

【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6部門第1区分

【発行日】平成27年3月26日(2015.3.26)

【公表番号】特表2014-506671(P2014-506671A)

【公表日】平成26年3月17日(2014.3.17)

【年通号数】公開・登録公報2014-014

【出願番号】特願2013-552696(P2013-552696)

【国際特許分類】

G 01 N	33/53	(2006.01)
G 01 N	33/543	(2006.01)
G 01 N	37/00	(2006.01)
C 12 M	1/26	(2006.01)
C 12 Q	1/68	(2006.01)
C 12 Q	1/02	(2006.01)
C 12 N	5/071	(2010.01)

【F I】

G 01 N	33/53	Y
G 01 N	33/543	5 2 5 W
G 01 N	33/543	5 2 5 U
G 01 N	33/543	5 2 5 E
G 01 N	37/00	1 0 1
C 12 M	1/26	
C 12 Q	1/68	Z
C 12 Q	1/02	
C 12 N	5/00	2 0 2 A

【手続補正書】

【提出日】平成27年2月3日(2015.2.3)

【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】

ヒドロゲル組成物であつて：

複数のアルギン酸分子と；

二価の陽イオンと；

複数の分岐したポリマー分子と；

1つ以上の結合剤とを含み

ここで前記複数のアルギン酸分子が、前記分岐したポリマー分子及び前記1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされるかまたはそれらと混合されて、ヒドロゲルを形成しかつ

各々の前記分岐したポリマー分子が複数の基を含み、

ここで、各々の分岐したポリマー分子の少なくとも1つの基が、前記アルギン酸分子の1つに対してコンジュゲートすることができる；かつ

各々の分岐したポリマー分子の少なくとも1つの他の基が、前記1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートすることができる、ヒドロゲル組成物。

【請求項2】

前記分岐したポリマーが、ポリエチレングリコールであり、特に4-アーム分子である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記1つ以上の結合剤が、抗体、抗体フラグメント、ペプチド模倣化合物、ペプチド、小分子、または核酸であり、特に前記抗体が、GPR49、LGR5、CD24、FLK1、CD45、CD31、CD34、およびsca-1タンパク質に対する抗体からなる群より選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

サンプルから標的の生物学的材料を捕獲および遊離する方法であって：
(a) 流体を受容するための1つ以上のチャンバを備えているマイクロ流体デバイスを設けることであって、ここで前記1つ以上のチャンバのうちの少なくとも1つが、ヒドロゲル組成物でコーティングされた表面を備え、前記ヒドロゲル組成物が：

複数のアルギン酸分子、二価の陽イオン、複数の分岐したポリマー分子及び前記標的の生物学的材料と結合する1つ以上の結合剤を含み；

ここで前記複数のアルギン酸分子が、前記分岐したポリマー分子及び前記1つ以上の結合剤とコンジュゲートされるかまたはそれらと混合されて、ヒドロゲルを形成し；かつ

ここで前記各々の分岐したポリマー分子が、複数の基を含み、各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの基が、前記アルギン酸分子の1つに対してコンジュゲートすることができ、そして各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの他の基が、前記1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートすることができることと；

(b) 標的および非標的の生物学的材料を含んでいるサンプルを、前記ヒドロゲル組成物に対して前記標的の生物学的材料を結合するのに有効な条件下で前記1つ以上のチャンバ中に導入することと；

(c) 前記標的の生物学的材料を、遊離剤を用いて遊離することと；
を包含する、方法。

【請求項5】

工程(c)の前に、前記サンプルから未結合の非標的の材料を除去することをさらに包含する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

サンプルから標的の生物学的材料を捕獲および遊離する方法であって：
(a) 流体を受容するための第一、第二及び第三のチャンバを備えているマイクロ流体デバイスを設けることであって、ここで前記1つ以上のチャンバのうちの少なくとも1つが、ヒドロゲル組成物でコーティングされた少なくとも1つの表面を備え、前記ヒドロゲル組成物が：

複数のアルギン酸分子、二価の陽イオン、複数の分岐したポリマー分子及び前記標的の生物学的材料と結合する1つ以上の結合剤を含み；

ここで前記複数のアルギン酸分子が、前記分岐したポリマー分子及び前記1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされるかまたはそれらと混合されて、ヒドロゲルを形成し；かつ

ここで前記各々の分岐したポリマー分子が、複数の基を含み、各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの基が、前記アルギン酸分子の1つに対してコンジュゲートすることができ、そして各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの他の基が、前記1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートすることができることと；

(b) 標的の生物学的材料を含んでいるサンプルを、前記ヒドロゲル組成物に対して生物学的材料を結合するのに有効な条件下で前記デバイスの前記第一のチャンバ中に導入することと；

