内での発現を可能にするように物理的に連結されることを意味する。

【0020】

本発明の発現構築物は、発現構築物のクローニング及び増殖を促進するベクター配列を含むことができる。多数のベクター(プラスミド及び真菌ベクターを含む)が、多様な真核及び原核宿主細胞での複製及び／又は発現のために報告されている。本発明で有用な標準的ベクターは当業界で周知であり、前記にはプラスミド、コスミド、ファージベクター、ウイルスベクター及び酵母人工染色体が含まれる(ただし前記に限定されない)。ベクター配列は、大腸菌(E. coli)での増殖のための複製起点;SV40複製起点;宿主細胞での選別のためのアンピシリン、ネオマイシン又はピューロマイシン耐性遺伝子;及び／又は優性選別性マーカーを増幅させる遺伝子(例えばジヒドロホレートレダクターゼ遺伝子)及び問題の遺伝子を含むことができる。例えば、FGF2は大腸菌を用いて発現させることができ、活性であるための翻訳後改変を必要としない。本発明に包含される任意の増殖因子は組換えタンパク質として発現させるか、又は天然に存在する供給源から単離するか、又は入手可能なときは市場から購入することができる。

【0021】

本明細書で用いられる、細胞培養の関係では、持続放出組成物からの“増殖因子の持続放出”という用語は、増殖因子が持続放出組成物から一定の期間にわたって、好ましくは少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日にわたって、又は前記より長い、例えば2週間、3週間、4週間、5週間、又は前記より長い期間にわたって放出され(すなわち細胞培養中の細胞にとって利用できるようにされ)、さらに放出された増殖因子が細胞培養中で一定の濃度又は相対的に一定の濃度(すなわち“安定な濃度範囲”)で維持されることを意味する。安定な

濃度範囲は、好ましくは増殖因子開始濃度の約50%内である。したがって、細胞培養の関係では、増殖因子は、好ましくは細胞が利用できる増殖因子の濃度又は量が（上記に示すように少なくとも1-7日の期間）、当該期間の開始時に当該細胞が利用できる増殖因子の量又は濃度の50%内であるように持続放出組成物から放出される。さらに好ましい実施態様では、安定な濃度範囲は、増殖因子開始濃度の約60%、70%、80%、90%又は95%以上である。特に好ましい実施態様では、放出される増殖因子の濃度は、1日以上にわたって、増殖因子の開始濃度の約80%-100%、80%-95%、又は80%-90%の範囲内に留まる。別の好ましい実施態様では、放出される増殖因子の濃度は、3日以上にわたって、増殖因子の開始濃度の少なくとも80%-100%、80%-95%、又は80%-90%の範囲内に留まる。増殖因子（例えばFGF2）の持続放出は、時間の経過中に細胞培養中の増殖因子レベルを検出することによって確認できる（例えばELISAによって）。本明細書では、増殖因子の持続放出はまた増殖因子の“時間性放出”又は増殖因子の安定化と称することができ、（例えば細胞培養で）放出される増殖因子の安定な濃度範囲を維持する任意の手段または方法を含む。

【0022】

本発明の“持続放出組成物”は、一定の期間をかけて1つ以上の放出因子（例えば増殖因子）の安定な濃度範囲の維持をもたらす任意の適切なベヒクルを含むことができる。本明細書で用いられる、持続放出組成物は、未分化細胞（例えば幹細胞及び／又は前駆細胞（ただしこれらに限定されない））とともに培養するために適切である。本発明の持続放出組成物の非限定的な例には、微小球（例えばポリ(DL-ラクチドコグリコリド) (PLGA) 微小球)、無水ポリビニルアルコール (PVA)、ミリシリンダー、アルギネートゲル、生物分解性ヒドロゲル、複合物質、及びナノ粒子が含まれる（例えば以下を参照されたい：Ashton, et al. (2007) Biomaterials, 28, 36, 5518; Drury, J. L. et al. (2003) Biomaterials, 24:4337-4351; 米国特許7,226,617号 (Ding et al); Simmons, C. A. et al. (2004) Bone, 35:562-569; Zhu, G. et al. (2000) Nat Biotech, 18:52-57, Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery, K. Park et al, 1993, Technomic Publishing, Trans Am Ophthalmol Soc, K. Derwent et al, 2008, 106:206-13)。時間性放出のための機械的手段及び方法にはまた例えば手動添加が含まれ、または機械的装置を用いて増殖因子の継続的又は継続的に近い持続供給を細胞培養に長時間にわたって提供し、したがって安定な増殖因子濃度に曝露することにより幹細胞又は前駆細胞を安定な分化レベルに維持することができる。分解を軽減しそれによって幹細胞培養に曝露される増殖因子の持続的濃度範囲をもたらす、増殖因子の改変または他の手段もまた含まれる。

【0023】

本明細書で用いられる、“未分化の状態を細胞を維持する”という用語は、細胞分化、例えば培養における自発的分化を予防するか又はその量を最小限にすることを指す。ある種の実施態様では、例えば幹細胞又は前駆細胞を培養するとき、前記用語はまた、幹細胞の1つ以上の成熟した分化細胞系列に分化する能力を増加させる未成熟な状態を維持することを含む。例えば、未分化状態で維持される多能性幹細胞又は前駆細胞は幹細胞又は前駆細胞に密接に関係するマーカーを発現するが、分化中または分化した細胞と密接に関係するマーカーは全く発現しないか低レベルでしか発現せず、さらに1つ以上の異なる細胞系列に分化するその能力はまた維持するであろう。したがって、未分化状態で維持される単能性ケラチノサイト前駆細胞は、例えばケラチノサイトに分化しないであろう（すなわち前駆細胞のままである）が、（例えばそのような分化を経るように細胞にシグナルを送る適切な培養条件下で）ケラチノサイトに分化する能力は維持するであろう。

【0024】

一般的には、幹細胞又は前駆細胞が幹細胞又は前駆細胞として“維持される”（すなわち未分化状態で維持される）か否かを決定することは、前記がそのような細胞と密接に関係する1つ以上のマーカーを発現し続けるか否かを決定することによって可能である。例えば、ヒト胚性幹細胞のマーカーには、OCT4、NANOG、TRA-1-81、SOX2、SSEA-4及び／又はSSEA-3が含まれる（ただしこれらに限定されない）。NSC及びNPCのマーカーには、ネス

チン、Lex (CD-15)、ムサシ、Bmi-1、Sox1、Hes1、Hes5、BLBP及びCD133が含まれる（ただしこれらに限定されない）。さらにまた、未分化状態で維持されるESCは、一般的に分化の指標であるマーカー、例えばブラチュリー（Brachyury）、Sox17、Foxa2、Pax6、Otx2及びSox1を発現しないか、又は相対的に低レベルで発現するであろう。未分化状態で維持されるNSCは、Tuj1、S100 β 、ガラクトセレブロシド及び／又はMBP（ミエリン塩基性タンパク質）（ただしこれらに限定されない）を含むマーカーを発現しないか、（分化した細胞と比較して）相対的に低レベルで発現するであろう。例えば、本実施例に示すように、増殖因子FGF2はhESCを未分化状態で維持する（前記は、SSEA-4及びOCT4の高い発現並びに分化マーカー（ブラチュリー及びSOX17）の低い発現によって証明される）。例えばSSEA-4、OCT4、ブラチュリー及びSox17のようなマーカーは、他の分化及び未分化状態の指標である他のマーカーと同様に公知であり、当業界で日常的に用いられている。未分化状態を維持することは幹細胞の誘導および維持に必須である。

10

【0025】

本発明に包含される他の未分化細胞もまた、細胞の未分化状態及び／又は分化状態に特徴的な同様な及び／又は異なるマーカーを発現するであろう。そのようなマーカーは公知であり、又は当業者は容易に決定でき、さらにそのようなマーカーの発現を解析して、当該細胞が未分化状態を維持しているか否かを決定できる。

本明細書で用いられる、培養細胞に関して“持続放出組成物の存在下”という用語は、持続放出組成物又は時間経過中に安定な増殖因子濃度を維持する他の方法によって提供される持続濃度の増殖因子又は他の薬剤に細胞を接触させることができることを意味する。細胞及び持続放出組成物は同じウェル又は他の培養容器に含まれることも含まれないこともある。細胞は持続放出組成物の存在下にあり、これには、例えば持続放出組成物及び細胞がトランスウェル又は他の分割手段によって互いに分離されていても、細胞を含む当該分離された領域と持続放出組成物間で液体（例えば培養液）及び／又は増殖因子が容易に交換され得る限り、このような状態も含まれる。

20

“約”又は“およそ”という用語は、統計的に意義のある範囲内の値を意味する。そのような範囲は、1桁内、好ましくはある値又は範囲の50%内、より好ましくは20%内、さらに好ましくは10%内、及びさらに好ましくは5%内であり得る。“約”又は“およそ”という用語によって包含される許容可能な変動は調べられている具体的な系に左右され、当業者には容易に理解できよう。

30

【0026】

本発明にしたがって、一般的な分子生物学、微生物学、及び当業界の技量範囲内の組換えDNA技術を用いることができる。そのような技術は文献で完全に説明されている。例えば以下を参照されたい：Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989（本明細書では“Sambrook et al., 1989”）；DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985)；Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984)；Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]；Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]；Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)]；Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]；B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984)；Ausubel, F.M. et al. (eds.). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 1994。これらの技術は以下の文献に記載されている位置特異的変異導入を含む：Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488- 492 (1985)；米国特許5,071, 743号；Fukuoka et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 357-360 (1999)；Kim and Maas, *BioTech.* 28: 196-198 (2000)；Parikh and Guengerich, *BioTech.* 24: 428-431 (1998)；Ray and Nickoloff, *BioTech.* 13: 342-346 (1992)；Wang et al., *BioTech.* 19: 556-559 (1995)；Wang and Malcolm, *BioTech.* 26: 680-682 (1999)；Xu and Gong, *BioTech.* 26: 639-641 (1999)；米国特許5,789, 166号及び5,932, 419号；Hogrefe, *Strategies* 14. 3: 74-75 (2001)；米国特許5,702,931号、5,780,270号及び6,242,222号；An

40

50

gag and Schutz, Biotech. 30: 486-488 (2001); Wang and Wilkinson, Biotech. 29: 976-978 (2000); Kang et al., Biotech. 20: 44-46 (1996); Ogel and McPherson, Protein Engineer. 5: 467-468 (1992); Kirsch and Joly, Nuc. Acids. Res. 26: 1848-1850 (1998); Rhem and Hancock, J. Bacteriol. 178: 3346-3349 (1996); Boles and Miogsa, Curr. Genet. 28: 197-198 (1995); Barrentino et al., Nuc. Acids. Res. 22: 541-542 (1993); Tessier and Thomas, Meths. Molec. Biol. 57: 229-237; 及び Pons et al., Meth. Molec. Biol. 67: 209-218。当業界で日常的なこれらの技術及び他の技術は当業者には公知であり、それらを本発明の実施に用いることができよう。

【0027】

II. 大要

上記で考察したように、未分化細胞（例えば幹細胞及び／又は前駆細胞）を培養する方法は少なくとも2つの実質的な困難に直面している。第一に、増殖因子（例えばFGF2）は頻繁に培養に添加する必要がある、そのためそのような細胞の培養を時間と労力を要する高価な仕事にしている。ESCには毎日、NSCには3日目毎に増殖因子を添加する標準的なプロトコルは、細胞が曝露される増殖因子濃度に顕著な変動を生じる。第二に、未分化細胞（例えば幹細胞及び／又は前駆細胞）を培養する場合、顕著な量の望ましくない自発的細胞分化が培養中に発生し、そのような分化を阻害するために増殖因子（例えばFGF2）を毎日添加したときでさえも自発的細胞分化は発生する。したがって、本発明は、未分化細胞を未分化状態で培養し維持するために必要な労力及び骨折りを実質的に軽減するだけでなく、得られた培養で驚くほどに自発的分化は減少し（培養の不均質性の低下をもたらす）、したがって予期に反して従来利用可能な方法によって培養した細胞と比較して質が改善される。

