

【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7月26日 (2012.7.26)

【公表番号】特表2010-532173(P2010-532173A)
 【公表日】平成22年10月7日 (2010.10.7)
 【年通号数】公開・登録公報2010-040
 【出願番号】特願2010-515226(P2010-515226)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 2 0 2 C

C 1 2 M 1/00 C

【手続補正書】
 【提出日】平成23年6月30日 (2011.6.30)
 【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】

規定の培地条件下における多能性幹細胞の自動化増殖のための方法であって：

(a) 規定の増殖培地において多能性細胞の第一の集団を得る工程と；

(b) 自動化分離システムによって該多能性細胞を分離する工程と；

(c) 新鮮な規定の増殖培地中に該分離された細胞を懸濁して多能性細胞の増殖した集団を得る工程と、
 を包含する、方法。

【請求項 2】

前記多能性細胞が E S 細胞または人工多能性細胞 (i P S) である かまたは好ましくはヒト E S 細胞である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記培養された増殖した多能性 E S 細胞のうち少なくとも 9 7 % で分化が全く生じないか、または本質的に生じない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記増殖培地が T e S R 培地を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

多能性細胞の前記第一の集団が細胞分離の時点で約 5 0 % コンフルエントと約 9 9 % コンフルエントとの間であり、好ましくは細胞分離の時点で約 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % または 9 0 % コンフルエントである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

新鮮増殖培地中の前記分離された細胞を懸濁する工程が、1 つ以上の新規な細胞培養プレート (単数または複数) 中に該細胞を播種する工程を包含し、好ましくはここで該新規な細胞培養プレート (単数または複数) の表面積が E S 細胞の前記第一の集団を含んでいる該プレートの表面積よりも約 5 倍と約 3 5 倍との間または好ましくは約 1 0 倍と約 3 5 倍との間大きい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記自動化分離プロトコールが、多能性細胞の前記第一の集団とタンパク質分解酵素と

を接触させる工程を包含し、好ましくはここで該タンパク質分解酵素がトリプシン、組み換えトリプシン、トリプシン様プロテイナーゼ、またはTRYPLEである、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記新鮮増殖培地がタンパク質分解酵素のインヒビターを、好ましくは細胞分離のために用いられる該タンパク質分解酵素のインヒビターを含み、より好ましくは、ここで該タンパク質分解酵素のインヒビターがトリプシンインヒビターまたはダイズトリプシンインヒビターである、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記分離システムがリキッド・ハンドラー・ロボットによって自動化され、好ましくはここで該自動化分離システムが：

(i) 前記第一の多能性細胞集団から前記培地を除去する工程と；

(ii) 該多能性細胞とタンパク質分解酵素とを接触させる工程と；

(iii) 該細胞とタンパク質分解酵素とをインキュベートして細胞集合を分離する工程と、
を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

タンパク質分解酵素インヒビターとRho関連キナーゼ(ROCK)インヒビターとを含む規定の培地が工程(iii)の後に溶液に添加される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記自動化分離システムがさらに：

(iv) 前記インキュベートされた細胞を機械的攪拌に供して、細胞集合をさらに分離する工程、
を包含する、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

多能性細胞の前記集団が非多能性細胞を含まないか、または実質的に含まず、好ましくはここで多能性細胞の該集団がヒトES細胞であり、ヒトES細胞の集団が非ヒト細胞を含まないか、または実質的に含まない、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

胚性幹(ES)細胞の自動化連続増殖のための方法としてさらに規定され：

(a) 増殖培地においてES細胞の第一の集団を得る工程と；

(b) 自動化分離システムによって該ES細胞を分離する工程と；

(c) 新鮮な増殖培地中に該分離された細胞を懸濁してES細胞の増殖した集団を得る工程と、

(d) 細胞増殖を支持する条件下で該増殖したES細胞集団をインキュベートする工程と、

(e) 工程b～dを1回以上反復してES細胞の連続増殖した集団を得る工程と、
を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記増殖培地がRho関連キナーゼ(ROCK)インヒビターの有効量を含み、好ましくはここで該Rho関連キナーゼ(ROCK)インヒビターがHA-100またはH-1135である、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

多能性細胞の自動化した維持および増殖のための装置であって：

(a) インキュベーター；

(b) リキッド・ハンドラー・ユニット；

(c) 1つ以上のリザーバであって、(i) 多能性細胞の生きている集団と、(ii) 規定の培地であって、多能性細胞が未分化状態で培養および維持され得る培地である、規定の培地と、(iii) プロテアーゼ、プロテアーゼインヒビターおよびRho関連キナーゼ(ROCK)インヒビターのうちの1つ以上とを含むリザーバ；ならびに

