

【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31年2月14日(2019.2.14)

【公表番号】特表2018-502576(P2018-502576A)

【公表日】平成30年2月1日(2018.2.1)

【年通号数】公開・登録公報2018-004

【出願番号】特願2017-535834(P2017-535834)

【国際特許分類】

C 12 N 5/071 (2010.01)

C 12 N 5/0735 (2010.01)

A 61 K 35/36 (2015.01)

A 61 K 35/545 (2015.01)

A 61 P 27/02 (2006.01)

A 61 P 43/00 (2006.01)

【F I】

C 12 N 5/071

C 12 N 5/0735

A 61 K 35/36

A 61 K 35/545

A 61 P 27/02

A 61 P 43/00 107

【手続補正書】

【提出日】平成31年1月4日(2019.1.4)

【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】

ヒト多角網膜色素上皮(RPE)細胞の集団であって、それらの細胞の少なくとも95%がブレメラノソームタンパク質(PMEL17)と細胞レチンアルデヒド結合タンパク質(CRALBP)とを同時発現し、該細胞の集団の経上皮電気抵抗が100オームより大きい、ヒト多角RPE細胞の集団。

【請求項2】

ヒト網膜色素上皮(RPE)細胞の集団であって、それらの細胞の少なくとも80%がブレメラノソームタンパク質(PMEL17)と細胞レチンアルデヒド結合タンパク質(CRALBP)とを同時発現し、かつ該集団内の細胞が、アンジオゲニン、組織メタロプロテアーゼ阻害物質2(TIMP2)、可溶性糖タンパク質130(sgp130)、および可溶型腫瘍壞死因子 遍在性膜受容体1(sTNF-R1)のそれぞれを分泌する、ヒトRPE細胞の集団。

【請求項3】

前記集団内の細胞が、アンジオゲニン、組織メタロプロテアーゼ阻害物質2(TIMP2)、可溶性糖タンパク質130(sgp130)、および可溶型腫瘍壞死因子 遍在性膜受容体1(sTNF-R1)のそれぞれを分泌する、請求項1に記載の細胞集団。

【請求項4】

前記細胞が、前記アンジオゲニン、前記TIMP2、前記sgp130、または前記sTNF-R1を活性化様式で分泌する、請求項2または3に記載の細胞集団。

【請求項5】

sgp130の基底側分泌に対するsgp130の頂端側分泌の比が1より大きい、請求項4に記載の細胞集団。

【請求項6】

アンジオゲニンの頂端側分泌に対するアンジオゲニンの基底側分泌の比が1より大きい、請求項4に記載の細胞集団。

【請求項7】

TIMP2の基底側分泌に対するTIMP2の頂端側分泌の比が1より大きい、請求項4に記載の細胞集団。

【請求項8】

前記集団中のOct4<sup>+</sup>TRA-1-60<sup>+</sup>細胞の数が1:250,000を下回る、請求項1または2に記載の細胞集団。

【請求項9】

(i) 免疫染色によって測定された場合に、前記細胞の少なくとも80%がベストロフィン1(Bestrophin 1)を発現する、

(ii) 免疫染色によって測定された場合に、前記細胞の少なくとも80%は小眼球症関連転写因子(MITF)を発現する、

(iii) FACSによって測定された場合に、前記細胞の50%超がペアードボックス遺伝子6(PAX-6)を発現する、

(iv) 前記細胞が、1日につき1mlあたり750ng超の色素上皮由来因子(PEDF)を分泌する、および/または

(v) PEDFの基底側分泌に対するPEDFの頂端側分泌の比が1より大きい、請求項1~8のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項10】

前記細胞の集団の経上皮電気抵抗が100オームより大きい、請求項2に記載の細胞集団。

【請求項11】

(a)分化細胞を生成するように、ヒト胚性幹細胞を、ニコチニアミドを含みアクチビンAを欠如している培地中で培養する段階；

(b)RPE系列にさらに分化している細胞を生成するように、該分化細胞を、ニコチニアミドおよびアクチビンAを含む培地中で培養する段階；ならびに

(c)該RPE系列にさらに分化している細胞を、ニコチニアミドを含みアクチビンAを欠如している培地中で培養する段階

によって作製された、請求項1~10のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項12】

段階(a)~(c)が、大気酸素レベルが約10%未満の条件下において行われる、請求項11に記載の細胞集団。

【請求項13】

活性物質としての請求項1~12のいずれか一項に記載の細胞集団と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項14】

