

【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24年2月2日(2012.2.2)

【公表番号】特表2011-514169(P2011-514169A)  
 【公表日】平成23年5月6日(2011.5.6)  
 【年通号数】公開・登録公報2011-018  
 【出願番号】特願2011-500744(P2011-500744)  
 【国際特許分類】

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 M 3/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 2 0 2 A

C 1 2 M 3/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成23年12月6日(2011.12.6)

【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】

ヒト胚性幹細胞またはヒトの誘導された多分化能性(pluripotent)幹細胞をインビトロで懸濁培養において培養する方法であって、

(i) ヒト胚性幹細胞またはヒトの誘導された多分化能性幹細胞を複数のマイクロキャリアに付着させてマイクロキャリア-幹細胞複合体を形成し、その際、当該マイクロキャリアの表面は細胞外マトリックス成分を含むマトリックス中にコートされており；

(ii) マイクロキャリア-幹細胞複合体を懸濁培養において培養し；

(iii) (ii)からの培養細胞を継代し；そして

(iv) 工程(i)~(iii)を通して少なくとも7継代反復する；

ことを含み、その際、工程(iv)の後の培養物中の幹細胞が多分化能性である、前記方法。

【請求項2】

マイクロキャリアが、ロッド形であるかまたは実質的に球形の形状を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

マトリックスが、Matrigel(商標)(BD Biosciences)、ヒアルロン酸、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲン、エラスチン、ヘパラン硫酸、デキストラン、デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸、または、ラミニン、I型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン及びエンタクチン1の混合物、のうち1以上を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

幹細胞の数が、各継代間で拡張している、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

マイクロキャリアが、セルロース、デキストラン、ヒドロキシル化メタクリレート、コラーゲン、ゼラチン、ポリスチレン、プラスチック、ガラス、セラミック、シリコーンのうち1以上を含むか、もしくはそれらからなる、または、マイクロキャリアがマクロ多孔質もしくはミクロ多孔質のcarboseedマイクロキャリアである、請求項1~4の

いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

マイクロキャリアが、プロタミンまたはポリリジンとカップリングしている、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

マイクロキャリアが陽電荷を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

工程 ( i i ) において、培養物中の幹細胞の数を拡張させるのに十分な期間、幹細胞を培養する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

各反復サイクルにおいて、工程 ( i ) の幹細胞がその前の反復サイクルの工程 ( i i i ) の継代細胞から得られる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

工程 ( i v ) において、工程 ( i ) ~ ( i i i ) を通して、少なくとも 8 継代、少なくとも 9 継代、少なくとも 10 継代、少なくとも 11 継代、少なくとも 12 継代、少なくとも 13 継代、少なくとも 14 継代、少なくとも 15 継代、少なくとも 16 継代、少なくとも 17 継代、少なくとも 18 継代、少なくとも 19 継代、少なくとも 20 継代、少なくとも 21 継代、少なくとも 22 継代、少なくとも 23 継代、少なくとも 24 継代、少なくとも 25 継代、少なくとも 30 継代、少なくとも 40 継代、少なくとも 50 継代、少なくとも 60 継代、少なくとも 70 継代、少なくとも 80 継代、少なくとも 90 継代、少なくとも 100 継代、の一つで反復する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

工程 ( i ) ~ ( i i i ) のサイクルの少なくとも 60 % について、マイクロキャリアがマトリックス中にコートされている、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

工程 ( i ) ~ ( i i i ) のサイクルにおいて、マイクロキャリアが同一マトリックス中にコートされている、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

工程 ( i ) ~ ( i i i ) の第 1 と第 2 の連続サイクルにおいて、マトリックスが異なるか、または存在しない、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

工程 ( i v ) の後、培養物中の少なくとも 60 % の幹細胞が多分化能性であるか、または Oct 4、SSEA 4、TRA - 1 - 60 および Mab 84 のうち 1、2、3 もしくはすべてを発現する、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