(d) 該リキッド・ハンドラー・ユニットと連絡したコントローラであって、該多能性細胞の自動化された増殖および維持を達成するように該リキッド・ハンドラー・ユニットに仕向けるように構成されている、コントローラ；
を備える、装置。

【請求項 16】

前記コントローラが操作プログラムを含むコンピューター読み取り可能な媒体を備えるか、またはここで該コントローラがコンピューター中に含まれる、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 17】

前記コントローラが：前記リキッド・ハンドラー・ユニット、1つ以上の前記リザーバ、および前記インキュベーターのうちの少なくとも1つを(i)多能性細胞集団から培地を除去するように；多能性細胞とタンパク質分解酵素とを接触させるように；および多能性細胞とタンパク質分解酵素とをインキュベートさせて細胞集合を分離するように仕向けるか、または(ii)インキュベートされた多能性細胞がプロテアーゼインヒビター、好ましくはRho関連キナーゼ(ROCK)インヒビターと接触するように仕向ける、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 18】

前記装置がさらに機械的攪拌装置および吸引装置を備え、かつ前記コントローラがさらに：前記リキッド・ハンドラー・ユニット、1つ以上の前記リザーバ、および前記インキュベーターのうちの少なくとも1つを、該多能性細胞が機械的攪拌または吸引に供されるように仕向けて、細胞集合をさらに分離する、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 19】

前記リキッド・ハンドラー・ユニットが少なくとも第一のリザーバおよび第二のリザーバを備え、該第一のリザーバがTeSR培地を含み、かつ該第二のリザーバがTeSR培地、Rho関連キナーゼ(ROCK)インヒビター、およびプロテアーゼインヒビターを含む、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 20】

前記リキッド・ハンドラーが、グリッパー・ツールおよびリキッド・ハンドリング・ツールを備える、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 21】

前記リキッド・ハンドラー・ユニットと前記インキュベーターとの間の流体連絡を容易にするように構成されたロボット様デバイスをさらに備える、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 22】

前記リキッド・ハンドラー・ユニットと連絡した第二のまたはそれ以上のリザーバをさらに備え、ここで、該第二のリザーバが細胞培養プレート、細胞増殖培地、またはタンパク質分解酵素溶液を好ましくは備え、好ましくはここで該リキッド・ハンドラーが少なくとも第一のリザーバおよび第二のリザーバと連絡しており、該第一のリザーバがTeSR培地を含み、かつ該第二のリザーバがTeSR培地を含み、該培地がさらに、Rho関連キナーゼ(ROCK)インヒビターおよびプロテアーゼインヒビターを含む、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 23】

前記インキュベーターが前記多能性細胞の一部を含み、前記装置が該増殖された多能性細胞のうち少なくとも97%で該細胞のさらなる分化を伴わないかまたは本質的に伴わずに、前記多能性細胞の増殖をもたらすように構成されているか、またはここで前記多能性細胞がヒトES細胞である、請求項 15 に記載の装置。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 2 5 】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになる。しかし、詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、例示のために示されているに過ぎないことが理解されるべきである。なぜならこの詳細な説明から当業者には本発明の趣旨および範囲内の種々の変化および改変が明らかになるからである。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

規定の増殖培地条件下における多能性幹細胞の自動化増殖のための方法であって：

(a) 規定の増殖培地において多能性細胞の第一の集団を得る工程と；

(b) 自動化分離システムによって該多能性細胞を分離する工程と；

(c) 新鮮な規定の増殖培地中に該分離された細胞を懸濁して多能性細胞の増殖した集団を得る工程と、
を包含する、方法。

(項目 2)

前記多能性細胞が E S 細胞または人工多能性細胞 (i P S) である項目 1 に記載の方法

(項目 3)

前記細胞がヒト E S 細胞である、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

前記培養された増殖した多能性 E S 細胞のうち少なくとも 9 7 % で分化が全く生じないか、または本質的に生じない、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

前記増殖培地が T e S R 培地を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 6)

多能性細胞の前記第一の集団が細胞培養プレート上に含まれる、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

前記細胞培養プレートがゲル・マトリックスを含む、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

多能性細胞の前記第一の集団が細胞分離の時点で約 5 0 % コンフルエントと約 9 9 % コンフルエントとの間である、項目 6 に記載の方法。

(項目 9)

多能性細胞の前記第一の集団が細胞分離の時点で約 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % または 9 0 % コンフルエントである、項目 8 に記載の方法。

(項目 1 0)

新鮮増殖培地中の前記分離された細胞を懸濁する工程が、 1 つ以上の新規な細胞培養プレート (単数または複数) 中に該細胞を播種する工程を包含する、項目 6 に記載の方法。

(項目 1 1)

