

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-502575

(P2018-502575A)

(43) 公表日 平成30年2月1日(2018.2.1)

(51) Int.Cl.

**C 12 Q 1/04 (2006.01)**  
**C 12 N 5/0735 (2010.01)**  
**G 01 N 33/50 (2006.01)**  
**G 01 N 33/53 (2006.01)**  
**G 01 N 33/48 (2006.01)**

F 1

C 12 Q 1/04  
C 12 N 5/0735  
G 01 N 33/50  
G 01 N 33/53  
G 01 N 33/48

テーマコード(参考)

2 G 04 5  
4 B 06 3  
4 B 06 5  
D  
P

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-535832 (P2017-535832)  
(86) (22) 出願日 平成27年12月30日 (2015.12.30)  
(85) 翻訳文提出日 平成29年8月22日 (2017.8.22)  
(86) 國際出願番号 PCT/IL2015/051270  
(87) 國際公開番号 WO2016/108240  
(87) 國際公開日 平成28年7月7日 (2016.7.7)  
(31) 優先権主張番号 62/097,753  
(32) 優先日 平成26年12月30日 (2014.12.30)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 62/116,980  
(32) 優先日 平成27年2月17日 (2015.2.17)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 62/195,304  
(32) 優先日 平成27年7月22日 (2015.7.22)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 517230275  
セル キュア ニューロサイエンシズ リ  
ミテッド  
イスラエル国 9112102 エルサレ  
ム ピー. オー. ボックス 12247  
(74) 代理人 100102978  
弁理士 清水 初志  
(74) 代理人 100102118  
弁理士 春名 雅夫  
(74) 代理人 100160923  
弁理士 山口 裕幸  
(74) 代理人 100119507  
弁理士 刑部 俊  
(74) 代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

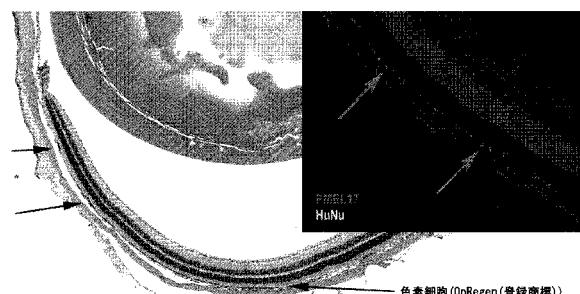
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】網膜色素上皮細胞集団の評価法

## (57) 【要約】

細胞集団が眼異常を処置するための適切な治療用物質(therapeutic)であるかどうか適格性を判定する方法が開示される。本方法は、細胞の該集団における、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)、レシチンレチノールアシルトランスフェラーゼ(LRAT)、および性決定領域Y-ボックス9(SOX9)からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドの同時発現を分析する段階を含む。

FIG. 27A



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞集団が眼異常を処置するための適切な治療用物質(therapeutic)であるかどうか適格性を判定する方法であって、

該方法が、細胞の該集団における、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)、レシチンレチノールアシルトランスフェラーゼ(L-RAT)、および性決定領域Y-ボックス9(SOX9)からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドの同時発現を分析する段階を含み、該PMEL17と該少なくとも1つのポリペプチドとを同時発現する細胞の数が所定のレベルを上回る場合に、該細胞集団が、眼異常を処置するための適切な治療用物質として適格であるとして判定される、方法。

10

**【請求項 2】**

前記少なくとも1つのポリペプチドがCRALBPである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記分析する段階がフローサイトメーターを用いて行われる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記分析する段階が免疫染色によって行われる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

エクスピボで多能性幹細胞をRPE細胞に分化させることによって、前記細胞集団が作製される、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 6】**

前記多能性幹細胞が胚性幹細胞を含む、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記分化させることの前に、前記胚性幹細胞が、bFGFおよびTGF $\beta$ を含む培地中で増殖される、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記分化させることの前に、段階(a)の前に、前記胚性幹細胞がヒト帯線維芽細胞上で培養される、請求項6に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記エクスピボで分化させることが、

(a)分化細胞を生成するように、胚性幹細胞を、分化物質を含む培地中で培養すること; 30 および

(b)該分化細胞を、トランスフォーミング成長因子(TGF $\beta$ )スーパーファミリーのメンバーを含む培地中で培養すること

によって行われる、請求項5に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記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、請求項9に記載の方法。

**【請求項 11】**

段階(a)の培地が、ニコチニアミド(NA)を含み、かつ前記TGF $\beta$ スーパーファミリーの少なくとも1つのメンバーを欠如しており、かつ段階(b)の培地が、NA、および該TGF $\beta$ スーパーファミリーの少なくとも1つのメンバーを含む、請求項9に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

(c)段階(b)の後に、ニコチニアミド(NA)を含みかつ前記TGF $\beta$ スーパーファミリーの少なくとも1つのメンバーを欠如している培地中で、前記細胞を培養する段階をさらに含む、請求項11に記載の方法。

**【請求項 13】**

段階(a)が少なくとも2日間行われる、請求項10に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記TGF $\beta$ スーパーファミリーの少なくとも1つのメンバーが、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 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6に記載の方法。

50

**【請求項 15】**

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12に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記多角細胞を増殖させる段階をさらに含む、請求項15に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記増殖させる段階が付着性表面上で行われる、請求項16に記載の方法。

**【請求項 18】**

(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)該RPE系列にさらに分化している細胞からの色素上皮由来因子(PEDF)の分泌を分析する段階；ならびに

(d)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

を含み、

該PEDFの量が所定のレベルを上回る場合に段階(d)が行われる、  
網膜上皮細胞を作製する方法。

**【請求項 19】**

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18に記載の方法。

**【請求項 20】**

段階(a)の分化物質および段階(d)の分化物質が同一である、請求項18に記載の方法。

**【請求項 21】**

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、請求項18に記載の方法。

**【請求項 22】**

前記多能性幹細胞が胚性幹細胞を含む、請求項18に記載の方法。

**【請求項 23】**

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、請求項22に記載の方法。

**【請求項 24】**

前記胚性幹細胞がヒト帯線維芽細胞上で培養される、請求項22に記載の方法。

**【請求項 25】**

細胞集団が眼異常を処置するための適切な治療用物質であるかどうか適格性を判定する方法であって、該方法が、細胞の該集団における、細胞レチナルデヒド結合タンパク質(CRALBP)と、プレメラノソームタンパク質(PMEL17)、レシチンレチノールアシルトランスフェラーゼ(LRAT)、および性決定領域Y-ボックス9(SOX9)からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドの同時発現を分析する段階を含み、該CRALBPと該少なくとも1つのポリペプチドとを同時発現する細胞の数が所定のレベルを上回る場合に、該細胞集団が、眼異常を処置するための適切な治療用物質として適格であると判定される、方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、その一部の態様では、網膜色素上皮細胞に関し、さらに詳細には、このような細胞を治療用物質(therapeutic)として評価することに関するが、これに限定されない。本発明はまた、胚性幹細胞からの網膜色素上皮細胞の作製に関する。

10

20

30

40

50

**【背景技術】****【0002】**

網膜色素上皮(RPE)は、神経網膜と脈絡毛細管板との間にある色素細胞の単層である。RPE細胞は、網膜およびその光受容体の維持および機能において重大な役割を果たしている。これらの維持および機能には、血液網膜閥門の形成、迷光の吸収、神経網膜への栄養分の供給、視物質の再生、ならびに脱落した光受容体外節の取り込みおよび再利用が含まれる。

**【0003】**

網膜組織は多くの理由で变成することがある。理由の中には、動脈または静脈の閉塞、糖尿病性網膜症、および未熟児網膜症があり、通常、これらは遺伝性である。網膜色素変性症、網膜分離、網膜格子状変性、ベスト病、および加齢黄斑変性(AMD)など疾患は進行型の網膜変性を特徴とする。

10

**【0004】**

RPE細胞は、潜在的に、上述した網膜疾患における变成RPEの細胞補充療法(cell replacement therapy)に用いられる可能性がある。それはまた、網膜変性疾患を処置するために遺伝子を導入するためのビヒクルとして用いられる可能性もある。これらの細胞はまた、網膜変性疾患のインビトロモデルとして、低分子に治療効果があるかどうかハイスクール・ラットスクリーニングするためのツールとして、ならびに網膜変性疾患の新薬を発見および試験するために役立つ可能性がある。RPE細胞はまた、RPEの発生、成熟、特徴、特性、代謝、免疫原性、機能、および他の細胞タイプとの相互作用の基礎研究に使用できる可能性がある。

20

**【0005】**

ヒト胎児RPEおよび成人RPEは同種移植のための代替ドナー供給源として用いられてきた。しかしながら、十分な組織供給を得る際の実施上の問題と、中絶胎児からの組織の使用に関する倫理上の問題があるために、これらのドナー供給源の普及は限られている。成人RPE移植片および胎児RPE移植片の供給における、これらの制約を考えて、代替ドナー供給源の可能性が研究されてきた。移植用のRPE細胞供給源としてヒト多能性幹細胞には大きな利点がある。ヒト多能性幹細胞は多能性発生能があるために、本物の機能的RPE細胞に分化できる可能性があり、無限の自己複製能があることを考えると、無制限のRPE細胞ドナー供給源として役立つ可能性がある。実際に、ヒト胚性幹細胞(hESC)およびヒト人工多能性幹細胞(iPS)はインビトロでRPE細胞に分化し、RPE機能不全によって引き起こされるRoyal College of Surgeons(RCS)ラット網膜変性モデルに網膜下移植された後には網膜変性を弱め、視覚機能を保つことが証明されている。従って、多能性幹細胞はRPE細胞を生産するための無制限の供給源となる可能性がある。

30

**【0006】**

多能性幹細胞からRPE細胞を得るために現行のプロトコールでは、色素細胞と非色素細胞の混合集団が生じる。しかしながら、基礎研究、創薬、および細胞療法におけるRPE細胞の使用には色素細胞の純粋な集団が望ましい。

**【0007】**

背景技術には、WO2013/114360(特許文献1)、WO2008/129554(特許文献2)、およびWO2013/184809(特許文献3)が含まれる。

40

**【先行技術文献】****【特許文献】****【0008】**

【特許文献1】WO2013/114360

【特許文献2】WO2008/129554

【特許文献3】WO2013/184809

**【発明の概要】****【0009】**

本発明の一部の態様の一局面によれば、ヒト多角RPE細胞の集団であって、それらの細

50

胞の少なくとも95%がプレメラノソームタンパク質(PMEL17)と細胞レチンアルデヒド結合タンパク質(CRALBP)とを同時発現し、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細胞の集団が提供される。

【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 偏在性膜受容体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。  
10

【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 偏在性膜受容体1(sTNF-R1)のそれぞれを分泌する。

【0012】

本発明の態様によれば、前記細胞は、アンジオゲニン、TIMP2、sgp130、またはsTNF-R1を極性化様式で分泌する。

【0013】

本発明の態様によれば、前記細胞は、アンジオゲニン、TIMP2、sgp130、およびsTNF-R1のそれぞれを極性化様式で分泌する。  
20

【0014】

本発明の態様によれば、sgp130の基底側分泌に対するsgp130の頂端側分泌の比は1より大きい。

【0015】

本発明の態様によれば、sTNF-R1の基底側分泌に対するsTNF-R1の頂端側分泌の比は1より大きい。

【0016】

本発明の態様によれば、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は1より大きい。  
30

【0017】

本発明の態様によれば、TIMP2の基底側分泌に対するTIMP2の頂端側分泌の比は1より大きい。

【0018】

本発明の態様によれば、集団中のOct4<sup>+</sup>TRA-1-60<sup>+</sup>細胞の数は1:250,000を下回る。

【0019】

本発明の態様によれば、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。

【0020】

本発明の態様によれば、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。  
40

【0021】

本発明の態様によれば、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。

【0022】

本発明の態様によれば、前記細胞は1日につき1mlあたり750ng超の色素上皮由来因子(PE DF)を分泌する。

【0023】

本発明の態様によれば、前記細胞はPEDFおよび血管内皮増殖因子(VEGF)を極性化様式で分泌する。

【0024】

10

20

30

40

50

本発明の態様によれば、PEDFの基底側分泌に対するPEDFの頂端側分泌の比は1より大きい。

【0025】

本発明の態様によれば、2~8における8時間のインキュベーション後に、比は依然として1より大きい。

【0026】

本発明の態様によれば、細胞の集団の経上皮電気抵抗は100オームより大きい。

【0027】

本発明の態様によれば、2~8における8時間のインキュベーション後に、前記細胞の経上皮電気抵抗は依然として100オームより大きい。

10

【0028】

本発明の態様によれば、VEGFの頂端側分泌に対するVEGFの基底側分泌の比は1より大きい。

【0029】

本発明の態様によれば、2~8における8時間のインキュベーション後に、比は依然として1より大きい。

【0030】

本発明の態様によれば、細胞集団は網膜下投与後にRCSラットにおける視力をレスキューすることができる。

【0031】

本発明の態様によれば、細胞集団は、RCSラットにおいて網膜下投与後少なくとも180日にわたって光受容体をレスキューすることができる。

20

【0032】

本発明の態様によれば、細胞集団はヒト胚性幹細胞のエクスピボ分化によって作製される。

【0033】

本発明の態様によれば、細胞集団は、

(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、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)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

によって作製される。

30

【0034】

本発明の態様によれば、胚性幹細胞は、bFGFおよびTGF $\beta$ を含む培地中で増殖される。

【0035】

本発明の態様によれば、胚性幹細胞はヒト帯(cord)線維芽細胞上で培養される。

【0036】

本発明の態様によれば、段階(a)~(c)は、大気酸素レベルが約10%未満の条件下において行われる。

40

【0037】

本発明の態様によれば、前記方法は、段階(c)の後に、分化した細胞を、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。

【0038】

本発明の一部の態様の一局面によれば、活性物質としての本明細書に記載の細胞集団と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物が提供される。

【0039】

本発明の一部の態様の一局面によれば、網膜変性を処置するための、本明細書に記載の

50

細胞集団の使用が提供される。

【0040】

本発明の一部の態様の一局面によれば、

(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、分化細胞を、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、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、方法が提供される。

【0041】

本発明の態様によれば、段階(a)は非付着条件下において行われる。

【0042】

本発明の態様によれば、非付着条件は非付着性培養プレートを含む。

【0043】

本発明の態様によれば、段階(a)は、

(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、ニコチン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、ニコチン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。

【0044】

本発明の態様によれば、前記方法は、段階(ii)の前に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。

【0045】

本発明の態様によれば、前記方法は、段階(c)の後に、分化した細胞を、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。

【0046】

本発明の態様によれば、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は、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。

【0047】

本発明の態様によれば、段階(a)の分化物質および段階(c)の分化物質は同一である。

【0048】

本発明の態様によれば、段階(a)の分化物質はニコチンアミド(NA)または3-アミノベンズアミドである。

【0049】

本発明の態様によれば、前記方法は、段階(c)の後に、多角細胞(polygonal cell)を選択する段階をさらに含む。

【0050】

本発明の態様によれば、前記方法は、多角細胞を増殖させる段階をさらに含む。

【0051】

本発明の態様によれば、増殖させる段階は付着性表面上または細胞外マトリックス上で行われる。

【0052】

本発明の態様によれば、多能性幹細胞は胚性幹細胞を含む。

10

20

30

40

50

## 【0053】

本発明の態様によれば、胚性幹細胞は、bFGFおよびTGF を含む培地中で増殖される。

## 【0054】

本発明の態様によれば、胚性幹細胞はヒト帯線維芽細胞上で培養される。

## 【0055】

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ますが、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。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0056】

本発明の一部の態様が、一例にすぎないが、添付の図面に関連して本明細書において説明される。今から、図面について具体的に詳述するが、示された事項は一例であり、本発明の態様を例示的に議論するためのものであることが強調される。この点に関して、図面と共に採用された説明が、本発明の態様がどのように実施され得るかを当業者に明らかにする。

20

## 【図1】データの直線性を示したグラフである。

【図2】抗CRALBPおよび抗PMEL17で染色した、陰性対照であるhESC細胞のFACS分析である。

【図3】抗CRALBPおよび抗PMEL17で染色した、陽性対照である参考RPE株OpRegen(登録商標)5C細胞のFACS分析である。

【図4】抗CRALBPおよび抗PMEL17で染色した、hESCにおける25%スパイクOpRegen(登録商標)5CのFACS分析である。

【図5】抗CRALBPおよび抗PMEL17で染色した、hESCにおける50%スパイクOpRegen(登録商標)5CのFACS分析である。

【図6】抗CRALBPおよび抗PMEL17で染色した、hESCにおける75%スパイクOpRegen(登録商標)5CのFACS分析である。

30

【図7】抗CRALBPおよび抗PMEL17で染色した、hESCにおける95%スパイクOpRegen(登録商標)5CのFACS分析である。

## 【図8】アイソタイプ対照で染色したhESCのFACS分析である。

## 【図9】アイソタイプ対照で染色したOpRegen(登録商標)5C細胞のFACS分析である。

【図10】PMEL17を用いた同時免疫染色はRPE細胞(CRALBP+PMEL17+)と非RPE色素細胞(PMEL17+CRALBP-; 例えば、メラノサイト)に差異を生じさせる。

40

## 【図11】工程内管理(IPC)ポイント5および8~10における模擬試験4および5の形態結果。

【図12】製造工程、段階1~3:ヒト帯線維芽細胞フィーダーワーキング細胞バンクの作製。

## 【図13】製造工程、段階4および5:hESCの増加。

## 【図14】製造工程、段階6~13:RPE(OpRegen(登録商標))細胞への分化。

## 【図15】製造工程、段階14~17:色素細胞の増加。

【図16】詳細なOpRegen(登録商標)製造工程および工程内管理ポイント(黄色の星、IPC1~11)。(NUTSPlus。bFGFおよびTGF を含有するNutristem培地; NUTS Minus。bFGFおよびTGF を含有しないNutristem培地; NIC、ニコチンアミド; SB、球状体)。

【図17】OpRegen(登録商標)模擬試験生産のラン4および5に沿ったCRALBP+PMEL17+RPE細胞のレベル。IPCポイント8および11の密度プロット(\*IPCポイント8を凍結保存後に試験した)、ならびに陽性対照OpRegen(登録商標)5Cおよび陰性対照HAD-C 102 hESCの代表的な密度プロット(陰性対照における%CRALBP+PMEL17+の範囲は0.02~0.17%であった)。各プロットの中にある数字は、単一生細胞ゲーティング集団からのパーセントCRALBP+PMEL17+細

50

胞を示す。FCS express 4ソフトウェアを用いて分析を行った。

【図18】RPEマーカーであるベストロフィン1、MITF、Z0-1、およびCRALBPに特異的な抗体を用いた、模擬試験5 IPCポイント7、10、および11の免疫蛍光染色。

【図19】P60での群2(BSS+; 図19A)、群5の対側性の無処置の眼(OD; 図19B)、および群5の処置した眼(OS; 図19C)の代表的な眼底カラー写真。高用量で処置した眼(OS)における色素過剰区域および色素不足区域は、移植された細胞を示すと推定される。

【図20】P60、P100、P150、およびP200に測定した視運動追跡視力(optokinetic tracking acuity)閾値。細胞処置群(群3-25,000個、群4-100,000個、および群5-200,000個)は全ての対照より成績が優れ、群4(100,000個)および群5(200,000個)用量は最良のレスキューを達成した。手術していない対側性の眼は群1(無処置)および群2(ビヒクル対照/BSS+)(示さず)と同等であった。

【図21】代表的なラットの局所(図21A)および全視野(図21B)結果を示したグラフ。

【図22】図22Aは、細胞で処置した代表的な眼のクレシルバイオレット染色切片の画像1枚1枚の合成写真を示す。矢印の間は、光受容体保護の場所と、移植細胞の推定された場所を示す。図22Bは、生後60日目、100日目、150日目、および200日目での、BSS+(群2)を注射した眼と、細胞を注射した代表的な眼(複数回投与群を表す)との比較を示す。GCL:神経節細胞層; ONL:外側顆粒層; RPE:網膜色素上皮。

【図23】核の数で測定した外側顆粒層の厚さ。それぞれの点は、全齢を対象にした、各用量群からの各動物からの数を表す。

【図24】抗ヒト核マーカー(H.N.M、緑色)、抗プレメラノソームマーカー(PMEL17、赤色)、抗ヒト増殖マーカー(Ki67、赤色)、および抗ラット錐体アレスチン(赤色)で染色した、陽性対照組織、ならびにP60、P100、P150、およびP200における実験細胞で処置した代表的な動物の免疫蛍光画像。Dapi(青色)は、顆粒層を強調するためにバックグラウンド染色に使用した。陽性対照組織には、PMEL17の場合はヒトメラノーマを使用し、Ki67の場合はヒト扁桃腺を使用し、錐体アレスチンの場合は若齢RCSラット網膜を使用した。下向きの矢印は外側顆粒層を示す。上向きの矢印は、本明細書に記載のように作製した、陽性染色されたヒトRPE細胞(OpRegen(登録商標))を示す。