該方法が、幹細胞を無血清培地、または幹細胞用馴化培地、またはフィーダー細胞を含まない状態で培養することを含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

フィーダー細胞もマイクロキャリアに付着している、ここで場合により、培養はさらに、幹細胞が付着するマイクロキャリアとは異なるマイクロキャリアに付着したフィーダー細胞を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

さらに、工程 ( i v ) の後に得られる幹細胞の分化を誘導する工程を含むか、または幹細胞の分化を誘導する条件下にマイクロキャリア幹細胞複合体を置くことを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

該方法が、工程 ( i v ) の後に、幹細胞をマイクロキャリアから分離し、そして分離した幹細胞をマイクロキャリアの無い培養において、幹細胞の分化を誘導する条件下で培養する工程を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

さらに、多分化能性幹細胞の分化を含む方法であって、

(v) 工程 (iv) の後に得られる多分化能性幹細胞を複数の第2マイクロキャリアに附着させてマイクロキャリア幹細胞複合体を形成し、その際、第2マイクロキャリアの表面は第2マトリックス中にコートされているか、またはコートされておらず；そして

(vi) (v) からのマイクロキャリア幹細胞複合体を懸濁培養において、幹細胞の分化を誘導する条件下で培養する；

ことを含み、ここで当該方法は、場合によりさらに以下：

(vii) 工程 (vi) から得られる分化した幹細胞を複数の第3マイクロキャリアに附着させてマイクロキャリア幹細胞複合体を形成し、その際、第3マイクロキャリアの表面は第3マトリックス中にコートされているか、またはコートされておらず；そして

(viii) (vii) からのマイクロキャリア幹細胞複合体を懸濁培養において、分化した幹細胞のさらなる分化を誘導する条件下で培養する；

ことを含む、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

分化した細胞を培養して胚様体を形成させる、請求項17～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

幹細胞をインビトロで懸濁培養において培養する方法であって、

(i) 幹細胞を複数のマイクロキャリアに附着させてマイクロキャリア-幹細胞複合体を形成し、その際、マイクロキャリアの表面はMatrigel (商標) 中にコートされており；

(ii) マイクロキャリア-幹細胞複合体を懸濁培養において培養し；

(iii) (ii) からの培養細胞を継代し；そして

(iv) 工程 (i) ~ (iii) を通して少なくとも7継代反復する

ことを含み、その際、工程 (iv) の後の培養物中の幹細胞が多分化能性 (pluripotent) であり、培養物がフィーダー細胞を含まず、各継代間で幹細胞の数が拡張し、幹細胞がヒトもしくは霊長類の胚性幹細胞またはヒトもしくは霊長類の誘導された多分化能性幹細胞である、前記方法。

【請求項22】

多分化能性 (pluripotent) 状態を有する新たな細胞を生じるための、ヒト多分化能性細胞の培養におけるインビトロでのマイクロキャリアの使用であって、当該マイクロキャリアはセルロース、デキストラン、ヒドロキシル化メタクリレート、またはコラーゲンのうち1以上を含み、そしてここで当該マイクロキャリアは細長い形状を有し、約2000 μm未滿の最長寸法および約10 μmより大きい最短寸法、好ましくは50 μmから400 μmの間の最長寸法、を有し、そしてここで当該マイクロキャリアの表面が細胞外マトリックス成分を含むマトリックス中にコートされ、そしてここで1個または複数のヒト多分化能性細胞がマトリックスコーティングに附着し、当該マイクロキャリアは場合によりロッド形である、前記使用。

【請求項23】

マトリックスコーティングが、Matrigel (商標) (BD Biosciences)、ヒアルロン酸、ラミニンまたはフィブロネクチンのうち1以上を含む、請求項22に記載の使用。

【請求項24】

多分化能性細胞が、ヒトの胚性幹細胞またはヒトの誘導された多分化能性幹細胞である、請求項22または23に記載の使用。

【請求項25】

マイクロキャリアが陽電荷を有する、請求項22～24のいずれか1項に記載の使用。