一例として、及び限定ではなく、本明細書に提供する実施例で、増殖因子FGF2の安定形を含む持続放出組成物を用いて、hESC、iPSC、RPESC及びNSCを培養した実験を述べる。前記持続放出組成物は、増殖因子濃度の変動を最小限にすることによって（例えば実施例2に示すように、細胞培養中のFGF2濃度はFGF2含有微小球を含む培養で3日間にわたって80 - 100%の範囲に維持された）、7日まで又はそれより長く（例えば35日間まで）安定なFGF2タンパク質濃度範囲を提供し、未分化hESC、iPSC、RPESC、NSC及びNPCの安定性を顕著に改善した。ある実施例では、FGF2を含む持続放出組成物の存在下で培養したhESCは、MEF又はMEF条件付け培養液の非存在下において未分化状態で維持された。さらにまた、FGF2の持続放出は、分化を経た細胞培養の全能性を大きく改善した（実施例6に示す）。

【0028】

したがって、ある種の特徴では、標準的な細胞培養方法が達成し得るよりも未分化な状態で細胞を維持するために、本発明は、生物学的に活性な形態の1つ以上の増殖因子の持続的で安定な濃度範囲を、延長期間にわたって、好ましくは1日または数日の期間にわたって、より好ましくは少なくとも1週間維持する新規な方法を提供する。

本実施例では、標準的なプロトコル（3日目毎）ではなく、手作業でNSC培養に直接増殖因子を頻繁に（8時間毎）投与することによってもまた、未分化NSC培養の安定性が改善されることもまた示された（すなわち、ネスチン及びTuj1の発現によって測定したとき、より多くの細胞が未分化状態で維持された）。さらに、産出される細胞の絶対数も顕著に増加した。したがって、ある実施態様では、本発明は、改善された細胞（例えばNSC）の培養方法を提供し、前記は、未分化状態で細胞を維持するために細胞を固定レベル（すなわち安定濃度範囲）の増殖因子に曝露することによって達成され、さらに細胞数の増加をもたらした。

【0029】

本発明はいずれの特定の作用理論または作用メカニズムにも限定されないが、本培養方法は、より厳密にin vivo環境を模倣する長時間（例えば少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日又はそれ以上）の増殖因子の安定な濃度範囲を担保すると考えられる。したがって、好ましい実施態様では、培養プロセスの開始時に1つ以上の増殖因子を持続放出处方物で細胞培養

にデリバリーすることができ、更なる培養液交換はこの延長期間（例えば数日間、及び好ましくは少なくとも7日間）に要求されない。別の実施態様では、増殖因子（例えばFGF2）は細胞培養に頻繁に、例えば毎日1日3回以上又は継続的に投与できる。目標の成果は、細胞の有意な増加を含む、より均質で未分化な細胞培養（すなわちより安定な未分化細胞集団）である。

好ましい実施態様では、未分化細胞は幹細胞又は前駆細胞であるが、しかしながら、当業者は、本方法が増殖因子又は他の薬剤の頻繁な投与を必要とする任意の未分化細胞の培養に有用であることを理解するであろう。

【0030】

III. 幹細胞及び前駆細胞

ある種の実施態様では、本方法は、ESCを標準的な培養皿の表面に未分化状態で維持するために有用である。本発明の別の特徴では、本方法は、持続的な安定濃度範囲の増殖因子（好ましくはFGF2）の存在下でESCを培養することによって、ESC培養を分化からレスキューし、分化したESCを未分化状態へ戻すために有用である。本方法は、任意の哺乳動物ESC（ヒト、ラット、ブタ、ヒツジ、マウス、又は非ヒト霊長類のESC（ただしこれらに限定されない））の培養に有用である。ESCは、当業界で公知の任意の適切な方法（Thomson et al., 1998; Amit, 2000; 及びCowan et al., 2004; 並びに米国特許5,843,780号、6,200,806号及び7,029,913号（いずれもThomsonによる））、又は本明細書に記載した持続的レベルの増殖因子を含むためのプロトコルを改変することによって誘導することができる。

【0031】

ヒトESCは、例えば以下のマーカーの高発現[8量体結合タンパク質4 (Oct-4) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_001159542.1 (mRNA), Swiss-Prot参照番号Q01860.1 (タンパク質)) ; Nanog (GenBank(商標)アクセッション番号NM_024865.2 (mRNA), AAP49529.1 (タンパク質)) ; SRY(性決定領域Y)-box 2 (Sox2) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_003106.3 (mRNA), NP_003097.1 (タンパク質))、TRA-18-1、SSEA-4及びSSEA-3 (ヒトESCにおけるTRA-1-81、SSEA-4及びSSEA-3の発現の記載については以下を参照されたい: Henderson, JK et al. (2002), Stem Cells; 20(4):329-37)]、及びhESC分化マーカーの低発現[例えばブラチュリー (GenBank(商標)アクセッション番号NM_080646.1 (mRNA、変種A)、NM_080647.1 (mRNA、変種C)、NM_005992.1 (mRNA、変種B)、AAB94018.1 (タンパク質))、SRY(性決定領域Y)-box 17 (Sox17) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_022454.3 (mRNA)、NP_071899.1 (タンパク質))、フォークヘッドボックスA2 (Foxa2) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_021784.4 (mRNA、変種1)、NM_153675.2 (mRNA、変種2)、及びAAH06545.2 (タンパク質)) ; 対合ボックス6 (Pax6) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_000280.3 (mRNA、変種1)、NM_001604.4 (mRNA、変種2)、NM_001127612.1 (mRNA、変種3)、及びABB55263.1 (タンパク質)) ; オルトデンティクルホメオボックス2 (Otx2) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_021728.2 (mRNA、変種1)、NM_172337.1 (mRNA、変種2) ; NP_068374.1 (タンパク質、アイソフォームa)、NP_758840.1 (タンパク質、アイソフォームb)) ; 及びSRY(性決定領域Y)-box 1 (Sox1) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_005986.2 (mRNA)、NP_005977.2 (タンパク質))]によって特徴づけられる。供給源となる多様な種のESCの適切なマーカーは公知であり、当業者によって容易に決定され得る。

【0032】

本発明のある特徴では、本方法はまた、培養で神経幹細胞及び／又は前駆細胞を未分化状態で維持するために有用である。本発明の別の特徴では、本方法は、持続的な濃度範囲の増殖因子（好ましくはFGF2）の存在下で神経幹細胞及び／又は前駆細胞を培養することによって、前記細胞培養を分化からレスキューするために有用である。

本明細書に記載の方法にしたがって培養できるNSC及びNPCは、一定のマーカー、例えば以下のマーカーの1つ以上の発現：ネスチン (GenBank(商標)アクセッション番号NM_006617.1 (mRNA)、NP_006608.1 (タンパク質)) ; フコシルトランスフェラーゼ4 (アルファ(1, 3)フコシルトランスフェラーゼ、骨髄系特異的) (FUT4) (LeX) (CD-15) (GenBank(商標)

アクセッション番号NM_002033.3 (mRNA)、NP_002024.1 (タンパク質)) ; ムサシ (GenBank(商標)アクセッション番号AB012851.1 (mRNA)、BAA33962.1 (タンパク質)) ; ポリクーム複合体タンパク質Bmi-1 (Bmi-1) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_005180.8 (mRNA)、NP_005171.4 (タンパク質)) ; Sox1 (GenBank(商標)アクセッション番号NM_005986.2 (mRNA)、NP_005977.2 (タンパク質)) ; SRY (性決定領域Y)-box 2 (Sox2) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_003106.3 (mRNA)、NP_003097.1 (タンパク質)) ; Hes1 (GenBank(商標)アクセッション番号Y07572.1 (mRNA)、CAA68857.1 (タンパク質)) ; Hes5 (GenBank(商標)アクセッション番号DQ272660.1 (mRNA)、ABB83829.1 (タンパク質)) ; 脂肪酸結合タンパク質、脳(BLBP) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_001446.3 (mRNA)、NP_001437.1 (タンパク質)) ; 及びCD133 (GenBank(商標)アクセッション番号NM_006017.2 (mRNA、変種1)、NM_001145847.1 (mRNA、変種2)、NM_001145848.1 (mRNA、変種3)、NM_001145852.1 (mRNA、変種4)、NM_001145851.1 (mRNA、変種5)、NM_001145850.1 (mRNA、変種6)、NM_001145849.1 (mRNA、変種7)、NP_006008.1 (タンパク質、アイソフォーム1)、NP_001139320.1 (タンパク質、アイソフォーム2)、NP_001139324.1 (タンパク質、アイソフォーム4)、NP_001139323.1 (タンパク質、アイソフォーム5)、NP_001139322.1 (タンパク質、アイソフォーム6)、及びNP_001139321.1 (タンパク質、アイソフォーム7)、及び、以下を含むマーカー (ただしこれらに限定されない) の無発現又は相対的に (分化細胞と比較して) 低レベルの発現によって同定することができる : Tuj1, S100 β (GenBank(商標)アクセッション番号、例えばNM_006272.2 (mRNA)、NP_006263 (タンパク質) (他のアイソフォームもまた報告されており、GenBank(商標)から入手できる) 、ガラクトセレブロシド (GenBank(商標)アクセッション番号NM_000153.3 (mRNA)、NP_000144.2 (タンパク質)) 及び/又はMBP (ミエリン塩基性タンパク質) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_01025081.1 (mRNA)、及びNP_001020252 (タンパク質) (他のアイソフォームもまた報告されており、GenBank(商標)から入手できる)) 。

【0033】

本明細書で用いられる“神経”は神経系を意味し、神経膠細胞及びニューロンを含む。NPCはまた高レベルのヘリックス-ループ-ヘリックス転写因子NeuroD、Atoh1並びにニューロゲニン及びニューロゲニン2を発現できる。NSC培養は、典型的にはNSC及びNPCの混合物を含むことができ、両細胞は本発明の方法にしたがって培養できる (以下を参照されたい : Abramova et al, Developmental Biology 2005 283:269-81 ; Beckervordersandforth, Cell Stem Cell (2010) 7:744-758 ; Shoemaker et al., Plos One (2010) 5:e9121) 。

NSC及びNPCは、神経細胞、例えばニューロン、神経膠細胞、星状神経膠細胞、網膜ニューロン、光受容体、稀突起神経膠細胞、嗅覚細胞、毛細胞、支持細胞などに分化する潜在能力を有する。

【0034】

ある種の特徴では、本発明は、未分化細胞 (例えばESC、NSC及びNPC) 並びに関連する細胞タイプの培養に有用な方法を提供する。例えば、胚盤胞は原外胚葉幹細胞として知られる幹細胞を生じる部分を含み、神経系はNSCのいくつかのサブタイプを含む。毎日又は3日目毎の投与に勝る本発明の持続放出方法のこれらのサブタイプに対する利点は、ESC、NSC及びNPCに対するものと同じであると期待される。他の特徴では、本発明は、他の未分化細胞 (例えば未成熟神経細胞) を培養する方法を提供し、この場合細胞は未分化状態で維持される。いくつかの特徴では、ESC、NSC及びNPC並びにiPSC、MSC及びCSC以外に、未分化細胞には、皮膚、毛、腸及び血液の幹細胞及び/又は前駆細胞が、他の幹細胞及び前駆細胞 (多くの中で取り分け脂肪組織、腎、原外胚葉幹細胞及び骨髓幹細胞及び/又は前駆細胞を含む) と同様に含まれる (ただしこれらに限定されない) 。