【図25】OpRegen(登録商標)細胞をRCSラットに網膜下移植した後の錐体定量を示したグラフである。細胞で処置した眼は全齢で対照眼より有意に多い。

【図26】網膜下空間におけるOpRegen(登録商標)細胞の免疫蛍光染色。図26Aは、多数のRPE細胞がある網膜の区域(赤色、矢印)、細片のない中央の区画(抗ラットロドプシン抗体を用いて調べた、緑色; 矢印)を示すが、細胞が無い場所(辺縁部)では細片区画は再構成する。高倍率では(図26B)、移植細胞に沿って、ロドプシンが染色された、いくつかの外節がある。さらに、移植細胞からの距離が増えるにつれて、細片区画は再構成する。図26C ~ Jは、移植細胞内のロドプシン陽性組織(矢印)を示した切片による1枚1枚の薄片である。

【図27】NOD-SCIDに網膜下注射した後の細胞の生体内分布を示した写真である。図27Aは、移植して9ヶ月後に、OpRegen(登録商標)細胞がNOD-SCID網膜下空間に生着する能力を示す。色素細胞はヒト核およびPMEL17が陽性に染色された。図27Bは、注射後、小胞の場所で密集している細胞を示した写真である。図27Cは、注射後、その後に細胞が広がって单層になるのを示した写真である。

【図28】RPE細胞の有効性をアッセイするのに使用され得るトランズウェル(transwell)アッセイ法の図による説明である。

【図29】本明細書に記載のように作製したRPE細胞(P2-DP、製剤: 模擬試験IV、模擬試験V、OpRegen(登録商標)バッチ2A; HuRPE: ScienCellからの正常ヒトRPE)におけるPAX6発現と、生産(P0)に沿ったPAX6発現を示したFACS分析の結果である。

【図30】FACSによって分析した場合の、OpRegen(登録商標)細胞におけるPAX6発現を示したグラフである(HES、ヒト胚性幹細胞を陰性対照として使用した)。

【図31】PAX6およびCRALBPの二重染色を示したFACS分析の結果である。

【図32】OpRegen(登録商標)細胞によるアンジオゲニン分泌のELISA評価を示したグラフ

である。A. 模擬試験V生産に沿ったアンジオゲニン分泌の増大。B.OpRegen(登録商標)細胞の3つの異なるバッチによるアンジオゲニン分泌(継代3代目)、ならびに頂端側分泌および基底側分泌を評価した3週間にわたるトランズウェル上でのアンジオゲニン分泌(継代4代目)。C.RPE7細胞によるアンジオゲニン分泌(継代3代目)。

【図33】OpRegen(登録商標)細胞によるTIMP-1およびTIMP-2の分泌を示す。A. タンパク質アレイによって検出された相対的なTIMP-1およびTIMP-2タンパク質レベル。B. 模擬試験V生産QCポイント3および4におけるELISA TIMP-2レベル。CおよびD.OpRegen(登録商標)細胞の異なるバッチによるELISA TIMP-2分泌レベル(継代3代目)、ならびに頂端側分泌および基底側分泌を評価した3週間にわたるトランズウェル上でのELISA TIMP-2分泌レベル(継代4代目)。E.RPE7およびHuRPE対照細胞(継代3代目、4日目および14日目)から分泌されたTIMP-2レベル。

【図34】ELISAによって測定した場合の、OpRegen(登録商標)細胞によるsgp130分泌を示す。A. 模擬試験V生産QCポイント3および4におけるsgp130分泌レベル。B～C.OpRegen(登録商標)細胞の様々なバッチによる分泌されたsgp130のレベル(継代3代目)、ならびに頂端側分泌および基底側分泌を評価した3週間にわたるトランズウェル上での分泌されたsgp130のレベル(継代4代目)。D.RPE7およびHuRPE対照細胞(継代3代目、4日目および14日目)から分泌されたsgp130レベル。

【図35】ELISAによって測定した場合の、OpRegen(登録商標)細胞上清中のsTNF-R1タンパク質レベルを示す。A. 模擬試験V生産QCポイント3および4からの細胞上清中のsTNF-R1レベル。B～C.OpRegen(登録商標)バッチの上清中のsTNF-R1レベル(継代3代目)、ならびに頂端側レベルおよび基底側レベルを評価した3週間にわたるトランズウェル上でのsTNF-R1レベル(継代4代目)。D.4日目および14日目のRPE7および対照HuRPE細胞培養物におけるsTNF-R1レベル(継代3代目)。

【図36】トランズウェル上でのOpRegen(登録商標)5C(参照株)、RPE1、およびRPE7の形態を示す。OpRegen(登録商標)5C、RPE1、およびRPE7をトランズウェル上に播種した後に毎週、画像化した(1週目～4週目)。OpRegen(登録商標)5Cは1週目から均質な多角単層を生じたのに対して、RPE1およびRPE7は、播種して1週間後に、均質でない異なる形態を生じ、2週目に穴が現れ始めた。培養して3週間後に、RPE1細胞はトランズウェルからはがれた。

【図37】RPE1細胞およびRPE7細胞がCRALBPとPMEL-17とを同時発現することを示す。FACS純度アッセイ法から、RPE1細胞の99.91%およびRPE7細胞の96.29%は、RPEマーカーであるCRALBPおよびPMEL-17に対して二重陽性であり、OpRegen(登録商標)模擬試験V細胞(陽性対照)において認められたレベルと同様なことが証明された。HAD-C 102 hESCを陰性対照として使用した。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0057】

##### 本発明の特定の態様の説明

本発明は、その一部の態様では、網膜色素上皮細胞に関し、さらに詳細には、治療用物質として、このような細胞を評価することに関するが、これに限定されない。本発明はまた、ヒト胚性幹細胞からの網膜色素上皮細胞の作製に関する。

##### 【0058】

本発明の少なくとも1つの態様を詳細に説明する前に、本願において、本発明は、必ずしも、以下の説明において示される、または実施例によって例示される詳細に限定されるわけではないことを理解しなければならない。本発明は他の態様が可能であるか、または様々なやり方で実施もしくは実行することができる。

##### 【0059】

神経網膜は視覚を開始し、下にある網膜色素上皮(RPE)によって支持されている。RPE細胞の機能不全、変性、および消失は、ベスト病、網膜色素変性症(RP)のサブタイプ、および西側世界での視覚障害の第1位の原因である加齢黄斑変性(AMD)の目立った特徴である。これらの状況では、徐々に視覚が失われ、失明することが多い。

**【 0 0 6 0 】**

網膜および隣接するRPEは両方とも神経外胚葉から生じる。下等な種では、RPEは網膜を再生するが、哺乳動物ではRPEを介した再生は阻害されており、再生は、末梢網膜周縁部に位置する幹細胞を介して、非常に限られた程度で起こる。

**【 0 0 6 1 】**

ヒト胚性幹細胞(hESC)は移植用の無制限のRPE細胞ドナー供給源として役立つ可能性がある。マウスESC、靈長類ESC、およびヒトESCがRPE様細胞に分化する能力、網膜下移植後に網膜変性を弱める能力および視覚機能を保つ能力が証明されている。

**【 0 0 6 2 】**

ヒト胚性幹細胞をRPE細胞に分化させるための様々なプロトコールが開発されてきた(例えば、WO2008/129554を参照されたい)。

**【 0 0 6 3 】**

本発明者らは今や、特定のポリペプチドの発現に基づいて、RPE細胞に首尾良く分化した細胞集団について適格性を判定するユニークかつ簡単な手法を発見している。本発明者らは、これらの分化した細胞の表面に発現している無数の潜在的なポリペプチドの中から2種類の特定のマーカーの組み合わせを用いて、成功した分化を実証できることを発見した。

**【 0 0 6 4 】**

本発明者らはまた、色素上皮由来因子(PEDF)の分泌が、RPE分化プロセスの初期段階を実証するためのマーカーとして用いられる可能性があることも発見した(表4を参照されたい)。

**【 0 0 6 5 】**

実施するために本発明をさらに縮小する一方で、本発明者らは、一部の態様においてRPE細胞を規定するシグネチャーとして用いられる可能性がある、RPE細胞によって分泌される、さらなるタンパク質を同定した。

**【 0 0 6 6 】**

従って、本発明の一局面によれば、細胞集団が眼異常を処置するための適切な治療用物質であるかどうか適格性を判定する方法であって、該方法が、細胞の集団における、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)、レシチンレチノールアシルトランスフェラーゼ(LRAT)、および性決定領域Y-ボックス9(SOX9)からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドの同時発現を分析する段階を含み、PMEL17と少なくとも1つのポリペプチドとを同時発現する細胞の数が所定のレベルを上回る場合に、細胞集団が、網膜障害を処置するための適切な治療用物質として適格であると判定される、方法が提供される。

**【 0 0 6 7 】**

別の局面によれば、細胞集団が眼異常を処置するための適切な治療用物質であるかどうか適格性を判定する方法であって、該方法が、細胞の集団における、細胞レチンアルデヒド結合タンパク質(CRALBP)と、プレメラノソームタンパク質(PMEL17)、レシチンレチノールアシルトランスフェラーゼ(LRAT)、および性決定領域Y-ボックス9(SOX9)からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドの同時発現を分析する段階を含み、CRALBPと少なくとも1つのポリペプチドとを同時発現する細胞の数が所定のレベルを上回る場合に、細胞集団が、眼異常を処置するための適切な治療用物質として適格であると判定される、方法が提供される。

**【 0 0 6 8 】**

本明細書で使用する「適切な治療用物質」という句は、細胞集団が眼異常を処置するのに適していることを指す。治療用物質である細胞は、複数の機構のいずれか1つによって効果を発揮することができる。例示的な機構の1つは、網膜内にある変成中の光受容体または他の細胞の生存を促す支持的な栄養作用(trophic effect)である。治療用RPE細胞はまた、機能不全中および/または変成中の宿主RPE細胞を補充する再生機構を介して効果を発揮してもよい。一態様によれば、RPE細胞は成熟しており、ロドプシンを含む光受容体

10

20

30

40

50

の脱落した外節を貪食する機能的能力を有する。別の態様によれば、RPE細胞は完全に成熟していない。

【0069】

前記細胞集団が治療用物質として役立つ眼異常には、一般的に網膜機能不全、網膜損傷、および/または網膜色素上皮の消失に関連する網膜疾患または網膜障害が含まれるが、これに限定されない。本発明に従って処置され得る異常の非限定的なリストは、網膜色素変性症、レーバー先天性黒内障、遺伝性または後天性の黄斑変性、加齢黄斑変性(AMD)、ベスト病、網膜剥離、脳回転状萎縮、コロイデレミア、パターンジストロフィならびにRPEの他のジストロフィー、シュタルガルト病、光傷害、レーザー傷害、炎症性傷害、感染性傷害、放射線傷害、新血管性傷害、または外傷性傷害のいずれか1つによって引き起こされる損傷が原因のRPE損傷および網膜損傷を含む。

10

【0070】

言及したように、本発明のこの局面の方法は、プレメラノソームタンパク質(PMEL17; SwissProt No. P40967)、ならびに細胞レチンアルデヒド結合タンパク質(CRALBP; SwissProt No. P12271)、レシチンレチノールアシルトランスフェラーゼ(LRAT; SwissProt No. O95327)、および性決定領域Y-ボックス9(SOX9; P48436)からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドを発現する量(例えば、パーセント細胞)を測定することによって行われる。

【0071】

または、この局面の方法は、CRALBP(CRALBP; SwissProt No. P12271)、ならびにレシチンレチノールアシルトランスフェラーゼ(LRAT; SwissProt No. O95327)、性決定領域Y-ボックス9(SOX 9; P48436)、およびPMEL17(SwissProt No. P40967)からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドを測定することによって行われる。

20

【0072】

従って、例えば、CRALBPおよびPMEL17が測定されてもよいか、PMEL17およびLRATが測定されてもよいか、または、PMEL17およびSOX9が測定されてもよい。または、CRALBPおよびLRATが測定されてもよいか、または、CRALBPおよびSOX9が測定されてもよい。

【0073】

本明細書において言及されたポリペプチドのうち2つ超を、例えば、上述したポリペプチドのうちの3つを、さらには、上述したポリペプチドのうちの4つ全てを測定できることが理解されるだろう。

30

【0074】

上述したポリペプチドの発現を分析するための方法は、典型的には、抗原を特異的に認識する抗体の使用を伴う。CRALBPを認識する市販抗体には、例えば、Abcamによって製造された抗体(例えば、ab15051およびab189329、クローンB2)が含まれる。PMEL17を認識する市販抗体には、例えば、Abcamによって製造された抗体(例えば、ab137062およびab189330、クローンEPR4864)が含まれる。LRATを認識する市販抗体には、例えば、Milliporeによって製造された抗体(例えば、MABN644)が含まれる。SOX9を認識する市販抗体には、例えば、Abcamによって製造された抗体(例えば、ab185230)が含まれる。分析は、フローサイトメトリー、ウエスタンプロット、免疫細胞化学、ラジオイムノアッセイ法、PCRなどを含む当技術分野において公知の任意の方法を用いて行うことができる。

40

【0075】

フローサイトメトリーの場合、抗体は蛍光部分に取り付けられ、蛍光励起セルソーター(FACS)を用いて分析されてもよい。または、蛍光部分を有する二次抗体の使用も想定される。

【0076】

分析されるポリペプチドが細胞内ポリペプチドであるので、典型的には、抗体が標的に結合できるように、細胞は透過処理されることが理解されるだろう。最初に、可溶性抗原または半減期が短い抗原の安定性を確かなものにするために、細胞は固定されてもよい。これにより、標的タンパク質は元々の細胞位置に保たれるべきである。細胞の透過性が保

50

たれることを確かなものにするために、抗体は透過処理用緩衝液中で調製されてもよい。細胞集団をゲーティングする時に、透過処理後および固定後に、フローサイトメーターにおける細胞の光散乱プロファイルは大幅に変わることが理解されるだろう。

#### 【0077】

細胞膜を透過処理する方法は、当技術分野において公知であり、例えば、

1. ホルムアルデヒド、続いて、界面活性剤：ホルムアルデヒドによる固定(例えば、4.5%以下で10~15分間(これによりタンパク質が安定化される)、続いて、界面活性剤、例えば、TritonまたはNP-40(PBS中で0.1~1%)、Tween20(PBS中で0.1~1%)、サポニン、ジギトニン、およびLeucoperm(例えば、PBS中で0.5%v/v)による膜の破壊；

2. ホルムアルデヒド(例えば、4.5%以下)、続いてメタノール；

3. メタノール、続いて、界面活性剤(例えば、80%メタノール、次いで、0.1%Tween20)；

4. アセトン固定および透過処理

を含む。

#### 【0078】

本明細書で使用する「フローサイトメトリー」という用語は、試料中の材料(例えば、特定のマーカーを含むRPE細胞)の割合が、(例えば、標識された抗体と材料を結合することによって)材料を標識し、材料を含有する流体の流れが光線を通過するようにし、試料から発せられた光を、一連のフィルターおよびミラーによって構成波長に分離し、光を検出することによって決定されるアッセイ法を指す。

#### 【0079】

例えば、Becton Dickinson FACScan、Navios Flow Cytometer(Beckman Coulterシリアル番号AT15119 RHE9266、およびFACScalibur(BD Biosciences, Mountain View, CA)を含む数多くのフローサイトメーターが市販されている。FACS分析に用いられ得る抗体はSchi ossman S, Boumell L, et al., [Leucocyte Typing V. New York: Oxford University Press; 1995]に開示されており、広く市販されている。

#### 【0080】

上述したポリペプチドの発現レベルはRNAレベルならびにタンパク質レベルで行われてもよいことが理解されるだろう。RNAレベルに基づいてポリペプチドの発現を確認するための例示的な方法には、PCR、RT-PCR、ノザンプロットなどが含まれるが、これに限定されない。

#### 【0081】

前記細胞が治療用物質として有用であるという適格性を判定するためには、細胞において同時発現しているポリペプチドのうち少なくとも2つの量は、非RPE細胞(例えば、未分化の胚性幹細胞)と比較した場合に、統計的に有意なレベルを上回って増加していかなければならない。

#### 【0082】

特定の態様によれば、前記細胞が治療用物質として有用であるという適格性を判定するためには、当業者に公知の方法(例えば、FACS)によってアッセイした場合に、前記集団内の細胞の少なくとも80%は、検出可能なレベルのPMEL17および上述したポリペプチドの1つ(例えば、CRALBP)を発現しなければならない、より好ましくは、前記集団内の細胞の少なくとも85%は、検出可能なレベルのPMEL17および上述したポリペプチドの1つ(例えば、CRALBP)を発現しなければならない、より好ましくは、前記集団内の細胞の少なくとも90%は、検出可能なレベルのPMEL17および上述したポリペプチドの1つ(例えば、CRALBP)を発現しなければならない、より好ましくは、前記集団内の細胞の少なくとも95%は、検出可能なレベルのPMEL17および上述したポリペプチドの1つ(例えば、CRALBP)を発現しなければならない。より好ましくは、前記集団内の細胞の少なくとも100%は、検出可能なレベルのPMEL17および上述したポリペプチドの1つ(例えば、CRALBP)を発現しなければならない。

#### 【0083】

10

20

30

40

50

別の態様によれば、前記細胞が治療用物質として有用であるという適格性を判定するためには、CRALBPと上述したポリペプチドの1つ(例えば、PMEL17)の同時発現のレベルは(例えば、平均蛍光強度によって測定された場合)、未分化ESCと比較して少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも3倍、より好ましくは少なくとも4倍、さらにより好ましくは少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍増加していなければならない。

#### 【0084】

特定の態様によれば、前記細胞が治療用物質として有用であるという適格性を判定するためには、当業者に公知の方法(例えば、FACS)によってアッセイした場合に、前記集団内の細胞の少なくとも80%は、検出可能なレベルのCRALBPおよび上述したポリペプチドの1つ(例えば、PMEL17)を発現しなければならない、より好ましくは、前記集団内の細胞の少なくとも85%は、検出可能なレベルのCRALBPおよび上述したポリペプチドの1つ(例えば、PMEL17)を発現しなければならない、より好ましくは、前記集団内の細胞の少なくとも90%は、検出可能なレベルのCRALBPおよび上述したポリペプチドの1つ(例えば、PMEL17)を発現しなければならない、より好ましくは、前記集団内の細胞の少なくとも95%は、検出可能なレベルのCRALBPおよび上述したポリペプチドの1つ(例えば、PMEL17)を発現しなければならない、より好ましくは、前記集団内の細胞の100%は、検出可能なレベルのCRALBPおよび上述したポリペプチドの1つ(例えば、PMEL17)を発現しなければならない。

10

#### 【0085】

さらに、インビボで動物モデルにおいて前記細胞は適格性を判定されてもよい。このようなモデルの1つは、Royal College of Surgeons(RCS)ラットモデルである。移植後に、眼底画像化、視運動追跡閾値(optokinetic tracking threshold)(OKT)、網膜電図(ERG)、組織学、錐体計数、およびロドプシン摂取を含む方法を用いて、細胞の治療効果が分析されてもよい。これらの方法は、本明細書中の以下の実施例5においてさらに説明される。

20

#### 【0086】

前記細胞は、例えば、核型分析、形態、細胞数、ならびに生存率、有効性(バリア機能ならびにPEDFおよびVEGFの極性分泌)、残存hESCのレベル、グラム染色、ならびに無菌性を含むさらなる手法で、適格性を判定されてもよいか、または特徴決定されてもよい。実施され得る例示的なアッセイ法は実施例4において説明される。

#### 【0087】

さらに、前記細胞は、バリア機能、ならびに増殖因子(例えば、色素上皮由来因子(PEDF)もしくはVEGF、サイトカイン、インターロイキン、および/またはケモカイン)の極性化様式での分泌のレベルについて分析されてもよい。

30

#### 【0088】

分泌されたPEDFを分析するために、細胞培養物から上清が収集され、細胞は回収および計数される。細胞培養上清中のPEDF量は、PEDF ELISAアッセイ法(例えば、ELISAquant(商標)PEDF Sandwich ELISA Antigen Detection Kit, BioProductsMD, PED613)を用いて、製造業者のプロトコールに従って定量されてもよい。

#### 【0089】

さらに、前記細胞におけるPEDFおよびVEGFの分泌の方向が分析されてもよい。これは、図28に示したようにトランズウェルアッセイ法を用いて行われてもよい。適格性判定の前または後に、前記細胞は当技術分野において公知の方法に従って保存(例えば、凍結または凍結保存)されてもよく、対象に直接投与されてもよい。

40

#### 【0090】

本発明は、任意の供給源に由来する網膜色素上皮(RPE)細胞を含む細胞集団を分析することを意図する。従って、この細胞集団は、ドナーから得られたRPE細胞(すなわち、網膜の色素層の天然RPE細胞)を含んでもよく、幹細胞の集団からエクスピボで分化したRPE細胞(hSC由来RPE細胞、例えば、多能性幹細胞、例えば、ヒト胚性幹細胞)を含んでもよい。別の態様によれば、RPE細胞は分化転換によって得られる。例えば、Zhang et al., Protein Cell 2014, 5(1): 48-58を参照されたい。この内容は参照により本明細書に組み入れ

50

られる。

【0091】

一態様によれば、分析されるRPE細胞はPax6を発現しない。

【0092】

別の態様によれば、分析されるRPE細胞はPax6を発現する。

【0093】

「網膜色素上皮細胞」、「RPE細胞」、「RPE」は、文脈が許す時には同義に用いられることがあり、網膜の色素上皮細胞層を形成する天然RPE細胞と機能上類似する細胞タイプの細胞を指す(例えば、眼内に移植されると、天然RPE細胞に似た機能活動を示す)。

