

【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7年6月17日(2025.6.17)

【国際公開番号】WO2022/270569
 【出願番号】特願2023-530110(P2023-530110)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 5/07(2010.01)
 C 1 2 N 1/00(2006.01)
 C 1 2 N 1/08(2006.01)
 C 0 7 K 14/47(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 5/07 Z N A
 C 1 2 N 1/00 K
 C 1 2 N 1/08
 C 0 7 K 14/47

【手続補正書】

【提出日】令和7年6月9日(2025.6.9)

【手続補正1】

20

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

培養細胞構造体は、限定されるものではないが、好ましくは細胞外マトリックスによって接着している。細胞外マトリックスに接着していることにより、培養細胞構造体は一定の強度を得ることができる。細胞外マトリックスとしては、例えばコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、コンドロイチン硫酸、ヘパリン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸などが挙げられるが、細胞の種類によっても異なるものであり、特に限定されるものではない。

30

【手続補正2】

【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】

前記高静水圧処理された細胞構造体は、洗浄液で洗浄する。洗浄液は、高静水圧処理の媒体と同じでもよいし異なってもよい。洗浄液は、有機溶媒又はキレート剤を含有することが好ましい。有機溶媒は脂質の除去効率を向上させることができ、キレート剤は、脱細胞化細胞構造体中のカルシウムイオンやマグネシウムイオンを不活性化することにより、本発明の粒子化脱細胞化細胞構造体を疾患部に適用した場合の石灰化を防ぐことができる。有機溶剤としては、脂質の除去効果が高いことから、水溶性の有機溶剤が好ましく、エタノール、イソプロパノール、アセトン、ジメチルスルホキシドが好ましい。キレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ニトリロ三酢酸(NTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸(HEDTA)、トリエチレントトラミン六酢酸(TTHA)、1,3-プロパンジアミン四酢酸(PDPA)、1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン四酢酸(DPTA-OH)、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸(HIDA)、ジヒドロキシエチルグリシン(DHEG)、グリコールエーテルジアミン四酢酸(GEDTA)、ジカルボキシメチルグルタミン

40

50

酸 (CMGA)、3-ヒドロキシ-2,2'-イミノジコハク酸 (HIDA)、ジカルボキシメチルアスパラギン酸 (ASDA) 等のイミノカルボン酸系キレート剤又はその塩；クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、乳酸等のヒドロキシカルボン酸系キレート剤又はその塩が挙げられ、これらのキレート剤の塩としては、ナトリウム塩又はカリウム塩が挙げられる。

洗浄温度は、熱による細胞構造体へのダメージがない温度であれば、特に限定されないが、洗浄性が良好で細胞構造体への影響も少ないことから 0 ~ 45 が好ましく、1 ~ 40 が更に好ましく、2 ~ 35 が最も好ましい。洗浄する場合には、必要に応じて、洗浄液を振盪又は攪拌してもよい。

【手続補正 3】

10

【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】

《脱細胞化 DNA 比の算出》

実施例 1 ~ 4 及び比較例 1 の脱細胞化細胞構造体の質量を測定し、これをサンプルとし、タンパク質分解酵素溶液に浸漬して溶解した後、フェノール/クロロホルムで処理してタンパク質を除去し、DNA を回収した。回収した DNA をピコグリーン (Life Technologies 社) により蛍光染色して蛍光強度を測定することにより DNA を定量し、サンプルの質量と DNA の量から、サンプルの DNA 含量を算出した。なお、DNA の定量には、ピコグリーンに添付された標準 DNA を用いて作成した検量線を用いた。別のサンプルを用いて、サンプルの質量 (水分量 70%) と乾燥したサンプル (60 の恒温槽に 12 時間保存したもの) の質量とから、乾燥減量比を求め、サンプルの DNA 含量と乾燥減量比から、サンプルの乾燥質量あたりの DNA 含量を算出した。結果を表 1 に示す。

20

(脱細胞化 DNA 比) = (脱細胞化細胞構造体の乾燥試験片の DNA 含量) / (脱細胞化細胞構造体の乾燥試験片の質量)