他の特徴では、本発明は、未分化細胞 (例えばiPSC、RPESC、HSC、MSC及びCSC) の培養に有用な方法を提供する。REESCはin vitroで何倍にも増大させることができ、多様な発生系列 (中胚葉及び外胚葉を含む) に由来する極めて多様な子孫を生じることができる。RPESCは網膜細胞を生じる能力を有し、それらはまた極めて広範囲のレパトリの子孫 (骨、筋肉及び脂肪細胞を含む) を生じることができる。これらの細胞並びにそれらの同

定及び／又は単離の仕方は、米国特許出願公開公報2009/0274667号 (Temple et al.) に詳細に記載されている。そのような細胞もまた本発明の方法にしたがって培養できる。

【0035】

iPSC細胞は、幹細胞（例えば幹細胞分化を制御する因子）のin vitro研究及び疾患の治療にiPSCを応用するための研究の両方で有用である。iPSCは、4つの特異的な転写因子、SOX2 (GenBank(商標)アクセッション番号NM_003106.3 (mRNA)、NP_003097.1 (タンパク質))、OCT4 (GenBank(商標)アクセッション番号NM_001159542.1 (mRNA)、Swiss-Prot参照番号Q01860.1 (タンパク質))、クルッペル様因子4 (消化管) (KLF4) (GenBank(商標)アクセッション番号NM_004235.4 (mRNA)及びNP_004226.3 (タンパク質)) 及びmyc プロトオンコジーンタンパク質 ("c-MYC") (GenBank(商標)アクセッション番号NM_002467.4 (mRNA) 及びNP_002458.2 (タンパク質)) をウイルスによる形質導入によって線維芽細胞に導入することによって、マウス線維芽細胞及びヒト線維芽細胞から誘導することができる（以下を参照されたい：Lowry, W.E., et al. (2008). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 2883-2888; Maherali, N., et al. (2007). Cell Stem Cell, 1, 55-70; Park, et al. (2008). Nature 451, 141-146; Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Cell, 126, 663-676; Takahashi, K. et al. (2007). Cell 131, 861-872; Yu, J. et al. (2007). Science, 318, 1917-1920; Stadtfeld and Hochedlinger (2010) Genes Dev, 24:2239-2263; Hochedlinger and Plath (2009) 136:509-523)。また、OCT4、SOX2、NANOG及びLIN-28 (GenBank(商標)アクセッション番号NM_024674.4 (mRNA) 及びNP_078950.1 (タンパク質)) が、ヒト体細胞を全能性幹細胞に再プログラムするために十分であると報告された。重要なことには、FGF2はまた線維芽細胞の全能性状態への再プログラミングプロセス（すなわち線維芽細胞からiPSCを誘導するため）に用いられる。さらにまた、iPSCは、未分化状態で維持されるために培養時にFGF2に依存する（以下を参照されたい：Takahashi et al. Cell, Volume 131, Issue 5, 861-872, 30 November 2007)。

【0036】

MSCは、胚から成人までの多様な組織から入手できる。例えば、それらは、臍帯組織（すなわちウォートンゼリー及び臍帯血）又は羊水から抽出できる。MSCはまた、下顎第三大臼歯の発育中の歯芽から、骨髄、骨格筋、骨膜、肺、皮膚及び脂肪組織から入手できる。MSCは成人に広く存在し、極めて多様な組織から抽出できる（以下を参照されたい：Lu et al, Haematologica, 2006 91: 1017-26; Zeddou et al, Cell Biol Int 2010. vol 34 :693-701; Lee et al Cell Physiol Biochem 2004 14:311-324; Rosenbaum et al 2008; Organogenesis 4:23027)。Rosenbaumらは、MSCの同定に用いることができる表面マーカーを記載している。

癌幹細胞 (CSC) は腫瘍形成性であり、幹細胞の自己再生プロセス及び多数の細胞タイプへの分化の間に腫瘍を発生させ得る。CSCは、新規な腫瘍を生じることによって再発及び転移を引き起こし得る別個の集団として腫瘍を存続させると考えられる。CSCを標的とする特異的な治療法の開発が、例えば癌の治療のために所望される。したがって、これらの細胞を調べそのような治療法を開発するためにこれらの細胞を培養することは有用である。しかしながら、CSCは原発性腫瘍サンプルから培養することはしばしば非常に困難で、in vivoで見出される増殖因子環境にそれらが依存していることを示唆している。したがって、それらの培養のための改善方法が所望される。CSCは、それらを未分化状態で維持するために、本発明にしたがって持続濃度範囲の増殖因子の存在下で培養できる。多様な供給源から得られる原発性腫瘍はしばしばFGF2依存性であり、いくつかの事例では、FGF2下で優れた増殖を示す（以下を参照されたい：Lee et al, Cancer Cell (2006), vol 9 391-403; Ricci-Vitiani et al, Nature, 445 pp111-115; New Yeoman, J Cell OPhysiol 1 (1992) 150:320-326)。

【0037】

造血幹細胞 (HSC) は骨髄または末梢血から単離できる。HSCの単離方法は例えば以下に記載されている：Hawley et al, Methods Enzymol, 2006; 419:149-179; 及びChallen et al, Cytometry A, 2009, 75:14-24。HSCを体外で培養することは非常に困難である。し

かしながら、FGF2はそれらの自己再生の保全に役立ちえる（以下を参照されたい：Yeoh et al, Stem Cells, 2006, 24:1564-1572）。

本発明の方法にしたがって培養できる幹細胞及び関連する前駆細胞の非限定的な例には、例えば皮膚幹細胞、精原幹細胞、毛嚢幹細胞、癌幹細胞、骨髄幹細胞、消化管幹細胞、造血幹細胞、脂肪組織幹細胞、マウス胚幹細胞、ヒト胚幹細胞、網膜色素上皮幹細胞、間葉幹細胞、原外胚葉幹細胞、腎幹細胞、羊膜幹細胞、臍帯血幹細胞、内皮幹細胞、神経冠幹細胞が含まれる。上記幹細胞に関連する前駆細胞（すなわちそのような幹細胞から誘導される）もまた本発明にしたがって培養できる。全ての幹細胞が未分化状態の維持に増殖因子を要求する。現在公知の又は将来発見されるいずれの幹細胞又は前駆細胞もまた本発明の方法にしたがって培養できる。当業者は幹細胞及び前駆細胞を誘導することができ、そのような方法は当業界では公知である。多くの幹細胞はまた市場で入手可能であるか、又は細胞バンク（例えばWiCell Research Institute, National Stem Cell Bank, Madison, WI）から入手できる。

【0038】

IV. 細胞培養方法

本発明は、未分化細胞（例えば幹細胞及び／又は前駆細胞（ただしこれらに限定されない））の培養のための新規で改善された方法を提供する。幹細胞及び／又は前駆細胞の培養のために適切な培養液は公知であり当業界で報告されている（例えば以下を参照されたい：Amit et al., 2000, 上掲書；Fasano et al., 2010, 上掲書；Ludwig et al., 2006, 上掲書；Bendall, et al., 2007, 上掲書；Qian et al., 1997, 上掲書；Fasano et al., 2007, 上掲書；及びShen Q, et al. (2004) Science 304, 1338-40）。例えば、細胞は、無血清DMEM/N2及びB27溶液並びに増殖因子補充高グルコース中で培養できる。典型的には細胞は、組織培養処理ウェルで37℃及び5%CO₂にてインキュベートされる。場合によっては、細胞は、フィーダー細胞（例えばマウス胚線維芽細胞（MEF））の存在下で培養できる。しかしながら、本実施例で示すように、本発明は、フィーダー細胞の必要性を排除する持続放出組成物を提供する。そのような方法は当業界では周知である（以下を参照されたい：Amit et al., 2000；Fasano et al, 2010；Ludwig et al., 2006；Bendall, et al., 2007；Qian et al., 1997；Fasano et al., 2007；及びShen et al., 2004）。具体的な培養条件は当業者により容易に決定及び調節される。

典型的には、ESCは、研究者が実施している該当実験に適切と思われる密度まで増殖させる（典型的には1週間）。この時点で、ESCは単一細胞として又は細胞凝集物としてMEFフィーダー上で、又は細胞外マトリックスで被覆した組織培養処理プラスチック皿で継代される（Fasano et al., 2007）。典型的には、NSC及び／又はNPCは、研究者が実施している該当実験に適切と思われる密度まで増殖させる（典型的には1週間）。この時点で、NSC及び／又はNPCは、単一細胞、分離細胞又は細胞凝集物として、細胞外マトリックス被覆組織培養処理プラスチック皿で、又は浮遊NSC（神経球）培養が所望される時は細胞外マトリックスが存在しない非組織培養処理プレートで継代される（Fasano et al., 2007）。

【0039】

幹細胞（例えばiPSC、MSC、CSC及びSCSC（ただしこれらに限定されない））の標準的な培養方法は当業界では公知である。例えばiPSCの培養方法は、例えば以下に詳細に記載されている：Maherali and Hochedlinger, Cell Stem Cell 2008 3:595-605。MSCの培養方法は以下に記載されている：Sotiropoulou PA, et al. Stem Cells. 2006 Feb;24(2):462-71。CSCの培養方法は例えば以下に記載されている：Cao, L. et al. BMC Gastroenterol. 2011 Jun 14;11(1):71；及びWakimoto et al. Cancer Res. 2009 Apr 15;69(8):3472-81。SCSCの培養方法は例えば以下に記載されている：Lowry et al. Exp Neurol. 2008 Feb;209(2):510-22；Yan J. et al., PLoS Med. 2007 Feb;4(2):e39；及びYeoh et al, stem cells 2006, 24:1564-1572。

本方法では、未分化細胞は持続的濃度の増殖因子の存在下でインキュベートされる。ある種の実施態様では、未分化細胞は、持続放出組成物（例えばPLGA微小球）の存在下でイ

ンキュベートされる。いくつかの特徴では、未分化細胞は、同じ又は異なる増殖因子を含む同じ又は異なる組成物である2つ以上の持続放出組成物とともにインキュベートできる。ある種の特徴では、細胞は、増殖因子を頻繁にフィードすることによって（例えば継続的、又は2、4、6、若しくは8時間毎）、1つ以上の増殖因子の定常的存在下で培養される。好ましくは、細胞は所望の増殖因子を8時間毎よりも頻繁にフィードされる。本発明にしたがえば、増殖因子の安定な濃度範囲は、細胞（例えば幹細胞又は前駆細胞）を未分化状態で維持するために有用であり、前記はまた生産される子孫の数の増加、均質性及び質の向上に有効である。

細胞培養へ増殖因子を“頻繁にフィード”する（例えば増殖因子が培養に数時間毎又は継続的に添加される）ために、増殖因子を任意の適切な方法によって、例えばピペット又はドリッパーによって細胞培養に投与するか、または自動細胞フィーディング系によって（すなわち機械的に）滴下してもよい。

【0040】

V. 持続放出組成物

本発明は持続放出組成物を提供し、前記組成物は、延長された期間にわたって（例えば数日、好ましくは少なくとも7日の期間にわたって）、細胞培養で増殖因子の持続的濃度又は濃度範囲を維持する。本発明は、具体的ないずれか1つの持続放出組成物又はいくつかの持続放出組成物（例えば本明細書に記載されるもの）には限定されないことは理解されるべきである。本発明の方法は、任意の適切な持続放出組成物又は調製物（例えば組織培養プレートコーティング）を用いて実施できるが、ただし持続放出組成物又は調製物によって提供される増殖因子が、本明細書に記載するように増殖因子の持続的で安定な濃度範囲を生じる態様で提供されることを条件とする。

他の実施態様では、増殖因子は、例えば1日に複数回又は継続的に細胞培養に直接添加できる。具体的な実施態様では、FGF2は、1日に3回、8時間毎にNSC培養に直接投与され、標準的な培養方法（FGF2を3日目毎に細胞にフィードする）と比較して分化状態及び細胞の数において予期しない顕著な改善を引き起こした。

