

【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 2 月 25 日 (2021.2.25)

【公開番号】特開 2019-122341 (P2019-122341A)  
 【公開日】令和 1 年 7 月 25 日 (2019.7.25)  
 【年通号数】公開・登録公報 2019-030  
 【出願番号】特願 2018-6810 (P2018-6810)  
 【国際特許分類】

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/00 (2006.01)

C 0 8 G 65/32 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 M 1/00 Z N A C

C 1 2 N 1/00 B

C 0 8 G 65/32

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 1 月 12 日 (2021.1.12)

【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】

液体を貯留可能な内部空間が形成された容器本体と、  
 前記内部空間を複数の液体貯留部に区画する隔壁と、を備え、  
 前記隔壁に、前記複数の液体貯留部のうち少なくとも 2 つを連通させる孔であって、  
 ハイドロゲルが保持される孔が形成されており、  
前記孔の開口部は、前記隔壁の厚さ方向から見て、前記隔壁の周縁から離れた位置に形成されている、容器。

【請求項 2】

前記孔の表面の少なくとも一部に、前記ハイドロゲルを固定するための化合物が積層されている、請求項 1 に記載の容器。

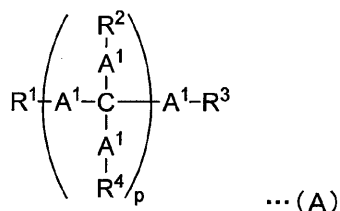
【請求項 3】

前記孔に前記ハイドロゲルが配置され、前記ハイドロゲルの前記液体と接する面が前記隔壁の厚さ方向に垂直な平面である、請求項 1 又は 2 に記載の容器。

【請求項 4】

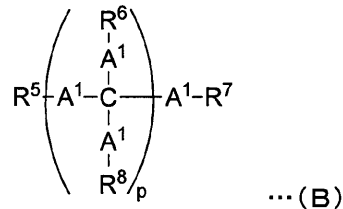
前記ハイドロゲルが、下記式 (A) で表される化合物、下記式 (B) で表される化合物及び水系液体を混合することにより得られるものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の容器。

【化 1】



[ 式 ( A ) 中、 $A^1$  は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^1 \sim R^4$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^1$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^1$  又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$  は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の 2 価の基を表し、 $Z^1$  はアルキニル基を表し、 $n$  は 20 ~ 500 の整数を表す。 $p$  は 0 以上の整数を表す。 $p$  が 2 以上の整数である場合、複数存在する  $R^2$  及び  $R^4$  はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。]

【化 2】

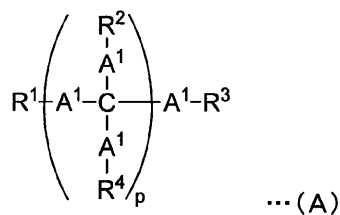


[ 式 ( B ) 中、 $A^1$  は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^5 \sim R^8$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^2$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^2$  又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$  は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の 2 価の基を表し、 $Z^2$  はアジド基を表し、 $n$  は 20 ~ 500 の整数を表す。 $p$  は 0 以上の整数を表す。 $p$  が 2 以上の整数である場合、複数存在する  $R^6$  及び  $R^8$  はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。]

【請求項 5】

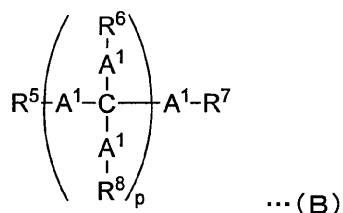
前記ハイドロゲルが、下記式 ( A ) で表される化合物、下記式 ( B ) で表される化合物、培地及び細胞を混合することにより得られるものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の容器。

【化 3】



[ 式 ( A ) 中、 $A^1$  は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^1 \sim R^4$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^1$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^1$  又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$  は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の 2 価の基を表し、 $Z^1$  はアルキニル基を表し、 $n$  は 20 ~ 500 の整数を表す。 $p$  は 0 以上の整数を表す。 $p$  が 2 以上の整数である場合、複数存在する  $R^2$  及び  $R^4$  はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。]

【化 4】



[ 式 ( B ) 中、 $A^1$  は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分

岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^5 \sim R^8$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^2$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^2$  又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$  は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の 2 価の基を表し、 $Z^2$  はアジド基を表し、 $n$  は 20 ~ 500 の整数を表す。 $p$  は 0 以上の整数を表す。 $p$  が 2 以上の整数である場合、複数存在する  $R^6$  及び  $R^8$  はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。]