(c) 前記結合した生物学的材料を、遊離剤を用いて遊離することと；

(d) 前記遊離剤と中和剤とを接触させて、前記第二のチャンバ中で前記遊離剤を中和することと；

(e) 前記ヒドロゲル組成物に対して前記標的の生物学的材料を結合するのに有効な条件

下で、前記第二のチャンバの内容物を、前記ヒドロゲル組成物でコーティングされた表面を備える前記第三のチャンバ中に提供することであって、ここで前記第三のチャンバ中の前記結合剤が、(a)で用いられたものとは異なる結合剤であることと；
(f)前記結合した標的の生物学的材料を、遊離剤を用いて遊離することと；
を包含する、方法。

【請求項7】

前記遊離された生物学的材料に対して培養培地を添加することをさらに包含するか、又は

異なる結合剤を用いて、(d)から(f)を繰り返すことと、任意に、前記ヒドロゲル組成物からの遊離後に、前記標的の生物学的材料を検出することをさらに包含する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記生物学的材料が、細胞、タンパク質、溶質または粒子であり、ここで前記遊離剤がキレート剤、酵素、またはそれらの組み合わせであり、特に前記細胞が、成体幹細胞、胎児幹細胞、前駆細胞、末梢造血幹細胞、内皮前駆細胞、循環中の腫瘍細胞、成熟の循環中の内皮細胞、羊膜幹細胞、間充織幹細胞、脂肪由来幹細胞、腸管幹細胞、皮膚幹細胞、神経幹細胞、または癌幹細胞であり、又は、

前記細胞が、前記サンプルから捕獲された生きている細胞である、請求項4～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記キレート剤が、EDTA、EGTA、およびクエン酸ナトリウムからなる群より選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

ヒドロゲル組成物を作製する方法であって：
(a)分岐したポリマー分子と1つ以上の結合剤とを緩衝液中で反応させることと；
(b)前記分岐したポリマー-結合剤溶液と、アルギン酸分子及び二価の陽イオンとを反応させて、官能化されたヒドロゲルを形成し、前記官能化されたヒドロゲルは、1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされ、さらに少なくとも1つのアルギン酸分子に対してコンジュゲートされた分岐したポリマー分子を含んでいることと、
を包含する、方法。

【請求項11】

前記分岐したポリマーがポリエチレングリコール分子であり、特に4-アーム分子である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記1つ以上の結合剤が、抗体、抗体フラグメント、ペプチド模倣化合物、ペプチド、小分子、または核酸であり、特に前記抗体が、GPR49、LGR5、CD24、FLK1、CD45、CD31、CD34、およびsca-1タンパク質に対する抗体からなる群より選択される、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

マイクロ流体デバイスであって：前記マイクロ流体デバイスは

(a)基板と；
(b)標的の生物学的材料を含んでいるサンプルを受容するための1つ以上のチャンバであって、前記1つ以上のチャンバが：

(i)ヒドロゲル組成物でコーティングされた表面であって、前記ヒドロゲル組成物が：

複数のアルギン酸分子、二価の陽イオン、複数の分岐したポリマー分子及び前記標的の生物学的材料と結合する1つ以上の結合剤を含んでおり、

ここで、前記複数のアルギン酸分子が、前記分岐したポリマー分子及び1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされるかまたはそれらと混合されて、ヒドロゲルを形成し；かつ

ここで、前記各々の分岐したポリマー分子が複数の基を含み、各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの基が前記アルギン酸分子の1つに対してコンジュゲートすることができ、かつ各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの他の基が前記1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートすることができ；

(i) 標的の生物学的材料と中和剤とを混合するための混合チャンバと；

(i) ヒドロゲル組成物でコーティングされた1つ以上の追加の表面であって、前記ヒドロゲル組成物が：

複数のアルギン酸分子、二価の陽イオン、複数の分岐したポリマー分子、及び、前記標的の生物学的材料と結合し、かつ、(i)における前記結合剤とは異なる結合剤を含んでおり；

ここで、前記複数のアルギン酸分子が、前記分岐したポリマー分子及び前記1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされるかまたはそれらと混合されてヒドロゲルを形成し；かつ

ここで、各々の前記分岐したポリマー分子が、複数の基を含み、各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの基が、前記アルギン酸分子の1つに対してコンジュゲートすることができ、かつ各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの他の基が、(i)における前記結合剤とは異なる前記結合剤に対してコンジュゲートすることができ、

を備えるチャンバと、

を備える、マイクロ流体デバイス。

【請求項14】

前記分岐したポリマー分子がポリエチレングリコール分子であり、特に前記ポリエチレングリコール分子が4-アーム分子である、請求項13に記載のデバイス。

【請求項15】

前記1つ以上の結合剤が、抗体、抗体フラグメント、ペプチド模倣化合物、ペプチド、小分子、または核酸であり、特に前記抗体が、GPR49、LGR5、CD24、FLK1、CD45、CD31、CD34、およびsca-1タンパク質に対する抗体からなる群より選択される、請求項13に記載のデバイス。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0120