【0041】

本発明の方法で用いることができる持続放出組成物の非限定的な例には、例えば微小球（例えばポリ(DL-ラクチドグリコリド) (PLGA) 微小球）、無水ポリビニルアルコール (PVA)、ミリシリンドラー、アルギネートゲル、生物分解性ヒドロゲル、リポソーム、複合物質、持続的極小ポンプ、ナノ粒子、及び持続的期間にわたって増殖因子を放出する任意の生物適合性材料が含まれる（例えば以下を参照されたい：Ashton, et al. (2007) Biomaterials, 28, 36, 5518; Drury, J. L. et al. (2003) Biomaterials, 24:4337-4351; 米国特許7,226,617号 (Ding et al); Simmons, C. A. et al. (2004) Bone, 35:562-569; Zhu, G. et al. (2000) Nat Biotech, 18:52-57, Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery, K. Park et al, 1993, Technomic Publishing, Trans Am Ophthalmol Soc, K. Derwent et al, 2008, 106:206-13)。さらにまた、公開されている米国特許出願公開公報2010/0021422号を参照されたい。本実施例では、微小球は、標準的なダブルエマルジョン技術を用いて改変を施した、文献 (Zhu, G. et al. (2000) Nat Biotech; 18:52-57) 記載の方法により調製した。

【0042】

いくつかの特徴では、本発明の微小球又はマイクロ粒子はPLGA及びPVAの組合せを含むことができる（以下を参照されたい：Edlund et al., Advances in Polymer Science Vol. 157, 2002, 67）。Edlundらは、薬剤の制御デリバリーに利用するために精査した多くの多様な分解性ポリマー（例えばポリグリコリド、ポリラクチド）を前記の77ページに列挙している。したがって、本発明で有用である適切な持続放出組成物は、これらの分解性ポリマー又は他の分解性ポリマーを用いて作製できよう。PVAは、エマルジョン溶媒蒸発技術によって製造される微小球の安定化のために用いることができる物質の想定可能な範囲内の1つである。PVAは安定化剤/乳化剤として用いられる。PVAの濃度を変更することによって微小球のサイズを変化させることができ、前記は順繰りに放出プロフィールに影響を

与えることができる（例えば以下を参照されたい：Zhao et al. (2007) BioMagnetic Research and Technology, 5:2）。

本発明のPLGA微小球のサイズは10 - 40 μm の範囲であり、平均直径は20 μm であり得る。サイズはホモジナイザーの速度を変化させることなどによって制御できる。ある種の実施態様ではより大きなサイズを用いることができる。微小球のサイズの変更は、培養条件の斟酌、所望される放出の動力学、積載効率及び増殖因子放出量を指標とすることができる。

【0043】

いくつかの実施態様では、培養細胞への増殖因子の時間性放出のために、PLGAミリシリンドーを本発明の持続放出組成物として用いることができる。本明細書で用いられる“ミリシリンドー”は、直径が約0.8-1.5mmの円筒形単一移植体である（以下を参照されたい：Zhu, G. et al. (2000) Nat Biotech; 18:52-57）。本発明のさらに別の特徴は、培養細胞（例えば未分化細胞）への増殖因子の時間性放出のためにナノ粒子の使用を含む。本明細書で用いられる“ナノ粒子は”、典型的には1-100ナノメートル（nm）の範囲のサイズであるが、1-1000nmの範囲を包含するより大きな粒子とともに1ミクロン以下も含む小粒子と定義される（例えば以下を参照されたい：Ya-Ping Li, et al., J. of Controlled Release, 2001, 71:203-211；Mu, L. and Feng, S. J. of Controlled Release, 2003, 86:33-48；及びGovender et al., J. of Controlled Release, 1999, 57:171-185）。

【0044】

本発明の別の特徴はヒドロゲル中の微小球の懸濁物を含む。前記は生物適合性、生物分解性と考えられ、細胞培養の細胞（例えば幹細胞及び／又は前駆細胞）に適合する。ヒドロゲルマトリックスは以下を含む（ただしこれらに限定されない）多くの有用性を有する：未分化細胞（例えば幹細胞及び／又は前駆細胞）のin vivo適用の安定化、三次元細胞培養の発生、並びに薬剤、増殖因子及び他の物質の細胞培養へのデリバリー。生物活性因子はヒドロゲルに存在する微小球から放出される。したがって、その放出速度は、ヒドロゲルが存在しないときと同じ態様で（例えば微小球の作製に用いられるポリマーの組成/分子量の変更、微小球へのタンパク質積載の変更、微小球サイズなどによって）調節することができる。アルギネートリアーゼを含有する微小球のヒドロゲルへの取り込みはこの酵素の制御放出を可能にし、前記は順繰りにヒドロゲルの分解速度に対する制御を提供することがAshtonらの文献（上掲書）で示された（以下を参照されたい：Ashton et al. (2007) 上掲書；Piantino et al., 2006, Exp Neurol., 201(2):359-67；米国特許7,226,617号（Ding et al.））。

【0045】

本発明の持続放出組成物の別の例は、非晶質炭水化物ガラスマトリックス（PCT公開公報 WO 93/10758に詳細に記載されている）を含み、前記マトリックスでは、生物活性物質（例えばFGF2）は炭水化物ガラスマトリックスに取り込まれ、制御放出又は分解は疎水性物質の添加によって調節される。本発明はまた、持続的態様で増殖因子を放出するマトリックスによるプラスチック又はガラスの培養皿のコーティングを提供する。例えば、前記組織培養プレートは、前記組織培養プレート又は他の容器の表面を被覆するか又は表面に含まれるFGF2又は他の増殖因子を、約3、4、5、6、又は7日にわたって時間放出をする。

細胞培養用持続放出組成物（例えばPLGA微小球）の典型的な濃度は、約1から約300ng/mL、好ましくは約1から約200ng/mL、より好ましくは約1から約100ng/mL、さらに好ましくは約1から約50ng/mL、もっとも好ましくは約1から約10ng/mL、又は約1から約5ng/mLの範囲である。典型的には（必然的というわけではないが）、培養液1mL当たり約7 μL のPLGA微小球調製物（調製物1 μL 当たり1000微小球の濃度）が培養に添加される。

本発明は、未分化状態で細胞を維持するために有用な任意の増殖因子を本発明の持続放出組成物で使用することを意図する。さらにまた、本発明の持続放出組成物は2つ以上の増殖因子を含むことができる。

【0046】

本発明で利用できる好ましい増殖因子はFGF2である。しかしながら、適切な増殖因子又

は他のサイトカインのその他の非限定的な例には例えば以下が含まれる：表皮成長因子（EGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、ソニックヘッジホッグ（Shh）、白血病阻害因子（LIF）及びWntタンパク質（例えばWnt1又はWnt3）、又は幹細胞を未分化状態で維持する任意の成長因子。例えば、脊髄幹細胞（SCSC）はShhによって増大する（以下を参照されたい：Lowry, N. et al. Exp Neurol. 2008 Feb;209(2):510-22）。したがって、ある実施態様では、SCSCは、未分化状態でSCSCを維持するために、安定濃度範囲のShhの存在下で培養される。ある実施態様では、SCSCは、持続放出組成物がShhを含む持続放出組成物（例えばPLGA微小球又は他の組成物（例えば本明細書に記載されたものであるが、ただしこれらに限定されない））の存在下で培養される。さらにまた、持続放出組成物は、Mg(OH)₂、ヘパリン、硫酸デキストラン及びEDTAの1つ以上を含むことができる。

10

本発明の持続放出組成物中の増殖因子の濃度は、約5%（w/v）から約0.001%、約3%から約0.05%、約2%から約0.1%、及び約1.0%から約0.1%の範囲であり得る。具体的な実施態様では、持続放出組成物は約0.5%（w/v）のFGF2を含む。しかしながらそれより多い又は少ないFGF2も具体的な培養条件に応じて用いることができる。

【0047】

本発明の持続放出組成物はさらに、当該組成物に含まれる1つ以上の増殖因子を安定化させるか又は複合体を形成する薬剤を含むことができる。例えば、組成物はさらにヘパリンを含むことができる（ヘパリンはFGF2を安定化させることが示された）（以下を参照されたい：Caldwell, M. et al. (2004), Exp Neurol, 188:405-420）。ヘパリンの代わりに又はヘパリンに加えて当該組成物に含まれ得る別の薬剤は硫酸デキストランである。ヘパリン及び／又は硫酸デキストランの濃度は、約5%（w/v）から約0.001%、約3%から約0.05%、約2%から約0.1%、及び約1.0%から約0.1%の範囲であり得る。具体的な実施態様では、持続放出組成物は約1.0%（w/v）のヘパリン及び／又は硫酸デキストランを含む。しかしながらそれより多い又は少ないヘパリン又は硫酸デキストランも具体的な培養条件に応じて用いることができる。さらにまた、FGF2と複合体を形成する他の多価陰イオン分子も本発明の部分であり得る（J. Med. Chem., 2000, 43 (13), pp 2591-2600）。分解を緩和する増殖因子の共有結合改変もまた含まれる。幹細胞増殖培養液における増殖因子の持続的濃度をもたらし全ての改変が、増殖の改善、幹細胞のより均質な未分化集団、及び幹細胞分化の低下という同様な予期に反する驚くべき結果をもたらすと期待される。

20

【0048】

本発明の持続放出組成物はさらに、持続放出組成物のpHを改変する薬剤を含むことができる。例えば、具体的な実施態様では、Mg(OH)₂が組成物に添加され、例えばPLGA微小球の酸性環境を中和する。Mg(OH)₂の濃度は、約15%（w/v）から約0.05%、約10%から約0.1%、及び約5%から約1.0%の範囲であり得る。具体的な実施態様では、持続放出組成物は約3.0%（w/v）のMg(OH)₂を含む。しかしながらそれより多い又は少ないMg(OH)₂も具体的な培養条件に応じて用いることができる。本発明の組成物はまた場合によって薬剤、例えばEDTA、アラビアゴム、シュクロース、MgCO₃及びBSAを含むことができる。

30

本発明の具体的な実施態様では、持続放出組成物はPLGA微小球であり、約10－50ミクロンの直径を有し、0.5%のFGF2、3%のMg(OH)₂、1.0%ヘパリン及び1mM EDTAを含む。別の実施態様では、持続放出組成物はPLGA微小球であり、約10－50ミクロンの直径を有し、0.5%のFGF2、3%のMg(OH)₂、1.0%硫酸デキストラン及び1mM EDTAを含む。どちらかの実施態様でも、前記持続放出組成物は、少なくとも約1、2、3、4、5、6又は7日又は前記より長い、例えば2週間、3週間、4週間、5週間、又は前記より長い期間にわたってFGF2を放出する。

40

【0049】

持続放出組成物からの増殖因子の放出の動力学および量は、当該持続放出組成物の具体的な組成及びサイズ、積載効率、非放出貯蔵容器、増殖因子の分解速度、並びに組成物に含まれる増殖因子の濃度及び他の薬剤に左右されるであろう。放出動力学及び放出される（例えば細胞培養中に）増殖因子の量は当業者には容易に決定されるであろう。好ましくは、FGF2を放出する持続放出組成物は、天然のFGF2を少なくとも3から7、4から7又は5か

50

ら7日間にわたって約10ng/mLのFGF2を放出するであろう（ただしFGF2の安定化型についてはもっと少ない量が必要とされる）。例えば、1mLのPBS（0.2% Tween20、1% BSA、10ug/mLヘパリン及び1mM EDTAを含む）中に1mgのFGF2が与えられ、さらに0.2%のタンパク質放出を基準にすると、1日当たり培養液に10ng/mLのFGF2が少なくとも約3日間の期間にわたって達成されるであろう。未分化細胞を安定化させる（すなわち、それらを未分化の状態に維持する）ために必要なFGF2及び他の増殖因子のレベルは放出動力学及び分解動力学に左右され得る。しかしながら好ましくは、培養液中のFGF2濃度は、約1ng/mLから約10ng/mL又はそれ以上、例えば15ng/mL又は20ng/mL又はそれ以上の範囲で、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、又はそれより長い、例えば2週間、3週間、4週間、5週間又はそれより長い期間にわたって維持されるであろう。

