

【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21年7月16日(2009.7.16)

【公表番号】特表2008-546406(P2008-546406A)

【公表日】平成20年12月25日(2008.12.25)

【年通号数】公開・登録公報2008-051

【出願番号】特願2008-518189(P2008-518189)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/06 (2006.01)

A 6 1 F 2/06 (2006.01)

A 6 1 L 27/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 E

A 6 1 F 2/06

A 6 1 L 27/00 Z

【手続補正書】

【提出日】平成21年5月28日(2009.5.28)

【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】

生体適合性マトリクスと植え付けられた細胞とを含む移植可能材料を貯蔵するための輸送培地組成物であり、

前記輸送培地組成物が、細胞生存率または抑制性の表現型を維持するのに十分であり、

前記細胞の標準的な細胞培養温度より低温で前記輸送培地組成物中に貯蔵されると、前記細胞が長期間生存したままであり、

該長期間とは、約 1 週間であり、

細胞生存率は、少なくとも約 80 % である、

輸送培地組成物。

【請求項 2】

前記細胞の標準的な細胞培養温度より低温において、細胞生存率または抑制性の表現型を維持するのに十分な量であり、前記細胞の標準的な細胞培養温度において必要な V E G F の量よりも多い量で、V E G F を含む、請求項 1 に記載の輸送培地組成物。

【請求項 3】

前記移植可能材料が、前記輸送培地組成物中に約 37 より低温で貯蔵される、請求項 1 に記載の輸送培地組成物。

【請求項 4】

前記移植可能材料が、前記輸送培地組成物中に周囲温度で貯蔵される、請求項 1 に記載の輸送培地組成物。

【請求項 5】

前記細胞が、貯蔵される時点で、ほぼコンフルエント、コンフルエント、またはコンフルエント後である、請求項 1 に記載の輸送培地組成物。

【請求項 6】

前記長期間が、約 2 週間である、請求項 1 に記載の輸送培地組成物。

【請求項 7】

前記長期間が、約 3 週間である、請求項 1 に記載の輸送培地組成物。

【請求項 8】

前記細胞が、内皮細胞または内皮細胞に類似する細胞である、請求項 1 に記載の輸送培地組成物。

【請求項 9】

V E G F の前記量が、約 4 n g / m L である、請求項 2 に記載の輸送培地組成物。

【請求項 10】

生体適合性マトリクスと植え付けられた細胞とを含む移植可能材料を、前記細胞の標準的な細胞培養温度よりも低温で長期間貯蔵する方法であり、前記方法が、

貯蔵中に細胞生存率または抑制性の表現型を維持するのに十分な輸送培地組成物に、前記移植可能材料を浸すステップ

を含み、前記細胞の標準的な細胞培養温度より低温で前記輸送培地組成物中に貯蔵される場合に、前記細胞が長期間生存しつづけるか抑制性の表現型を維持し、

該長期間とは、約 1 週間であり、

細胞生存率は、少なくとも約 80 % である、

方法。

【請求項 11】

前記輸送培地組成物が、前記細胞の標準的な細胞培養温度より低温で、細胞生存率または抑制性の表現型を維持するのに十分な量であり、前記細胞の標準的な細胞培養温度で必要な V E G F の量よりも多い量で、V E G F を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

輸送培地組成物の量の、移植可能材料の量に対する比率が約 50 : 1 である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記輸送培地組成物の量が約 50 m L である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記輸送培地組成物の p H が約 7 . 4 である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記移植可能材料が、約 37 より低温で前記輸送培地組成物中に貯蔵される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

前記移植可能材料が、周囲温度で前記輸送培地組成物中に貯蔵される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

前記細胞が、貯蔵される時点で、ほぼコンフルエント、コンフルエント、またはコンフルエント後である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 18】

前記長期間が約 2 週間である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 19】

前記長期間が約 3 週間である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 20】

前記細胞が、内皮細胞または内皮細胞に類似する細胞である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 21】

V E G F の前記量が、約 4 n g / m L である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 22】