前記新規な細胞培養プレート (単数または複数) の表面積が E S 細胞の前記第一の集団を含んでいる該プレートの該表面積よりも約 5 倍と約 3 5 倍との間大きい、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 2)

前記新規な細胞培養プレート (単数または複数) の前記表面積が E S 細胞の前記第一の集団を含んでいる該プレートの該表面積よりも約 1 0 と約 3 5 倍との間大きい、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記自動化分離プロトコールが、多能性細胞の前記第一の集団とタンパク質分解酵素とを接触させる工程を包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記タンパク質分解酵素がトリプシンである、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 5)

前記タンパク質分解酵素が、組み換えトリプシン、トリプシン様プロテイナーゼ、またはTRYPLEである、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記タンパク質分解酵素が、組み換え酵素である、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記新鮮増殖培地がタンパク質分解酵素のインヒビターを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記新鮮増殖培地が細胞分離のために用いられる前記タンパク質分解酵素のインヒビターを含む、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記タンパク質分解酵素インヒビターがトリプシンインヒビターである、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記タンパク質分解酵素インヒビターがダイズトリプシンインヒビターである、項目 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記新鮮増殖培地が約 0 . 5 m g / m l のダイズトリプシンインヒビターを含む、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記分離システムがリキッド・ハンドラー・ロボットによって自動化される、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記自動化分離システムが：

(i) 前記第一の多能性細胞集団から前記培地を除去する工程と；

(i i) 該多能性細胞とタンパク質分解酵素とを接触させる工程と；

(i i i) 該細胞とタンパク質分解酵素とをインキュベートして細胞集合を分離する工程と、

を包含する、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 2 4)

タンパク質分解酵素インヒビターとR h o 関連キナーゼ (R O C K) インヒビターとを含む規定の培地が工程 (i i i) の後に溶液に添加される、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記 E S 細胞が、約 2 ～ 約 1 0 分の間前記タンパク質分解酵素とともにインキュベートされる、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 6)

前記 E S 細胞が、約 2 5 と約 4 0 との間で前記タンパク質分解酵素とともにインキュベートされる、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記 E S 細胞が、約 3 7 で前記タンパク質分解酵素とともにインキュベートされる、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記自動化分離システムがさらに：

(i v) 前記インキュベートされた細胞を機械的攪拌に供して、細胞集合をさらに分離する工程、

を包含する、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記機械的攪拌が、前記 E S 細胞を剪断力または吸引に供する工程を包含する、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記タンパク質分解酵素インヒビターを含む前記増殖培地を、該インヒビターを実質的に含まない増殖培地で置き換える工程をさらに包含する、項目 17 に記載の方法。

(項目 31)

多能性細胞の前記集団が非多能性細胞を含まないか、または実質的に含まない、項目 1 に記載の方法。

(項目 32)

多能性細胞の前記集団がヒト E S 細胞であり、ヒト E S 細胞の集団が非ヒト細胞を含まないか、または実質的に含まない、項目 31 に記載の方法。

(項目 33)

胚性幹 (E S) 細胞の自動化連続増殖のための方法としてさらに規定され：

(a) 増殖培地において E S 細胞の第一の集団を得る工程と；

(b) 自動化分離システムによって該 E S 細胞を分離する工程と；

(c) 新鮮な増殖培地中に該分離された細胞を懸濁して E S 細胞の増殖した集団を得る工程と、

(d) 細胞増殖を支持する条件下で該増殖した E S 細胞集団をインキュベートする工程と、

(e) 工程 b ~ d を 1 回以上反復して E S 細胞の連続増殖した集団を得る工程と、を包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 34)

(d) 細胞増殖を支持する条件下で前記増殖した E S 細胞集団をインキュベートする工程が、培地灌流培養で該細胞をインキュベートする工程を包含する、項目 33 に記載の方法。

(項目 35)

前記増殖培地が R h o 関連キナーゼ (R O C K) インヒビターの有効量を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 36)

前記 R h o 関連キナーゼ (R O C K) インヒビターが H A - 100 である、項目 35 に記載の方法。

(項目 37)

前記 H A - 100 が約 10 μ M の濃度で存在する、項目 36 に記載の方法。

(項目 38)

前記 R h o 関連キナーゼ (R O C K) インヒビターが H - 1135 である、項目 35 に記載の方法。

(項目 39)

前記 H - 1135 が約 1 ~ 3 μ M の濃度で存在する、項目 38 に記載の方法。

(項目 40)

