【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27年6月18日(2015.6.18)

【公開番号】特開2014-57527(P2014-57527A)
【公開日】平成26年4月3日(2014.4.3)
【年通号数】公開・登録公報2014-017
【出願番号】特願2012-203154(P2012-203154)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　5/00　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　5/00

【手続補正書】
【提出日】平成27年4月28日(2015.4.28)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１７】
本開示の第１の製造方法において、培地の少なくとも一部を５日以上継続使用して被覆細胞の培養を行う。本開示において「培地の少なくとも一部を５日以上継続使用して被覆細胞培養を行う」とは、一又は複数の実施形態において、被覆細胞が培養されている培地の２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は略１００％を少なくとも５日間使用したままでの状態で被覆細胞の培養を行うことをいう。また、被覆細胞が培養されている培地の２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、又は略１００％を少なくとも５日間除去することなく被覆細胞の培養を行うことを含む。本開示の第１の製造方法は、一又は複数の実施形態において、被覆細胞の培養時に、新しい培地を添加することを含んでいてもよい。培地の少なくとも一部を継続使用する期間は、少なくとも５日間であり、一又は複数の実施形態において、６日以上、７日以上、８日以上、９日以上、１０日以上、１５日以上、２０日以上、又は２５日以上である。継続使用する期間の上限は特に限定されるものではなく、培地の量、播種する細胞数、及び細胞の種類等に応じて適宜決定でき、一又は複数の実施形態において、９０日以下、６０日以下、又は４０日以下である。本開示の第１の製造方法の一又は複数の実施形態において、少なくとも５日間培地交換を行うことなく被覆細胞の培養を行ってもよいし、また培地交換周期が５日以上であってもよい。また、本開示の第１の製造方法の一又は複数の実施形態において、培養開始から最初の培地交換を少なくとも５日以降に行うこと、又は２回目の培地交換を少なくとも６日以降に行うことを含んでいてもよい。なお、本開示において「培地交換」とは、被覆細胞が培養されている培地の略全量を除去して新たな培地に交換することをいう。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１８】
本開示の第１の製造方法は、一又は複数の実施形態において、被覆細胞を播種後１６～３６時間後に培地交換を行うことを含んでいてもよい。

【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２８】
本開示の第２の製造方法において、培地の量は細胞１×１０^{4}個あたり７０μＬ以上であり、培養中に培地に含まれる老廃物の影響を低減する点から、好ましくは１７０μＬ以上、又は１ｍＬ以上であり、また１００ｍＬ以下、又は１０ｍＬ以下である。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２９】
本開示の第２の製造方法は、一又は複数の実施形態において、培地交換を行うことを含んでいてもよい。培地交換を行う周期は特に制限されるものではなく、一又は複数の実施形態において、１日おき、２日おき、３日おき、又は４日おきに行ってもよい。また、一又は複数の実施形態において、より層数及び／又は厚みの大きい三次元細胞培養体が得られうる点から、培地の少なくとも一部を５日以上継続使用して被覆細胞を培養することを含んでいてもよい。継続使用する期間は、一又は複数の実施形態において、６日以上、７日以上、８日以上、９日以上、１０日以上、１５日以上、２０日以上、又は２５日以上であり、また９０日以下、６０日以下、又は４０日以下である。本開示の第２の製造方法の一又は複数の実施形態において、培地交換の周期が５日以上であってもよい。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３３】
本開示の第１及び２の製造方法は、さらに、被覆細胞を調製する工程を含んでいてもよい。被覆細胞は、物質Ａを含む溶液と、物質Ｂを含む溶液とを細胞に交互に接触させることにより調製することができる。物質Ａと物質Ｂとの組み合わせとしては、上記の通り、ＲＧＤ配列を有する物質と相互作用を有する物質との組み合わせ、又は、正の電荷を有する物質と負の電荷を有する物質との組み合わせが挙げられる。
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４５】
以下に、細胞に、まずＲＧＤ配列を有する物質を含有する溶液Ａと接触させた後、ＲＧＤ配列を有する物質に相互作用を有する物質を含有する溶液Ｂと接触させる場合を例にとり、被覆細胞の調製方法を説明する。
【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４７】

接触条件は、一又は複数の実施形態において、接触方法、ＲＧＤ配列を有する物質及び又は細胞の種類、及び含有液の濃度等に応じて適宜決定できる。接触時間は、一又は複数の実施形態において、３０秒～２４時間、１分～６０分、１分～１５分、１分～１０分、又は１分～５分が好ましい。接触時の雰囲気温度及び又は溶液Ａの温度は、一又は複数の実施形態において、４～６０℃、２０～４０℃、又は３０～３７℃が好ましい。

【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５２】

ついで、ＲＧＤ配列を有する物質を含む膜で被覆された細胞を溶液Ｂと接触させる。これにより、ＲＧＤ配列を有する物質を含む膜表面に相互作用をする物質を含む膜が形成され、ＲＧＤ配列を有する物質を含む膜で被覆された細胞表面が相互作用をする物質を含む膜によって被覆される。溶液Ｂとの接触は、ＲＧＤ配列を有する物質に代えて相互作用する物質を使用する以外は、溶液Ａとの接触と同様に行うことができる。

【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５３】

溶液Ａ又は溶液Ｂと細胞との接触とを交互に繰り返し行うことにより、細胞表面全体に、ＲＧＤ配列を有する物質を含む膜と相互作用をする物質を含む膜とが交互に積層された細胞外マトリックス成分を含む被膜を形成することができる。溶液Ａ又は溶液Ｂと細胞との接触を行う回数は、例えば、形成する細胞外マトリックス成分を含む被膜の厚み等に応じて適宜決定できる。

【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６５】

図３に示すように、ＡＬＢの発現量は培地量が多くなればなるほど高くなった。一方、ＣＹＰ１Ａ１の発現量は、培地量が実施例３と４とで同程度であった。これらの結果より、培地の量をより多くすることによって、より活性の高い三次元細胞培養体を製造できる可能性が示唆された。