可撓性の平面状基材または流動可能な生体適合性基材に対して細胞 - マトリクス間相互作用を介して付着した哺乳動物細胞集団を含む、移植可能材料であって、

該細胞集団は、対数増殖期の細胞集団ではなく、

さらに、該移植可能材料は、凍結状態である、

移植可能材料。

**【請求項 23】**

少なくとも約 30 日間凍結状態である、請求項 22 に記載の移植可能材料。

**【請求項 24】**

少なくとも約 180 日間凍結状態である、請求項 22 に記載の移植可能材料。

**【請求項 25】**

少なくとも約 365 日間凍結状態である、請求項 22 に記載の移植可能材料。

**【請求項 26】**

前記細胞集団が少なくとも約 80 % 生存している、請求項 22 ~ 25 のうちのいずれか 1 項に記載の移植可能材料。

**【請求項 27】**

請求項 22 ~ 25 のうちのいずれか 1 項に記載の移植可能材料であって、

前記細胞集団は、凍結保存されていない同様の細胞集団と同じバイオマーカーを発現し、該バイオマーカーは、ヘパラン硫酸、TGF- $\beta$ 、b-FGF、および NO からなる群より選択される、  
移植可能材料。

**【請求項 28】**

前記細胞集団により発現されるバイオマーカーが、少なくとも約 200 ng/ml/日のヘパラン硫酸を含む、請求項 27 に記載の移植可能材料。

**【請求項 29】**

前記細胞集団により発現されるバイオマーカーが、少なくとも約 300 pg/ml/日の TGF- $\beta$  をさらに含む、請求項 28 に記載の移植可能材料。

**【請求項 30】**

前記細胞集団により発現されるバイオマーカーが、約 300 pg/ml/日以下の b-FGF をさらに含む、請求項 29 に記載の移植可能材料。

**【請求項 31】**

非凍結状態へと転移する、請求項 22 に記載の移植可能材料。

**【請求項 32】**

約 7 日間まで非凍結状態である、請求項 31 に記載の移植可能材料。

**【請求項 33】**

少なくとも約 7 日間非凍結状態である、請求項 31 に記載の移植可能材料。

**【請求項 34】**

少なくとも約 21 日間非凍結状態である、請求項 31 に記載の移植可能材料。

**【請求項 35】**

少なくとも約 28 日間非凍結状態である、請求項 31 に記載の移植可能材料。

**【請求項 36】**

請求項 32 ~ 35 のうちのいずれか 1 項に記載の移植可能材料であって、

前記細胞集団は、凍結保存されていない同様の細胞集団と同じバイオマーカーを発現し、該バイオマーカーは、ヘパラン硫酸、TGF- $\beta$ 、b-FGF、および NO からなる群より選択される、  
移植可能材料。

**【請求項 37】**

前記細胞集団により発現されるバイオマーカーが、少なくとも約 200 ng/ml/日のヘパラン硫酸を含む、請求項 36 に記載の移植可能材料。

**【請求項 38】**

前記細胞集団により発現されるバイオマーカーが、少なくとも約 300 pg/ml/日の TGF- $\beta$  をさらに含む、請求項 37 に記載の移植可能材料。

**【請求項 39】**

前記細胞集団により発現されるバイオマーカーが、約 300 pg/ml/日以下の b-FGF をさらに含む、請求項 38 に記載の移植可能材料。

**【請求項 40】**

前記細胞集団が少なくとも約 80 % 生存している、請求項 32 ~ 36 のうちのいずれか 1 項に記載の移植可能材料。

【請求項 41】

約 37 においてかまたは約 37 未満で貯蔵される、請求項 32 ~ 36 のうちのいずれか 1 項に記載の移植可能材料。

【請求項 42】

約 15 ~ 約 25 で貯蔵される、請求項 32 ~ 36 のうちのいずれか 1 項に記載の移植可能材料。

【請求項 43】

前記細胞集団が固定されていない、請求項 22 または 31 に記載の移植可能材料。

【請求項 44】

前記生体適合性基材が固体形態または非固体形態である、請求項 22 に記載の移植可能材料。

【請求項 45】

請求項 31 に記載の移植可能材料であって、該材料は、以前のその凍結した形態を保持する、移植可能材料。

【請求項 46】

前記細胞集団が、内皮細胞、内皮様細胞、非内皮細胞、幹細胞、およびこれらのうちのいずれか 1 つの機能的等価物からなる群より選択される、請求項 22 に記載の移植可能材料。