【手続補正 4】

30

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0064】

《タンパク質の解析》

前記実施例 1 の脱細胞化細胞構造体及び比較例 1 の脱細胞化細胞構造体の組成の違いを、二次元電気泳動で解析した。

実施例及び比較例の脱細胞化細胞構造体に、タンパク質溶解溶液 (尿素及び界面活性剤含有) を 0.3 mL 添加し、室温下で 1,400 rpm で 2 時間振とうした。ポリトロン型ホモジナイザーでホモジナイズした後、20,000 X g で 30 分間室温で遠心し上清を回収した。2-D Clean-Up Kit (cytiva、グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社) を用いてサンプル溶液の精製を行った。その後、タンパク質定量、電気伝導度測定を行って測定値が二次元電気泳動実施許容内にあることを確認し、二次元電気泳動用試料とした。

40

二次元電気泳動用試料に緩衝液を加えた後、タンパク質溶解溶液 (尿素及び界面活性剤含有) を加えて総量を 0.34 mL に調製し試料溶液とした。膨潤用トレイに試料溶液を入れ、一次元目電気泳動プレキャストゲル (Immobiline Dry Strip、cvtiva、グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社) を溶液の上に被せた。更にドライストリップカバー液 (Plus One Dry Strip Cover Fluid、cvtiva、グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社) を

50

重層して一晚静置した。膨潤したプレキャストゲルを電気泳動装置 (MultiPhor I I Electrophoresis Unit, c y t i v a、グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社) にセットし、泳動した (500Vで1分、3500Vで7.5時間、20)。

10 ~ 20%の濃度勾配を有するアクリルアミドゲルを使用した。作製後24時間静置し、アクリルアミドを完全に重合させた。平衡化した一次元目電気泳動プレキャストゲルをアクリルアミドゲルに載せ、0.125%プロモフェノールブルー入り1%アガロース溶液で固定した。ゲル左端に分子量マーカーをアプライし、分子量のスタンダードとした。80Vで17時間、プロモフェノールブルーのバンドがゲル下端に見えるまで泳動した。

10

【手続補正5】

【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】

《タンパク質染色》

泳動後のゲルは、全タンパク質検出用蛍光染色剤 (SYPRO Ruby protein gel stain, S21900, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて染色し、蛍光スキャナを用いてイメージを保存した。スキャナによる画像の取り込みは、励起波長: 488nm、蛍光フィルタ: 640nm Bandpass、解像度: 100micrometerで行った。

20

得られた蛍光染色像の t i f f イメージファイルを ImageMaster Platinum (c y t i v a、グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社) にインポートし、数値化解析を行った。数値化解析においては、まずゲルの共通スポットにマニュアルでランドマークを付けた。ゲルあたり340スポットまでランドマーク付与作業を行った後、ゲルのマッチングを行った。当該作業により、2枚のゲル (実施例1をアプライしたゲル及び比較例1をアプライしたゲル) 上で展開されたスポットに共通のスポットIDが与えられた。その後、ゲルのスポット検出を行い、スポットシグナル濃度 (% Volume) を算出した。

30

スポットシグナル濃度は、ゲル内の全スポットのシグナルの総和に対して、スポットのシグナルが占める割合から算出した。% Volume 値は百分率表示とし、最小表示は0.001%とした。

下記2条件に該当するスポットを、タンパク質同定の条件とした。

・SYPRO Ruby 染色像のスポットシグナル濃度の合計 (2枚ずつ組み合わせた際のゲル同士の和) が、0.1以上であること。

・スポットの濃度変化量 (2枚ずつ組み合わせた際のゲル間の変化量) が、0.5倍以下または2倍以上であること。

二次元電気泳動の結果を図5に示す。実施例1は、等電点 pI 4.00 ~ 4.90、分子量 45,000 ~ 53,000 あたりに、1つのスポット (1) が検出された。これに対し、比較例1は、実施例1で検出されたスポットは検出されなかった。実施例1は、比較例1にはない特定のタンパク質を含有していることがわかった。

40