【0094】

一態様によれば、RPE細胞は、少なくとも1種類、2種類、3種類、4種類、または5種類の成熟RPE細胞マーカーを発現する。このようなマーカーには、CARLBP、RPE65、PEDF、PMEL17、ベストロフィン、およびチロシナーゼが含まれるが、これに限定されない。任意で、RPE細胞はまた、RPE前駆細胞マーカー、例えば、MITFも発現してもよい。別の態様において、RPE細胞はPAX-6を発現する。別の態様において、RPE細胞は、OTX2、SIX3、SIX6、およびLHX2を含むが、これに限定されない少なくとも1種類の網膜前駆細胞マーカーを発現する。

【0095】

さらに別の態様によれば、RPE細胞は、本明細書の下記の実施例セクションに記載の方法に従って胚性幹細胞から分化されたRPE細胞である。実施例の内容は、本明細書そのものに含まれるような内容である。

【0096】

本明細書で使用する「成熟RPE細胞マーカー」という句は、成熟RPE細胞において、非RPE細胞または未熟RPE細胞に対して(例えば、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍)上昇している抗原(例えば、タンパク質)を指す。

【0097】

本明細書で使用する「RPE前駆細胞マーカー」という句は、RPE前駆細胞において、非RPE細胞に対して(例えば、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍)上昇している抗原(例えば、タンパク質)を指す。

【0098】

別の態様によれば、RPE細胞は、網膜の色素上皮細胞層を形成する天然RPE細胞に似た形態を有する、すなわち、色素細胞である、および/または特徴的な多角形状を有する。

【0099】

さらに別の態様によれば、RPE細胞は黄斑変性などの疾患を処置することができる。

【0100】

さらに別の態様によれば、RPE細胞は、本明細書において上記で列挙した要件の少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、または全てを満たす。

【0101】

「hSC由来RPE細胞」という用語は、hSCからの定方向分化(directed differentiation)によって得られたRPE細胞を指すために本明細書において用いられる。好ましい態様によれば、hSC由来RPE細胞は、下記で定義されるパラメータによって示されるような機能的RPE細胞である。「定方向分化」という用語は、「RPE誘導性分化」という用語と同義に用いられ、RPE細胞タイプへの分化を誘導/促進する培養条件下においてhSCを操作するプロセスを意味すると理解しなければならない。

【0102】

特定の態様によれば、RPE細胞は、TGF- $\beta$ スーパーファミリーの1つまたは複数のメンバーの存在下でのhSCの定方向分化によって得られ、以下の特徴の少なくとも1つを示す：

- 分化の間に、培養細胞はTGF- $\beta$ シグナル伝達に応答すること；
- RPE細胞は、最終分化を示すマーカー、例えば、ベストロフィン1、CRALBP、および/またはRPE65を発現すること；

10

20

30

40

50

-移植後に(すなわち、インサイチューで)、RPE細胞は、RPE細胞に隣接する光受容体を支持する栄養作用を示すこと;

-さらに、インサイチューで、RPE細胞は、これらの光受容体の正常な再生プロセスの一環として、脱落した光受容体外節の食作用を伴って機能することができること;

-さらに、インサイチューで、RPE細胞は網膜閥門を作製し、視サイクルにおいて機能することができる。

#### 【0103】

本明細書で使用する「幹細胞」という句は、特定の特殊化された機能を有する他の細胞タイプ(例えば、完全に分化した細胞)に分化するように誘導されるまで、培養中に長期間にわたって未分化状態にとどまることができる細胞(例えば、多能性または多分化能性の幹細胞)を指す。好ましくは、「幹細胞」という句は、胚性幹細胞(ESC)、人工多能性幹細胞(iPS)、成人幹細胞、間葉系幹細胞、および造血幹細胞を包含する。

10

#### 【0104】

特定の態様によれば、RPE細胞は、ヒト胚性幹細胞または人工多能性幹細胞を含む多能性幹細胞に由来する。

#### 【0105】

「胚性幹細胞」という句は、3つ全ての胚葉(すなわち、内胚葉、外胚葉、および中胚葉)に分化することができるか、または未分化な状態に留まることができる胚細胞を指す。

「胚性幹細胞」という句は、胚着床前の、妊娠後に形成された胚組織(例えば、胚盤胞)から得られた細胞(すなわち、着床前胚盤胞)、着床後/原腸形成前の段階の胚盤胞から得られた拡張胚盤胞細胞(ex-*stended blastocyst cell*)(EBC)(WO2006/040763を参照されたい)、および妊娠中のいつでも、好ましくは、妊娠10週前に胎児の生殖組織から得られた胚性生殖(EG)細胞を含んでもよい。本発明の一部の態様の胚性幹細胞は周知の細胞培養方法を用いて得ることができる。例えば、ヒト胚性幹細胞はヒト胚盤胞から単離することができる。ヒト胚盤胞は、典型的には、ヒトのインビボ着床前胚から得られるか、または体外受精(IVF)胚から得られる。または、単一細胞ヒト胚を胚盤胞段階まで拡張することができる。ヒトES細胞を単離するために、胚盤胞から透明帯が除去され、外科手術によって内部細胞塊(ICM)が単離される。この場合、栄養外胚葉細胞が溶解され、穏やかにピペッティングすることによってインタクトなICMから除去される。次いで、ICMは、その増生(outgrowth)を可能にする適切な培地を含有する組織培養フラスコ中にプレーティングされる。9~15日後に、ICM由来増殖は機械的解離または酵素的分解によって凝集塊に解離され、次いで、細胞は新鮮な組織培養培地上に再プレーティングされる。未分化形態を示すコロニーが1つ1つ、マイクロピペット/幹細胞ツールによって選択され、断片/凝集塊に機械的に切開され、再プレーティングされる。次いで、結果として生じたES細胞は定期的に4~7日ごとにスプリットされる。ヒトES細胞を調製する方法に関する、さらなる詳細については、Reubinoff et al., Nat Biotechnol 2000, May: 18(5): 559; Thomson et al., [米国特許第5,843,780号; Science 282: 1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38: 133, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844, 1995]; Bongso et al., [Hum Reprod 4: 706, 1989]; およびGardner et al., [Fertil. Steril. 69: 84, 1998]を参照されたい。

20

#### 【0106】

本発明の一部の態様によれば、市販の幹細胞も使用できることが理解されるだろう。ヒトES細胞は、NIHヒト胚性幹細胞登録所(NIH human embryonic stem cells registry)[HyperText Transfer Protocol://grants(dot)nih(dot)gov/stem\_cells/registry/current(dot)htm]および他の欧洲登録所から購入することができる。市販の胚性幹細胞株の非限定的な例は、HAD-C 102、ESI、BG01、BG02、BG03、BG04、CY12、CY30、CY92、CY10、TE03、TE32、CHB-4、CHB-5、CHB-6、CHB-8、CHB-9、CHB-10、CHB-11、CHB-12、HUES1、HUES2、HUES3、HUES4、HUES5、HUES6、HUES7、HUES8、HUES9、HUES10、HUES11、HUES12、HUES13、HUES14、HUES15、HUES16、HUES17、HUES18、HUES19、HUES20、HUES21、HUES22、HUES23、HUES24、HUES25、HUES26、HUES27、HUES28、CyT49、RUES3、WA01、UCSF4、NYUES1、NYUES2、NYUES3、NYUES4、NYUES5、NYUES6、NYUES7、UCLA1、UCLA2、UCLA3、WA077(H7)、WA09(H50

30

40

50

9)、WA13(H13)、WA14(H14)、HUES62、HUES63、HUES64、CT1、CT2、CT3、CT4、MA135、Ene avour-2、WIBR1、WIBR2、WIBR3、WIBR4、WIBR5、WIBR6、HUES45、Shef3、Shef6、BJNhem1 9、BJNhem20、SA001、SA001である。

#### 【0107】

さらに、ES細胞は、マウス(Mills and Bradley, 2001)、ゴールデンハムスター[Doetschman et al., 1988, Dev Biol. 127: 224-7]、ラット[Iannaccone et al., 1994, Dev Biol. 163: 288-92]、ウサギ[Giles et al. 1993, Mol Reprod Dev. 36: 130-8; Graves & Moreadith, 1993, Mol Reprod Dev. 1993, 36: 424-33]、いくつかの家畜種[Notarianni et al., 1991, J Reprod Fertil Suppl. 43: 255-60; Wheeler 1994, Reprod Fertil Dev. 6: 563-8; Mitalipova et al., 2001, Cloning. 3: 59-67]、ならびに非ヒト靈長類種(アカゲザルおよびマーモセット)[Thomson et al., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 7844-8; Thomson et al., 1996, Biol Reprod. 55: 254-9]を含む他の種からも得ることができる。10

#### 【0108】

拡張胚盤胞細胞(EBC)は、原腸形成前の段階である、受精して少なくとも9日後の胚盤胞から得ることができる。胚盤胞を培養する前に、内部細胞塊を露出するように、透明帯が[例えば、タイロード酸性溶液(Sigma Aldrich、St Louis、MO、USA)によって]消化される。次いで、胚盤胞は、標準的な胚性幹細胞培養法を用いて、インビトロで全胚として、受精後、少なくとも9日間かつ14日以下で(すなわち、原腸形成事象の前に)培養される。20

#### 【0109】

ES細胞を調製するための別 の方法は、Chung et al., Cell Stem Cell, Volume 2, Issue 2, 113-117, 7 February 2008に記載されている。この方法は、体外受精プロセスの間に胚から単一細胞を取り出す段階を含む。このプロセスにおいて胚は破壊されない。20

#### 【0110】

ES細胞を調製するためのさらに別の方法は単為生殖によるものである。このプロセスでも胚は破壊されない。

#### 【0111】

現在行われているES培養法は、主に、幹細胞増殖に必要な因子を分泌するが、同時に幹細胞分化を阻害するフィーダー細胞層の使用に基づいている。例示的なフィーダー層には、ヒト胚線維芽細胞、成人ファロピウス管上皮細胞、初代マウス胚線維芽細胞(PMEF)、マウス胚線維芽細胞(MEF)、マウス胎仔線維芽細胞(MFF)、ヒト胚線維芽細胞(HEF)、ヒト胚性幹細胞の分化から得られたヒト線維芽細胞、ヒト胎児筋肉細胞(HFM)、ヒト胎児皮膚細胞(HFS)、ヒト成人皮膚細胞、ヒト包皮線維芽細胞(HFF)、ヒト臍帯線維芽細胞、臍帯または胎盤から得られたヒト細胞、およびヒト骨髄ストローマ細胞(hMSC)が含まれる。ESCを未分化状態で維持するために、培地に増殖因子が添加されてもよい。このような増殖因子にはbFGFおよび/またはTGF $\beta$ が含まれる。別の態様において、hESCをナイーヴな未分化状態で維持するために、培地に作用物質が添加されてもよい。例えば、Kalkan et al., 2014, Phil. Trans. R. Soc. B, 369: 20130540を参照されたい。30

#### 【0112】

ES細胞培養では無フィーダー細胞系も用いられてきた。このような系では、フィーダー細胞層の代用品として、血清代用品、サイトカイン、および増殖因子(IL6および可溶性IL6受容体キメラを含む)が加えられたマトリックスが用いられる。幹細胞は、細胞外マトリックス(例えば、Matrigel(登録商標)またはラミニン)などの固体表面上で、培養培地、例えば、LonzaL7系、mTeSR、StemPro、XFKSR、E8の存在下で増殖することができる。フィーダー細胞と幹細胞が同時に増殖されることを必要とし、混合細胞集団が生じる可能性があるフィーダーに基づく培養とは異なり、無フィーダー系上で増殖させた幹細胞は表面から容易に分離される。幹細胞を増殖させるのに用いられる培養培地は、分化を効果的に阻害し、幹細胞の増殖を促進する因子、例えば、MEF条件培地およびbFGFを含有する。しかしながら、一般的に用いられる無フィーダー培養系では、マウス血清もしくはウシ血清またはMEF条件培地が加えられた、動物に基づくマトリックス(例えば、Matrigel(登録商標))40

が用いられる[Xu C, et al. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 19: 971-4]。動物に基づくマトリックスは、動物病原体がヒトES細胞に交差移動(cross-transfer)する危険をもたらし、従って、将来の臨床応用を危うくする。

【0113】

ESCをRPE系列に分化させるための非常に多くの方法が公知であり、定方向分化プロトコール、例えば、WO2008/129554、2013/184809に記載の定方向分化プロトコールと、自然分化プロトコール、例えば、米国特許第8,268,303号および米国特許出願第20130196369号に記載の自然分化プロトコールを両方とも含む。それぞれの内容は参照により組み入れられる。

10

【0114】

特定の態様によれば、RPE細胞は、定方向分化プロトコールを用いて、例えば、実施例セクションに開示されたプロトコールに従ってESC細胞から作製される。

【0115】

ある例示的な分化プロトコールでは、胚性幹細胞は、第1の分化物質を用いてRPE細胞系列に分化され、次いで、トランスフォーミング成長因子- $\beta$ (TGF $\beta$ )スーパーファミリーのメンバー(例えば、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、およびTGF $\beta$ 3サブタイプ、ならびにアクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンB、およびアクチビンAB)、nodal、抗ミュラー管ホルモン(A/MH)、いくつかの骨形成タンパク質(BMP)、例えば、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、およびBMP7、ならびに増殖分化因子(GDF)を含む相同リガンド)を用いて、RPE細胞にさらに分化される。

20

【0116】

特定の態様によれば、TGF $\beta$ スーパーファミリーメンバーは、TGF $\beta$ 1、アクチビンA、およびTGF $\beta$ 3からなる群より選択される。

【0117】

特定の態様によれば、トランスフォーミング成長因子- $\beta$ (TGF $\beta$ )スーパーファミリーのメンバーは、アクチビンA、例えば、20~200ng/ml、例えば、100~180ng/mlのアクチビンAである。

30

【0118】

第1の分化物質はRPE系列への分化を促進する。例えば、第1の分化物質は多能性幹細胞から神経前駆体への分化を促進する可能性がある。このような細胞はPAX6などの神経前駆体マーカーを発現してもよい。

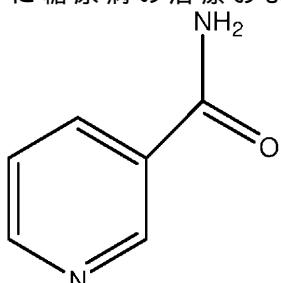
【0119】

特定の態様によれば、第1の分化物質は、ニコチンアミド(NA)、例えば、1~100mM、5~50mM、5~20mM、例えば、10mMのニコチンアミド(NA)である。

【0120】

NAは「ナイアシンアミド」としても公知であり、細胞機能を保護および改善すると考えられているアミド誘導体型のビタミンB3(ナイアシン)である。NAの化学式はC<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Oである。NAは、成長と、食物からエネルギーへの変換に不可欠であり、関節炎の治療ならびに糖尿病の治療および予防において用いられてきた。

40



ニコチンアミド(NA)

【0121】

50

特定の態様によれば、ニコチニアミドはニコチニアミド誘導体またはニコチニアミド模倣物である。本明細書で使用する「ニコチニアミド(NA)誘導体」という用語は、天然NAの化学修飾誘導体である化合物を指す。一態様において、化学修飾は、アミド部分の窒素原子または酸素原子を介した、(環の炭素メンバーまたは窒素メンバーを介した)基本NA構造のピリジン環の置換でもよい。置換時には、1つもしくは複数の水素原子が置換基によって置き換えられてもよく、および/または置換基がN原子に取り付けられて四価の正荷電窒素を形成してもよい。従って、本発明のニコチニアミドには置換ニコチニアミドまたは非置換ニコチニアミドが含まれる。別の態様において、化学修飾は、例えば、NAのチオベンズアミド類似体を形成するような、単一の基の欠失または交換でもよい。これらは全て、有機化学に精通した人により理解される通りである。本発明の文脈における誘導体はまたNAのヌクレオシド誘導体(例えば、ニコチニアミドアデニン)も含む。

10

## 【0122】

様々なNA誘導体が説明されており、一部は、PDE4酵素の阻害活性とも関連して説明されている(WO03/068233; WO02/060875; GB2327675A)、またはVEGF-受容体型チロシンキナーゼ阻害剤(WO01/55114)として説明されている。例えば、4-アリール-ニコチニアミド誘導体を調製するプロセス(WO05/014549)。他の例示的なニコチニアミド誘導体はWO01/55114およびEP2128244に開示される。

## 【0123】

ニコチニアミド模倣物には、多能性細胞からのRPE細胞の分化および成熟においてニコチニアミドの作用を再現する、修飾型ニコチニアミドおよびニコチニアミドの化学類似体が含まれる。例示的なニコチニアミド模倣物には、安息香酸、3-アミノ安息香酸、および6-アミノニコチニアミドが含まれる。ニコチニアミド模倣物として作用し得る別のクラスの化合物はポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)阻害剤である。例示的なPARP阻害剤には、3-アミノベンズアミド、イニパリブ(Iniparib)(BSI201)、オラバリブ(Olaparib)(AZD-2281)、ルカパリブ(Rucaparib)(AG014699、PF-01367338)、ベリパリブ(Veliparib)(ABT-888)、CEP9722、MK4827、およびBMN-673が含まれる。

20

## 【0124】

特定の態様によれば、分化は以下の通りに行われる:

(a) ESCを第1の分化物質(例えば、ニコチニアミド)を含む培地中で培養する段階; ならびに

30

(b) 段階(a)から得られた細胞を、TGF- $\beta$ スーパーファミリーのメンバー(例えば、アクチビンA)および第1の分化物質(例えば、ニコチニアミド)を含む培地中で培養する段階。

## 【0125】

好ましくは、段階(a)はTGF- $\beta$ スーパーファミリーのメンバーの非存在下で行われる。

## 【0126】

前記のプロトコールは、段階(b)において得られた細胞を、第1の分化物質(例えば、ニコチニアミド)を含むが、TGF- $\beta$ スーパーファミリーのメンバー(例えば、アクチビンA)が無い培地中で培養することによって継続されてもよい。この段階は本明細書では段階(c)と呼ばれる。

40

## 【0127】

今から、前記のプロトコールを、さらなる態様を用いて、さらに詳細に説明する。

## 【0128】

十分な量のESCが得られたら、分化プロセスを開始する。ESCは、典型的には、(例えば、コラゲナーゼA、ディスパーゼ、TrypLE select、EDTAを用いることによって)付着細胞培養物から取り出され、非付着性基材(例えば、Hydrocell非付着性細胞培養プレート)上に、ニコチニアミドの存在下で(およびアクチビンAの非存在下で)プレーティングされる。例示的なニコチニアミド濃度は、1~100mM、5~50mM、5~20mM、例えば、10mMである。細胞が非付着性基材上にプレーティングされたら、細胞培養物は、細胞懸濁液、好ましくは、懸濁培養物中の浮遊クラスター、すなわち、ヒト胚性幹細胞(hESC)に由来する細胞の凝集物と呼ばれることがある。この細胞クラスターは、どんな基材(例えば、培養プレー

50

ト、担体)にも付着しない。浮遊幹細胞の供給源は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、W006/070370において以前に述べられた。この段階は、最低1日、より好ましくは、2日間、3日間、1週間、さらには10日間、行われてもよい。好ましくは、前記細胞は、懸濁液中で、ニコチニアミドと一緒に(およびTGF- $\beta$ スーパーファミリーメンバー、例えば、アクチビンAの非存在下で)2週間を超えては長く培養されない。

#### 【0129】

好ましい態様によれば、細胞が非付着性基材上で培養される時、大気酸素条件は、パーセントが約20%、15%、10%であるか、または約20%、15%、10%未満であるように、より好ましくは、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満になるように、より好ましくは約5%(例えば、1%~20%、1%~10%、または0~5%)になるように操作される。

10

#### 【0130】

非付着性細胞培養プレートの例には、Hydrocell(例えば、カタログ番号174912)、Nuncなどによって製造される非付着性細胞培養プレートが含まれる。

#### 【0131】

典型的に、前記クラスターは、少なくとも50~500,000個、50~100,000個、50~50,000個、50~10,000個、50~5000個、50~1000個の細胞を含む。一態様によれば、クラスター中の細胞は層へと組織化されず、不規則な形を形成する。一態様において、クラスターには多能性胚性幹細胞が無い。別の態様において、クラスターは少量の多能性胚性幹細胞(例えば、タンパク質レベルでOCT4とTRA1-60とを同時発現する、5%以下または3%以下(例えば、0.01~2.7%)の細胞)を含む。典型的に、クラスターは、ニコチニアミドの影響を受けて部分的に分化された細胞を含む。このような細胞はPAX6などの神経前駆体マーカーを発現してもよい。前記細胞はまた、例えば、 $\text{-フェトプロテイン}$ 、MIXL1、およびブラキウリ(Brachyuri)などの他の系列の前駆体マーカーも発現してもよい。

20

#### 【0132】

前記クラスターは、当技術分野において公知の酵素的方法または非酵素的方法(例えば、機械的方法)を用いて解離されてもよい。一態様によれば、前記細胞は、もはや、クラスター、例えば、2~100,000個の細胞、2~50,000個の細胞、2~10,000個の細胞、2~500個の細胞、2~1000個の細胞、2~500個の細胞、2~100個の細胞、2~50個の細胞の凝集物または凝集塊の形をとらないように解離される。特定の態様によれば、前記細胞は単一細胞懸濁液中に存在する。