【請求項 47】

可撓性の平面状基材または流動可能な生体適合性基材に対して細胞 - マトリクス間相互作用を介して付着した哺乳動物細胞集団を含む、移植可能材料であって、

該細胞集団は、阻害性表現型を示し、

該阻害性表現型は、少なくとも約 200 ng / ml / 日のヘパラン硫酸の発現、少なくとも約 300 pg / ml / 日の TGF の発現、約 300 pg / ml / 日以下の b - FGF の発現からなる群より選択され、

さらに、該移植可能材料は、凍結状態である、移植可能材料。

【請求項 48】

処置のための組成物であって、

請求項 22 に記載の移植可能材料

を含み、該組成物は、処置を必要とする患者中に非凍結状態で移植されることを特徴とする、組成物。

【請求項 49】

非凍結状態が達成された後、約 1 週間 ~ 約 1 ヶ月間にわたり移植されることを特徴とする、請求項 48 に記載の組成物。

【請求項 50】

非凍結状態が達成された後、約 1 週間 ~ 約 1 年間にわたり移植されることを特徴とする、請求項 48 に記載の組成物。

【請求項 51】

凍結保存される移植可能材料であって、

ほぼコンフルエントな細胞集団、コンフルエントな細胞集団、またはコンフルエント後の細胞集団を植え付けられた、生体適合性マトリクス；ならびに

マトリクスの完全性と、少なくとも約 80 % の細胞生存率と、少なくとも約 200 ng / ml / 日のヘパラン硫酸産生、少なくとも約 300 pg / ml / 日の TGF 産生、および約 300 pg / ml / 日以下の b - FGF 産生を含む表現型とを維持しながら、約 - 4 以下の温度にて少なくとも約 30 日間という長期間にわたり凍結保存されるために十分な体積の、凍結保存培地；

を含む、移植可能材料。

**【請求項 5 2】**

請求項 5 1 に記載の凍結保存される移植可能材料であって、該材料は、約 - 2 0 以下の温度で凍結保存される、移植可能材料。

**【請求項 5 3】**

請求項 5 1 に記載の凍結保存される移植可能材料であって、該材料は、約 - 8 0 以下の温度で凍結保存される、移植可能材料。

**【請求項 5 4】**

請求項 5 1 に記載の凍結保存される移植可能材料であって、該材料は、約 - 1 4 0 以下の温度で凍結保存される、移植可能材料。

**【請求項 5 5】**

請求項 5 1 に記載の凍結保存される移植可能材料であって、該材料は、約 1 8 0 日間以下という長期間にわたり凍結保存される、移植可能材料。

**【請求項 5 6】**

請求項 5 1 に記載の凍結保存される移植可能材料であって、該材料は、約 3 6 5 日間以下という長期間にわたり凍結保存される、移植可能材料。

**【請求項 5 7】**

請求項 5 1 に記載の凍結保存される移植可能材料であって、該材料は、少なくとも約 3 6 5 日間という長期間にわたり凍結保存される、移植可能材料。

**【請求項 5 8】**

請求項 5 1 に記載の凍結保存される移植可能材料であって、前記細胞は、内皮細胞、内皮様細胞、またはそれらのアナログを含む、移植可能材料。

**【請求項 5 9】**

請求項 5 1 に記載の凍結保存される移植可能材料であって、前記細胞は、幹細胞を含む、移植可能材料。

**【請求項 6 0】**

細胞と生体適合性マトリクスとを含む移植可能材料を製造する方法であって、該方法は、  
該生体適合性マトリクスと該細胞とを接触させるために適した条件および試薬を使用し、  
該生体適合性マトリクスと該細胞とを接触させる工程；  
を包含し、