10

VI. 細胞分化のアッセイ

多様な方法を利用して、未分化細胞が未分化細胞として維持されていたか否かを決定することができる。例えば、hESC培養の細胞を、未分化細胞のマーカー（例えばOCT4、NANOG TRA-1-81、SSEA-4及び／又はSSEA3（ただしこれらに限定されない））の発現について調べることができる。NSC及びNPCは、1つ以上のマーカー（例えばネスチン、Lex（CD-15）、Sox-1、Sox-2、CD133、ムサシ、Bmi-1、Hes1及び／又はHes5（ただしこれらに限定されない））の発現について調べることができる。

そのような細胞はまた、分化進行又は分化済み細胞のマーカー、例えば以下のもの（ただしこれらに限定されない）の発現について調べることができる：ブラチュリー、Sox17、Foxa2、Otx2、Sox1及び／又はSSEA-1（hESCの場合）；及びTuj1、S100β、O4及びミエリン塩基性タンパク質（NSC及びNPCの場合）。そのようなマーカーの遺伝子及び／又はタンパク質発現を、例えば定量的PCR、FACS解析及び／又はELISAによって決定することができる。そのような方法は当業界で周知である。そのようなマーカーはまた、他の非ヒト種起源の分化進行細胞の性状決定のために有用であり、適切なマーカーは公知で当業者はそれらを容易に決定できる。

20

【0050】

本発明の方法は、任意の種に由来する多くのタイプの未分化細胞、例えば幹細胞、前駆細胞、神経細胞（例えば未熟な神経細胞など）（ただしこれらに限定されない）の培養に用いることができることは理解されよう。当業者は、培養された具体的な細胞の性状決定にどのマーカーが適切かを容易に決定できる。

30

幹細胞のためには特に、幹細胞分化（又は未分化状態での幹細胞の維持）の判定はまた幹細胞の形態学的特徴の解析によって決定できる。hESCは高い核対細胞質比を示して核仁が目立ち、球形であり、典型的には一緒に堅固にまとまったコロニーとして増殖する。これらのコロニーの境界は非常に密で堅固で範囲は明瞭である。NSCは、平坦でいくつかの事例では敷石を敷き詰めたような形態を示す。NSCは、クローンとして又は非常に堅固にまとまった群として増殖する傾向があり、この場合それらは四角か又は大雑把に三角形の外観を採ることがある（Temple, 1989; Thomson et al, 1998）。さらにまた、NSCは、培養で神経球として知られる浮遊凝集物として存在し得る。1週間後、これらの神経球は分離して単一細胞になり、同じ状態で再度プレートされる。適切に維持されているNSC株は、前の継代と同じ速度またはそれよりも速い速度で新しい球体を形成し続ける。NSCの維持の欠損は、継代後の神経球形成低下をもたらすであろう（Fasano et al, 2007）。

40

【0051】

VII. キット

本明細書に記載する未分化細胞（例えば幹細胞及び／又は前駆細胞）培養用持続放出組成物はキットとして提供され得る。本キットは、そのような細胞を未分化状態で維持するために適切な1つ以上の増殖因子を含む、1つ以上の本発明の持続放出組成物（例えばPLGA微小球）、及び場合によって（b）情報資料を含むことができる。2つ以上の組成物が含まれる場合は、各持続放出組成物は本キット中で別々に提供されるか、又はそれらは種々の持続放出組成物の1つ以上の混合物として提供され得る。活性化化合物（例えば増殖因子）に加えて、キットの持続放出組成物は、他の成分（例えば溶媒又は緩衝液、安定化剤、保

50

存料、及び／又は細胞を未分化状態で培養及び維持するための追加の薬剤（例えば増殖因子）を本明細書に記載するように含むことができる。持続放出組成物は、即席物としてキットで提供され得る。すなわち、前記は、細胞培養への添加時に含まれるべき全ての薬剤（例えばpH安定化剤（例えば $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ）、増殖因子安定化剤（例えばヘパリン）、及び活性薬剤（例えば増殖因子））を含む。或いは、キットは、最終的な持続放出組成物の成分のいくつか又は各々を、使用前にそれら成分を組み合わせる仕方を指示するものとともに別々に提供してもよい。

【0052】

前記情報資料は、本明細書に記載の方法及び／又は本明細書に記載の方法における持続放出組成物の使用に関連する説明資料、指示資料、市場資料又は他の資料であり得る。例えば、前記説明資料は、未分化細胞（例えば幹細胞及び／又は前駆細胞）の培養のためにキットとして提供される持続放出組成物の使用に関連する。キットはまた1つ以上の化合物を細胞に投与するための調剤備品（例えばピペット、ドロPPERなど）を含むことができる。

キットの情報資料はその形態に制限を受けない。多くの事例では、前記情報資料（例えば指示書）は、印刷物として、例えば印刷された冊子、図面及び／又は写真（例えばラベル又はプリントシート）として提供される。しかしながら、情報資料はまた、他の様式（例えば点字、コンピュータ読み出し可能資料、ビデオ記録物、又はオーディオ記録物）でも提供できる。もちろん、情報資料は複数の様式の任意の組合せで提供することもできる。

キットは持続放出組成物のための1つ以上の容器を含むことができる。いくつかの実施態様では、キットは組成物及び添付説明資料のために別々の容器、仕切り物又は区画を含むことができる。例えば、組成物はビン、チューブ又はバイアルに収納され、情報資料はプラスチックスリーブ又はポケットに収納され得る。他の実施態様では、キットの別々の成分は1個の仕切りの無い容器を用いて収納される。例えば、持続放出組成物は、ラベルの形で前記組成物に添付された情報資料を有するビン、チューブ又はバイアルとして収納される。

【0053】

本発明はまた以下の実施例により説明及び論証を提供する。しかしながら、本明細書のいずれかの箇所におけるこれらの実施例又は他の実施例の使用は例示であり、本発明又はいずれの実証項目の範囲及び意味をいかなる態様でも制限するものではない。同様に、本発明は、ここに記載したいずれの特定の好ましい実施態様にも限定されない。実際、本発明の多くの改変及び変型は本明細書を読んだときに当業者には明白であり、そのような変型は本発明の範囲から逸脱することなく実施し得る。本発明は、したがって添付の特許請求の範囲及びそれら特許請求の範囲が権限を与える完全な等価物によってのみ制限を受ける。

【0054】

本発明の具体的実施態様をいくつか以下に例示する。

〔1〕哺乳動物の幹細胞又は前駆細胞を培養する方法であって、少なくとも1つの増殖因子を含む持続放出組成物の存在下で前記幹細胞又は前駆細胞をインキュベートする工程を含み、前記持続放出組成物が前記増殖因子を放出し、さらに前記増殖因子の存在が細胞を未分化状態で維持する、前記方法。

〔2〕増殖因子の持続放出が、前記増殖因子の開始濃度の80%－100%の安定な濃度範囲で増殖因子の濃度を細胞培養物中で維持する、前記〔1〕に記載の方法。

〔3〕増殖因子の持続放出が、前記増殖因子の開始濃度の80%－95%の安定な濃度範囲で増殖因子の濃度を細胞培養物中で維持する、前記〔1〕に記載の方法。

〔4〕増殖因子の持続放出が、前記増殖因子の開始濃度の80%－90%の安定な濃度範囲で増殖因子の濃度を細胞培養物中で維持する、前記〔1〕に記載の方法。

〔5〕持続放出組成物が、少なくとも約1日の期間にわたって少なくとも1つの増殖因子を放出する、前記〔1〕に記載の方法。

- 〔 6 〕 持続放出組成物がポリ(DL-ラクチドコグリコリド) (PLGA) 微小球である、前記〔 1 〕に記載の方法。
- 〔 7 〕 PLGA微小球の濃度が約5から約300ng/mLの範囲である、前記〔 6 〕に記載の方法。
- 〔 8 〕 持続放出組成物がさらにヘパリン又は硫酸デキストランを含む、前記〔 1 〕に記載の方法。
- 〔 9 〕 持続放出組成物がさらにMg(OH)₂を含む、前記〔 1 〕に記載の方法。
- 〔 1 0 〕 細胞が少なくとも約3日間未分化状態で維持される、前記〔 1 〕に記載の方法。
- 〔 1 1 〕 幹細胞が、胚性幹細胞 (ESC)、人工多能性幹細胞 (iPSC)、神経幹細胞 (NSC)、網膜色素上皮幹細胞 (RPESC)、造血幹細胞 (HSC)、間葉幹細胞 (MSC)、癌幹細胞 (CSC) 及び原外胚葉幹細胞から成る群から選択される細胞である、前記〔 1 〕に記載の方法 10
- 。
- 〔 1 2 〕 幹細胞がヒト胚性幹細胞である、前記〔 1 〕に記載の方法。
- 〔 1 3 〕 前駆細胞が神経前駆細胞である、前記〔 1 〕に記載の方法。
- 〔 1 4 〕 幹細胞又は前駆細胞を培養する方法であって、前記方法が、線維芽細胞増殖因子 2 (FGF2) を含む持続放出組成物の存在下で幹細胞又は前駆細胞をインキュベートする工程を含み、前記持続放出組成物がFGF2を放出する、前記培養方法。
- 〔 1 5 〕 幹細胞又は前駆細胞が少なくとも約3日間未分化状態で維持される、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 1 6 〕 持続放出組成物が少なくとも1日の期間にわたってFGF2を放出する、前記〔 1 4 〕に記載の方法。 20
- 〔 1 7 〕 持続放出組成物が、幹細胞又は前駆細胞とのインキュベーションの開始時に0.5% (w/v) の濃度でFGF2を含む、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 1 8 〕 FGF2の持続放出が、FGF2の開始濃度の80% - 100% の安定な濃度範囲でFGF2の濃度を細胞培養物中で維持する、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 1 9 〕 FGF2の持続放出が、FGF2の開始濃度の80% - 95% の安定な濃度範囲でFGF2の濃度を細胞培養物中で維持する、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 2 0 〕 FGF2の持続放出が、FGF2の開始濃度の80% - 90% の安定な濃度範囲でFGF2の濃度を細胞培養物中で維持する、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 2 1 〕 持続放出組成物がさらに、ヘパリン、硫酸デキストラン、FGF2と複合体を形成する多価陰イオン、Mg(OH)₂、及びEDTAから成る群から選択される1つ以上の薬剤を含む、前記〔 1 4 〕に記載の方法。 30
- 〔 2 2 〕 持続放出組成物がポリ(DL-ラクチドコグリコリド) (PLGA) 微小球である、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 2 3 〕 PLGA微小球の濃度が約5ng/mLから約300ng/mLの範囲である、前記〔 1 6 〕に記載の方法。
- 〔 2 4 〕 持続放出組成物がさらに1.0% (w/v) のヘパリン又は1.0% (w/v) の硫酸デキストランを含む、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 2 5 〕 FGF2に対するヘパリン又は硫酸デキストランの割合が約2 : 1である、前記〔 2 4 〕に記載の方法。
- 〔 2 6 〕 持続放出組成物がさらに3% (w/v) のMg(OH)₂を含む、前記〔 1 4 〕に記載の方法。 40
- 〔 2 7 〕 持続放出組成物がさらに1mMのEDTAを含む、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 2 8 〕 幹細胞が、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、神経幹細胞、網膜色素上皮幹細胞、造血幹細胞、間葉幹細胞、癌幹細胞及び原外胚葉幹細胞から成る群から選択される細胞である、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 2 9 〕 幹細胞がヒト胚性幹細胞である、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 3 0 〕 前駆細胞が神経前駆細胞である、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 3 1 〕 持続放出組成物がさらに1つ以上の追加される増殖因子を含む、前記〔 1 4 〕に記載の方法。
- 〔 3 2 〕 1つ以上の追加される増殖因子が、表皮成長因子 (EGF)、血小板由来成長因子 (50