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0120】

他の態様、改変および実施形態は、添付の特許請求の範囲内である。

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

(1) ヒドロゲル組成物であって：

複数のアルギン酸分子と；

複数の分岐したポリマー分子と；を含み

ここで前記複数のアルギン酸分子が、前記分岐したポリマー分子または1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされるかまたはそれらと混合されて、ヒドロゲルを形成し；かつ

各々の前記分岐したポリマー分子が複数の基を含み、

ここで、各々の分岐したポリマー分子の少なくとも1つの基が、前記アルギン酸分子に対してコンジュゲートされ；かつ

各々の分岐したポリマー分子の少なくとも1つの他の基が、前記1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされる、ヒドロゲル組成物。

(2) 前記分岐したポリマーが、ポリエチレングリコールである、前記(1)に記載の組成物。

(3) 前記ポリエチレングリコール分子が4-アーム分子である、前記(2)に記載の組

成物。

[4] 前記1つ以上の結合剤が、抗体、抗体フラグメント、ペプチド模倣化合物、ペプチド、小分子、または核酸である、前記〔1〕に記載の組成物。

[5] 前記抗体が、GPR49、LGR5、CD24、FLK1、CD45、CD31、CD34、およびsca-1タンパク質に対する抗体からなる群より選択される、前記〔4〕に記載の組成物。

[6] サンプルから標的の生物学的材料を捕獲および遊離する方法であって：

(a) 流体を受容するための1つ以上のチャンバを備えているマイクロ流体デバイスを設けることであって、ここで前記1つ以上のチャンバのうちの少なくとも1つが、ヒドロゲル組成物でコーティングされた表面を備え、前記ヒドロゲル組成物が：

複数のアルギン酸分子および複数の分岐したポリマー分子を含み；

ここで前記複数のアルギン酸分子が、分岐したポリマー分子または1つ以上の結合剤とコンジュゲートされるかまたはそれらと混合されて、ヒドロゲルを形成し；かつ

ここで前記各々の分岐したポリマー分子が、複数の基を含み、各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの基が、アルギン酸分子に対してコンジュゲートされ、そして各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの他の基が、前記1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされること；

(b) 標的および非標的の生物学的材料を含んでいるサンプルを、前記ヒドロゲル組成物に対して前記標的の生物学的材料を結合するのに有効な条件下で前記1つ以上のチャンバ中に導入すること；

(c) 前記標的の生物学的材料を、遊離剤を用いて遊離することと；
を包含する、方法。

[7] 前記サンプルから未結合の非標的の材料を除去することをさらに包含する、前記〔6〕に記載の方法。

[8] サンプルから標的の生物学的材料を捕獲および遊離する方法であって：

(a) 流体を受容するための1つ以上のチャンバを備えているマイクロ流体デバイスを設けることであって、ここで前記1つ以上のチャンバのうちの少なくとも1つが、ヒドロゲル組成物でコーティングされた少なくとも1つの表面を備え、前記ヒドロゲル組成物が：

複数のアルギン酸分子および複数の分岐したポリマー分子を含み；

ここで前記複数のアルギン酸分子が、分岐したポリマー分子または1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされて、ヒドロゲルを形成し；かつ

ここで前記各々の分岐したポリマー分子が、複数の基を含み、各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの基が、アルギン酸分子に対してコンジュゲートされ、そして各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの他の基が、1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされること；

(b) 標的の生物学的材料を含んでいるサンプルを、前記ヒドロゲル組成物に対して生物学的材料を結合するのに有効な条件下で前記デバイスの第一のチャンバ中に導入すること；

(c) 前記結合した生物学的材料を、遊離剤を用いて遊離することと；

(d) 前記遊離剤と中和剤とを接觸させて、第二のチャンバ中で前記遊離剤を中和することと；

(e) 前記第二のチャンバの内容物を、前記ヒドロゲル組成物でコーティングされた表面を備える第三のチャンバ中に提供することであって、ここで前記第三のチャンバ中の前記結合剤が、(a)前記ヒドロゲル組成物に対して前記標的の生物学的材料を結合するのに有効な条件下で、で用いられたものとは異なる結合剤であることと；