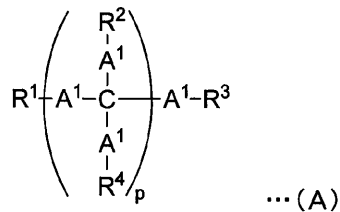
【請求項 6】

請求項 1 又は 2 に記載の容器と、前記ハイドロゲルの材料とを含む、キット。

【請求項 7】

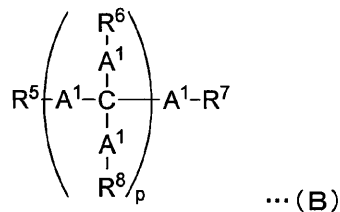
前記ハイドロゲルの材料が、下記式 (A) で表される化合物及び下記式 (B) で表される化合物を含む、請求項 6 に記載のキット。

【化 5】



[式 (A) 中、 $A^1$  は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^1 \sim R^4$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^1$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^1$  又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$  は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の 2 価の基を表し、 $Z^1$  はアルキニル基を表し、 $n$  は 20 ~ 500 の整数を表す。 $p$  は 0 以上の整数を表す。 $p$  が 2 以上の整数である場合、複数存在する  $R^2$  及び  $R^4$  はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。]

【化 6】



[式 (B) 中、 $A^1$  は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^5 \sim R^8$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^2$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^2$  又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$  は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の 2 価の基を表し、 $Z^2$  はアジド基を表し、 $n$  は 20 ~ 500 の整数を表す。 $p$  は 0 以上の整数を表す。 $p$  が 2 以上の整数である場合、複数存在する  $R^6$  及び  $R^8$  はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。]

【請求項 8】

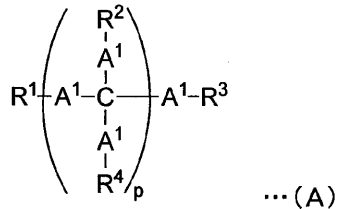
請求項 1 又は 2 に記載の容器の前記孔にハイドロゲルを配置する工程と、

前記複数の液体貯留部の少なくとも 2 つに、対象物質の濃度が互いに異なる液体をそれぞれ入れ、その結果、前記ハイドロゲルに前記対象物質の濃度勾配が形成される工程と、を含む、対象物質の濃度勾配を有する前記ハイドロゲルの製造方法。

【請求項 9】

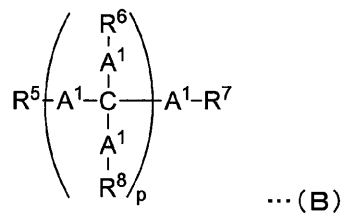
前記ハイドロゲルが、下記式 (A) で表される化合物、下記式 (B) で表される化合物及び水系液体を混合することにより得られるものである、請求項 8 に記載の製造方法。

## 【化 7】



〔式(A)中、 $A^1$ は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数1～20の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^1 \sim R^4$ は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^1$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^1$ 又は炭素原子数1～20の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$ は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数1～20の2価の基を表し、 $Z^1$ はアルキニル基を表し、 $n$ は20～500の整数を表す。 $p$ は0以上の整数を表す。 $p$ が2以上の整数である場合、複数存在する $R^2$ 及び $R^4$ はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。〕

## 【化 8】



〔式(B)中、 $A^1$ は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数1～20の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^5 \sim R^8$ は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^2$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^2$ 又は炭素原子数1～20の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$ は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数1～20の2価の基を表し、 $Z^2$ はアジド基を表し、 $n$ は20～500の整数を表す。 $p$ は0以上の整数を表す。 $p$ が2以上の整数である場合、複数存在する $R^6$ 及び $R^8$ はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。〕

## 【請求項 10】

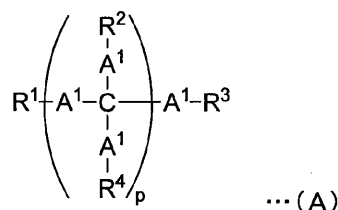
請求項1又は2に記載の容器の前記孔に細胞含有ハイドロゲルを配置する工程と、  
前記複数の液体貯留部の少なくとも2つに、対象物質の濃度が互いに異なる培地をそれぞれ入れ、その結果、前記細胞含有ハイドロゲルに前記対象物質の濃度勾配が形成される工程と、