PDGF)、ソニックヘッジホッグ(Shh)、白血病阻害因子(LIF)及びWntタンパク質から成る群から選択される、前記〔14〕に記載の方法。

〔33〕未分化哺乳動物細胞を培養する方法であって、少なくとも1つの増殖因子を含む持続放出組成物の存在下で前記未分化哺乳動物細胞をインキュベートする工程を含み、前記持続放出組成物が前記増殖因子を放出し、放出される増殖因子が予め定めた濃度範囲内で維持され、さらに放出される増殖因子の前記濃度範囲内での維持が細胞を未分化の状態

で維持する、前記方法。

〔34〕哺乳動物の幹細胞又は前駆細胞を培養する方法であって、少なくとも1日の期間にわたって安定な濃度範囲の少なくとも1つの増殖因子の存在下で前記幹細胞又は前駆細胞をインキュベートする工程を含む、前記方法。

〔35〕増殖因子の安定な濃度範囲が、機械的手段を用いる増殖因子の持続的放出によって維持される、前記〔34〕に記載の方法。

〔36〕増殖因子の安定な濃度範囲が、持続放出組成物による増殖因子の持続的放出によって維持される、前記〔34〕に記載の方法。

【実施例1】

【0055】

hESCの標準的培養条件下でのFGF2の変動

本実施例は、標準的なhESC培養条件下でFGF2濃度が激しく変動することを示す。

WA-09 hESC (WiCell Research Institute, National Stem Cell Bank, Madison, WI) を、組織培養処理培養皿又はプレートに標準的なマウス胚線維芽細胞(MEF)フィーダー(Global Stem Inc., Rockville, MD)条件又は無MEF(マトリゲル:BD Biosciences, Bedford, MA)条件下で、10ng/mLのFGF2を含む完全培養液、又は10ng/mLのFGF2を含むMEF条件付け培養液(MEF CM)を用いプレートした。完全培養液はDMEM/F12(Invitrogen, Carlsbad, CA)を含み、前記は、L-グルタミン(Invitrogen)、最少必須アミノ酸(Invitrogen)、20%ノックアウト血清代替物(Invitrogen)及び2-メルカプトエタノール(Invitrogen)を含んでいた。MEF CMは同じ完全培養液であるが、使用前に24時間MEFを浸したものである。

標準的なhESC培養技術にしたがい前記培養液は毎日交換された(以下を参照されたい:Fasano et al., 2010)。それぞれの再フィード(培養液交換)の前に、培養液サンプルを収集し、サイトカインビーズキット及びFACSを製造業者のプロトコル(BD Cat# 558327)にしたがって用いてFGF2レベルを定量した。培養5時間後に、MEF及びマトリゲルの両条件で、FGF2レベルは50%より大きく低下し、次の培養液交換までに(24時間後)FGF2レベルは検出不能であった(図1A及び図1B)。これらの結果は、培養でhESCを維持する標準的な方法は、増殖因子の不安定性のために最適に達していないことを示した。

【実施例2】

【0056】

FGF2含有微小球はhESC培養でFGF2レベルを持続させる

組織培養処理培養皿又はプレートのDMEM/F12(Invitrogen, Carlsbad, CA)(L-グルタミン(Invitrogen)、最少必須アミノ酸(Invitrogen)、20%ノックアウト血清代替物(Invitrogen)、2-メルカプトエタノール(Invitrogen)及び10ng/mLのFGF2を含む)を含む標準的hESC培養液中の標準的MEF(Global Stem Inc.)に、WA-09 hESC(WiCell Research Institute)を-1日目にプレートした。生物分解性PLGA微小球は、0.5%FGF2(R&D(商標)Systems)、3%のMg(OH)₂、ヘパリン対FGF2の重量比が1:1のヘパリン及び1mMのEDTAを用いて作製した(“FGF2-微小球”)。

時間経過の間のhESC培養中のFGF2培養を測定するために、プレートしたhESCの培養液を0日目に交換し、10ng/mLのFGF2を含む新しい完全培養液に置き換えた。培養液交換直後に、0日目のFGF2の濃度(開始濃度)を決定するためにサンプルを収集した。培養サンプルを収集したすぐ後に、FGF2含有微小球を1つのグループに添加した(“FGF2-微小球”)。培養液1mLにつき7µLのFGF2-微小球調製物(調製物µLにつき1000微小球)を用いた。6時間後、続いて24時間毎(0日目の培養液交換から算出)に培養液サンプルを収集し、サイ

10

20

30

40

50

トカインビーズキット及びFACSを製造業者のプロトコル (BD Cat# 558327) にしたがって用いて各培養のFGF2レベルを定量した。上記実施例1と一致して、可溶性FGF2培養のFGF2レベルは急速に下降し、培養1日後にはFGF2は検出できなかった。しかしながら、FGF-2微小球培養では、FGF2レベルは安定で、FGF2開始レベルの20%が3日目に減少しただけであった (図2)。これらのデータは、持続放出組成物 (例えばPLGA微小球) を用いて細胞培養で安定な増殖因子レベルを維持でき、それによって幹細胞培養の標準的方法が有する従来の問題 (すなわち急速なFGF2レベルの変動及び下降) に対する解決を提供できることを示している。

【実施例3】

【0057】

FGF2含有PLGA微小球とのhESCの培養

上記実施例1に記載したように標準的なマウス胚線維芽細胞 (MEF) 及び無MEF条件下のD MEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) (L-グルタミン (Invitrogen)、最少必須アミノ酸 (Invitrogen)、20% ノックアウト血清代替物 (Invitrogen)、2-メルカプトエタノール (Invitrogen) 及び10ng/mLのFGF2を含む) を含む標準的hESC培養液に、WA-09 hESCを-1日目にプレートした。5日間の実験中に細胞培養液は交換しなかった。

0.5%の可溶性ヒトFGF2 (R&D Systems)、3%のMg(OH)₂、ヘパリン対FGF2の重量比が1:1のヘパリン及び1mMのEDTAを含む生物分解性PLGA微小球 (“FGF2-微小球”)、又は3%のMg(OH)₂、ヘパリン対FGF2の重量比が1:1のヘパリン及び1mMのEDTAを含むFGF2は含まないコントロール微小球 (“空の微小球”) を0日目 (プレートから24時間後) に細胞培養のいくつかに添加し、続いて前記培養液を10ng/mL FGF2補充完全hESC培養液を用いhESCを含むウェルで直接又はhESCの上方にあるトランスウェルで交換した。培養液1mLにつき7 µLのFGF2-微小球調製物 (調製物 µLにつき1000微小球) を用いた。コントロールグループでは、10ng/mLの可溶性ヒトFGF2を毎日培養に添加した (“可溶性FGF2”)。

5日後、細胞をSSEA-4発現についてFACSにより評価した。FACS染色に用いたSSEA-4抗体は市場 (BD Bioscience) から入手した。期待したように、空の微小球条件下で培養した細胞は、毎日可溶性FGF2を投与した細胞と比較して5日後のSSEA-4発現は低下した (図3)。しかしながら、FGF2微小球とともに培養した細胞はSSEA-4のわずかな増加を示し、これらの細胞は、毎日可溶性FGF2処理を受けたものよりさらに低い自発的分化を経たことを示した (図3)。さらにまた、細胞の未分化形態が、可溶性FGF2又はFGF2微小球で処理した細胞で観察され、分化形態は陰性コントロール (空の微小球) で観察された。

FACS解析に加えて、OCT-4 (未分化hESCマーカー) 並びに分化マーカーブランチュリー及びSox17のmRNAの発現レベルを定量的RT-PCRによって決定した。実証済みのTaqManプローブ (Applied BioSystemsTM, Foster City, CA) を用いて遺伝子発現を評価した。培養では、典型的には標準的幹細胞培養方法 (すなわち可溶性FGF2の毎日の添加) により、hESCは低レベルの自発的分化を経る。驚くべきことに、毎日の可溶性FGF2処理と比較して、PLGA微小球によって提供される安定な濃度範囲のFGF2の存在下で培養されたhESCは極めて少ない偶発的分化を示した。前記は、ブランチュリー及びSox17のmRNA発現レベルの低下並びにOCT-4のmRNAの高い発現レベルによって示された (図4)。同様な結果は、FGF2微小球をhESCの上方のトランスウェルに置いたときに観察され、微小球と幹細胞との直接接触は要求されないことを示した。OCT-4、ブランチュリー及びSox17のmRNA発現解析結果は形態学的な培養均質性と一致した。

したがって、本実施例で用いた培養方法は、hESC培養において安定なFGF2濃度範囲の維持及びhESCの自発的分化の驚くべき低下をもたらした (自発的分化は標準的培養方法 (すなわち、培養液に可溶性FGF2を毎日直接添加する) に付随する問題である)。本実施例に記載した方法は、培養hESCの有用性を高め、さらにそれらを増殖させるために要求される労力を顕著に緩和するという利点を提供する。

【実施例4】

【0058】

長期hESC培養におけるFGF2の持続放出

上記実施例1に記載したように、WA-09 hESCを標準的MEF上にプレートし、10ng/mLのFGF2を含む完全hESC培養液で培養した。生物分解性PLGA微小球は、0.5% FGF2 (R&D (商標) Systems)、3%のMg(OH)₂、ヘパリン対FGF2の重量比が1:1のヘパリン及び1mMのEDTAを用いて作製した(“FGF2-微小球”)。培養液1mLにつき7μLのFGF2-微小球調製物(調製物μLにつき1000微小球)を用いた。細胞に10ng/mLの可溶性FGF2を毎日、3日目毎又は1回フィードするか、又は細胞にFGF2微小球を3日目毎又は1回フィードした。7日後に、hESCを標準的方法にしたがって継代し(Fasano et al., 2010、上掲書)、いくつかの細胞をFACSで解析して、全能性のマーカーSSEA-4及びSSEA-3並びに分化マーカーSSEA-1の発現を評価した。細胞を7日毎に5週間継代した。35日後に、SSEA-1、SSEA-3及びSSEA-4について陽性に染色される細胞のパーセンテージを各グループで決定した。発現データは、FGF2微小球を1回又は3日目毎にフィードした細胞について類似していた。FGF2微小球をフィードされた細胞は、全能性マーカーSSEA-3及びSSEA-4の高い発現及び分化マーカーSSEA-1の低い発現を維持し、細胞が長期培養において未分化状態で維持されたことを示した(図5A)。

前記に加えて、14日目及び21日目に、RNAを培養細胞から単離し、全能性マーカーNANOGのmRNA発現をqRT-PCRによって定量した。驚くべきことに、可溶性FGF2を毎日フィードした細胞と比較して、両時点でNANOGのより高い発現がFGF2微小球で培養した全ての細胞グループで認められた。したがって、これらの結果は、FGF2微小球の存在下で長期培養した細胞は、一定の全能性マーカーの発現を、さらにいくつかのアッセイでは標準的培養方法を用いて培養した細胞よりも高い全能性マーカーの発現レベルを有することを示した(図5B)。持続放出組成物(例えばFGF2微小球)によって提供される安定なFGF2レベルは、したがって培養へのフィード回数を最小限にし、さらにより未分化状態でhESCを維持できる。