該細胞は、該マトリクスへと集団を形成してほぼコンフルエントな集団、コンフルエントな集団、またはコンフルエント後の集団へと増殖するのに十分な量であり、

さらに、該マトリクスは、細胞型非依存性であり、適合性を試験していない、マッチングしていない細胞と、集団を形成される、  
方法。

**【請求項 6 1】**

処置のための組成物であって、

請求項 6 0 に記載の方法に従って製造された移植可能材料  
を含む、組成物。

**【請求項 6 2】**

細胞と、

請求項 6 0 に記載の方法に従って製造された生体適合性マトリクスと  
を含む、移植可能材料。

**【請求項 6 3】**

非対数増殖期の内皮細胞を植え付けられた生体適合マトリクスと、  
凍結保存培地と、

を含む、凍結保存組成物。

**【請求項 6 4】**

前記細胞が、ほぼコンフルエントな細胞集団、コンフルエントな細胞集団、またはコンフルエント後の細胞集団である、請求項 6 3 に記載の組成物。

**【請求項 6 5】**

前記凍結保存培地が、凍結保存剤、多糖類、および規定された血清を含む、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 6 6】

前記低温保存培地が、C r y o S t o r C S - 1 0 溶液である、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 6 7】

前記多糖類がデキストランである、請求項 6 5 に記載の組成物。

【請求項 6 8】

前記血清がウシ胎仔血清 ( F B S ) である、請求項 6 5 に記載の組成物。

【請求項 6 9】

前記生体適合性マトリクスが、ゲル、発泡体、懸濁物、粒子、マイクロキャリア、マイクロカプセル、または繊維構造体である、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 7 0】

生体適合性粒子の懸濁物である、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 7 1】

前記生体適合性マトリクスが可撓性平面形態である、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 7 2】

前記可撓性平面形態の寸法が、 $1\text{ cm} \times 4\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$  ( $1.2\text{ cm}^3$ ) である、請求項 7 1 に記載の組成物。

【請求項 7 3】

前記生体適合性マトリクスが、フィブリン、アルギン酸塩、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム、デキストラン、P L A / P G A、p H E M A / M M A 共重合体、コラーゲン、またはゼラチンを含む、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 7 4】

前記ゼラチンが、G e l f o a m (登録商標) 粒子の形態、G e l f o a m (登録商標) 粉末の形態、または粉砕された G e l f o a m (登録商標) の形態である、請求項 7 3 に記載の組成物。

【請求項 7 5】

前記細胞が、ほぼコンフルエントな細胞集団、コンフルエントな細胞集団、またはコンフルエント後の細胞集団からなる群より選択される、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 7 6】

前記細胞が脈管内皮細胞である、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 7 7】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 7 8】

前記低温保存溶液が生理食塩水で洗い流された、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 7 9】

請求項 6 3 に記載の組成物であって、前記細胞は、解凍された場合に、適切なレベルのヘパラン硫酸、トランスフォーミング増殖因子 1、および塩基性線維芽細胞増殖因子を産生する、組成物。

【請求項 8 0】

クリオバイアル中に含まれた、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 8 1】

約 - 4 ~ 約 - 1 6 0 の範囲の温度で維持される、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 8 2】

約 - 2 0 ~ 約 - 8 0 の範囲の温度で維持される、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 8 3】

処置のための医薬の製造における請求項 2 2 に記載の移植可能材料の使用であって、該医薬は、処置を必要とする患者中に非凍結状態で移植されることを特徴とする、使用。

**【請求項 8 4】**

非凍結状態が達成された後、約 1 週間～約 1 ヶ月間にわたり移植されることを特徴とする、請求項 8 3 に記載の使用。

**【請求項 8 5】**

非凍結状態が達成された後、約 1 週間～約 1 年間にわたり移植されることを特徴とする、請求項 8 3 に記載の使用。

**【請求項 8 6】**

請求項 6 0 に記載の方法によって製造された移植可能材料の、処置のための医薬の製造における、使用。