網膜変性を処置するための、請求項1~12のいずれか一項に記載の細胞集団を含む、薬学的組成物。

【請求項15】

(a)分化細胞を生成するように、多能性幹細胞を、分化物質を含みトランスフォーミング成長因子(TGF )スーパーファミリーのメンバーを欠如している培地中で培養する段階；

(b)網膜色素上皮(RPE)系列にさらに分化している細胞を生成するように、該分化細胞を、該トランスフォーミング成長因子(TGF )スーパーファミリーのメンバーおよび該分化物質を含む培地中で培養する段階；および

(c)RPE細胞を生成するように、該RPE系列にさらに分化している細胞を、分化物質を含みトランスフォーミング成長因子(TGF )スーパーファミリーのメンバーを欠如してい

る培地中に培養する段階

を含む、RPE細胞を作製する方法であって、

段階(a)～(c)が、大気酸素レベルが約10%未満の条件下において行われる、方法。

【請求項 16】

段階(a)が、

(i)分化細胞を含む細胞のクラスターを生成するように、培養されるヒト多能性幹細胞の集団を、ニコチニアミドを含む培地中で、アクチビンAの非存在下で非付着条件下において培養する段階、および、その後に、

(ii)(i)の分化細胞を、ニコチニアミドを含む培地中で、アクチビンAの非存在下で付着条件下において培養する段階

を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

段階(c)の後に、分化した前記細胞を、分化物質の存在下で大気酸素レベルが約10%を超える条件下において培地中で培養する段階をさらに含む、請求項15または16に記載の方法。

【請求項 18】

前記トランスフォーミング成長因子(TGF )スーパーファミリーのメンバーが、TGF 1、TGF 3、およびアクチビンAからなる群より選択される、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

段階(c)の後に、多角細胞を選択する段階をさらに含む、請求項15または16に記載の方法。

【請求項 20】

前記多能性幹細胞が胚性幹細胞を含み、かつ該胚性幹細胞が、bFGFおよびTGF を含む培地中で増殖される、請求項16に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

本発明の一部の態様の一局面によれば、ヒトRPE細胞の集団であって、それらの細胞の少なくとも80%がプレメラノソームタンパク質(PMEL17)と細胞レチンアルデヒド結合タンパク質(CRALBP)とを同時発現し、かつ集団内の細胞が、アンジオゲニン、組織メタロプロテアーゼ阻害物質2(TIMP2)、可溶性糖タンパク質130(sgp130)、および可溶型腫瘍壞死因子 遍在性膜受容体1(sTNF-R1)のそれぞれを分泌する、ヒトRPE細胞の集団が提供される。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

本発明の態様によれば、前記集団内の細胞は、アンジオゲニン、組織メタロプロテアーゼ阻害物質2(TIMP2)、可溶性糖タンパク質130(sgp130)、および可溶型腫瘍壞死因子 遍在性膜受容体1(sTNF-R1)のそれぞれを分泌する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0170

【補正方法】変更

**【補正の内容】****【0170】**

別の局面によれば、前記細胞集団内の細胞の少なくとも80%はプレメラノソームタンパク質(PMEL17)と細胞レチナルデヒド結合タンパク質(CRALBP)とを同時発現し、さらに、前記細胞の一部(少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%)は、アンジオゲニン、組織メタロプロテアーゼ阻害物質2(TIMP2)、可溶性糖タンパク質130(sgp130)、および可溶型腫瘍壞死因子遍在性膜受容体1(sTNF-R1)のそれぞれを分泌/放出する。

**【手続補正5】****【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0171****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0171】**

場合によっては、プレメラノソームタンパク質(PMEL17)と細胞レチナルデヒド結合タンパク質(CRALBP)とを同時発現する細胞は全て、アンジオゲニン、組織メタロプロテアーゼ阻害物質2(TIMP2)、可溶性糖タンパク質130(sgp130)、および可溶型腫瘍壞死因子遍在性膜受容体1(sTNF-R1)も分泌/放出することが理解されるだろう。

**【手続補正6】****【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0172****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0172】**

他の場合、プレメラノソームタンパク質(PMEL17)と細胞レチナルデヒド結合タンパク質(CRALBP)とを同時発現する細胞の大多数(50%、60%、70%、80、90%超)は、アンジオゲニン、組織メタロプロテアーゼ阻害物質2(TIMP2)、可溶性糖タンパク質130(sgp130)、および可溶型腫瘍壞死因子遍在性膜受容体1(sTNF-R1)も分泌/放出する。

**【手続補正7】****【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0055****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0055】****[本発明1001]**

ヒト多角RPE細胞の集団であって、それらの細胞の少なくとも95%がプレメラノソームタンパク質(PMEL17)と細胞レチナルデヒド結合タンパク質(CRALBP)とを同時発現し、該細胞の集団の経上皮電気抵抗が100オームより大きい、ヒト多角RPE細胞の集団。