30

#### 【0133】

次いで、前記細胞(例えば、解離した細胞)は付着性基材上にプレーティングされ、ニコチニアミド、例えば、1~100mM、5~50mM、5~20mM、例えば、10mMのニコチニアミドの存在下で(およびアクチビンAの非存在下で)培養される。この段階は、最低1日、より好ましくは、2日間、3日間、1週間、さらには14日間行われてもよい。好ましくは、前記細胞は付着細胞培養においてニコチニアミドの存在下で(およびアクチビンの非存在下で)1週間を超えては培養されない。

#### 【0134】

概していえば、前記細胞は、典型的には、第2の分化因子(例えば、アクチビンA)が添加される前に約2~3週間、好ましくは4週間以下でニコチニアミド(1~100mM、5~50mM、5~20mM、例えば、10mMの濃度)に曝露される。

40

#### 【0135】

付着性基材の例には、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、(例えば、ラミニン521)が含まれるが、これに限定されない。

#### 【0136】

定方向分化の第1の段階(すなわち、ニコチニアミド(例えば、10mM)の存在下、非付着培養条件下、低酸素大気条件下において培養した後に、付着性基材上でニコチニアミドの存在下、低酸素大気条件下において培養する)の後に、次いで、半分化した(semi-differentiated)細胞は、付着性基材上でさらなる分化段階、すなわち、ニコチニアミド(例えば、10mM)およびアクチビンA(例えば、20~200ng/ml、100~200ng/ml、例えば、140ng/ml、

50

150ng/ml、160ng/ml、または180ng/ml)の存在下で培養される。この段階は、1日～10週間、3日～10週間、1週間～10週間、1週間～8週間、1週間～4週間、例えば、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも5週間、少なくとも6週間、少なくとも7週間、さらには8週間行われてもよい。好ましくは、この段階は約2週間行われる。一態様によれば、この分化段階はまた、低大気酸素条件、すなわち、約20%、15%、10%未満、より好ましくは、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、より好ましくは、約5%(例えば、1%～20%、1%～10%、または0～5%)でも行われる。

#### 【0137】

定方向分化の第2の段階(すなわち、付着性基材上でニコチニアミドおよびアクチビンAの存在下で培養する)の後に、さらに分化した細胞は、任意で、付着性基材上で、その後の分化段階、すなわち、ニコチニアミド(例えば、1～100mM、5～50mM、5～20mM、例えば、10mM)の存在下、アクチビンAの非存在下で培養されてもよい。この段階は、少なくとも1日、2日間、3日間、1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、さらには4週間行われてもよい。好ましくは、この段階は約1週間行われる。この分化段階は、低大気酸素条件(すなわち、約20%、15%、10%未満、より好ましくは、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、より好ましくは、約5%(例えば、1%～20%、1%～10%、もしくは0～5%)または正常大気酸素条件、あるいは両方の組み合わせ(すなわち、最初は低大気酸素条件、その後に、わずかに色素沈着のある細胞が観察された場合に正常大気酸素条件)で行われてもよい。

10

#### 【0138】

特定の態様によれば、大気酸素条件が正常大気条件に戻された場合に、細胞は、少なくとも、もう1日(例えば、2週間まで)、ニコチニアミド(例えば、10mM)の存在下およびアクチビンAの非存在下で培養される。

20

#### 【0139】

本発明による基本培地は、インピトロで細胞増殖を支持するための当技術分野において公知の任意の公知の細胞培養培地、典型的には、培養中の細胞を生存可能な状態で維持するのに必要な、塩、糖、アミノ酸、および他の任意の栄養分を含む、規定された基本溶液を含む培地である。本発明に従って用いられ得る市販の基本培地の非限定的な例は、Nuri stem(ESC分化の場合はbFGFおよびTGF を含まず、ESC増加の場合はbFGFおよびTGF を含む)、Neurobasal(商標)、KO-DMEM、DMEM、DMEM/F12、LonzaL7系、mTeSR、StemPro、XF KS R、E8、Cellgro(商標) Stem Cell Growth Medium、またはX-Vivo(商標)を含む。基本培地には、細胞培養を扱う当技術分野において公知の様々な作用物質が加えられてもよい。以下は、本開示に従って用いられる培養系に含まれ得る様々なサプリメントについての非限定的な言及である。

30

-ノックアウト血清代用品(knock out serum replacement)(KOSR)、Nutridoma-CS、TCH(商標)、N2、N2誘導体、もしくはB27、または組み合わせなどがあるが、これに限定されない、血清または血清代用品を含有する培地。

-フィプロネクチン、ラミニン、コラーゲン、およびゼラチンなどがあるが、これに限定されない、細胞外マトリックス(ECM)成分。ECMは、増殖因子の1つまたは複数のTGF スーパーファミリーのメンバーを運ぶのに用いられてもよい。

40

-ペニシリンおよびストレプトマイシンなどがあるが、これに限定されない、抗菌剤。

-非必須アミノ酸(NEAA)。BDNF、NT3、NT4などがあるが、これに限定されない、培養中のSCの生存の促進において役割を果たすことが公知であるニューロトロphins。

#### 【0140】

好ましい態様によれば、ESCを分化させるのに用いられる培地は、Nuristem培地(Biological Industries、05-102-1Aまたは05-100-1A)である。

#### 【0141】

特定の態様によれば、ESCの分化はゼノフリー条件下において行われる。

#### 【0142】

一態様によれば、増殖/成長培地には異種の汚染物質が無い、すなわち、血清、動物由

50

来増殖因子、およびアルブミンなどの動物由来成分が無い。従って、この態様によれば、培養する段階は異種の汚染物質の非存在下で行われる。

【0143】

ESCをゼノフリー条件下において培養するための他の方法は、その内容が全体として組み入れられる米国特許出願公開第20130196369号に示される。

【0144】

分化段階の間に、胚性幹細胞は分化状態についてモニタリングされてもよい。分化を示すことが分かっている細胞特異的マーカーまたは組織特異的マーカーを調べると、細胞分化を決定することができる。

【0145】

組織/細胞特異的マーカーは、当技術分野において周知の免疫学的技法を用いて検出すことができる[Thomson JA et al.,(1998). Science 282: 1145-7]。例には、膜結合マーカーまたは細胞内マーカーの場合はフローサイトメトリー、細胞外マーカーおよび細胞内マーカーの場合は免疫組織化学、ならびに分泌分子マーカー(例えば、PEDF)の場合は酵素イムノアッセイ法が含まれるが、これに限定されない。

10

【0146】

従って、本発明の別の局面によれば、

(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；

20

(b)RPE系列にさらに分化している細胞を生成するように、分化細胞を、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分化物質を含む培地中で培養する段階；

(c)RPE系列にさらに分化している細胞からの色素上皮由来因子(PEDF)の分泌を分析する段階；ならびに

(d)RPE細胞を生成するように、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

を含み、

PEDF量が所定のレベルを上回る場合に段階(d)が行われる、  
網膜上皮細胞を作製する方法が提供される。

30

【0147】

好ましくは、段階(d)は、PEDFのレベルが100ng/ml/日、200ng/ml/日、300ng/ml/日、400ng/ml/日、または500ng/ml/日を上回る場合に行われる。

【0148】

分化プロセスの間または分化プロセスの後に細胞の有効性を判定するための別 の方法は、本明細書の下記の実施例4において示したように、バリア機能ならびにPEDFおよびVEGFの極性分泌を分析することによる方法である。

【0149】

前記細胞はRPE細胞へと促されたら選択/または増加されてもよい。

40

【0150】

特定の態様によれば、選択は、ネガティブ選択に、すなわち、非RPE細胞を除去することに基づいている。これは、非色素細胞を除去することによって、または非多角細胞を除去することによって、または表面マーカーを使用することによって機械的に行われてもよい。

【0151】

別の態様によれば、選択は、ポジティブ選択、すなわち、形態(例えば、色素細胞および/または多角細胞)に基づいて選択することに基づいている。これは目視による分析によって行われてもよく、表面マーカーを使用することによって行われてもよい。

【0152】

50

さらに別の態様によれば、選択は、最初に、ネガティブ選択に基づき、次いで、ポジティブ選択に基づいている。

【0153】

RPE細胞の増加は、細胞外マトリックス上、例えば、ゼラチン、コラーゲン、またはポリ-D-リジン、およびラミニン上で行われてもよい。増加のために、前記細胞は、無血清KOM、血清を含む培地(例えば、DMEM+20%)、またはNuristem培地(06-5102-01-1A Biological Industries)中で培養されてもよい。任意で、前記細胞は、増加期の間に、濃度1~100mM、5~50mM、5~20mM、例えば、10mMのニコチニアミドに曝露されてもよい。これらの培養条件下では、色素細胞は色素沈着を減らし、子宮筋腫に似た形態を獲得する。さらに長期間培養し、高密度培養物まで増殖させた後に、前記細胞は特徴的な多角形の形態を再獲得し、好ましくは、RPE細胞の色素沈着も再獲得する。

10

【0154】

RPE細胞は、懸濁液中で増加されてもよいか、または単層の状態で増加されてもよい。単層培養でのRPE細胞の増加は、当業者に周知の方法によるバイオリアクター内での大規模増加に変更されてもよい。

【0155】

本明細書に記載の方法に従って作製されたRPE細胞の集団は多数の異なるパラメータに従って特徴決定されてもよい。

【0156】

従って、例えば、得られたRPE細胞は形状が多角形であり、色素沈着している。

20

【0157】

一態様によれば、得られたRPE細胞集団内の細胞の少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、さらには100%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。

【0158】

投与後に、本明細書に記載の細胞は(図27Cに示したように)単層を形成することができる。

【0159】

一態様によれば、単層中の細胞の経上皮電気抵抗は100オームより大きい。

30

【0160】

好ましくは、前記細胞の経上皮電気抵抗は、150オーム、200オーム、250オーム、300オーム、300オーム、400オーム、500オーム、600オーム、700オーム、800オームより大きいか、さらには900オームより大きい。

【0161】

特定の態様によれば、TEERは、100~1000オーム、より好ましくは、100~900オーム、例えば、200~900オーム、300~800オーム、300~700オーム、400~800オーム、または400~700オームである。

【0162】

経上皮電気抵抗(TEER)を測定するための装置は当技術分野において公知である。TEERを測定するための例示的な構成を図28に示した。

40

【0163】

本明細書において開示された細胞集団には未分化なヒト胚性幹細胞が無いことが理解されるだろう。一態様によれば、例えば、FACSによって測定された場合に、1:250,000より少ない細胞がOct4<sup>+</sup>TRA-1-60<sup>+</sup>である。前記細胞はまた、PCRによって測定された場合に、hESCに関連するGDF3もTDGFも発現しないか、hESCに関連するGDF3またはTDGFを下方制御する。

【0164】

本明細書において開示された細胞集団を特徴決定する別の手法はマーカー発現による手法である。従って、例えば、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

50

80%、85%、または90%はペストロフィン1を発現する。一態様によれば、前記細胞の90~95%はペストロフィンを発現する。

#### 【0165】

別の態様によれば、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%、85%、87%、89%、または90%は小眼球症関連転写因子(MITF)を発現する。例えば、前記細胞の85~95%はMITFを発現する。

#### 【0166】

別の態様によれば、FACSによって測定された場合に、前記細胞の少なくとも50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、87%、89%、または90%はペアードボックス遺伝子6(PAX-6)を発現する。

10

#### 【0167】

本明細書に記載の細胞はまた、分泌する因子の量および/またはタイプに従って特徴決定されることもできる。従って、一態様によれば、前記細胞は、好ましくは、ELISAによって測定された場合に、(例えば、培養して14日後に)1日につき1mIあたり500、750、1000ng、さらには2000ng超の色素上皮由来因子(PEDF)を分泌する。

#### 【0168】

本明細書において作製したRPE細胞はPEDFおよび血管内皮増殖因子(VEGF)を極性化様式で分泌することが理解されるだろう。特定の態様によれば、PEDFの基底側分泌に対するPEDFの頂端側分泌の比は1より大きい。特定の態様によれば、PEDFの基底側分泌に対するPEDFの頂端側分泌の比は2より大きい。特定の態様によれば、PEDFの基底側分泌に対するPEDFの頂端側分泌の比は3より大きい。さらに、VEGFの頂端側分泌に対するVEGFの基底側分泌の比は1より大きい。特定の態様によれば、VEGFの頂端側分泌に対するVEGFの基底側分泌の比は、1.5、2、または2.5より大きい。

20

#### 【0169】

本発明の細胞は、例えば、アンジオゲニン、免疫調節性因子IL-6、sgp130、MIF、sTNF-R1、sTRAIL-R3、MCP-1およびオステオプロテジエリン、細胞外マトリックス制御因子TIMP-1およびTIMP-2、ならびにタンパク質Ax1を含む、さらなる因子を分泌する。

#### 【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 偏在性膜受容体1(sTNF-R1)のそれぞれを分泌/放出する。

30

#### 【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 偏在性膜受容体1(sTNF-R1)も分泌/放出することが理解されるだろう。

40

#### 【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 偏在性膜受容体1(sTNF-R1)も分泌/放出する。

#### 【0173】

本明細書において作製したRPE細胞は、好ましくは、アンジオゲニン、TIMP2、sgp130、およびsTNF-R1を極性化様式で分泌する。

#### 【0174】

特定の態様によれば、sgp130の基底側分泌に対するsgp130の頂端側分泌の比は1より大きい。特定の態様によれば、sgp130の基底側分泌に対するsgp130の頂端側分泌の比は2よ

50

り大きい。特定の態様によれば、sgp130の基底側分泌に対するsgp130の頂端側分泌の比は3より大きい。

【0175】

さらに、基底側sTNF-R1に対する頂端側sTNF-R1の比は1より大きい。特定の態様によれば、基底側sTNF-R1に対する頂端側sTNF-R1の比は2より大きい。特定の態様によれば、基底側sTNF-R1に対する頂端側sTNF-R1の比は3より大きい。

【0176】

さらに、アンジオゲニンの基底側分泌:アンジオゲニンの頂端側分泌の比は1より大きい。特定の態様によれば、アンジオゲニンの基底側分泌:アンジオゲニンの頂端側分泌の比は1.5、2、2.5、または3より大きい。

10

【0177】

さらに、TIMP2の基底側分泌に対するTIMP2の頂端側分泌の比は1より大きい。特定の態様によれば、TIMP2の基底側分泌に対するTIMP2の頂端側分泌の比は2より大きい。特定の態様によれば、TIMP2の基底側分泌に対するTIMP2の頂端側分泌の比は3より大きい。

【0178】

前記細胞の安定性は別の特徴である。従って、例えば、PEDF分泌の量は、2~8における6時間、8時間、10時間、12時間、さらには24時間のインキュベーション後でも細胞内で依然として安定している。さらに、PEDFおよびVEGFの極性分泌は、2~8における6時間、8時間、10時間、12時間、さらには24時間のインキュベーション後でも依然として安定している。さらに、前記細胞のTEERは、2~8における6時間、8時間、10時間、12時間、さらには24時間のインキュベーション後でも細胞内で依然として安定している。

20

【0179】

別の態様において、前記細胞は治療効果があることを特徴とする。従って、例えば、本発明者らは、細胞集団が網膜下投与後にRCSラットにおける視力をレスキューすることができる示している。さらに、細胞集団はRCSラットにおいて網膜下投与後180日までにわたって(一部の態様では少なくとも180日にわたって)、光受容体(例えば、錐体光受容体)をレスキューすることができる。

【0180】

RPE細胞を得ることが大いに有益なことは当業者によく理解されるだろう。RPE細胞は、RPE細胞の生存、再生、および機能を促す新薬を開発するためのインビトロモデルとして用いられる可能性がある。RPE細胞は、RPE細胞に対して毒性作用または再生作用のある化合物のハイスクループットスクリーニングに役立つ可能性がある。RPE細胞は、光受容体細胞の発生、分化、維持、生存、および機能に重要な機構、新たな遺伝子、可溶性因子または膜結合因子を明らかにするために用いられる可能性がある。

30

【0181】

RPE細胞はまた、網膜変性における機能不全の、または变成したRPE細胞を移植、補充、および支持するための無制限のRPE細胞供給源としても役立つ可能性がある。さらに、遺伝子組換えされたRPE細胞は、移植後に眼および網膜に遺伝子を運び、発現するためのベクターとして役立つ可能性がある。

40

【0182】

本開示の方法によって生産されるRPE細胞は、このような細胞の大規模な、および/または長期の培養に用いられる可能性がある。この目的のために、本発明の方法は、細胞の大規模生産に適したバイオリアクターおよびまたは細胞培養系において実施しなければならず、この場合、本発明に従って未分化hSCを培養しなければならない。バイオリアクターおよびまたは細胞培養系において細胞を培養するための一般要件は当業者に周知である。

【0183】

前記細胞の収集は当技術分野において公知の様々な方法によって行うことができる。非限定的な例には、機械的切開、およびパパインまたはトリプシン(例えば、TrypLE select)を用いた解離が含まれる。当技術分野において公知の他の方法も適用可能である。

【0184】

50

本明細書に記載のように作製したRPE細胞は対象の眼内の様々な標的部位に移植することができる。一態様によれば、RPE細胞の移植は、RPEの正常な解剖学的位置である(光受容体外節と脈絡膜との間にある)眼の網膜下空間への移植である。さらに、前記細胞の遊走能力および/または正のパラクライン作用に応じて、内側網膜または外側網膜、網膜周辺部、および脈絡膜内を含む、さらなる眼区画への移植を考慮することができる。

#### 【0185】

本明細書に記載のRPE細胞を用いて処置され得る網膜疾患には、網膜色素変性症、網膜分離、網膜格子状変性、ベスト病、および加齢黄斑変性(AMD)が含まれるが、これに限定されない。

#### 【0186】

さらに、移植は、当技術分野において公知の様々な技法によって行うことができる。RPE移植を行うための方法は、例えば、米国特許第5,962,027号、同第6,045,791号、および同第5,941,250号、ならびにEye Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol March 1997; 235(3): 149-58; Biochem Biophys Res Commun Feb. 24, 2000; 268(3): 842-6; Ophthalmic Surg February 1991; 22(2): 102-8に記載されている。角膜移植を行うための方法は、例えば、米国特許第5,755,785号、ならびにEye 1995; 9 (Pt 6 Su): 6-12; Curr Opin Ophthalmol August 1992; 3 (4): 473-81; Ophthalmic Surg Lasers April 1998; 29 (4): 305-8; Ophthalmology April 2000; 107 (4): 719-24; およびJpn J Ophthalmol November-December 1999; 43(6): 502-8に記載されている。主パラクライン作用(mainly paracrine effect)が用いられるのであれば、細胞はまた、半透性の容器に入れられた眼に送達され、この中で維持される可能性もあり、これはまた宿主免疫系への細胞の曝露も減少させる(Neurotech USA CNTF delivery system; PNAS March 7, 2006 vol. 103(10) 3896-3901)。

#### 【0187】

一態様によれば、移植は、経扁平部硝子体切除術の後に、細胞を小さな網膜開口部を通して網膜下空間内に送達することによって、または直接注射することによって行われる。または、細胞は経強膜、経脈絡叢アプローチを介して網膜下空間に送達されてもよい。さらに、硝子体空間への直接的な経強膜注射または毛様体の近くにある前側網膜周辺部への送達を行うことができる。

#### 【0188】

RPE細胞は様々な形で移植することができる。例えば、RPE細胞は細胞懸濁液の形で標的部位に導入されてもよく、マトリックス上、細胞外マトリックス上、もしくは基材上、例えば、生分解性ポリマー上、または組み合わせ上に付着されてもよい。RPE細胞はまた、他の網膜細胞と、例えば、光受容体と一緒に移植(同時移植)されてもよい。

#### 【0189】

従って、本発明はまた、本明細書に記載のRPE細胞の薬学的組成物に関する。この組成物は、好ましくは、眼に移植するのに適している。従って、例えば、RPE細胞はBSS plus(商標)などの眼内洗浄液中に製剤化されてもよい。

#### 【0190】

本願から成立しつつある特許の期間中に、RPE細胞を作製するための多くの関連する技術が開発されることが予想される。RPE細胞という用語は、このような全ての新技術をアブリオリに含むことが意図される。

#### 【0191】

本明細書で使用する「約」という用語は±10%を指す。

#### 【0192】

「含む(comprises)」、「含む(comprising)」、「含む/includes)」、「含む(including)」、「有する(having)」という用語、およびこれらの活用形は、「～を含むが～に限定されない(including but not limited to)」を意味する。

#### 【0193】

「～からなる(consisting of)」という用語は、「～を含みかつ～に限定される(including and limited to)」を意味する。

10

20

30

40

50

**【0194】**

「～から本質的になる(consisting essentially of)」という用語は、さらなる成分、段階、および/または部分が、請求された組成物、方法、および構造の基本的かつ新規の特徴を実質的に変えない限り、前記の組成物、方法、または構造が、さらなる成分、段階、および/または部分を含んでもよいことを意味する。

**【0195】**

本明細書で使用する単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、特に文脈によってはっきりと規定されていない限り複数の指示物を含む。例えば、「1つの化合物」または「少なくとも1つの化合物」という用語は、その混合物を含む複数の化合物を含んでもよい。

10

**【0196】**

本願全体を通じて、本発明の様々な態様を範囲の形で提示することができる。範囲の形での説明は単なる便宜および簡略のためのものであり、本発明の範囲に対する融通の利かない限定として解釈してはならないと理解されるべきである。従って、範囲の説明は、可能性のある全ての部分範囲(subrange)ならびにその範囲内にある個々の数値を具体的に開示したとみなされるべきである。例えば、1~6などの範囲の説明は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などの部分範囲、ならびにその範囲内にある個々の数値、例えば、1、2、3、4、5、および6を具体的に開示したとみなされるべきである。これは範囲の幅に関係なく適用される。

