

【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25年7月18日(2013.7.18)

【公表番号】特表2012-527902(P2012-527902A)

【公表日】平成24年11月12日(2012.11.12)

【年通号数】公開・登録公報2012-047

【出願番号】特願2012-513250(P2012-513250)

【国際特許分類】

C 1 2 M 3/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

【F I】

C 1 2 M 3/00 A

C 1 2 N 5/00 2 0 2 C

【手続補正書】

【提出日】平成25年5月27日(2013.5.27)

【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】

細胞培養のためのマイクロキャリアであって、

(i) ヒドロキシル基を有する親水性(メタ)アクリレートモノマーまたはヒドロキシル基を有する親水性(メタ)アクリルアミドモノマーから選択されるヒドロキシル基を有する非荷電性の親水性不飽和モノマー、

(ii) アクリル酸2-カルボキシエチルを含む親水性のカルボン酸含有不飽和モノマー、および

(iii) 親水性の多官能性(メタ)アクリレートモノマーまたは親水性の多官能性(メタ)アクリルアミドモノマーから選択される第1の親水性の多官能性不飽和モノマーを含む、モノマーの混合物の共重合から形成されたポリマー性マイクロキャリアベースと

、前記マイクロキャリアベースに共役したRGD配列を含むポリペプチドとを備え、

前記マイクロキャリアベースが75%を超える平衡含水率を有する、マイクロキャリア。

【請求項2】

前記モノマーの混合物が、

(i) 30~70重量部の、前記ヒドロキシル基を有する非荷電性の親水性不飽和モノマー；

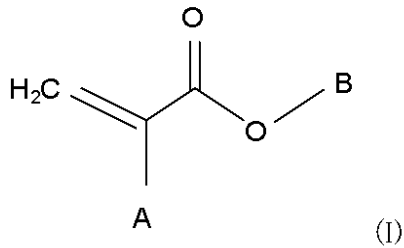
(ii) 20~60重量部の、前記親水性のカルボン酸含有不飽和モノマー；および

(iii) 1~15重量部の、前記第1の親水性の多官能性不飽和モノマーを含むことを特徴とする請求項1記載のマイクロキャリア。

【請求項3】

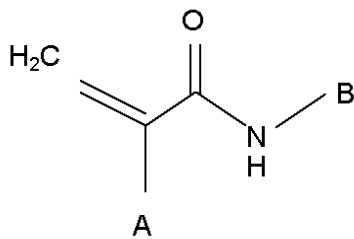
前記ヒドロキシル基を有する非荷電性の親水性不飽和モノマーが、式(I)または式(II)に従ったモノマーであることを特徴とする請求項1または2記載のマイクロキャリア：

## 【化 1】



ここで、AはHまたはメチルであり、Bは、C 1 - C 6 の直鎖または分岐鎖アルコールまたはエーテルであるか；あるいは

## 【化 2】



ここで、AはHまたはメチルであり、Bは、C 1 - C 6 の直鎖または分岐鎖アルコールまたはエーテルである。

## 【請求項 4】

前記ヒドロキシル基を有する非荷電性の親水性不飽和モノマーが、メタクリル酸ヒドロキシプロピル、メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル、アクリル酸 2 - ヒドロキシエチル、メタクリル酸グリセロール、アクリル酸ヒドロキシプロピル、アクリル酸 4 - ヒドロキシブチル、N - (ヒドロキシメチル)アクリルアミド、N - [トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アクリルアミド、3 - アクリロイルアミノ - 1 - プロパノール、N - アクリルアミド - エトキシエタノール、および N - ヒドロキシエチルアクリルアミドからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 または 2 記載のマイクロキャリア。

## 【請求項 5】

前記第 1 の親水性の多官能性不飽和モノマーが、N, N' - メチレンビスアクリルアミド、N, N' - (1, 2 - ジヒドロキシエチレン)ビスアクリルアミド、ポリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリグリセロールジアクリレート、プロピレングリコールグリセレートジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、およびグリセリン 1, 3 - ジグリセレートジアクリレートからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 いずれか 1 項記載のマイクロキャリア。

## 【請求項 6】

前記モノマーの混合物が、多官能性の不飽和(メタ)アクリレートモノマーまたは多官能性の不飽和(メタ)アクリルアミドモノマーから選択される第 2 の多官能性の不飽和モノマーをさらに含むことを特徴とする請求項 1 記載のマイクロキャリア。