**[本発明1002]**

ヒトRPE細胞の集団であって、それらの細胞の少なくとも80%がプレメラノソームタンパク質(PMEL17)と細胞レチナルデヒド結合タンパク質(CRALBP)とを同時発現し、かつ該集団内の細胞が、アンジオゲニン、組織メタロプロテアーゼ阻害物質2(TIMP2)、可溶性糖タンパク質130(sgp130)、および可溶型腫瘍壞死因子遍在性膜受容体1(sTNF-R1)のそれぞれを分泌する、ヒトRPE細胞の集団。

**[本発明1003]**

前記集団内の細胞が、アンジオゲニン、組織メタロプロテアーゼ阻害物質2(TIMP2)、可溶性糖タンパク質130(sgp130)、および可溶型腫瘍壞死因子遍在性膜受容体1(sTNF-R1)のそれぞれを分泌する、本発明1001の細胞集団。

**[本発明1004]**

前記細胞が、前記アンジオゲニン、前記TIMP2、前記sgp130、または前記sTNF-R1を極性

化様式で分泌する、本発明1002または1003の細胞集団。

[本発明1005]

前記細胞が、前記アンジオゲニン、前記TIMP2、前記sgp130、および前記sTNF-R1のそれを極性化様式で分泌する、本発明1002または1003の細胞集団。

[本発明1006]

sgp130の基底側分泌に対するsgp130の頂端側分泌の比が1より大きい、本発明1004または1005の細胞集団。

[本発明1007]

sTNF-R1の基底側分泌に対するsTNF-R1の頂端側分泌の比が1より大きい、本発明1004または1005の細胞集団。

[本発明1008]

アンジオゲニンの頂端側分泌に対するアンジオゲニンの基底側分泌の比が1より大きい、本発明1004または1005の細胞集団。

[本発明1009]

TIMP2の基底側分泌に対するTIMP2の頂端側分泌の比が1より大きい、本発明1004または1005の細胞集団。

[本発明1010]

前記集団中のOct4<sup>+</sup>TRA-1-60<sup>+</sup>細胞の数が1:250,000を下回る、本発明1001または1002の細胞集団。

[本発明1011]

免疫染色によって測定された場合に、前記細胞の少なくとも80%がベストロフィン1(Berstrophin 1)を発現する、本発明1001～1010のいずれかの細胞集団。

[本発明1012]

免疫染色によって測定された場合に、前記細胞の少なくとも80%が小眼球症関連転写因子(MITF)を発現する、本発明1001～1011のいずれかの細胞集団。

[本発明1013]

FACSによって測定された場合に、前記細胞の50%超がペードボックス遺伝子6(PAX-6)を発現する、本発明1001～1012のいずれかの細胞集団。

[本発明1014]

前記細胞が、1日につき1mlあたり750ng超の色素上皮由来因子(PEDF)を分泌する、本発明1001～1013のいずれかの細胞集団。

[本発明1015]

前記細胞がPEDFおよび血管内皮増殖因子(VEGF)を極性化様式で分泌する、本発明1001～1014のいずれかの細胞集団。

[本発明1016]

PEDFの基底側分泌に対するPEDFの頂端側分泌の比が1より大きい、本発明1015の細胞集団。

[本発明1017]

2～8における8時間のインキュベーション後に、前記比が依然として1より大きい、本発明1016の細胞集団。

[本発明1018]

前記細胞の集団の経上皮電気抵抗が100オームより大きい、本発明1002の細胞集団。

[本発明1019]

2～8における8時間のインキュベーション後に、前記細胞の前記経上皮電気抵抗が依然として100オームより大きい、本発明1001または1018の細胞集団。

[本発明1020]

VEGFの頂端側分泌に対するVEGFの基底側分泌の比が1より大きい、本発明1015または1016の細胞集団。

[本発明1021]

2～8における8時間のインキュベーション後に、前記比が依然として1より大きい、本

発明1020の細胞集団。

[本発明1022]

網膜下投与後にRCSラットにおける視力をレスキューすることができる、本発明1001～1021のいずれかの細胞集団。

[本発明1023]

RCSラットにおいて網膜下投与後少なくとも180日間にわたって光受容体をレスキューすることができる、本発明1001～1021のいずれかの細胞集団。

[本発明1024]

ヒト胚性幹細胞のエクスピボ分化によって作製された、本発明1001～1023のいずれかの細胞集団。

[本発明1025]