20

**【0197】**

本明細書で使用する「方法」という用語は、化学、薬理学、生物学、生化学、なおよび医学の当業者に公知の手法、手段、技法、および手順、または化学、薬理学、生物学、生化学、および医学の当業者によって、公知の手法、手段、技法、および手順から容易に開発される手法、手段、技法、および手順を含むが、これに限定されない、所与のタスクを達成するための手法、手段、技法、および手順を指す。

**【0198】**

本明細書で使用する「処置する」という用語は、異常の進行を妨げる、実質的に阻害する、遅延する、もしくは逆転させるか、異常にに関する臨床症状もしくは審美的症状を実質的に寛解させるか、または異常にに関する臨床症状もしくは審美的症状の出現を実質的に阻止することを含む。

30

**【0199】**

理解しやすくするために別々の態様の文脈において説明された本発明のある特定の特徴は、1つの態様において組み合わされて提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔にするために1つの態様の文脈において説明された本発明の様々な特徴は、別々に、または任意の適切なサブコンビネーションで、または本発明の他の任意の説明された態様において適切なように提供されてもよい。様々な態様の状況において説明された、ある特定の特徴は、これらの要素がなければ態様が機能しない場合を除いて、これらの態様の必須の特徴とみなしてはならない。

**【0200】**

前記で説明され、下記の特許請求の範囲のセクションにおいて請求される本発明の様々な態様および局面は以下の実施例において実験的に裏付けられる。

40

**【実施例】****【0201】**

ここで、以下の実施例について言及する。以下の実施例は、前記の説明と共に本発明の一部の態様を非限定的に例示する。

**【0202】**

一般的に、本明細書において用いられる命名法および本発明において用いられる実験手順には、分子的技法、生化学的技法、微生物学的技法、および組換えDNA技法が含まれる。このような技法は文献において細かな点に至るまで説明されている。例えば、「Molecular Cloning: A laboratory Manual」 Sambrook et al., (1989); 「Current Protocols

50

in Molecular Biology」 Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, 「A Practical Guide to Molecular Cloning」, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., 「Recombinant DNA」, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) 「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」, Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 米国特許第4,666,828号；同第4,683,202号；同第4,801,531号；同第5,192,659号、および同第5,272,057号に示された方法；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」, Volume I-III Cellis, J. E., ed. (1994); Freshneyによる「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; 「Current Protocols in Immunology」 Volume I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), 「Basic and Clinical Immunology」 (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), 「Selected Methods in Cellular Immunology」, W. H. Freeman and Co., New York (1980)を参照されたい。10 特許および科学文献において、使用可能なイムノアッセイ法が広範囲にわたって説明されている。例えば、米国特許第3,791,932号；同第3,839,153号；同第3,850,752号；同第3,850,578号；同第3,853,987号；同第3,867,517号；同第3,879,262号；同第3,901,654号；同第3,935,074号；同第3,984,533号；同第3,996,345号；同第4,034,074号；同第4,098,876号；同第4,879,219号；同第5,011,771号、および同第5,281,521号を参照されたい。「Oligonucleotide Synthesis」 Gait, M. J., ed. (1984); 「Nucleic Acid Hybridization」 Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); 「Transcription and Translation」 Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); 「Animal Cell Culture」 Freshney, R. I., ed. (1986); 「Immobilized Cells and Enzymes」 IRL Press, (1986); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」 Perbal, B., (1984)、および「Methods in Enzymology」 Vol. 1-317, Academic Press; 「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., 「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」 CSHL Press (1996)を参照されたい。20 これらは全て、本明細書において完全に示されたように参考により組み入れられる。本文書全体を通して他の一般的な参考文献が提供される。その中にある手順は当技術分野において周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。その中に収められている情報は全て参考により本明細書に組み入れられる。30

### 【0203】

#### 実施例1

##### CRALBP/PMEL17二重染色FACS法の適格判定

この研究の目的は、少なくとも3日の試験日にわたる少なくとも6回の独立したスパイキング(spiking)アッセイ法において、CRALBP/PMEL17二重染色FACS法の正確度および精度を証明することによって、CRALBP/PMEL17二重染色FACS法について適格性を判定することであった。陽性対照細胞としてOpRegen(登録商標)バッチ5Cを使用し、陰性対照細胞としてHAD-C 102-hESCを使用して、このアッセイ法の適格性判定を行った。異なるスパイキングポイントの正確度および精度を試験するために、hESCにスパイクした既知量のRPE(OpRegen(登録商標)5C)の較正曲線を使用した。予想された正確度および精度は、全ポイントで25%までであった。40

### 【0204】

染色プロトコール：スポンサープロトコールに従って、凍結保存したhESCバンク(HAD-C 102 p48 4.5.2014)から取得した陰性対照hESC細胞をNutristem(HSAを含有する)に入れて融解した。陽性対照RPE細胞ストック：スポンサープロトコールに従って、OpRegen(登録商標)バッチ5C細胞(参照株)を20%HS-DMEMに入れて融解した。融解したOpRegen(登録商標)5CおよびHAD-C 102 hESCを遠心沈殿し、1mlのPBS(-)に再懸濁し、35 μMセルストレーナーで濾過し、トリパンブルーを用いて計数した。細胞濃度をPBS(-)中で1mlにつき $0.73 \times 10^6$  ~  $10^6$ 個の細胞まで調整した。1 μl/mlのFVS450を各細胞懸濁液に添加した後に、ボルテッ50

クスし、37℃で6分間インキュベートした。FVS450を0.1%BSAで洗浄し、0.1%BSA-Fc-blockに再懸濁して( RTで5分)、細胞上の全Fcエピトープをブロックした。次いで、細胞をPBS(-)で洗浄し、80%メタノールで固定した(4℃で5分)。固定した細胞をPBS(-)で1回、0.1%PBS-Tで1回、洗浄し、0.1%PBS-Tで透過処理した( RTで20分)。透過処理溶液を10%正常ヤギ血清(NGS)ブロッキング溶液(200,000細胞/50μl)とRTで少なくとも30分間(最大1時間)交換した。インキュベーション時間の間に品質試料チューブ(QS)を調製し、ブロッキングの終了時に細胞を分け、免疫染色した。細胞を一次抗体と30分間インキュベートし、その後に、0.1%PBS-Tで3回洗浄し、二次抗体と30分間インキュベートし、0.1%PBS-Tで3回洗浄した。

#### 【0205】

10

陰性対照細胞および陽性対照細胞をviability stain FVS450で染色し、固定し、ブロックし、透過処理した。次いで、各集団のトリパンブルー生存率による細胞数に基づいて、4種類の濃度(hESC中25%、50%、75%、および95%のRPE)での陰性対照hESC中の既知量の陽性対照RPE(OpRegen(登録商標)5C)細胞の較正曲線を作製した。陰性対照細胞および陽性対照細胞ならびに混合集団を、RPEマーカーであるCRALBPおよびPMEL17に特異的な一次モノクローナル抗体で免疫染色し、その後に、適合する二次抗体(それぞれ、抗マウス-FITCおよび抗ウサギ-Alexa Fluor647)で染色した。染色細胞をFACS分析して、パーセント単一生細胞ゲーティングCRALBP+PMEL17+細胞を測定した。

#### 【0206】

20

##### 結果

正確度: アッセイ法の正確度を4つのレベルのスパイク済RPE(25%、50%、75%、および95%)の試験結果から求めた。潜在的に100%のRPE細胞であることに対して、RPEストック(OpRegen(登録商標)5C)の正確度を求めた。それぞれのレベル値を6回の独立したラン/測定によって分析した。

#### 【0207】

30

50%濃度レベルが、25%までの期待された正確度で定量する下限であるとみなされた(50%レベルは-8.41~20.14であった; 75%および99.5%レベルは-5.32~6.88であった)。

#### 【0208】

これらの結果は25%までの期待された相対バイアス(relative bias)アウトカムを満たし、このアッセイ法が50~99.5%の濃度のCRALBP+PMEL17+二重陽性細胞を決定するために正確度があることを示す。OpRegen(登録商標)5Cは99.5%のCRALBP+PMEL17+二重陽性RPE細胞を生じるので、99.5%より大きい結果については25%未満の相対バイアスを保証することができない。

#### 【0209】

(表1)

ラン	指定した濃度(%)	測定した濃度(%)	相対バイアス(%)	
1	25	20.88	-16.48	10
2		31.61	26.44	
3		32.20	28.80	
4		32.01	28.04	
5		25.71	2.84	
6		26.87	7.48	
1	50%	45.93	-8.14	20
2		60.08	20.16	
3		56.87	13.74	
4		58.51	17.02	
5		50.56	1.12	
6		49.52	-0.96	
1	75%	71.01	-5.32	30
2		79.64	6.19	
3		78.41	4.55	
4		80.16	6.88	
5		73.85	-1.53	
6		72.94	-2.75	
1	95%	93.94	-1.12	40
2		96.14	1.20	
3		95.11	0.12	
4		95.59	1.01	
5		93.81	-1.25	
6		93.70	-1.37	
1	100%	98.79	-1.21	50
2		99.69	-0.31	
3		99.62	-0.38	
4		99.59	-0.41	
5		99.60	-0.40	
6		99.48	-0.52	

【 0 2 1 0 】

室内再現精度(Intermediate Precision):1人のオペレーターが行った6回のアッセイ法の結果からアッセイ法の室内再現精度を求めた。アッセイごとにパーセント単一生RPEを求め、これから%CYを計算した。表2は試験結果をまとめたものである。示したように、

全濃度レベルについて%CYは20%より小さく、十分な精度で測定することができる。濃度レベル25%、50%、75%、95%、および100%RPEの%CYは、それぞれ、16.14%、10.61%、5.10%、1.17%、および0.34%であった。これらの結果は精度の期待値を満たしている。全濃度でパーセントRPEの測定値は期待値の20%以内である。これらの結果は、このアッセイ法が25~99.5%の濃度のRPEを測定するために精度があることを示す。

【0211】

(表2)

指定した濃度(%)	ラン	測定した濃度(%RPE)
25	1	20.88
	2	31.61
	3	32.20
	4	32.01
	5	25.71
	6	26.87
	平均 %RPE	28.21
	SD	4.55
	%CV	16.14
50	1	45.93
	2	60.08
	3	56.87
	4	58.51
	5	50.56
	6	49.52
	平均 %RPE	53.58
	SD	5.68
	%CV	10.61
75	1	71.01
	2	79.64
	3	78.41
	4	80.16
	5	73.85
	6	72.94
	平均 %RPE	76.00
	SD	3.88
	%CV	5.10
95	1	93.94
	2	96.14
	3	95.11
	4	95.96
	5	93.81
	6	93.70
	平均 %RPE	94.78
	SD	1.11
	%CV	1.17
100	1	98.79
	2	99.69
	3	99.62
	4	99.59
	5	99.60
	6	99.48
	平均 %RPE	99.46
	SD	0.34
	%CV	0.34

【0 2 1 2】

併行精度(Repeatability): 試料の併行精度を3回のラン(#2、#3、および#4)で試験し、3回のラン(#2、#3、および#4)では2つの同じOpRegen(登録商標)SC試料を染色し、並行して取得した。結果から、実験内で得られた試料同一性が試料全体にわたって再現可能であり、首尾一貫していることが確認された。

10

20

30

40

50

**【 0 2 1 3 】**

直線性/範囲: 図1に示したように、正確度および精度があることが見出されたデータを用いて直線性を測定した。目標値(スパイク済)と、試験されたアッセイ範囲(50% ~ 100%)にわたる測定結果との回帰係数は0.99であることが見出された。従って、許容される正確度および精度ならびに直線性を証明した、この方法の範囲は、試験試料の期待された範囲をカバーする、50% ~ 99.5% の範囲のRPE細胞である。

**【 0 2 1 4 】**

陽性対照細胞: CRALBP/PMEL17二重陽性細胞の暫定レベルを95%以上に設定した。

**【 0 2 1 5 】**

陰性対照細胞: hESCに対するCRALBP/PMEL17二重陽性細胞の暫定レベルを2%またはそれ未満に設定した。 10

**【 0 2 1 6 】**

安定性: 結果から、染色された試料は1日後および4日後でも4で安定しており、正確度は、期待された許容基準内に保たれ、従って、試料を調製して96時間以内にデータを取得できることが分かる。

**【 0 2 1 7 】****結論**

本明細書に示した結果から、開示された方法は適格であると判定され、OpRegen(登録商標)最終産物におけるRPEの純度およびOpRegen(登録商標)の生産工程に沿った異なる段階でのRPEの純度をインビトロで求める所期の用途に適していることが分かる。50% ~ 99.5% の範囲のRPE細胞において、相対バイアスの正確度は<25%、%CVの精度は<20%であった。 20

**【 0 2 1 8 】****実施例2****OpRegen(登録商標)純度のレベルの評価**

ヒト網膜色素上皮細胞(RPE)の純度ならびにRPE細胞中の非RPE細胞不純物のレベルを評価するためのFACSに基づく方法を開発した。視サイクル成分の1つである細胞レチンアルデヒド結合タンパク質(CRALBP)が、成熟RPE細胞のユニークなマーカーとしてバイオインフォマティクスを用いて同定された。CRALBP特異的モノクローナル抗体を用いた予備研究から、本明細書に記載の方法に従って作製されたRPE細胞において98%を超える純度が示されている。さらに、これらの結果は、RPEに認められるメラノソームマーカーであるPMEL17の免疫染色によって裏付けられた。さらに、いくつかのRPE特異的マーカーとは異なり、CRALBPは、可能性のある神経冠細胞汚染物質であるメラノサイトにおいて発現していない。 30

**【 0 2 1 9 】**

試験試料および対照: ヒト初代メラノサイト(ATCC、PCS-200-013)をCRALBPの場合は陰性対照細胞として使用し、メラノソーム(メラニン顆粒)に豊富にあるI型膜貫通糖タンパク質であるPMEL17の場合は陽性対照細胞として使用した。P29におけるHADC102-hESC(OpRegen(登録商標)親株)をCRALBPおよびPMEL17両方の陰性対照細胞として使用した。臨床グレードOpRegen(登録商標)細胞(バッチ2A)および研究グレードOpRegen(登録商標)(GMPに似た模擬試験生産で生産し；模擬試験IV D16)を試験試料として使用した。これらの細胞を実施例3に記載のように作製した。 40

**【 0 2 2 0 】**

免疫染色およびFACS分析: 細胞を融解し、Fixable Viability Stain(FVS450)(BD 562247)を用いて染色し、80%メタノールで固定し、一次マウス抗CRALBP(クローンB2、Abcam ab15051)、またはそのマウスIgG2aに対するアイソタイプ対照(Abcam ab170191)およびウサギ抗ヒトPMEL17(クローンEPR4864、Abcam ab137062)で免疫染色し、その後に、それぞれ、二次抗体ヤギ抗マウス(Dako F0479)およびヤギ抗ウサギ(Jackson 111-606-144)で免疫染色した。

**【 0 2 2 1 】**

10

20

30

40

50

FACSデータの取得は、検証済みのNaviosフローサイトメーター(Beckman Coulter)を用いて行い、分析はFlowJo7.6を用いて行った。

#### 【0222】

##### 結果

抗CRALBPモノクローナル抗体を用いた初期FACSデータから、OpRegen(登録商標)の純度レベルは98%を上回ることが分かった。可能性のある神経冠細胞汚染物質であるメラノサイトは、ユニークなRPE特異的マーカーであるCRALBPが陰性であることが見出された。(1.7%)。親株HADC102-hESCは予想した通りCRALBP陰性であった(0.2%)。

#### 【0223】

OpRegen(登録商標)の純度レベルはCRALBPおよびPMEL17による二重染色後でも98%超にとどまった(図10)。メラノサイトは予想した通りPMEL17陽性染色を示したが、二重に印がつけられた集団については陰性であった(約1%)。HADC102-hESCはCRALBPおよびPMEL17について陰性染色を示した(0.07%)。

#### 【0224】

##### 実施例3

###### 製造工程および工程管理の説明

OpRegen(登録商標)は、放射線照射された、ゼノフリーGMPグレードのヒト臍帯線維芽細胞フィーダー上で増殖させた、ゼノフリーGMPグレードのHAD-C 102 hESC株から製造される。臨床グレードヒト線維芽細胞フィーダー細胞株(CRD008; MCB)およびワーキング細胞バンク(WCB)を医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規則(Good Manufacturing Practice)(GMP)の下で、かつゼノフリー条件下において生産し、適切に試験し、特徴決定し、バンク化(bank)した。次いで、GMPの下で、かつゼノフリー条件下において、余ったヒト胚盤胞から臨床グレードのhESC HAD-C 102株を得る際に、これらを使用した。

#### 【0225】

生産の初期段階では、放射線照射済みフィーダー上でhESCをコロニーとして増加させる。次いで、分化を定方向で開始するために、hESCを懸濁培養に移す。球状体(SB)を形成し、次いで、神経運命に向かい、その後に、RPE細胞に向かう継続した定方向分化条件下において付着性培養物としてブレーティングする。分化段階の終了時に、非色素区域を物理的に切除し、色素細胞を酵素により収集し、播種し、増加させる。精製されたhESC由来RPE細胞(DS)を継代2代目で収集し、DPにすぐに加工する。製造工程の期間はhESCの増殖速度に左右され(融解から約2ヶ月)、通常、合計で4~5ヶ月以上にわたる。

#### 【0226】

工程内品質管理(QC)試験を含む、製造工程の各段階を以下で手短に説明する。

#### 【0227】

段階1~3: ヒト帯線維芽細胞フィーダーワーキング細胞バンク(WCB)の作製。継代3および4代目のヒト帯フィーダーマスター細胞バンク(MCB)(CRD008-MCB)のバイアルを融解し、20%ヒト血清(14-498E、Lonza)を加えたダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、SH30081.01、Hyclone)中で増加させ、放射線照射し(Gamma cell、220 Exel、MDS Nordin 3,500ラド)、ワーキング細胞バンク(WCB)を作製するために継代7および8代目で凍結保存した。凍結保存の前に、フィーダー細胞培養からの試料を、無菌性、マイコプラズマ、およびリムルスアメーバサイトライセート(Limulus Amebocyte Lysate)(LAL)、形態、核型、細胞数、ならびに生存率について試験した。さらに、融解後に、MCBとの同一性、増殖できないこと、および未分化HAD-C 102-hESC増殖を支持する能力を確認した。WCBが全てのQC試験に合格した場合に、hESCを増加させるために該バンクをリリースした。

#### 【0228】

生産段階1~3を図12に図示した。

#### 【0229】

段階4および5:hECSの増加。ヒト帯線維芽細胞WCB(CRD008-WCB8またはCRD008-WCB9)の1個のバイアルを融解し、組換えヒトゼラチン(RhG 100-001、Fibrogen)で覆ったセンター・ウェルプレートに、20%ヒト血清(14-498E、Lonza)を加えたDMEM(SH30081.01、Hyclone)

10

20

30

40

50

中70,000～100,000細胞/ml/プレートの濃度でプレーティングした。線維芽細胞を付着させるために、細胞を37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートした。1～4日後に、HAD-C 102-hESC MCBからの試料を融解し、増殖因子bFGFおよびTGF-β(05-102-1A、Biological Industries、Israel)を含有するNutristem「Plus」培地(GMPグレードであり、かつゼノフリー)中のフィーダー細胞の上に置いて37℃、5%CO<sub>2</sub>で6～7日間プレーティングした。6日目～7日目に、hESC培養物を機械的に破壊し(滅菌したチップ、または使い捨ての滅菌した幹細胞用ツールを用いた；14602 Swemed)、フィーダー細胞を含有する、さらなる新鮮に調製されたプレートに70,000～100,000細胞/プレートの濃度で継代した。分化を開始するのに必要なhESC量に達するように、これを数回の継代の間毎週繰り返した(図13、段階4および5)。増加させたHAD-C 102-hESCを使用する前に、無菌性、マイコプラズマ、LAL、核型、およびMCBとの同一性について試験した。さらに、多能性の形態学的な外観ならびに多能性マーカー(TRA-1-60、Oct4、およびアルカリホスファターゼ)の一体化した発現を確認した(図2、段階5)。生産段階4および5を図13に図示した。

10

### 【0230】

段階6～13:RPE細胞への分化。増加させたHAD-C 102-hESCを、6cm細胞培養プレート中でさらに増加させるために、コラゲナーゼ(4152、Worthington)で酵素処理した(図14、段階6)。次いで、OpRegen(登録商標)DSを得る際に、増加させたHAD-C 102-hESCを使用した。