【実施例5】

【0059】

持続されるFGF2濃度範囲は、フィーダー細胞又は条件付けフィーダー培養液の非存在下でhESCをより未分化の状態で維持する

hESCをMEFフィーダーの非存在下で、MEF条件付けhESC培養液のみの存在下で、又は非常に高レベルのFGF2を含む高価な“特別”培養液で増殖させることができる。本実施例では、FGF2微小球によって提供される持続的FGF2レベルは、MEFフィーダー、MEF条件付けhESC培養液又は特別培養液の非存在下でのhESCの培養に十分であるか否かを決定した。WA-09 hESCを実施例1に記載したようにhESC培養液中のマトリゲル上で増殖させた。0.5%のFGF2、3%のMg(OH)₂、ヘパリン対FGF2の重量比が1:1のヘパリン及び1mMのEDTAを含むPLGA微小球(“FGF2微小球”)をいくつかの細胞培養ウェルに添加し、持続的FGF2レベルを提供した。培養液1mLにつき7μLのFGF2-微小球調製物(調製物μLにつき1000微小球)を用いた。コントロールグループ(“標準的方法”を用いて処理)では、培養液の交換時に新しい培養液に10ng/mLの可溶性ヒトFGF2を毎日添加した。他のグループでは、FGF2微小球を1週間に1回又は2回培養液に添加した。

細胞を5日間増殖させ、続いて全能性マーカーOCT-4及び分化マーカーSOX17のmRNA発現レベルを定量的RT-PCRによって決定した。FGF2微小球の存在下で培養した細胞は、可溶性FGF2で毎日処理した細胞よりも高いOCT-4レベルを発現した(図6)。驚くべきことに、FGF2微小球の存在下で培養した全てのグループで、分化マーカーSOX17のmRNA発現は検出不能であった(図6)。これらのデータは、持続放出組成物(例えばFGF2微小球)によって提供される安定で持続的なFGF2レベルは、上記に記載したMEFフィーダー、MEFフィーダー条件付け培養液又は特別培養液の非存在下で、hESCをより未分化な状態で維持できることを示している。

【実施例6】

【0060】

持続的FGF2レベルは分化したhESC培養の全能性を改善した

FGF2を含まない培養液で培養すると、hESCはゆっくりと分化し始め、徐々に全能性が低下していく。本実施例では、持続的FGF2レベルは分化可能に置かれたhESCの全能性を回復

させ、hESCの培養物をより均質に全能性にするか否かを試験した。

プレート時に実施例1に記載した10ng/mLのFGF2を含む完全培養液をhESCにフィードし、続いてFGF2を毎日（“FGF2毎日”）フィードするか又は再度のフィーディングを実施せず（“FGF2無し”）、さらに7日間培養を続けた。7日目に、標準的方法にしたがって（上掲書（Fasano et al., 2010）参照）細胞を継代し、いくつかの細胞を全能性マーカーSSEA-3及びSSEA-4のタンパク質発現について評価した。FACS解析によって決定したSSEA-3及びSSEA-4の両発現は、毎日FGF2をフィードした細胞（“FGF2毎日”）の当該マーカーの発現と比較して毎日FGF2を投与されなかった細胞（“FGF2無し”グループ）で低下することが判明した（図7A）。

この時点で、両グループの細胞を再プレーティングし、通常のFGF2含有完全培養液又はFGF2微小球を含む完全培養液（0.5%FGF2、3%のMg(OH)₂、ヘパリン対FGF2の重量比が1：1のヘパリン及び1mMのEDTAを含む）を前記培養に添加した。培養液1mLにつき7μLのFGF2-微小球調製物（調製物μLにつき1000微小球）を用いた。10ng/mLのFGF2を毎日（“毎日”条件）又はFGF2微小球を1回（0日目）又は2回（0日目及び2日目）（それぞれ“ビーズ1回”又は“ビーズ週2回”条件）細胞にフィードした。再プレーティングに続いてさらに7日間培養した後、SSEA3の発現レベルをもう一度決定した。SSEA-3発現レベルは、毎日可溶性FGF2をフィードした細胞（“毎日”条件）と比較して、FGF2微小球の存在下で培養した全てのグループ（“ビーズ1回”又は“ビーズ週2回”条件）で高かった。“FGF2無し”のグループでは、再プレーティングに続く可溶性FGF2の毎日のフィードは、SSEA-3をコントロールレベルへ回復させなかったが（すなわち、さらに7日間の培養中に可溶性FGF2を毎日フィードした“FGF2毎日”グループのSSEA3⁺細胞のパーセンテージ）、FGF2微小球を1回フィードした細胞グループで、全能性は部分的にレスキューされ、1週間に2回FGF2微小球をフィードしたグループでは、分化細胞の全能性（SSEA-3の発現）はコントロールレベルと比較してほぼ完全にレスキューされた（図7B）。

【実施例7】

【0061】

NSCのFGF2 PLGA微小球との培養

マウスNSCは胚の脳皮質から単離して培養し、以前に記載されたように（Qian et al, 1997（上掲書））又は前記プロトコルに下記に記載する改変を加えて維持した。簡単に記せば、いくつかのウェルで、10ng/mLのFGF2を補充した基本培養液中で細胞をプレートし、培養液を3日目毎に交換した。前記は“標準的条件”であった。他のウェルでは、空の微小球単独の存在下で可溶性FGF2を含まない基礎培養液中でNSCを培養し（実施例3のように“FGF2無し”）、微小球単独は有糸分裂誘発性ではないことを示した。他のウェルでは、可溶性FGF2を含まない基礎培養液中の細胞を、PLGA微小球（0.5%FGF2、3%のMg(OH)₂、ヘパリン対FGF2の重量比が1：1のヘパリン及び1mMのEDTAを含む）の存在下で培養し、それ以上のものはこれらのウェルの培養中に一切添加されなかった（培養液は交換されず、微小球の添加後培養には何も添加されなかった）。

7日間の処理に続いて、標準的技術を用いて細胞をネスチン（DSHB）及びβ-チューブリン（Sigma-Aldrich）特異的抗体で染色した（以下を参照されたい：Fasano et al., 2007（上掲書）；及びFasano et al., 2009, Genes Dev. (2009) Mar 1, 23(5):561-74）。標準的条件では、期待したように細胞クローンはNSC及びNPC並びにニューロン（分化細胞）の混合物とともに生じた（前記はネスチンの陽性染色（NSC及びNPC）又はβ-チューブリン陽性染色（ニューロン（分化細胞））によって示された）。具体的には、3日目毎に可溶性FGF2をフィードした細胞は、380のNSC及びNPC（ネスチン+）及び170のニューロン（β-チューブリン+）を含む混合クローンを生じた（図8）。空の微小球を含むウェルは細胞総数が減少し、ネスチン染色がほとんどなくNSC及びNPCが失われ極めて低い生存率を示した（図8）。対照的に、FGF2含有微小球（“FGF2微小球”）を直接添加したウェルはより多くのクローンの増殖を示し、ネスチン+細胞の数は劇的に増加してより良好なNSC及びNPC増殖を示した。具体的には、FGF2含有微小球によるある処理は、細胞数とともにNSC及びNPCの割合を増加させた（1440（ネスチン+）：120ニューロン（β-チューブリン））（図

8)。

【0062】

標準的（すなわち通常の）幹細胞培養方法を用いるとき、ゆっくりと一定に進行するNSCの分化はそれら細胞の有用性を制限する。しかしながら、本明細書に記載した発見された新規な方法（PLGA微小球を用いて安定したFGF2濃度範囲が幹細胞培養物中で長時間維持された）は、培養NSCの自発的分化の驚くべき低下をもたらし、それによってこれら細胞の有用性を高め、さらにそれらを増殖させるために要求される労力を顕著に軽減した。ある実験では、さらに別のウェルの細胞を標準的条件下で培養し空の微小球を追加して、微小球が細胞に何らかの毒性を与えるか否かを決定した。標準条件下で培養した細胞への空微小球の添加は、標準的条件と比較して細胞に影響を与えなかった（すなわち有害ではな

10

【実施例8】

【0063】

NSCへのFGF2の頻繁投与

本実施例では、NSCに10ng/mLの可溶性ヒトFGF2を8時間毎にフィードし、6日間にわたってFGF2の定常的供給を達成した。NSC及びNPCは、細胞対細胞の相互作用によって幹細胞又は前駆細胞の一生を維持する（すなわち未分化状態で存続する）。細胞対細胞接触の消失は分化応答を開始させる。したがって、より堅固なコロニーはより分化度の低いNSC及びNPCの指標である。6日間のNSCへの頻繁なフィーディング（8時間毎）の後、NSCは、未分化細胞の指標であるより堅固な外観を有する細胞を含んでいた。前記NSC培養はまたより強いネスチン染色を示し、Tuj1染色によって測定したとき標準方法（FGF2を3日目毎にフィード）と比較してより低い分化度を示した（図9）。このデータは、定常的なFGF2供給（例えば頻繁なフィーディング）は、標準的プロトコルよりも低い分化状態でNSC培養を維持できることを明らかにした。

20

【実施例9】

【0064】

持続レベルのFGF2の存在下でのヒトRPESCの培養

本実施例は、ヒト網膜色素上皮幹細胞（RPESC）を培養で増殖させるために持続レベルのFGF2を使用することを示す。RPESCは以下のように単離した。

30

精密切り分け

22歳から99歳のドナーに由来するヒトの眼を施設（Eye-Bank for Sight Restoration, Inc., New York, NY；及びNational Disease Research Interchange (NDRI), Philadelphia, PA）から入手した。眼を鋸状縁で切開し、後方部分を廃棄した。RPE層を露出させたまま硝子体及び網膜を取り出した。RPEの精密切り分け及び単一細胞分離は以前に記載されたように実施した（以下を参照されたい：米国特許公開公報2009/0274667号（Temple）；Burke, C. M. et al., 1996, Exp Eye Res 62, 63；及びMaminishkis, A. et al., 2006, Invest Ophthalmol Vis Sci 47, 3612）。洗眼用カップ内でブルー膜が維持されるように慎重にすり潰して、杆状体外側部分、血液又は他の細胞タイプによる夾雑が最小限のRPE細胞懸濁物を得た。

40

RPEシートの精密切り分け及びコップルストーン培養

上記のように硝子体及び網膜を分離した後、洗眼用カップを無菌的PBSで洗浄し、続いて無酵素ハンクス系細胞分離緩衝液（Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA）とともに37℃で10分間インキュベートした。静かに分離緩衝液を除去し、このカップに20%のPBS（Gibco-Invitrogen）を補充したDMEM/F12培養液を満たした。鈍端を有し急角度の二重刃スプレンブレード（3.0mm）を用いて穏やかにこすり落とすことによって、RPEの小シート（1mm²）をブルー膜から取り出した。マトリゲル（BD Biosciences）前処理組織培養プレートにRPEを静置し、RPE培養液で培養した。REE培養液：MEM- α 改変培養液（Sigma-Aldrich）、2mM L-グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン（1：100）、1%ビルビン酸ナトリ

50

ウム、10%のFBS（ウシ胎児血清）；記載（De, S. et al. Arch Ophthalmol. 2007, May, 125(5):641-5；Burke et al., 1996, 上掲書；及びMaminishkis, A. et al., 2006, 上掲書）にしたがってTHT（タウリンヒドロコチゾン、トリヨード-サイロニン）及びN1（Sigma-Aldrich）が補充され、さらに10ng/mLのFGF2及び1ng/mLのEGF（Gibco-Invitrogen）が含まれる。

培養

MEM- α 改変培養液（Sigma-Aldrich）、2mM L-グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン（1：100）、1%ピルビン酸ナトリウム、10%のFBS（ウシ胎児血清）を含み、THT（タウリンヒドロコチゾン、トリヨード-サイロニン）及びN1（Sigma-Aldrich）が補充され、さらに培養液1mL当たり約7 μ LのFGF2含有PLGA微小球（0.5% FGF2、3%のMg(OH)₂、ヘパリン対FGF2の重量比が1：1のヘパリン及び1mMのEDTAを含む）が補充された規定の増殖培養液を用いて、RPESCを5日間増殖させた。細胞は、米国特許出願公開公報2009/0274667（Temple et al.）に詳細に記載された方法にしたがって増殖させた。5日後、細胞の写真を撮影した。細胞は、可溶性FGF2を含む培養液と比較して正常な形態及び増殖パターンを示した（図10）。