(f) 前記結合した標的の生物学的材料を、遊離剤を用いて遊離することと；
を包含する、方法。

[9] 前記遊離された生物学的材料に対して培養培地を添加することをさらに包含する、前記〔8〕に記載の方法。

[10] 異なる結合剤を用いて、(d)から(f)を繰り返すことをさらに包含する、前

記〔8〕に記載の方法。

〔11〕前記ヒドロゲル組成物からの遊離後に、前記標的の生物学的材料を検出することをさらに包含する、前記〔10〕に記載の方法。

〔12〕前記生物学的材料が、細胞、タンパク質、溶質または粒子であり、ここで前記遊離剤がキレート剤、酵素、またはそれらの組み合わせである、前記〔6〕～〔11〕のいずれか1項に記載の方法。

〔13〕前記細胞が、成体幹細胞、胎児幹細胞、前駆細胞、末梢造血幹細胞、内皮前駆細胞、循環中の腫瘍細胞、成熟の循環中の内皮細胞、羊膜幹細胞、間充織幹細胞、脂肪由来幹細胞、腸管幹細胞、皮膚幹細胞、神経幹細胞、または癌幹細胞である、前記〔12〕に記載の方法。

〔14〕前記細胞が、前記サンプルから捕獲された生きている細胞である、前記〔12〕に記載の方法。

〔15〕前記キレート剤が、EDTA、EGTA、およびクエン酸ナトリウムからなる群より選択される、前記〔12〕に記載の方法。

〔16〕前記生きている細胞を培養、検出、分析または形質転換するために有効な条件下で前記生きている細胞を維持することをさらに包含する、前記〔14〕に記載の方法。

〔17〕ヒドロゲル組成物を作製する方法であって：

(a) 分岐したポリマー分子と1つ以上の結合剤とを緩衝液中で反応させることと；
(b) 前記分岐したポリマー-結合剤溶液と少なくとも1つのアルギン酸分子とを反応させて、官能化されたヒドロゲルを形成し、前記官能化されたヒドロゲルは、1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされ、さらに少なくとも1つのアルギン酸分子に対してコンジュゲートされた各々の分岐したポリマー分子を含んでいることと、
を包含する、方法。

〔18〕前記分岐したポリマーがポリエチレングリコール分子である、前記〔17〕に記載の方法。

〔19〕前記ポリエチレングリコール分子が4-アーム分子である、前記〔18〕に記載の方法。

〔20〕前記1つ以上の結合剤が、抗体、抗体フラグメント、ペプチド模倣化合物、ペプチド、小分子、または核酸である、前記〔17〕に記載の方法。

〔21〕前記抗体が、GPR49、LGR5、CD24、FLK1、CD45、CD31、CD34、およびscfa-1タンパク質に対する抗体からなる群より選択される、前記〔20〕に記載の方法。

〔22〕マイクロ流体デバイスであって：前記マイクロ流体デバイスは

(a) 基板と；

(b) 1つ以上のチャンバを含み、標的の生物学的材料を含んでいるサンプルを受容するための1つ以上のチャンバであって、前記1つ以上のチャンバが：

(i) ヒドロゲル組成物でコーティングされた表面であって、前記ヒドロゲル組成物が：

複数のアルギン酸分子および複数の分岐したポリマー分子を含んでおり、
ここで、前記複数のアルギン酸分子が、前記分岐したポリマー1分子または1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされて、ヒドロゲルを形成し；かつ

ここで、前記各々の分岐したポリマー分子が複数の基を含み、各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの基がアルギン酸分子に対してコンジュゲートされ、かつ各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの他の基が前記結合剤に対してコンジュゲートされ；

(ii) 結合された標的の生物学的材料と中和剤とを混合するための混合チャンバと；

(iii) ヒドロゲル組成物でコーティングされた1つ以上の追加の表面であって、前記ヒドロゲル組成物が：

複数のアルギン酸分子および複数の分岐したポリマー分子を含んでおり；

ここで、前記複数のアルギン酸分子が、前記分岐したポリマー分子または前記1つ以上の結合剤に対してコンジュゲートされてヒドロゲルを形成し；かつ

ここで、各々の前記分岐したポリマー分子が、複数の基を含み、各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの基が、アルギン酸分子に対してコンジュゲートされ、かつ各々の分岐したポリマー分子のうちの少なくとも1つの他の基が、工程(i)における前記結合剤とは異なる前記結合剤に対してコンジュゲートされる、
チャンバと、

を備える、マイクロ流体デバイス。

[23] 前記分岐したポリマー分子がポリエチレングリコール分子である、前記[22]に記載のデバイス。

[24] 前記1つ以上の結合剤が、抗体、抗体フラグメント、ペプチド模倣化合物、ペプチド、小分子、または核酸である、前記[22]に記載のデバイス。

[25] 前記ポリエチレングリコール分子が4-アーム分子である、前記[23]に記載のデバイス。

[26] 前記抗体が、GPR49、LGR5、CD24、FLK1、CD45、CD31、CD34、およびsca-1タンパク質に対する抗体からなる群より選択される、前記[25]に記載のデバイス。