20

### 【0231】

段階6の培養物からコラゲナーゼAによって収集したHAD-C 102-hESCクラスターを、10mMニコチニアミド(N-5535、Sigma)を加えたNutristem「Minus」培地(増殖因子bFGFおよびTGF-βを含有しない；06-5102-01-1A Biological Industries、特別注文)の存在下でフィーダー無しの非付着性の6cm Hydrocell培養ディッシュの機械的に移し替えによって、それぞれのOpRegen(登録商標)のバッチの分化を開始した(図14、段階7)。次いで、球状体が生じるように、プレートを低酸素雰囲気(5%)条件(37℃、5%CO<sub>2</sub>)下で1週間まで培養した。次いで、ある週齢の球状体を懸濁液中に収集し、ピペッティングによって穏やかに解離し、低酸素雰囲気(5%)下、10mMニコチニアミドを加えたNutristem「Minus」培地の存在下で、さらに1週間増殖させるために、ヒトラミニン(511、Biolamina)でコーティングした6ウェルプレートに移し替えた(図14、段階8)。細胞は、低酸素(5%)雰囲気下で、さらに4週間まで；10mMニコチニアミドおよび140ng/mlアクチビンA(G-120-14E、Peprotech)を加えたNutristem「Minus」培地の存在下で2週間(図14、段階9)、それに続いて、10mMニコチニアミドしか加えていないNutristem「Minus」培地の存在下で2週間まで(図14、段階10)増殖し続けた。多角細胞パッチにおいて薄い色素沈着の区域が目ではっきりと見えた場合に、プレートを正常酸素(20%)雰囲気(37℃、5%CO<sub>2</sub>)に戻し、10mMニコチニアミドを含むNutristem「Minus」培地の存在下で2週間まで増殖させた(図14、段階11)。2週間後までに、非色素細胞の区域の中に、特有の色素沈着のある拡大した多角パッチが目ではっきりと見えた(図14、段階12)。残りの色素細胞をはがし、TrypLE Select(12563-011、Invitrogen)で37℃で15分間処理した後に手作業で収集した(図14、段階13)。生産段階6～13を図14に図示した。

30

### 【0232】

段階14～17:OpRegen(登録商標)細胞の増加。次いで、20%ヒト血清(14-498E、Lonza)を加えたDMEM(SH30081.01、Hyclone)の存在下で2～3日間、増殖させるために、色素細胞を6ウェルゼラチンコーティングプレート(0.5～1×10<sup>6</sup>細胞/プレート；P0)に移し替えた(図15、段階14)。次いで、DMEMをNutristem「Minus」培地と交換し、プレートがわずかに色素沈着のある多角細胞で覆われるまで2～3週間にわたって細胞を増殖させた(図15、段階14)。次いで、これらのP0細胞を、ゼラチンで覆ったフラスコに入れてさらに2回の継代(P1、P2)の間増加させた。TrypLE Selectで37℃で処理した後にP0およびP1における細胞を収集し、洗浄し、ゼラチンコーティングフラスコ上に置いて、20%ヒト血清を加えたDMEMの存在下で2～3日間培養した。DMEMをNutristem「Minus」培地と交換し、プレートが薄い色素沈着のある多角細胞で覆われるまで2～3週間にわたって細胞を増殖させた(図15、段階15～16)。次いで、T175フラスコ中で増殖させたP2における細胞を37℃でTrypLE Selectで処

40

50

理した後に収集し、20%ヒト血清を加えたDMEMに再懸濁し、プールし、計数した。

#### 【0233】

無菌性、マイコプラズマ、およびLALの試験のために、各バッチから増殖培地試料を採取した。細胞形態を観察し、記録に残した(図15、段階17)。生産段階14~17を図15に図示した。

#### 【0234】

##### 実施例4

###### 工程管理ポイント

IPCポイントを図16に図示した。生産工程に沿ってhESC不純物およびRPE純度を評価するために選択したサンプリングポイントを以下で説明する。

10

#### 【0235】

IPCポイント1:分化前の、正常核型を有する、機械的に増加させたHAD-C 102 hESC。これは、最高レベルのhESCが予想される出発物質である。このポイントは、分化前の最大hESCレベルを評価する目的で加えた。

#### 【0236】

IPCポイント2:分化前の、コラゲナーゼによって増加させたHAD-C 102 hESC。この段階では、ある程度の分化が予想され、それによって、Oct4およびTRA-1-60を発現する細胞のレベルの低下ならびにGDF3およびTDGFの発現レベルの低下が予想される。このポイントは、非定方向分化段階の間にhESC不純物を評価する目的で加えた。

20

#### 【0237】

IPCポイント3:無フィーダー条件下においてニコチニアミドの存在下でhESC分化を誘導して1週間後に生産した球状体。この分化初期段階では、分化中のhESC不純物は最大レベルにあることが予想され、それによって、この評価は最高レベルの安全問題を示すと予想される。

#### 【0238】

IPCポイント4:アクチビンA処理の終了時の細胞。アクチビンAは分化をRPE細胞に向ける。このポイントでは、hESC不純物の大きな減少と、RPEマーカー発現の大幅な増大が予想される。このポイントは、RPEへのhESC分化をモニタリングする目的で加えた。

30

#### 【0239】

IPCポイント5~7:非色素区域(IPCポイント6)を色素区域(IPCポイント7)から分離する前および分離した後の、分化プロセスの終了時の細胞。IPCポイント5および6は細胞不純物を含有するのに対して、試料7は、増加前の、分化プロセスの終了時の製品に相当する。試料6に認められる細胞汚染物質は試料7中では少量であり、製品ではさらに少量になる。

#### 【0240】

IPCポイント8:P0における色素細胞。2~3週間増加された、分化プロセスの終了時の色素細胞。これらの細胞は、生産工程が終了する2段階前の製品に相当する。

40

#### 【0241】

IPCポイント9:P1における色素細胞。2~3週間増加されたP0細胞。これらの細胞は、生産工程が終了する1段階前の製品に相当する。

#### 【0242】

IPCポイント10:凍結保存前のP2における色素細胞。2~3週間増加されたP1細胞を収集およびプールする。これらの細胞は、凍結保存前の原体(DS)に相当する。

#### 【0243】

IPCポイント11:凍結保存したP2における色素細胞。これらの細胞は製剤(DP)に相当する。生産全体を通して、全サンプリングポイントで、RPE細胞から分泌されることが公知である色素上皮由来因子(PEDF)の分泌を評価するために細胞培養地を収集した。

#### 【0244】

##### 結果

TRA-1-60<sub>+</sub>Oct4<sub>+</sub>hESCの定量:生産工程に沿って収集した様々な試料中のhESCのレベルを、高感度のロバストなOct4/TRA-1-60二重染色FACS法を用いて決定した。初期の神経/眼野

50

(eye field)分化を支持する増殖条件下において、多能性細胞増殖を支持するフィーダーならびに増殖因子(TGF<sub>β</sub> およびbFGF)を除去して1週間後に、TRA-1-60<sub>+</sub>Oct4<sub>+</sub>細胞は0.0106～2.7%しかなかった(IPCポイント3、球状体)。RPE分化を促進するアクチビンAを添加した後に、TRA-1-60<sub>+</sub>Oct4<sub>+</sub>細胞のレベルは0.00048～0.0168%までさらに減少した(IPCポイント4、アクチビンの終了)。分化終了時に、非色素細胞を切除した後に、TRA-1-60<sub>+</sub>Oct4<sub>+</sub>細胞のレベルは0.00033～0.03754%であった(IPCポイント7、色素細胞)。生産工程が終了する2段階前であるP0では、0.00009～0.00108% (LODを下回る-LLOQに近い)のレベルのTRA-1-60<sub>+</sub>Oct4<sub>+</sub>細胞が検出された(IPCポイント8)。P1(IPCポイント9)、凍結保存前のP2(原体; IPCポイント10)、および凍結保存後のP2(DP; IPCポイント11)におけるTRA-1-60<sub>+</sub>Oct4<sub>+</sub>細胞のレベルはアッセイLLOQを下回る(すなわち、それぞれ、0.00004～0.00047%、0.00000～0.00016%、および0.00000～0.00020%)。

10

## 【0245】

多能性hESCマーカーGDF3およびTDGFの相対発現:生産工程に沿った様々なIPCポイントで、多能性遺伝子GDF3およびTDGFの相対発現を分析した。GDF3およびTDGFの発現レベルは徐々に低下した。このことは、分化プロセスに沿ってTRA-1-60<sub>+</sub>Oct4<sub>+</sub>細胞の数が徐々に低下したことと相關関係にあった。生産工程が終了する2段階前であるP0、P1、ならびに凍結保存前のP2(原体)および凍結保存後のP2(製剤)の終了時に、GDF3およびTDGFの発現レベルは、陰性対照OpRegen(登録商標)5C細胞において認められる発現レベルと同様であった。

## 【0246】

CRALBP<sub>+</sub>PMEL17<sub>+</sub>細胞の定量:P0およびP2で分化段階の終了時に(それぞれ、IPCポイント8および11)、RPE純度を測定するためにCRALBP<sub>+</sub>PMEL17<sub>+</sub>細胞を評価した。表3および図17から分かるように、生産工程が終了する2段階前であるP0(IPCポイント8)でのCRALBP<sub>+</sub>PMEL17<sub>+</sub>RPE純度のレベルは98.53～98.83%の範囲であった。凍結保存後のP2では、同様のRPE純度レベルが検出された(99.61～99.76%; IPCポイント11)(表3)。

20

## 【0247】

(表3)

IPCポイント サンプリングの時間および段階			%CRALBP <sup>+</sup> PMEL17 <sup>+</sup> 細胞		
IPC	週	段階	模擬試験4	模擬試験5	範囲
8	12	P0における色素細胞*	98.53	98.83	98.53-98.83
11	18	OpRegen(登録商標)(P2); DP	99.61	99.76	99.61-99.76

30

DP、製剤(Drug Product)。\*IPCポイント8を凍結保存後に試験した。hESC(HAD-C 102、陰性対照)にスパイクしたRPE細胞の内部標準(OpRegen(登録商標)5C、陽性対照)から正確度の誤差は 25% あることが証明された。

## 【0248】

模擬試験生産ラン4および5に沿った、ベストロフィン1、MITF、およびCRALBPで免疫染色した細胞の共焦点画像化:分化段階の終了時に(IPCポイント7)、増加段階の終了時に(IPCポイント10、DS)、および凍結保存後に(IPCポイント11、DP)、RPEマーカーであるベストロフィン1、MITF、ZO-1、およびCRALBPについて細胞を免疫染色した。免疫染色のために、手作業で単離した非色素細胞(IPCポイント6)をプレーティングしたが、固定中にプレートからはがれ、そのために染色することができなかった。12日間(模擬試験5のみ)。進行中の生産からのP0における細胞と並行して)および28日間プレーティングした選択された色素細胞(IPCポイント7)は、試験された全RPEマーカーに対して陽性に染色され、ベストロフィン1を発現する細胞およびMITFを発現する細胞のパーセントは、それぞれ、93%および93.3～96.5%であった。同様のレベルのベストロフィン1陽性細胞およびMITF陽性細胞が、P0(それぞれ、94.9%および95.9%; 模擬試験4のみ試験した)、凍結保存前のP2、原体(それぞれ、92.2～92.75%および93.7～95.5%)、ならびに凍結保存後のP2、製剤(それぞれ、91.1～95.7%および83.8～94.9%; 模擬試験5のMITF免疫染色の減少から、分析のために無作為に選択された区域のアウトライアーガが証明された)において検出された。全てのIPC7、10、および11試料においてCRALBP(ならびにZO-1)発現が検出された(図18)。

40

50

## 【0249】

模擬試験生産2、4、および5に沿ったRPEマーカーであるベストロフィン1、CRALBP、およびRPE65の相対発現:生産工程に沿った様々なIPCポイントで、RPE遺伝子であるベストロフィン1、CRALBPおよびRPE65の相対発現を測定した。生産工程に沿って、ベストロフィン1、CRALBP、およびRPE65の相対発現レベルは徐々に増加した。分化をRPE細胞に向けるアクチビンA処理の終了時に(IPCポイント4)、ベストロフィン1、CRALBP、およびRPE65の相対レベルは、それぞれ、分化前の機械的に継代したhESC(IPCポイント1;模擬試験4)におけるそれぞれの相対レベルの685倍、36倍、および325倍であった。ベストロフィン1、CRALBP、およびRPE65の相対発現レベルは分化段階の終わり(IPCポイント5)からP1段階(IPCポイント9)にかけてピークに達した。これらの段階において、それぞれの発現レベルは、分化前の機械的に継代したhESC(IPCポイント1)におけるレベルの5,838~11,841倍、211~299倍、および5,708~8,687倍であった。

## 【0250】

模擬試験生産4および5に沿った形態評価:分化段階の終了時に(IPCポイント5)、色素細胞の相対面積を見積るために、および増加期P0~P2に(IPCポイント8~10)、コンフルエントな多角形態を検証するために細胞形態を分析した。分化段階の終了時に(IPCポイント5)、非色素区域を切除する前に色素細胞の相対面積を見積もった。色素細胞の相対面積は、模擬試験4では $32.5\% \pm 13.5\%$ (平均 $\pm$ SD、6ウェルプレートのn=7ウェル)、模擬試験5では $60\% \pm 13\%$ であった(平均 $\pm$ SD、6ウェルプレートのうちのn=7ウェル)(図11における代表的な画像を参照されたい)。色素細胞区域を選択し、拡大させた。増加期P0(IPCポイント8)、P1(IPCポイント9)、およびP2(IPCポイント10)の終了時の形態から、典型的な多角形の上皮単層形態のある高密度に詰め込まれた培養物が証明された(図11)。

## 【0251】

模擬試験生産4および5に沿ったPEDF分泌および有効性測定:模擬試験生産4および5に沿った様々なIPCポイントで、RPE細胞から分泌することが公知である色素上皮由来因子(PEDF)を細胞培養培地中で測定した。表4から分かるように、4~79ng/mL/日の範囲の非常に低いレベルのPEDFがhESC(IPCポイント1および2)ならびに球状体(IPCポイント3;ニコチンアミドを用いた最初の週の終わり)によって分泌された。分化をRPE細胞に向けるアクチビンA処理の終了時に(IPCポイント4)、分泌されたPEDFのレベルは682~1,038ng/mL/日の範囲であり、球状体によって分泌されたレベルと比較して31~37倍多かった。正常酸素条件の細胞をニコチンアミドとインキュベートした後(IPCポイント5)、PEDF分泌は1,482~4,746ng/mL/日にさらに増大(2.2~4.6倍)したことが観察された。増加段階の間(それぞれ、P0~P2、IPC8~10)、PEDF分泌レベルは2,187~8,681ng/mL/日の範囲であり、P0~P1でピークに達した。

## 【0252】

(表4) 模擬試験生産4および5に沿ったPEDF分泌

IPC	週	段階	PEDF分泌(ng/mL/日)		範囲
			模擬試験4	模擬試験5	
1	0	機械的に継代したhESC			
	1	機械的に継代したhESC	ND	ND	NA
	2	機械的に継代したhESC	4	ND	NA
2	3	コラゲナーゼによって継代したhESC	21	79	21-79
3	4	球状体	22	28	22-28
4	7	アクチビンA処理終了時の細胞	682	1,038	682-1,038
5	10	分化終了時の細胞	1,482	4,746	1,482-4,746
8	12	P0における色素細胞	7,523	7,951	7,523-7,951
9	14	P1における色素細胞	8,681	7,287	7,287-8,681
10	16	OpRegen(登録商標)(P2); DS	2,187	5,147	2,187-5,147
11	18	OpRegen(登録商標)(P2); DP	2,462	3,936	2,462-3,936

ND、実施せず; NA、該当なし; DS、原体; DP、製剤。

## 【0253】

10

20

30

40

50

RPE細胞間に生じた密着結合は、血液網膜閥門と、PEDFおよびVEGFの極性分泌とを生じさせることを可能にする。PEDFは頂端側に分泌され、頂端側で抗血管新生性かつ神経向性の増殖因子として作用する。VEGFは主に基底側に分泌され、基底側で、脈絡叢内皮に対して血管新生促進性の増殖因子として作用する。P0の終了時(IPCポイント8)、凍結保存前のP2の終了時(IPCポイント10)、および凍結保存後のP2の終了時(IPCポイント11)に、RPE極性化(バリア機能ならびにPEDFおよびVEGFの極性分泌)をトランズウェルシステムにおいて測定した。表5から分かるように、全てのIPCポイントで、バリア機能/経上皮電気抵抗(TEER)ならびにPEDFおよびVEGFの極性分泌が証明された。

## 【0254】

(表5)

IPCポイント サンプリングの時間および段階			極性化							
			14日目のPEDF(ng/mL/日)		トランズウェル3週目におけるTEER(Ω)		トランズウェル3週目におけるPEDF比(頂端側/基底側)		トランズウェル3週目におけるVEGF比(基底側/頂端側)	
IPC	週	段階	M4	M5	M4	M5	M4	M5	M4	M5
8	12	P0における色素細胞	1,985	3,292	768	933	6.01	6.72	3.01	3.09
10	16	OpRegen (登録商標) (P2); DP	1,754	4,250	819	941	5.72	4.72	2.54	2.73
11	18	OpRegen (登録商標) (P2); DP	2,462	3,936	688	616	6.78	3.93	2.57	2.74

ND、実施せず;DS、原体;DP、製剤。PEDFおよびVEGFをELISAで測定した。12ウェルプレート中で培養している間に、細胞から14日目のPEDFを収集した。次いで、細胞をトランズウェル上に継代し、6週間培養した。この間に、TEERと、トランズウェルの基底側および頂端側からのVEGFおよびPEDFの分泌を測定した。

10

20

30

40

50

## 【0255】

模擬試験ラン4および5において生産されたRPE細胞のバッチャリリース試験：模擬試験ラン4および5において生産されたOpRegen(登録商標)がGMP生産OpRegen(登録商標)と同等なことを検証するために、凍結保存前のP2の終了時での形態試験(IPCポイント10、DS)、ならびに凍結保存後のP2の終了時での生存率、総細胞数/クライオバイアル(cryovial)、同一性(ベストロフィン1およびMITFの発現)、hESC不純物、ならびに核型分析(IPCポイント11、DP)を含む、簡略化されたOpRegen(登録商標)バッチャリリース試験を行った。模擬試験ラン4および5において生産されたOpRegen(登録商標)はバッチャリリース基準に合格した。模擬試験ラン2において生産されたOpRegen(登録商標)は凍結保存されず、そのために試験することができなかった。

10

## 【0256】

## 結論

3つの模擬試験生産ラン(模擬試験ラン2、4、および5)を、臨床バッチのGMP生産で使用した同じGMP生産方法、ゼノフリーGMPグレード細胞(放射線照射済みCRD008フィーダー上で増殖させたHAD-C 102 hESC)、ゼノフリーGMPグレード試薬、およびGMPグレード実験器具を用いて研究グレード条件下において行った。模擬試験生産2、4、および5は、生産に沿ってhESC不純物のレベルを評価することを目的とし、模擬試験生産4および5はまた、工程品質管理において重要なものを同定することも目的とした。

## 【0257】

適格であると判定されたTRA-1-60/Oct4二重染色FACS法(LOD 0.0004%、1/250,000、およびLLOQ 0.001%、1/100,000)ならびに適格であると判定されたフローサイトメーターを用いて、模擬試験5生産工程が終了する3段階前である分化段階の終了時に、負に選択された色素細胞中にアッセイLODを下回るレベルのhESC不純物が観察された。アッセイ適格性判定の前に中心施設のフローサイトメーターを用いて行った模擬試験ラン2および4では、hESC不純物のレベルは生産工程が終了する2段階前にはアッセイLODを下回った。このデータと一致して、定量RT-PCR分析から、生産工程が終了する2段階前に、多能性hESC遺伝子であるGDF3およびTDGFの発現が陰性対照(OpRegen(登録商標)5C細胞)と同様のレベルまで下方制御されたことが証明された。

20

## 【0258】

生産が終了する3段階前(色素細胞の単離)に行った同一性試験から、ベストロフィン1およびMITFはそれぞれ免疫染色細胞の93%および96.5%まで発現しており、CRALBPおよびZO-1が発現している(定量せず)ことが証明された。1段階過ぎて(すなわち、生産工程が終了する2段階前であるP0)、負に選択された色素細胞の増加サイクルが1回終わった後に行つたRPE純度試験から、細胞の>98.5%がFACSによってCRALBP<sub>+</sub>PMEL17<sub>+</sub>二重陽性であることが分かった。製剤において同様のレベルのRPE純度(すなわち、>99.6%)も検出された。これらの結果は、典型的な多角形上皮単層形態を証明した形態試験と、RPE遺伝子であるベストロフィン1、CRALBP、およびRPE65の発現が陽性対照(OpRegen(登録商標)5C細胞)と同様のレベルまで上方制御されたことを証明した定量RT-PCR分析によって裏付けられた。

30

## 【0259】

模擬試験ラン4および5の生産工程に沿って様々な段階で、RPE細胞から分泌することが公知であるPEDFを細胞培養培地内で測定した。分化をRPE細胞に向けることがIdelsonら, 2009によって以前に示されていたアクチビンA処理の終了時に(IPCポイント4)、分泌されたPEDFのレベルは以前の生産段階(球状体の誘導)と比べて大きく増加した(模擬試験4では31倍、模擬試験5では37倍)。PEDF分泌レベルは増加し続け、P0～P1でピークに達した(アクチビンA後のレベルと比べて1.7～5.8倍増加)。分化プロセスの終了時(IPCポイント5)の色素細胞の相対面積の評価は、RPE分化を評価するための別の重要な品質管理尺度であると確認された。この尺度を用いて、模擬試験4および5ランにおいて色素細胞の収量に2倍の差があることが観察された(模擬試験4では32.5%、模擬試験5では60%)。これは、この段階のPEDF分泌において認められた同様の差と相関関係にあった(模擬試験4では1,482ng/ml/日、模擬試験5では4,746ng/ml/日)。