10

【実施例 10】

【0065】

FGF2存在下でのiPSCの作製

本実施例は、人工多能性幹細胞（iPSC）の作製のためにFGF2持続レベルを使用することを示す。タカハシら（Takahashi, K. et al. (2007); Cell 131, 861-872. 10）の記載した方法にしたがって、成人線維芽細胞をOCT4、KLF4、c-MYC及びSOX2を含むレトロウイルス上清で感染させた。感染10日後に、細胞をトリプシン処理して計数し、10⁵細胞をDMEM + 10%FBS中のMEF上にプレートした。その次の日に、培養液を標準的hESC培養液（DMEM/F12, Invitrogen, Carlsbad, CA）（L-グルタミン（Invitrogen）、最少必須アミノ酸（Invitrogen）、20%ノックアウト血清代替物（Invitrogen）及び2-メルカプトエタノール（Invitrogen）を含む）+4ng/ml FGF2（“可溶性FGF2”グループ）、又はhESC培養液+FGF2含有PLGA微小球（0.5% FGF2、3%のMg(OH)₂、ヘパリン対FGF2の重量比が1：1のヘパリン及び1mMのEDTAを含む）（“FGF2-微小球”グループ）で交換した。可溶性FGF2グループでは、培養液は毎日交換し、一方、FGF2含有PLGA微小球を含む培養液は1週間に2回交換した（培養液交換時に培養に添加される新しい培養液はFGF2微小球を含んでいた）。写真は細胞をプレートしてから9日後に撮影された。可溶性FGF2を毎日フィードする条件では、細胞は区別し得るコロニーサイズ又はコロニー形成を示さなかった（図11、左パネル）。対照的に、FGF2微小球の存在下で培養した細胞は、ヒト胚性幹細胞コロニーの特徴を示すコロニーを生じ（図11、右パネル）、持続レベルのFGF2の存在下でのiPSCの培養はiPSC生成効率を増加させることを論証した。

20

30

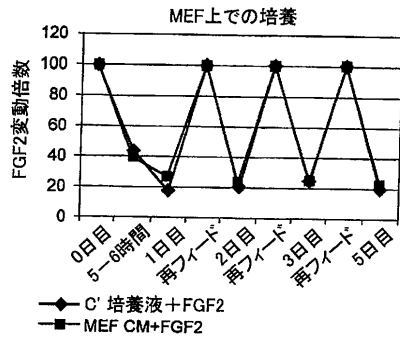
【0066】

本発明は本明細書に記載した特定の実施態様によって範囲を限定されるべきではない。実際、本明細書に記載した実施態様以外に本発明の多様な改変が、前述の記載から当業者には明白となろう。そのような改変は添付の特許請求の範囲内に包含されよう。

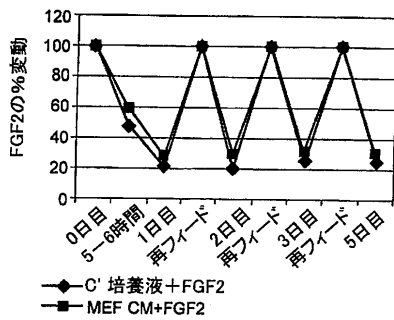
本明細書に引用した全ての特許、刊行物、試験方法、文献及び他の資料は、実際に本明細書に存在するかのようになり、及びその各々が個々に参照によって取り込まれたかのように、参照によりその全体が本明細書に含まれる。しかしながら、そのような資料のいかなる引用も（本発明の背景技術を考察する場合でさえも）、前記資料が、本発明にとって従来技術として利用可能であったこと、または利用可能であることの容認と解されるべきではない。

40

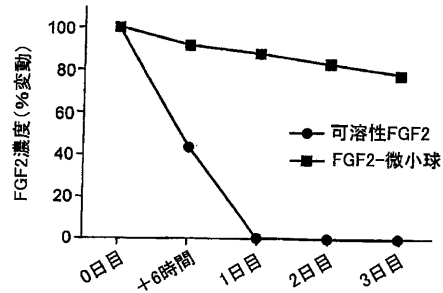
【図 1 A】



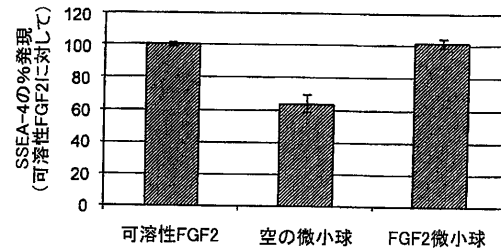
【図 1 B】



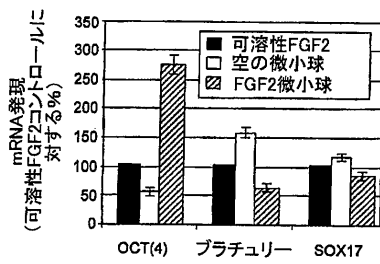
【図 2】



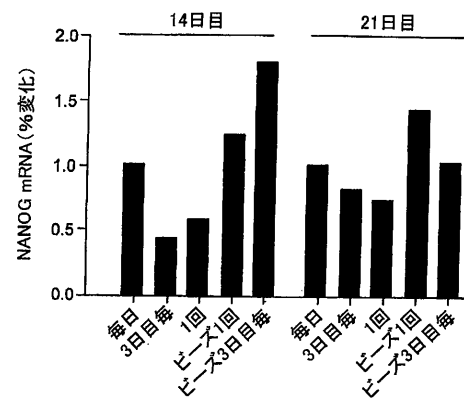
【図 3】



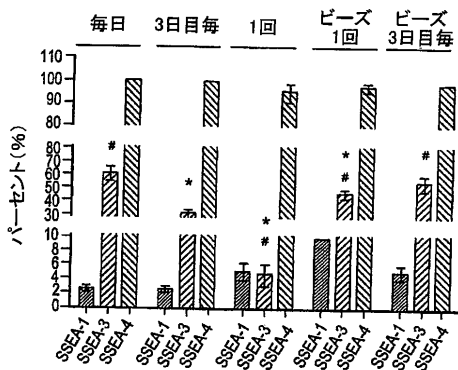
【図 4】



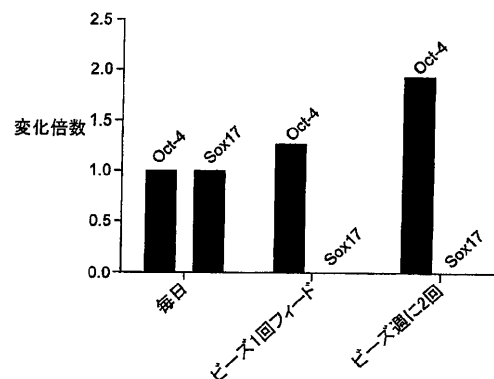
【図 5 B】



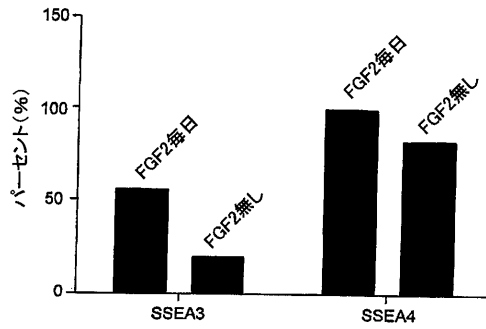
【図 5 A】



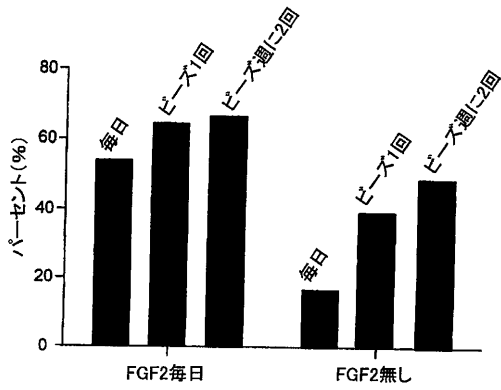
【図 6】



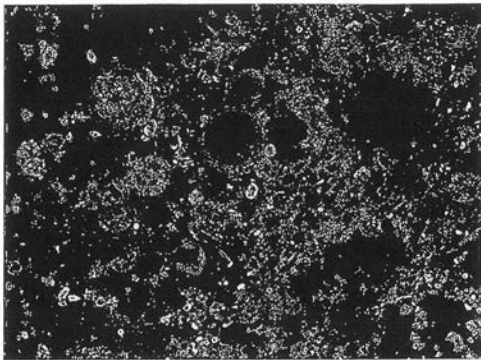
【図 7 A】



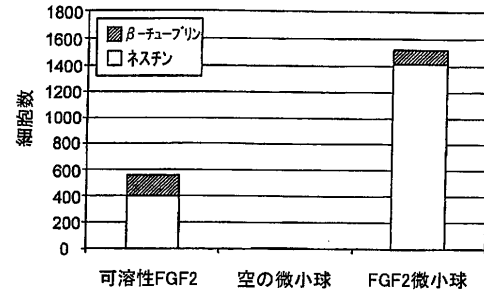
【図 7 B】



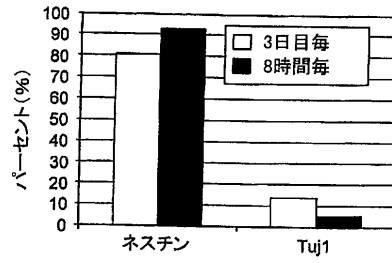
【図 10】



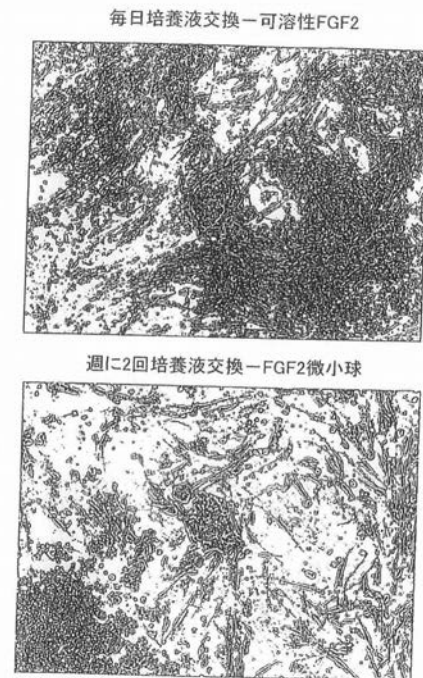
【図 8】



【図 9】



【図 11】



【配列表】

2020005654000001.app

【手続補正書】

【提出日】 令和1年10月15日 (2019.10.15)

【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】

哺乳動物の幹細胞又は前駆細胞を培養して未分化状態で維持する方法であって、

(a) 幹細胞又は前駆細胞の培養物に、少なくとも1つの増殖因子を含むポリ(DL-ラクチドコグリコリド) (PLGA) 微小球を含み、前記増殖因子の濃度を、前記増殖因子を含む培養液の交換直後、及び微小球添加前の濃度 (開始濃度) の約80% - 100% 濃度で少なくとも1日の期間維持されるように前記増殖因子を前記培養物に放出する持続放出組成物を添加する工程、および、

(b) 前記細胞が未分化状態で維持されるように、前記持続放出組成物を添加する工程を繰り返す工程、
を含む前記方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N 15/12

(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信

(74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 スターン ジェフリー
アメリカ合衆国 1 2 1 5 9 ニューヨーク州 スリンガーランズ キャロル プレイス 1 4

(72)発明者 スターン サリー テンプル
アメリカ合衆国 1 2 1 5 9 ニューヨーク州 スリンガーランズ キャロル プレイス 1 4

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA93X AB01 BA02 BB19 BB40 BD39 BD40 BD50 CA44
CA60