多能性細胞の自動化した維持および増殖のための装置であって：

a) インキュベーター；

b) リキッド・ハンドラー・ユニット；

c) 1 つ以上のリザーバであって、i) 多能性細胞の生きている集団と、i i) 規定の培地であって、多能性細胞が未分化状態で培養および維持され得る培地である、規定の培地と、i i i) プロテアーゼ、プロテアーゼインヒビターおよび R h o 関連キナーゼ (R O C K) インヒビターのうちの 1 つ以上とを含むリザーバ；ならびに

d) 該リキッド・ハンドラー・ユニットと連絡したコントローラであって、該多能性細胞の自動化された増殖および維持を達成するように該リキッド・ハンドラー・ユニットに仕向けるように構成されている、コントローラ；

を備える、装置。

(項目 41)

前記コントローラが操作プログラムを含むコンピューター読み取り可能な媒体を備える、項目 40 に記載の装置。

(項目 4 2)

前記コントローラが：前記リキッド・ハンドラー・ユニット、1つ以上の前記リザーバ、および前記インキュベーターのうちの少なくとも1つを i) 多能性細胞集団から培地を除去するように； i i) 多能性細胞とタンパク質分解酵素とを接触させるように；および i i i) 多能性細胞とタンパク質分解酵素とをインキュベートさせて細胞集合を分離するように仕向ける、項目 4 0 に記載の装置。

(項目 4 3)

前記装置がさらに機械的攪拌装置および吸引装置を備え、かつ前記コントローラがさらに：前記リキッド・ハンドラー・ユニット、1つ以上の前記リザーバ、および前記インキュベーターのうちの少なくとも1つを、該多能性細胞が機械的攪拌または吸引に供されるように仕向けて、細胞集合をさらに分離する、項目 4 0 に記載の装置。

(項目 4 4)

前記コントローラがさらに：前記リキッド・ハンドラー・ユニット、1つ以上の前記リザーバ、および前記インキュベーターのうちの少なくとも1つを、インキュベートされた多能性細胞がプロテアーゼインヒビターと接触するように仕向ける、項目 4 0 に記載の装置。

(項目 4 5)

前記コントローラがさらに：前記リキッド・ハンドラー・ユニット、1つ以上の前記リザーバ、および前記インキュベーターのうちの少なくとも1つを、インキュベートされた多能性細胞が R h o 関連キナーゼ (R O C K) インヒビターと接触するように仕向ける、項目 4 4 に記載の装置。

(項目 4 6)

前記リキッド・ハンドラー・ユニットが少なくとも第一のリザーバおよび第二のリザーバを備え、該第一のリザーバが T e S R 培地を含み、かつ該第二のリザーバが T e S R 培地、R h o 関連キナーゼ (R O C K) インヒビター、およびプロテアーゼインヒビターを含む、項目 4 0 に記載の装置。

(項目 4 7)

前記 R h o 関連キナーゼ (R O C K) インヒビターが H - 1 1 5 2 または H - 1 0 0 である、項目 4 0 に記載の装置。

(項目 4 8)

前記多能性細胞が E S 細胞または人工多能性細胞 (i P S) である、項目 4 0 に記載の装置。

(項目 4 9)

前記リキッド・ハンドラーが、グリッパー・ツールおよびリキッド・ハンドリング・ツールを備える、項目 4 0 に記載の装置。

(項目 5 0)

前記多能性細胞がヒト E S 細胞である、項目 4 0 に記載の装置。

(項目 5 1)

前記リキッド・ハンドラー・ユニットと前記インキュベーターとの間の流体連絡を容易にするように構成されたロボット様デバイスをさらに備える、項目 4 0 に記載の装置。

(項目 5 2)

前記リキッド・ハンドラー・ユニットと連絡した第二のまたはそれ以上のリザーバをさらに備える、項目 4 0 に記載の装置。

(項目 5 3)

前記第二のリザーバが細胞培養プレート、細胞増殖培地、またはタンパク質分解酵素溶液を備える、項目 5 2 に記載の装置。

(項目 5 4)

前記リキッド・ハンドラーが少なくとも第一のリザーバおよび第二のリザーバと連絡しており、該第一のリザーバが T e S R 培地を含み、かつ該第二のリザーバが T e S R 培地を含み、該培地がさらに、R h o 関連キナーゼ (R O C K) インヒビター、およびプロテ

アーゼインヒビターを含む、項目４０に記載の装置。

（項目５５）

前記コントローラがコンピューター中に含まれる、項目４０に記載の装置。

（項目５６）

前記インキュベーターが前記多能性細胞の一部を含み、前記装置が該増殖された多能性細胞のうち少なくとも９７％で該細胞のさらなる分化を伴わないかまたは本質的に伴わずに、前記多能性細胞の増殖をもたらすように構成されている、項目４０に記載の装置。

（項目５７）

前記インキュベーターが前記多能性細胞の一部を含み、かつ前記多能性細胞がヒトＥＳ細胞である、項目４０に記載の装置。