前記細胞含有ハイドロゲルをインキュベートする工程と、  
を含む、細胞培養方法。

## 【請求項 11】

前記細胞含有ハイドロゲルが、下記式(A)で表される化合物、下記式(B)で表される化合物、培地及び細胞を混合することにより得られるものである、請求項10に記載の細胞培養方法。

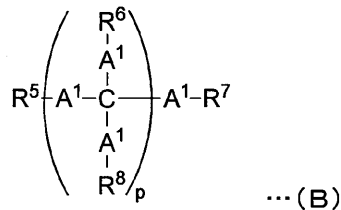
## 【化 9】



〔式(A)中、 $A^1$ は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数1～20の直鎖状若しくは分

岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^1 \sim R^4$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^1$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^1$  又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$  は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の 2 価の基を表し、 $Z^1$  はアルキニル基を表し、 $n$  は 20 ~ 500 の整数を表す。 $p$  は 0 以上の整数を表す。 $p$  が 2 以上の整数である場合、複数存在する  $R^2$  及び  $R^4$  はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。]

【化 10】



[式 (B) 中、 $A^1$  は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^5 \sim R^8$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^2$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^2$  又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$  は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の 2 価の基を表し、 $Z^2$  はアジド基を表し、 $n$  は 20 ~ 500 の整数を表す。 $p$  は 0 以上の整数を表す。 $p$  が 2 以上の整数である場合、複数存在する  $R^6$  及び  $R^8$  はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。]

【請求項 12】

前記細胞が下垂体原基の性質を有する細胞塊であり、前記対象物質が、糖質コルチコイド、骨形成タンパク質 (BMP)、線維芽細胞増殖因子 (FGF) 及びソニック・ヘッジホッグ (Shh) からなる群より選択される分化誘導因子である、請求項 10 又は 11 に記載の細胞培養方法。

【請求項 13】

下垂体の製造方法であって、

請求項 1 又は 2 に記載の容器の前記孔に、下垂体原基の性質を有する細胞塊を含有する、細胞塊含有ハイドロゲルを配置する工程と、

前記複数の液体貯留部の少なくとも 2 つに、糖質コルチコイド、BMP、FGF 及び Shh からなる群より選択される分化誘導因子の濃度が互いに異なる培地をそれぞれ入れ、その結果、前記細胞塊含有ハイドロゲルに前記分化誘導因子の濃度勾配が形成される工程と、

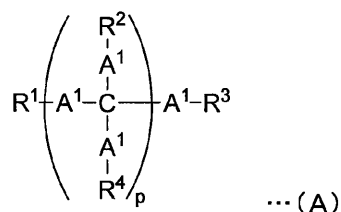
前記細胞塊含有ハイドロゲルをインキュベートし、その結果、前記細胞塊から下垂体が形成される工程と、

を含む、製造方法。

【請求項 14】

前記細胞塊含有ハイドロゲルが、下記式 (A) で表される化合物、下記式 (B) で表される化合物、培地及び下垂体原基の性質を有する細胞塊を混合することにより得られるものである、請求項 13 に記載の製造方法。

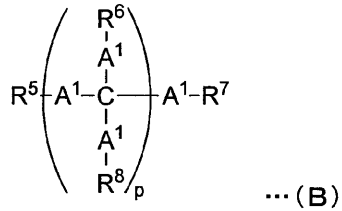
【化 11】



[式 (A) 中、 $A^1$  は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分

岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^1 \sim R^4$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^1$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^1$  又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$  は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の 2 価の基を表し、 $Z^1$  はアルキニル基を表し、 $n$  は 20 ~ 500 の整数を表す。 $p$  は 0 以上の整数を表す。 $p$  が 2 以上の整数である場合、複数存在する  $R^2$  及び  $R^4$  はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。]

【化 1 2】



[式 (B) 中、 $A^1$  は、それぞれ独立に、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキレン基を表し、 $R^5 \sim R^8$  は、それぞれ独立に、水素原子、 $-L-Z^2$ 、 $-O(CH_2CH_2O)_n-L-Z^2$  又は炭素原子数 1 ~ 20 の直鎖状若しくは分岐鎖状のアルキル基を表す。ここで、 $L$  は、それぞれ独立して、単結合又は炭素数 1 ~ 20 の 2 価の基を表し、 $Z^2$  はアジド基を表し、 $n$  は 20 ~ 500 の整数を表す。 $p$  は 0 以上の整数を表す。 $p$  が 2 以上の整数である場合、複数存在する  $R^6$  及び  $R^8$  はそれぞれ同一であってもよく異なってもよい。]