## 【請求項 7】

前記第 2 の多官能性の不飽和モノマーが、テトラ(エチレングリコール)ジメタクリレートであることを特徴とする請求項 6 記載のマイクロキャリア。

## 【請求項 8】

前記マイクロキャリアが、マイクロキャリアベース 1 ミリグラムあたり 100 nmol を超える共役ポリペプチドを有することを特徴とする請求項 1 記載のマイクロキャリア。

## 【請求項 9】

ヒト胚幹細胞を培養する方法であって、

前記細胞を、請求項 1 ~ 8 いずれか 1 項記載のマイクロキャリアを有する細胞培養培地

と接触させ；

前記細胞を、前記培地中で培養する、  
各工程を有してなる方法。

【請求項 10】

前記マイクロキャリアベースが、メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル、2 - カルボキシエチルメタクリレート、および ( i ) メチレンビスアクリルアミドまたは ( i i ) ジヒドロキシエチレンビスアクリルアミドを含むモノマーの混合物から形成され、

前記モノマーの混合物が、

( i ) 30 ~ 70 重量部の前記メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル；

( i i ) 20 ~ 60 重量部の前記 2 - カルボキシエチルメタクリレート；および

( i i i ) 1 ~ 15 重量部のメチレンビスアクリルアミドまたはジヒドロキシエチレンビスアクリルアミド

を含むことを特徴とする請求項 9 記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0104

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0104】

ここで、A は水素またはメチルであり、D は、カルボキシル基 ( - C O O H ) で置換された C 1 - C 6 の直鎖または分岐鎖アルキルである。第 7 の態様では、親水性のカルボン酸含有不飽和モノマーが、2 - カルボキシエチルメタクリレート、アクリル酸 2 - カルボキシエチル、アクリル酸、メタクリル酸、2 - カルボキシエチルアクリルアミド、およびアクリルアミドグリコール酸からなる群より選択される、態様 1 ~ 5 のいずれかに従ったマイクロキャリアが提供される。第 8 の態様では、親水性のカルボン酸含有不飽和モノマーが 2 - カルボキシエチルメタクリレートである、態様 1 ~ 5 のいずれかに従ったマイクロキャリアが提供される。第 9 の態様では、第 1 の親水性の多官能性不飽和モノマーが、N , N ' - メチレンビスアクリルアミド、N , N ' - ( 1 , 2 - ジヒドロキシエチレン ) ビスアクリルアミド、ポリエチレングリコールジ ( メタ ) アクリレート、トリグリセロールジアクリレート、プロピレングリコールグリセロールジアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレートトリアクリレート、およびグリセリン 1 , 3 - ジグリセロールジアクリレートからなる群より選択される、態様 1 ~ 8 のいずれかに従ったマイクロキャリアが提供される。第 10 の態様では、第 1 の親水性の多官能性不飽和モノマーが、メチレンビスアクリルアミドおよびジヒドロキシエチレンビスアクリルアミドからなる群より選択される、態様 1 ~ 8 のいずれかに従ったマイクロキャリアが提供される。第 11 の態様では、モノマーの混合物が、多官能性の不飽和 ( メタ ) アクリレートモノマーまたは多官能性の不飽和 ( メタ ) アクリルアミドモノマーからなる群より選択される第 2 の多官能性の不飽和モノマーをさらに含む、態様 1 ~ 10 のいずれかに従ったマイクロキャリアが提供される。第 12 の態様では、第 2 の多官能性の不飽和モノマーが、第 1 の親水性の多官能性不飽和モノマーよりも親水性に乏しい、態様 11 に従ったマイクロキャリアが提供される。第 13 の態様では、第 2 の多官能性の不飽和モノマーがテトラ ( エチレングリコール ) ジメタクリレートである、態様 11 または請求項 12 に従ったマイクロキャリアが提供される。第 14 の態様では、第 1 の親水性の多官能性不飽和モノマーと第 2 の多官能性の不飽和モノマーを合わせて、モノマーの混合物の 15 重量部を超えない、態様 11 ~ 13 のいずれかに従ったマイクロキャリアが提供される。第 15 の態様では、ポリペプチドが R G D 含有ポリペプチドである、態様 1 ~ 14 のいずれかに従ったマイクロキャリアが提供される。第 16 の態様では、ポリペプチドが、B S P ポリペプチド、ピトロネクチンポリペプチド、フィブロネクチンポリペプチド、およびコラーゲンポリペプチドからなる群より選択される、態様 1 ~ 14 のいずれかに従ったマイクロキャリアが提供される。第 17 の態様では、マイクロキャリアがマイクロキャリアベース 1 ミリグラムあたり 10

