

【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】令和3年7月26日(2021.7.26)

【公表番号】特表2020-505038(P2020-505038A)

【公表日】令和2年2月20日(2020.2.20)

【年通号数】公開・登録公報2020-007

【出願番号】特願2019-539835(P2019-539835)

【国際特許分類】

C 12 N 5/0735 (2010.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

C 12 N 5/074 (2010.01)

【F I】

C 12 N 5/0735

C 12 N 5/10

C 12 N 5/074

【手続補正書】

【提出日】令和3年5月25日(2021.5.25)

【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】

担体の存在下で1種または複数種の脂質を含む、培地においてクローン密度でプレーティングされた1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞をクローニングするための、哺乳動物多能性幹細胞培養培地に添加されるクローニング補充物であって、

前記1種または複数種の脂質はオレイン酸および/またはパルミチン酸を含み、

前記オレイン酸の量は、それが存在する場合、リノレン酸およびアラキドン酸の量より多い、かつ、前記パルミチン酸の量は、それが存在する場合、リノレン酸およびアラキドン酸の量より多い、および

前記哺乳動物多能性幹細胞のクローニング効率が補充物の存在下で高められる、
前記クローニング補充物。

【請求項2】

ミード酸、アラキジン酸、パルミトレン酸、ミリスチン酸、ミリストレン酸、リノール酸、ステアリン酸、リノレン酸、アラキドン酸、コレステロール、DL- -トコフェリル、およびKolliphor P188の1種または複数種をさらに含む、請求項1記載のクローニング補充物。

【請求項3】

前記1種または複数種の脂質がオレイン酸およびパルミチン酸の両方を含む、請求項1または2記載のクローニング補充物。

【請求項4】

クローニング効率が5% ~ 65%である、請求項1~3のいずれか一項記載のクローニング補充物。

【請求項5】

前記多能性幹細胞がES細胞またはiPS細胞である、請求項1記載のクローニング補充物。

【請求項6】

前記担体が、前記1種または複数種の脂質を前記1つまたは複数の哺乳動物幹細胞に輸送

するための作用物質である、請求項1～5のいずれか一項記載のクローニング補充物。

【請求項7】

前記担体がアルブミン、リポソーム、細胞外小胞、エキソソーム、ナノ構造脂質担体、またはシクロデキストリンである、請求項1～6のいずれか一項記載のクローニング補充物。

【請求項8】

前記アルブミンがヒトのものである、請求項7記載のクローニング補充物。

【請求項9】

前記アルブミンが組換え型のものである、請求項7または8記載のクローニング補充物。

【請求項10】

前記1種または複数種の脂質の少なくともいくつかが前記担体に結合している、請求項1～9のいずれか一項記載のクローニング補充物。

【請求項11】

前記1種または複数種の脂質の濃度が1ng/mL～35 μg/mLの範囲である、請求項1～10のいずれか一項記載のクローニング補充物。

【請求項12】

請求項1～11のいずれか一項記載のクローニング補充物、および、1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞の生存を促進する1種または複数種の分子または化合物を含む、クローニング密度でプレーティングされた1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞の生存または増殖を高めるための培養培地。

【請求項13】

前記1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞の生存を促進する1種または複数種の分子または化合物が1種または複数種の小分子阻害剤である、請求項12記載の培養培地。

【請求項14】

前記1種または複数種の小分子阻害剤が、チアゾビピン、Y-27632、CHIR99021、S8202190、MI-7、ネクロスタチン-1、NS3694、Wnt-C59、NSCI、またはBIPV5を含む、請求項13記載の培養培地。

【請求項15】

前記1種または複数種の小分子阻害剤がRho/Rock経路阻害剤を含む、請求項13または14記載の培養培地。

【請求項16】

前記Rho/Rock経路阻害剤がY-27632である、請求項15記載の培養培地。

【請求項17】

Y-27632の濃度が1 μ ~ 20 μ の範囲である、請求項16記載の培養培地。

【請求項18】

細胞外マトリックスをさらに含む、請求項12～17のいずれか一項記載の培養培地。

【請求項19】

前記細胞外マトリックスの濃度がそのゲル化閾値より低い、請求項18記載の培養培地。

【請求項20】

前記ゲル化閾値が約0.5%以上である、請求項19記載の培養培地。

【請求項21】

前記細胞外マトリックスが天然由来のマトリックス生成物または脱細胞化マトリックスである、請求項18～20のいずれか一項記載の培養培地。

【請求項22】

前記細胞外マトリックスが1種または複数種のモノマトリックス成分を含む、請求項18～21のいずれか一項記載の培養培地。

【請求項23】

前記1種または複数種のモノマトリックス成分が、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、エラスチン、ビトロネクチン、エンタクチン、ヘパリンサルフェート、またはプロテオグリカンである、請求項22記載の培養培地。

【請求項 2 4】

前記細胞外マトリックスがMatrigel（商標）である、請求項18～20のいずれか一項記載の培養培地。

【請求項 2 5】

クローン密度でプレーティングされた1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞の生存または増殖を高めるための、請求項1～11のいずれか一項記載のクローニング補充物または請求項13～24のいずれか一項記載の培養培地の使用。

【請求項 2 6】

前記哺乳動物多能性細胞が胚性幹細胞である、請求項25に記載の使用。

【請求項 2 7】

前記哺乳動物多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、請求項25に記載の使用。

【請求項 2 8】

1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞の生存または増殖を高めるための方法であって、

- a) 1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞をクローン密度で播種する工程、および
- b) i) 哺乳動物多能性細胞培養培地中の請求項1～11のいずれか一項記載のクローニング補充物または

ii) 請求項13～24のいずれか一項記載の培養培地

の存在下で、該1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞を培養する工程を含む、方法。

【請求項 2 9】

培養する工程が単層として培養することを含む、請求項28記載の方法。

【請求項 3 0】

単層として培養することが、細胞外マトリックス中に前記1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞を播種する工程を含む、請求項29記載の方法。

【請求項 3 1】

培養する工程が、前記1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞を非接着条件下で培養することを含む、請求項28記載の方法。

【請求項 3 2】

前記クローン密度が1細胞／ウェルから最大約1000細胞／cm²である、請求項28～31のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 3】

前記1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞を单一細胞として播種する工程をさらに含む、請求項28～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 4】

前記1つまたは複数の哺乳動物多能性幹細胞について約5%～約65%の生存率を得ることをさらに含む、請求項28～33のいずれか一項記載の方法。