(a)分化細胞を生成するように、ヒト胚性幹細胞を、ニコチニアミドを含みアクチビンAを欠如している培地中で培養する段階；

(b)RPE系列にさらに分化している細胞を生成するように、該分化細胞を、ニコチニアミドおよびアクチビンAを含む培地中で培養する段階；ならびに

(c)該RPE系列にさらに分化している細胞を、ニコチニアミドを含みアクチビンAを欠如している培地中で培養する段階

によって作製された、本発明1001～1024のいずれかの細胞集団。

[本発明1026]

前記胚性幹細胞が、bFGFおよびTGF を含む培地中で増殖される、本発明1025の細胞集団。

[本発明1027]

前記胚性幹細胞がヒト帯線維芽細胞上で培養される、本発明1025の細胞集団。

[本発明1028]

段階(a)～(c)が、大気酸素レベルが約10%未満の条件下において行われる、本発明1025～1027のいずれかの細胞集団。

[本発明1029]

段階(c)の後に、分化した前記細胞を、ニコチニアミドの存在下で大気酸素レベルが約10%を超える条件下において培地中で培養する段階をさらに含む、本発明1028の細胞集団。

[本発明1030]

活性物質としての本発明1001～1029のいずれかの細胞集団と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

[本発明1031]

網膜変性を処置するための、本発明1001～1030のいずれかの細胞集団の使用。

[本発明1032]

(a)分化細胞を生成するように、多能性幹細胞を、分化物質を含みトランスフォーミング成長因子(TGF )スーパーファミリーのメンバーを欠如している培地中で培養する段階；

(b)RPE系列にさらに分化している細胞を生成するように、該分化細胞を、該トランスフォーミング成長因子(TGF )スーパーファミリーのメンバーおよび該分化物質を含む培地中で培養する段階；

(c)RPE細胞を生成するように、該RPE系列にさらに分化している細胞を、分化物質を含みトランスフォーミング成長因子(TGF )スーパーファミリーのメンバーを欠如している培地中で培養する段階

を含む、RPE細胞を作製する方法であって、

段階(a)～(c)が、大気酸素レベルが約10%未満の条件下において行われる、方法。

[本発明1033]

段階(a)が非付着条件下において行われる、本発明1032の方法。

[本発明1034]

前記非付着条件が非付着性培養プレートを含む、本発明1033の方法。

[本発明1035]

段階(a)が、

(i)分化細胞を含む細胞のクラスターを生成するように、培養されるヒト多能性幹細胞の集団を、ニコチニアミドを含む培地中で、アクチビンAの非存在下で非付着条件下において培養する段階、および、その後に、

(ii)(i)の分化細胞を、ニコチニアミドを含む培地中で、アクチビンAの非存在下で付着条件下において培養する段階  
を含む、本発明1032の方法。

[本発明1036]

段階(ii)の前に前記細胞のクラスターを解離して、細胞の凝集塊または細胞の単一細胞懸濁液を作製する段階をさらに含む、本発明1035の方法。

[本発明1037]

段階(c)の後に、分化した前記細胞を、分化物質の存在下で大気酸素レベルが約10%を超える条件下において培地中で培養する段階をさらに含む、本発明1032の方法。

[本発明1038]

前記トランスフォーミング成長因子(TGF )スーパーファミリーのメンバーが、TGF 1、TGF 3、およびアクチビンAからなる群より選択される、本発明1032の方法。

[本発明1039]

段階(a)の分化物質および段階(c)の分化物質が同一である、本発明1032の方法。

[本発明1040]

段階(a)の分化物質がニコチニアミド(NA)または3-アミノベンズアミドである、本発明1032の方法。

[本発明1041]

段階(c)の後に、多角細胞を選択する段階をさらに含む、本発明1032の方法。

[本発明1042]

前記多角細胞を増殖させる段階をさらに含む、本発明1041の方法。

[本発明1043]

前記増殖させる段階が付着性表面上で行われる、本発明1042の方法。

[本発明1044]

前記多能性幹細胞が胚性幹細胞を含む、本発明1032の方法。

[本発明1045]

前記胚性幹細胞が、bFGFおよびTGF を含む培地中で増殖される、本発明1044の方法。

[本発明1046]

前記胚性幹細胞がヒト帯線維芽細胞上で培養される、本発明1044の方法。

特に定義のない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語は全て、本発明が属する当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様のまたは等価な方法および材料を本発明の態様の実施または試験において使用することができるが、例示的な方法および/または材料を下記で説明する。矛盾する場合は、定義を含む本明細書が優先される。さらに、材料、方法、および実施例は例示にすぎず、必ず限定することが意図されない。