0 nmol を超える共役ポリペプチドを有する、態様 1 ~ 16 のいずれかに従ったマイクロキャリアが提供される。第 18 の態様では、マイクロキャリアベースがモノリス型である、態様 1 ~ 17 のいずれかに従ったマイクロキャリアが提供される。第 19 の態様では、ヒト胚幹細胞を培養する方法であって、前記細胞を、請求項 1 ~ 18 のいずれかに従ったマイクロキャリアを有する細胞培養培地と接触させ；前記細胞を前記培地中で培養する、各工程を有してなる方法が提供される。第 20 の態様では、マイクロキャリアベースが、メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル、2 - カルボキシエチルメタクリレート、および ( i ) メチレンビスアクリルアミドまたは ( i i ) ジヒドロキシエチレンビスアクリルアミドを含むモノマーの混合物から形成され、前記モノマーの混合物が、( i ) 30 ~ 70 重量部のメタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル；( i i ) 20 ~ 60 重量部の 2 - カルボキシエチルメタクリレート；および ( i i i ) 1 ~ 15 重量部のメチレンビスアクリルアミドまたはジヒドロキシエチレンビスアクリルアミドを含み、前記ポリペプチドが RGD 含有ポリペプチドである、態様 19 に従った方法が提供される。第 21 の態様では、前記ポリペプチドがビトロネクチンポリペプチドである、態様 20 に従った方法が提供される。第 22 の態様では、前記モノマーの混合物が、テトラ (エチレングリコール) ジメタクリレートをさらに含み、前記テトラ (エチレングリコール) ジメタクリレートと前記メチレンビスアクリルアミドの組合せまたは前記テトラ (エチレングリコール) ジメタクリレートと前記ジヒドロキシエチレンビスアクリルアミドとの組合せがモノマーの混合物の 15 重量部を超えない、態様 20 または 21 に従った方法が提供される。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0133

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0133】

実施例 14：マイクロキャリアの調製 (  $\mu$ HG14 )

200 g の乾燥トルエンおよび 15 g の SPAN 85 乳化剤を、温度の自動調節器つきの覆いおよび下部ドレイン、滴下漏斗、アンカースターラーおよび不活性ガスのバブリングチューブを備えた 500 ミリリットルの反応器に入れた。反応器の温度を 40 に設定し、混合物を、アルゴンバブリング下、少なくとも 15 分間、330 rpm で攪拌した。次に、10 ミリリットルの脱イオン水、3.1 g のメタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル、5.0 g のアクリル酸 2 - カルボキシエチル、0.8 g のグリセリン 1,3 - ジグリセレートジアクリレートを含み均質な混合物を調製した。pH を、約 4.46 g の 10 M 水酸化ナトリウムを滴下して加えることによって、pH 8 ~ 9 に調整した。次に、0.63 g の過硫酸アンモニウムを、透明かつ均質な溶液が得られるまで、この水溶液に溶解した。次いで、この溶液を乾燥アルゴンで 1 分間バブリングし、40 で、滴下漏斗を用いて、攪拌したトルエン / SPAN 85 混合物にて気化して加えた。15 分間の混合後、150 マイクロリットルのテトラメチルエチレンジアミンを攪拌エマルジョンに素早く加えた。3 時間の反応後、温度を 20 まで冷却し、マイクロキャリアを、反応器の下部ドレインを使用して反応器から回収した。界面活性剤および未反応の材料を除去するために、得られたマイクロキャリアをアセトンで十分に洗浄した。ビーズを水中で 2 時間膨潤させ、100、200 および 400  $\mu$ m のナイロンメッシュの篩を用いて湿式篩にかけた。風乾後、200 ~ 400  $\mu$ m の大きさを有する、篩にかけたマイクロキャリアを、実施例 13 から得たプロトコルに従ったペプチド共役に用いた。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0153

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0153】

表 1 に提示される数字は、g 単位で用いられるモノマーの量を表している；H E M A = 2 - メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル；C E A = アクリル酸 2 - カルボキシエチル；M B A = メチレンビスアクリルアミド；T E G D M A = テトラ（エチレングリコール）ジメタクリレート；G D G D A = グリセリン 1 , 3 - ジグリセロレートジアクリレート。