40

50

## 【0260】

結論として、生産工程が終了する3段階と早い段階で、TRA-1-60, Oct4, hESC不純物は観察されなかった。このことは、GDF3およびTDGFの低い発現レベル、ベストロフィン1、CRA LBP、およびRPE65の高い発現レベル、ならびに高レベルのベストロフィン1-重陽性細胞およびMITF-重陽性細胞、ならびに多量のCRALBP, PMEL17, 二重陽性細胞(1段階過ぎて試験された)と相関関係にあった。重要な安全性IPCおよび有効度IPCが重大な生産段階において同定された。

## 【0261】

## 実施例5

## 有効度評価

10

実験の構成:本発明者らは、実施例4に記載のように作製したRPE細胞の網膜下移植によって、Royal College of Surgeons(RCS)ラットモデルにおけるRDD進行を遅らせることができるかどうか調べた。

## 【0262】

生後(P)21～23日目(光受容体死が開始する前)に、25,000個、100,000個、または200,000個のRPE細胞をRCSラットの一方の眼の網膜下空間に移植した。BSS+(Alcon)で処置した動物およびナイーヴな無処置動物が対照として役立った。群を4つの生存齢:生後P60日目、P100日目、P150日目、およびP200日目に分けた。眼底写真撮影を用いて小疱形成を同定し、注射の質をモニタリングした。

## 【0263】

眼底検査もP60日目、P100日目、P150日目、およびP200日目に行った。視運動追跡を用いて、全時点(P60、P100、P150、P200)で全動物の視力を測定した。

20

## 【0264】

P60およびP100における全研究群において局所ERGおよび全視野ERGを評価した。各動物の割り当てられた屠殺日に両眼を取り出し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結保存し、Optimum Cutting Temperature compound(OCT)に包埋し、凍結切片にした。クレシルバイオレット染色を用いて、光受容体の構造レスキューを同定し、数え上げた。免疫蛍光染色(IF)を用いて移植細胞を同定し、その運命、増殖状態、光受容体外節を貪食する能力を評価した。さらに、宿主錐体のレスキューを測定する際に免疫蛍光を使用した。

## 【0265】

30

研究デザインを本明細書の以下の表6にまとめた。

## 【0266】

(表6)

群 #	処置群		注射後の屠殺時間 研究開始時のマウスの匹数 (雄および雌)			
	項目	細胞の総数	P60	P100	P150	P200
1	無処置	なし	13	11	13	10
2	ビヒクル対照	なし	15	13	16	17
3	RPE 低用量	25,000	15	15	16	14
4	RPE 中用量	100,000	15	15	18	13
5	RPE 高用量 (MFD)	200,000	15	16	15	13

40

## 【0267】

## 材料および方法

細胞数:細胞を計数した後に、適切な投与濃度にアリコートした。全注射時点について

50

注射前の細胞生存率の平均は $94.0\% \pm 0.03$ であった。注射後の細胞生存率の平均は $92.4\% \pm 0.02$ であった。

#### 【0268】

外科手術:ゲージが徐々に小さくなる針:18、22、25、および30を用いて、結膜および強膜を貫通する小さな切開部を作製した。注射した細胞が出てくるのを少なくするために、角膜の外側周辺部分への穿刺を用いて眼内圧を下げた。次いで、ガラスピペットを網膜下空間に挿入し、 $2\mu\text{l}$ の懸濁液を注射した。次いで、強膜切開を縫合糸により閉じた。細胞または緩衝液のみ(BSS+)の注射の成功は、最初に、網膜下小胞を手作業で視覚化し、その後に、眼底カメラ(Micron III)を用いて写真撮影することによって確認された。

#### 【0269】

視運動追跡閾値:視運動追跡閾値を盲検方式で測定および記録した。反復測定ANOVAまたは一元配置ANOVAとFisherのLSD事後解析を用いて、OKTデータを分析した。

#### 【0270】

網膜電図(Electroretinogram)(ERG):2種類のERG:小さな光の点を用いて網膜の局部を刺激する診査的な形式の局所ERGと、視野全体を刺激する標準的な方式の全視野ERGを測定した。

#### 【0271】

組織学および免疫組織化学:各動物から両眼を収集し、固定し、凍結保護し、包埋し、凍結した。凍結ブロックを $12\mu\text{m}$ の凍結切片にした。1枚のスライドにつき4枚の切片を含む約60枚のスライドを入手した。

#### 【0272】

クレシルバイオレット:(1)注射部位および縫合糸、(2)光受容体レスキューレスキーの証拠、(3)移植細胞の証拠、(4)不適当な病態について、クレシルバイオレット染色切片を調べた。各スライドについて、レスキーを定量するために外側顆粒層の最大厚も記録した。

#### 【0273】

免疫蛍光(IF):IF用に選択する、RPE細胞で処置した眼のスライドを、移植ヒト細胞のサイズおよび形態と一致する細胞を網膜下空間に含むクレシルバイオレット染色切片から選択した。さらに、宿主ONLの保護を二次的な判断基準として使用した。全IF染色を二重染色として行った。DAPIはバックグラウンド核染色として役立った。細胞で処置した全ての動物から少なくとも1枚のスライドを各ランのために使用した。

#### 【0274】

ラン#1は、ヒトRPE細胞および非RPE細胞を検出するために、マウスモノクローナル抗核マーカー(HuNu、クローン3E1.3、Millipore、カタログ番号MAB4383)と一緒に同時染色するウサギモノクローナル抗メラノーマgp100(PMEL17、クローンEPR4864; ヒト特異的、Abcamカタログ番号ab137062)を用いて行った。

#### 【0275】

ラン#2は、ヒト増殖細胞を検出するために、ウサギモノクローナル抗Ki67(Ki67; クローンEPR3610、ヒト特異的、Abcam、カタログ番号ab92742)および抗核マーカーを用いて行った。

#### 【0276】

ラン#3は、切片の錐体計数を評価するために、ウサギポリクローナル抗ラット錐体アレスチン(Milliporeカタログ番号ab15282)を用いて行った(セクション6.8.3を参照されたい)。さらに、食細胞活性の尺度として宿主ロドプシン/外節を含有する移植ヒト細胞を同定するために、選択されたスライドを、マウスモノクローナル抗ロドプシン(クローンRho1D4、Millipore、MAB5356)とPMEL17の組み合わせを用いて染色した。

#### 【0277】

錐体計数:細胞を移植した眼の全てから入手した、および食塩水を注射した同齢の対照から入手した網膜の切片から、共焦点z-スタック(z-stack)画像を取得した。以前に評価されたクレシルバイオレット染色切片を用いて明らかにされた光受容体レスキューレスキー区域において、細胞を注射した眼からの切片を選択した。3人の観察者が盲検方式で錐体を計数

10

20

30

40

50

した。次いで、3回の計数値を平均し、投与群と齢との間で計数値を比較した。

#### 【0278】

ロドプシン摂取:移植細胞によって用いられる潜在的なレスキュー機構は、光受容体外節および脱落した細片を摂取する機構である。細片区画の除去は光受容体に及ぼす毒性ストレスを小さくし、従って、光受容体の生存を持続するのに役立つ。ここでは、本発明者は、細胞生存率および光受容体保護指数に基づいてRPE細胞によるロドプシン摂取を評価するために特定の動物を選択した。免疫蛍光を用いて、この評価を行った。

#### 【0279】

##### 結果

眼底画像化:細胞で処置した眼の剖検時に収集した眼底画像から、外科手術中に網膜下小疱が形成された場所; 細胞が網膜下空間に沈着した場所に対応する網膜の色素過剰区域および色素不足区域が明らかになった(図19A~C)。これらのまだら模様の区域は、BSS+を注射した眼でも注射をしていない眼でも、はっきりと分からなかった。

10

#### 【0280】

視運動追跡閾値:OKT閾値は、全齢で、全ての細胞処置群においてレスキューされた(図20)。細胞処置群は、全齢で、手術していないか、または食塩水を注射した眼より成績が優れていた。低用量(25K)と、さらに多い2種類の用量(100K( $p<0.0001$ )および200K( $p<0.0001$ ))との間には、特に、高齢になってから有意な用量依存的効果があったが、中用量を(100K)過ぎて高用量(200K)からはOKTに対する明らかな利益は観察されなかつた( $p=0.5646$ )。OKT閾値は全ての細胞処置群においてレスキューされたのに対して、視力絶対値は時間と共にゆっくりと低下した。無処置の動物および食塩水を注射した動物のOKT閾値は研究の間に低下し続けた。BSS+を注射した眼はナイーヴな無処置群( $p=0.6068$ )および無処置の他眼と差がなかつた。

20

#### 【0281】

局所ERG:局所ERGを、約P60における全ての実験ラット( $n=252$ )において測定した。図21Aに示したように、RPE細胞で処置した個々の動物はうまく働き、対照より成績が大きく優れていた。

30

#### 【0282】

全視野ERG:全視野ERGを、P60における125匹のRCSラットと、P100における63匹のRCSラットから測定した。図21Bに示したように、RPE細胞で処置した個々の動物はうまく働き、対照より成績が大きく優れていた。

30

#### 【0283】

クレシルバイオレット染色:クレシルバイオレット染色切片の例示的な合成写真を図22Aに示した。BSS+を注射した眼からの代表的な画像と、細胞で処置した眼からの代表的な画像(複数の群からの画像)を図22Bに示した。

40

#### 【0284】

外側顆粒層の厚さ(ONL)を光受容体レスキューの一次指標として測定した。データを、齢全体にわたる各用量群に存在する光受容体核の最大数として記録した(図23)。P60、P100、およびP150における細胞処置群のONLの厚さはBSS+で処置した眼より有意に厚かった(全て $p<0.0001$ )。光受容体レスキューの証拠がある動物のパーセントの点では、P60では動物の76~92%、P100では80~90%、P150では72~86%、P200では0~18%に光受容体の証拠があつた。

40

#### 【0285】

免疫蛍光:移植RPE細胞は、それぞれの生存齢の動物において免疫蛍光によって陽性と同定された(図24)。しかしながら、齢が進むにつれて、同定された細胞のある動物の数は減少した。最初は移植細胞を示さなかつた動物のさらなるスライドを繰り返し染色すると、さらなる動物において陽性細胞があると同定されたが、全ての場合でそうではなかつた。

50

#### 【0286】

IF分析によって、移植細胞は全ての動物において発見されていないが、ONLの厚さの測定結果から、細胞で処置した動物の70~90%には、OKTレスキューによって確認された大

幅な光受容体レスキューがあった。このことから、ほとんどの処置眼には、ある時点で移植細胞があったことが示唆された。増殖マーカーKi67を用いて、増殖中のヒト細胞を同定した。Ki67陽性ヒト細胞は観察されなかった(図24)。

#### 【0287】

錐体計数:細胞移植を受けた動物中の錐体の数は対照眼より有意に多かった(図25; それとの比較について $p=<0.0001$ )。一般的に、低投与量、中投与量、および高投与量の細胞全体にわたって錐体数には差がなかった。各齢からの代表的な画像を図24に示した。

#### 【0288】

ロドプシン摂取:試験したそれぞれの場合において( $n=6$ )、移植RPE細胞中に蛍光標識ロドプシンが観察された(図26A~J)。これにより、移植後に移植細胞は外節細片を摂取することが確認された。

#### 【0289】

#### 結論

RCSラットの網膜下空間に移植した場合に、RPE細胞は、試験された全齢で、RCSラットの視力を対照の視力を上回ってレスキューした。移植片が、評価するのに十分に大きいか、または評価のために到達可能な網膜区域にあった場合に、ERG応答は保護された。移植して180日後までに移植区域において桿体光受容体および錐体光受容体はレスキューされた。まとめると、このデータから、OpRegen(登録商標)は宿主網膜の機能完全性および構造完全性を長期間にわたって維持することが証明される。従って、OpRegen(登録商標)は、RPおよびAMDなどのヒトRPE細胞障害の処置に大きな可能性を秘めている。

10

20

#### 【0290】

#### 実施例6

#### RPE細胞の安定性

#### 短期安定性

BSS plus中の製剤化されたRPE細胞(実施例4に記載のように作製した)をバイアル1個あたり $600\sim1000\mu\text{l}$ の最終体積で調製した。短期安定性を0時間、4時間、8時間、および24時間の時点での試験した。細胞は全ての時点で安定なことが見出された。

30

#### 【0291】

RPE細胞の生存率および細胞濃度は、全ての用量製剤について8時間インキュベートした時点で安定していた;以下の濃度についてのパーセント平均生存率( $\pm SD$ )。

- ・低濃度(BSS plus  $100\mu\text{l}$ につき $70\times10^3$ 個)は時点0時間の $93\%\pm5$ から時点8時間の $91\%\pm1$ に変化し、有意な減少はなかった。

- ・高濃度(BSS plus  $100\mu\text{l}$ につき $70\times10^3$ 個)は時点0時間の $92\%\pm3$ から時点8時間の $91\%\pm2$ に変化し、有意な減少はなかった。

#### 【0292】

試験した中濃度(BSS plus  $100\mu\text{l}$ につき $250\times10^3$ 個)について、時点全体を通して有意な変化はなかった。

#### 【0293】

全ての時点および処方された用量について全体の範囲は時点0時間~8時間まで $88\%\sim97\%$ であった。時点0時間( $93\%\pm3$ )および時点8時間( $91\%\pm1$ )の全ての結果を平均した場合に、2%の減少が見出された。

40

#### 【0294】

時点でも処方された用量でも、細胞濃度の有意な変化は観察されなかった。細胞濃度は、わずかな減少(2%)が高用量の1つのバッチで見られた以外は3つ全ての研究において変化しなかった。

#### 【0295】

様々な投与製剤の外観は、試験された時点全体を通して変化しなかった。細胞懸濁液は、外来粒子および非解離凝集物を含まない。

#### 【0296】

試験された全ての時点で、それぞれの処方されたRPE細胞用量の同一性および純度は24

50

時間まで安定しており、バッチリリース基準内にあった。8時間で(全ての処方されたRPE細胞用量について)、MITF陽性細胞およびベストロフィン陽性細胞のレベルはそれぞれ86~97%および90~94%であり、CRALBP<sub>+</sub>PMEL17<sub>+</sub>二重陽性細胞のレベルは98.35~99.64%の範囲であった。

#### 【0297】

処方されたRPE細胞用量は、全ての試験された時点(4時間、8時間、24時間)において有効性を維持し、両方とも高レベルのPEDFを分泌し、PEDFの主に頂端側への、およびVEGFの基底側への極性分泌による極性化RPE単層を形成した。試験された8時間の時点の結果:TEE Rは376~724オームの範囲、基底側に対するPEDFの頂端側比は2.77~5.70の範囲、頂端側に対するVEGFの基底側比は2.04~3.88の範囲であった。

10

#### 【0298】

無菌性は、全ての細胞用量製剤について全てのインキュベーション時点において保たれた。

#### 【0299】

これらの結果から、2~8に保たれた場合に全臨床用量の最終製剤におけるOpRegen(登録商標)細胞安定性は少なくとも8時間あることが裏付けられる。収集した部分的なデータ(同一性、無菌性、および中用量有効性)に基づいて、24時間までの安全マージンが存在する。

#### 【0300】

短期安定性アッセイ法の結果を以下の表7にまとめた。

20

#### 【0301】

(表7)

試験	許容基準	低用量 70,000細胞/100 ml	中用量 250,000細胞/100 ml	高用量 700,000細胞/100 ml
細胞生存率	≥70%	91 ± 1 (n=3)	92 (n=1)	91 ± 1.5 (n=3)
細胞用量	初回用量から±40%	91.3 ± 30 (n=3)	103 (n=1)	104 ± 5.7 (n=3)
MITF陽性細胞	≥80%	90 (n=2)	93 (n=1)	96 (n=2)
ベストロフィン1陽性細胞	≥80%	94 (n=2)	92 (n=1)	92 (n=2)
CRALBP <sub>+</sub> PMEL17 <sub>+</sub> 細胞	≥95%	99.3 ± 0.15 (n=3)	99.5 (n=1)	99 ± 0.65 (n=3)
バリア機能、TER(Ω)	参考まで	605 (n=2)	724 (n=1)	410 (n=2)
PEDF極性分泌 (頂端側/基底側)		3.4 (n=2)	3.5 (n=1)	4.5 (n=2)
VEGF極性分泌 (基底側/頂端側)		3.3 (n=2)	2.2 (n=1)	2.3 (n=2)
無菌性 米国薬局方<71>	陰性	陰性	陰性	陰性
外観	外来粒子および/または 非解離凝集物はない	合格	合格	合格

#### 【0302】

長期安定性:3つのRPE細胞バッチを気相液体窒素に入れて凍結した。凍結保存中の長期安定性の試験は凍結日の後に開始した。得られた結果は、凍結して3年後のものである。以下のパラメータ:生存率、細胞数、RPE同一性(%ベストロフィン1陽性細胞および%MITF陽性細胞)、RPE純度(FACS %CRALBP<sub>+</sub>PMEL17<sub>+</sub>RPE細胞)、有効性(極性化およびPEDF分泌)、核型分析、ならびに無菌性を試験している。各時点において、必要な数のバイアルを融解し、本明細書に記載のようにアッセイ法のために細胞を調製する。

30

#### 【0303】

長期安定性アッセイ法の結果を以下の表8にまとめた。

40

#### 【0304】

(表8)

試験	0-3ヶ月	19-21ヶ月	34-36ヶ月
細胞生存率	86 ± 2 (n=3)	87 ± 4 (n=5)	89 ± 2 (n=6)
総細胞/バイアル	1.44 ± 0.13 (n=3)	1.13 ± 0.2 (n=5)	1.13 ± 0.2 (n=6)
同一性: MITF陽性細胞	84	95	86 (n=2)
ベストロフィン1 陽性細胞	91	90	93 (n=2)
純度: CRALBP <sup>+</sup> PMEL17 <sup>+</sup> 細胞	99.8	NA	99.4
有効性: バリア機能、TER(Ω)	616	368	396 ± 200 (n=3)
PEDF極性分泌 (頂端側/基底側)	3.93	3.86	3.05 ± 0.04 (n=3)
VEGF極性分泌 (基底側/頂端側)	2.74	1.86	2.90 ± 0.50 (n=3)
安全性: 核型分析	正常	正常	NA
無菌性 米国薬局方<71>	陰性	NA	NA

10

20

30

40

50

## 【0305】

## 結果

生存率、総細胞数/バイアル、およびRPE同一性は3年間にわたってずっと維持された。さらに、示したように、データから、保存前に収集したものと同様のレベルで有効性および純度が証明された。

## 【0306】

凍結保存して4年後に正常核型が観察された。このことから、気相中の長期保管は、これまでのところ、RPEゲノム安定性に有害な影響を及ぼさなかったことが分かる。

## 【0307】

試料無菌性は、3ヶ月で全臨床バッチにおいて細菌/真菌増殖が存在しないかどうか試験することで証明された。別のバッチが、凍結保存して4年後に陰性の試験結果を示した。これまでのところ3年間の安定性試験に及ぶ、これらのー様に許容される安定性結果に基づいて、RPE細胞産物は液体窒素の気相中で-180℃以下の温度で保管された場合に少なくとも3年間にわたって安定していると結論づけられる。

## 【0308】

## 実施例7

## 安全性および生体内分布

本研究の目的は、雄NOD-SCIDマウスおよび雌NOD-SCIDマウスに6ヶ月の研究期間にわたって網膜下投与した後に、(実施例4に記載のように作製した)RPE細胞の生存、生体内分布、および安全性を評価することであった。

## 【0309】

注射時には5~6週齢のNOD-SCIDマウス(NOD.CB17-Prkdcscid)に、BSS Plus(ビヒクル対照)、または1μLのBSS Plusに懸濁した2種類の用量のRPE細胞:50 × 10<sup>3</sup>個の細胞もしくは100 × 10<sup>3</sup>個の細胞(実行可能な最大用量)を注射した。RPEを、33G Hamilton針を用いて経硝子体経路(提案された臨床投与経路)を介して網膜下投与した。単一用量の50 × 10<sup>3</sup>個の細胞または100 × 10<sup>3</sup>個の細胞を一方の眼に注射したのに対して、他眼は内部標準として役立った。各投薬作業には、各群からのマウス(雄および雌)が入っていた。予備試験後に研究に入れられたマウスを様々な試験群に無作為に割り当てた。2回の無作為化を行った。ビヒクル/試験物品を投与する前に処置群に配置するために、重量による測定値無作為化手順を用いた。投与後に、最終処置群に配置するために連續無作為化を用いて、研究での使用に適した動物を目標の研究に移した。予備試験で眼の異常性、異常な臨床観察、または16グラム未満の体重を有するマウス、および網膜下RPE注射がうまく行かなかつたマウス

を研究から除外した。

### 【0310】

研究測定: この研究におけるRPE安全性の評価は、動物死亡率、臨床観察、体重、眼科検査、臨床病理学(血液学および血液化学)、肉眼的病理学による肉眼的評価、臓器重量(絶対的ならびに体重および脳の重量に対して相対的)、眼および様々な臓器の病理組織学的評価に基づいた。RPEの生存率および生体内分布の評価は、眼および様々な臓器の病理組織学的評価および蛍光免疫染色評価ならびにqPCR分析によって行った。以下の測定を行った:

- ・臨床観察;
- ・体重;
- ・眼科検査(肉眼検査および生体顕微鏡検査(biomicroscopic examination)を含む);
- ・LEICA M80 Stereo顕微鏡を用いた、網膜下注射の質の外科的顕微鏡検査(眼底検査);
- ・全血球数および血液化学;
- ・剖検および肉眼的病理学;
- ・臓器重量(絶対的ならびに体重および脳の重量に対して相対的);
- ・視神経を含む対側性の処置および無処置の眼の収集、固定、およびパラフィンブロッキング;
- ・眼ならびに組織(骨髄のある胸骨、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、下頸リンパ節、脊髄、脾臓、胸腺、腫瘍、および肉眼的病変)の盲検式ヘマトキシリン-エオジン組織病理学;
- ・ヘマトキシリン-エオジン染色スライドにおける色素細胞の盲検式半定量;
- ・ヒトマーカー(ヒト核)+RPEマーカー(ヒトPMEL17)を対象にした、眼における色素細胞移植片を証明する、代表的なヘマトキシリン-エオジンスライドに隣接する選択されたスライドの盲検式免疫染色、ならびにヒトRPE細胞および非RPE細胞、ヒトマーカー(ヒト核)+増殖マーカー(ヒトKi67)の評価、ならびにヒト増殖細胞および非ヒト増殖細胞、RPEマーカー(RPE65)+増殖マーカー(ヒトKi67)の評価、ならびにRPEヒト増殖細胞および非RPEヒト増殖細胞の評価;
- ・ヒト起源を排除するためのヒトマーカー(ヒト核)を対象にした、テラトーマ、腫瘍、異常細胞、および病変部を証明する、代表的なヘマトキシリン-エオジンスライドに隣接する選択されたスライドの盲検式免疫染色;
- ・血液、骨髄(大腿から収集した)、脳、視神経のある左眼および右眼、心臓、左腎臓および右腎臓、肝臓、肺、下頸リンパ節、卵巣、骨格大腿二頭筋、脊髄、脾臓、精巣、ならびに胸腺からのゲノムDNAの収集および抽出、ならびにヒトグロビンのqPCR分析;
- ・同じ群および時点からの動物においてヒトグロビン陽性であることが見出された(上記以外の)組織に対するヘマトキシリン-エオジン組織病理学。

### 【0311】

#### 結果

詳細な臨床観察、体重、眼科検査、ならびに血液学および血清臨床化学で構成される臨床病理学を含む生存中の検査において、RPEに関連する毒物学的所見はなかった。詳細な臨床観察および眼科検査において、両用量レベルのRPE色素細胞で処置したマウスでは、アルビノバックグラウンドを有する左眼に「眼が黒っぽく変色した」と観察されたことが見出された。生き残っている動物の眼科検査から、この観察は、硝子体中央の(mid-vitreal)黒っぽい色素沈着のある病巣(foci)で構成されることが分かった。色素沈着のある病巣は、側頭部後側(temporal posterior)水晶体包から網膜表面に及ぶ線に沿ってランダムに分布していた。これらの病巣は、注射中に見られる硝子体の逆流により裏付けられるように、注射後に眼から注射カニューレを取り外す際に注射カニューレから漏れたRPE細胞、または網膜下移植後に硝子体液内に漏れたRPE細胞であると解釈された。

### 【0312】

この研究において観察された眼病変部は全て、麻酔、外科的注射手順に二次的に生じたもの、または偶発的には加齢性変化として生じたものであると考えられた。硝子体液内、色素沈着のある複数の病巣が発見されたことから、RPE細胞は硝子体内で生存できる可

10

20

30

40

50

能性があることが示唆される。RPEで処置した動物の一部で硝子体内に色素細胞が存在することが顕微鏡的レベルで確認された。

#### 【0313】

2週間、2ヶ月、および6ヶ月の間隔で一組のヒト グロビン遺伝子プローブ/プライマーを用いたqPCRによって評価した場合の生体内分布の点では、 $100 \times 10^3$ 個のOpRegen(登録商標)細胞で処置した左眼は、8/12匹、11/12匹、および16/16匹の動物においてRPE DNA陽性であり、群平均レベルは、それぞれ、眼の総DNA 1 μgあたり38コピー、47コピー、および249コピーであった。このことは、時間と共に増加する傾向があることを示している。雄と雌との間に有意差はなかった。これらの動物では、1匹の2週間雄動物からの脊髄(27コピー/ $\mu$ g DNA)と、1匹の2週間雌動物からの骨格筋(16コピー/ $\mu$ g DNA)および脊髄(適格性のレベルを下回る)(おそらく、これらの組織からDNAを抽出している間に外因性ヒトDNAによって不注意に汚染されたため)を除いて、無処置の右眼と、血液、大腿骨髄、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、下頸リンパ節、卵巣、骨格大腿二頭筋、脊髄、脾臓、精巣、および胸腺を含む、眼でない全ての組織において、RPE DNAは検出されなかった。10

#### 【0314】

RPEに関連する肉眼的变化は、2ヶ月および6ヶ月の間隔では、数匹の動物の左眼における黒色の変色または黒色の病巣に限定され、これは、生存中の臨床観察および/または眼科検査と一致した。これらの变化は、色素細胞と相関関係にあり、高用量群において生き残っている動物と、両用量群において死の間ぎわに安楽死させられた動物および死体となって発見された動物との顕微鏡検査によって判定された場合に有害なものとみなされなかつた。色素細胞は、高用量群の各時点で検査された生き残っているマウスのほぼ全てにおいて(2週間、2ヶ月、および6ヶ月の間隔で、11/12、12/12、および16/16の網膜下空間に)、ならびに低用量群および高用量群において死の間ぎわに安楽死させられた動物または死体となって発見された動物において、処置された左眼に存在した。ヒト細胞特異的バイオマーカーおよびRPE特異的バイオマーカーの免疫染色によって確認された場合に、色素細胞の最もよく見られる場所は網膜下空間および硝子体であった。網膜下空間では、色素細胞は早い時点では注射部位に限定される傾向があったのに対して、後の時点では、注射部位から離れた場所に存在した。このことから、細胞は局所的に広がったことが示唆される。雄において、6ヶ月時点での1眼当たりの色素細胞の総数の平均は2週間または2ヶ月の時点と比較してわずかに増加した。このヒト由来色素細胞数の増加はqPCR分析によって裏付けられた。20

#### 【0315】

RPE細胞の長期生着を図27Aに示した。移植して9ヶ月後に、NOD-SCID網膜下空間にある色素細胞はヒト核およびPMEL17が陽性に染色された。

#### 【0316】

図27Bは、注射後に小胞の場所で密集している細胞を示した写真である。図27Cは、注射後、その後に細胞が広がって単層になったのを示した写真である。

#### 【0317】

RPEはどんな臓器重量変化とも関連しなかつた。無処置の右眼と、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、下頸リンパ節、脊髄、脾臓、および胸腺を含む、この研究で検査された、眼でない臓器には肉眼的变化および顕微鏡的变化がなかつた。高用量群の検査された動物において、抗ヒト核バイオマーカー抗体染色(ヒト核)が、2週間の時点では試験された左眼の64%、2ヶ月の時点では36%、および6ヶ月の時点では73%において検出された。40

#### 【0318】

ヒト核の最も高い検出レベルが網膜下空間内の色素細胞集団に認められ、硝子体がこれに続いた。抗ヒトRPE特異的バイオマーカーであるPMEL17染色が、試験された動物のほとんどで観察されたのに対して、別のRPE特異的バイオマーカーであるRPE65は様々な時点で様々な検出レベルが認められた。これらのRPE特異的バイオマーカーは主に網膜下空間で検出され、硝子体ではそれより少なく検出された。ヒト細胞増殖バイオマーカーであるKi 67は、少数の動物において、ほんのわずかな細胞にしか検出されず、主に硝子体内の色素50

細胞、それより少なく網膜下空間内の色素細胞において検出された。Ki67陽性の発生率は時間と共に減少し、6ヶ月では1匹の動物だけだった。Ki67陽性細胞は、どんな異常形態とも関連しなかった。

#### 【0319】

いくつかの顕微鏡的变化が全ての時点および全ての研究群にまたがって注射部位に認められ、外科的注射手順に関連すると考えられた。これらの変化の一部は、6ヶ月で高用量群において検査された動物においてわずかによく見られた。例えば、網膜剥離が1匹の動物において認められ、網膜変性/萎縮または線維増殖の発生率または重篤度がビヒクル対照群と比較してわずかに増大した。

#### 【0320】

動物の死亡率および生存率に対してRPE依存的作用は無かった。

#### 【0321】

##### 結論

RPEを100,000細胞 /  $\mu$ l / 眼までの用量レベルで1回注射した後、6ヶ月の研究期間の間に、NOD/SCID動物モデルにおいて局所または全身の毒物学的作用、致死作用、または腫瘍形成作用は観察されなかった。RPE細胞の生体内分布は、処置された左眼に限定され、網膜下細胞は時間の関数として網膜下注射部位から局所的に広がった。2週間、2ヶ月、および6ヶ月の間隔で、高用量群において検査された動物のほとんどにおいてRPE細胞は主に網膜下空間に存在し、硝子体がこれに続き、ヒト核特異的バイオマーカーおよび/またはヒトRPE特異的バイオマーカーに対する抗体による免疫染色の陽性は一定でなかった。眼におけるRPE細胞の持続性は少なくとも6ヶ月と見積もられ、細胞増殖は非常に限られていた。限られた増殖は主に硝子体で起こり、有害な作用を及ぼさなかった。処置された眼においてRPE細胞数が経時的に増加するという証拠があったが、これには、検査された網膜下集団における増殖発生の低下が伴った。RPE特異的マーカーであるRPE65およびPMEL17は、硝子体内とは対照的に、主に網膜下空間内のRPE細胞で発現した。硝子体内にKi67陽性細胞発生の大部分が見出された。後者は、RPE細胞の経時的な増加が硝子体空間に限定され、特異的なRPE65およびPMEL17 RPEマーカーの発現が微小環境によって調節される可能性があることを示唆している。結論として、上記で示されたデータに基づいて、ビヒクル対照群と比較した場合に、本明細書で説明されたRPE細胞の注射に関連する重大な安全問題はなかった。

10

20

30

40

50

#### 【0322】

##### 実施例8

###### RPE細胞におけるPax-6発現

目的：ヒト網膜色素上皮(RPE)細胞においてPAX-6レベルを評価するためのFACSに基づく方法の開発。

#### 【0323】

##### 材料および方法

(実施例4に記載のように作製した)凍結RPE細胞を融解し、遠心沈殿し、1mlのPBS minusに再懸濁し、35  $\mu$ Mセルストレーナーで濾過し、NC-200細胞カウンターを用いて計数した。細胞濃度を、PBS minus中1mlにつき約 $1 \times 10^6$ 個の細胞まで調整した。細胞懸濁液1mlにつき1  $\mu$ l/mlのFVS450を添加した後に、ボルテックスし、37℃で6分間インキュベートした。FVS450を0.1%BSA(-Ig)-PBS minusでクエンチし、0.1%BSA(-Ig)-Fc-block( RTで5分間)に再懸濁して、細胞上の全Fcエピトープをブロックした。次いで、細胞を固定し、抗Pax-6抗体(AF647カタログ番号562249)で染色した。

#### 【0324】

##### 結果

図29から分かるように、P0およびP2における細胞はPAX6陽性である(P0では81.5% ~ 82.5%、P2では91.3% ~ 96.1%)。P2は生産工程の終了時に継代したものであり、P0は2増加段階前のものである。図29および図30に示したように、データはバッチ全体にわたって首尾一貫していることが示された。さらに、本発明者らは、FACS分析によって、RPE細胞がP

AX-6およびCRALBPに対して二重染色されることを示した(図31)。

【0325】

実施例9

RPE細胞によって分泌されたタンパク質の同定

目的:バッチリリース有効性アッセイ法ならびに工程管理アッセイ法として使用することができる、OpRegen(登録商標)(RPE細胞)によって分泌されたタンパク質(既知および新規)のシグネチャーを同定すること。

【0326】

以下に示した様々な培養条件下において培養した(実施例3に記載のように作製した)RPE細胞から上清を収集した。次いで、G6およびG7 RayBiotechアレイを用いて製造業者の説明書に従って、関連するアレイと上清を一晩スクリーニングした後に、上清をスクリーニングした。

1. 12ウェルプレート上で4日間および14日間培養した、融解後のRPE製剤細胞(継代3代目で $0.5 \times 10^6$ 細胞/ウェル)(本明細書中ではOpRegen(登録商標)と呼ぶ)。

2. 12ウェルプレート上で14日間培養し、次いで、(AM-RPE-15に従って)トランズウェル上で3週間培養し、500 を超えるTEERを示した、融解後のRPE製剤細胞。頂端側チャンバーおよび基底側チャンバーから上清を採取した。

3. アクチビンA処理前(QC3)およびアクチビンA処理後(QC4)の、実施例3に記載のプロトコールに従って作製した細胞。

4. TGF およびFGFが添加されていないNutriStem培地(Nut-)。

【0327】

上清を以下の細胞培養物からも収集し、ELISAによって試験した。

1. それぞれ、12ウェルプレート上で14日間培養し、次いで、(AM-RPE-15に従って)トランズウェル上で3週間培養し、それぞれ355 および505 のTEERを示した、融解後のOpRegen(登録商標)製剤細胞。上清を、14日目(継代3代目)から、ならびに頂端側チャンバーおよび基底側チャンバーから採取した。

2. 12ウェルプレート上で14日間培養した、融解後のRPE7細胞(継代3代目で $0.5 \times 10^6$ 細胞/ウェル)。

3. (実施例3に記載のように)酵素または機械によって単離した後にラミニン521上で増殖させた、生産工程の継代1代目の終了時の模擬試験VI細胞。これらの細胞をAM-RPE-15に従って有効性について試験し、12ウェルプレート上で14日目の細胞(継代2代目)から、ならびにトランズウェル上で3週間後の頂端側チャンバーおよび基底側チャンバーから採取した細胞から、上清を収集した。

4. 4日目および14日目の継代3代目の胎児HuRPE細胞( $0.5 \times 10^6$ 細胞/ウェル)。

【0328】

それぞれのELISAキットに関連する製造業者の説明書に従って、ELISA試験の検証を行った。各プロトコールにおいて上清とのインキュベーションは一晩であった。

【0329】

研究デザイン:様々な培養条件下において培養した細胞から上清を収集し、-80 に保った。タンパク質アレイ分析後に、ヒットの検証をELISAによって測定した。

【0330】

結果

G7アレイ結果を本明細書中の以下の表9に示した。

【0331】

(表9)

10

20

30

40

<i>G7</i>	<i>Nut (-)</i>	4日目	14日目	<i>TW 頂端側</i>	<i>TW 基底側</i>	<i>QC3</i>	<i>QC4</i>
POS	18,132	18,132	18,132	18,132	18,132	18,132	18,132
NEG	69	65	15	41	79	23	45
Acrp30	18	4,739	46	22	114	102	4
AgRP	56	61	62	72	75	57	94
アンギオポエチン-2	15	35	13	22	32	373	306
アンフィレギュリン	28	24	32	36	30	27	32
Axl	15	30	100	365	29	41	103
bFGF	15	22	23	95	20	211	28
b-NGF	11	29	31	24	31	61	30
BTC	41	58	46	47	54	127	59
CCL-28	37	42	40	36	34	88	60
CTACK	57	58	80	71	79	68	73
Dtk	16	17	17	21	21	23	24
EGF-R	11	61	174	227	156	138	77
ENA-78	23	34	27	31	34	36	36
Fas/TNFRSF6	19	22	25	24	33	21	23
FGF-4	16	19	19	20	25	14	22
FGF-9	19	17	27	21	27	21	26
GCSF	200	246	235	233	246	245	262
GITR-リガンド	47	54	52	50	53	46	56
GITR	24	26	26	29	29	28	24
GRO	121	367	224	952	400	549	472
GRO- $\alpha$	65	61	79	64	77	65	85
HCC-4	50	72	40	38	43	40	85
HGF	19	20	20	31	18	239	35
ICAM-1	13	20	24	27	17	106	56
ICAM-3	9	14	14	8	12	2	9
IGFBP-3	18	22	25	84	24	25	601
IGFBP-6	13	172	39	167	59	107	66
IGF-I SR	27	26	27	27	29	23	33
IL-1 R4/ST2	43	36	44	41	45	34	111
IL-1 RI	61	56	50	54	59	48	65
IL-11	54	58	51	60	89	55	64
IL-12 p40	10	16	13	12	17	18	12
IL-12 p70	15	18	27	19	18	18	20

10

20

30

40

IL-17	47	57	67	51	52	50	55
IL-2 Rapha	57	67	115	62	66	64	69
IL-6 R	12	25	42	15	15	81	18
IL-8	107	119	113	237	135	993	226
I-TAC	14	20	23	18	25	26	24
リンホタクチン	20	26	27	23	24	19	23
MIF	27	261	2,712	3,463	515	4,300	3,736
MIP-1 $\alpha$	26	24	25	29	27	23	25
MIP-1 $\beta$	18	22	20	17	23	28	1,056
MIP-3 $\beta$	19	21	17	19	23	15	17
MSP- $\alpha$	21	34	26	25	25	37	33
NT-4	10	14	11	12	13	9	15
オステオプロテジエリン	16	48	4,622	191	33	830	593
オンコスタチンM	40	46	44	52	61	53	39
PIGF	46	111	110	89	75	284	336
sgp130	16	93	199	393	40	222	564
sTNF RII	13	15	12	13	18	40	10
sTNF-RI	123	449	675	1,703	163	293	203
TECK	50	61	60	52	54	75	59
TIMP-1	130	1,223	1,909	1,674	1,948	2,006	1,798
TIMP-2	15	571	621	1,937	753	483	776
トロンボポエチン	48	48	47	47	48	54	39
TRAIL R3	39	100	100	310	56	572	314
TRAIL R4	23	22	21	18	21	46	20
uPAR	68	161	67	148	65	276	87
VEGF	14	508	689	559	554	546	592
VEGF-D	20	21	23	20	22	25	19

## 【 0 3 3 2 】

G6アレイ結果を本明細書中の以下の表10に示した。

## 【 0 3 3 3 】

(表10)

G6	Nut (-)	4日目	14日目	TW 頂端側	TW 基底側	QC3	QC4
POS	12,843	12,843	12,843	12,843	12,843	12,843	12,843
NEG	18	5	20	8	10	2	12
アンジオゲニン	4	3,006	3,152	423	1,749	2,838	3,574
BDNF	12	8	12	9	9	8	9
BLC	14	17	18	11	17	10	12
BMP-4	9	38	9	9	6	6	6
BMP-6	6	3	4	2	4	3	1

10

20

30

40

CK $\beta$ 8-1	9	7	8	9	10	6	8
CNTF	79	72	68	68	68	75	78
EGF	5	8	6	8	7	10	1
エオタキシン	9	13	11	11	12	11	12
エオタキシン-2	9	11	8	4	7	7	8
エオタキシン-3	58	53	62	42	59	47	59
FGF-6	7	4	7	1	9	0	7
FGF-7	9	9	16	14	13	9	14
Flt-3リガンド	49	51	50	46	54	49	46
フラクタルカイン	6	3	6	4	4	5	5
GCP-2	8	8	9	8	13	16	7
GDNF	10	11	12	12	9	10	11
GM-CSF	63	52	58	50	52	51	60
I-309	5	7	9	6	6	5	7
IFN- $\gamma$	96	77	72	71	89	80	79
IGFBP-1	7	19	21	25	9	7	10
IGFBP-2	10	274	432	490	257	602	442
IGFBP-4	9	11	10	8	7	6	4
IGF-I	9	13	13	14	13	14	16
IL-10	59	59	54	43	57	60	66
IL-13	81	77	66	62	70	69	75
IL-15	56	55	62	46	58	57	55
IL-16	3	3	1	6	3	3	4
IL-1 $\alpha$	77	76	63	72	78	77	71
IL-1 $\beta$	8	12	16	12	8	8	14
IL-1ra	65	58	68	58	60	55	59
IL-2	54	53	62	51	54	51	190
IL-3	56	49	52	50	52	51	177
IL-4	7	6	7	7	6	6	10
IL-5	81	79	82	67	87	76	80
IL-6	309	429	280	1,053	386	2,704	377
IL-7	64	56	62	59	63	57	63
レプチン	15	19	14	17	15	23	17
ライト(LIGHT)	8	12	10	5	11	7	8
MCP-1	67	3,046	1,460	4,269	3,963	5,061	2,876
MCP-2	16	19	22	22	22	21	21
MCP-3	8	10	10	9	8	62	8
MCP-4	9	11	10	7	8	11	7
M-CSF	19	18	13	14	17	21	19
MDC	9	8	8	7	7	8	7

10

20

30

40

MIG	34	28	31	29	31	29	52
MIP-1- $\delta$	8	8	8	6	6	6	0
MIP-3- $\alpha$	8	8	8	7	7	33	72
NAP-2	7	11	12	8	7	6	10
NT-3	12	11	10	12	12	11	9
PARC	60	60	56	53	60	57	57
PDGF-BB	13	17	20	15	20	23	21
RANTES	6	63	15	8	13	35	11
SCF	5	14	4	3	11	17	6
SDF-1	20	25	26	20	22	22	22
TARC	11	14	12	12	12	12	10
TGF- $\beta$ 1	82	79	83	81	75	85	77
TGF- $\beta$ 3	6	11	5	6	4	8	4
TNF- $\alpha$	86	89	84	78	81	86	81
TNF- $\beta$	82	78	84	80	86	83	77

## 【 0 3 3 4 】

RPE分泌タンパク質は、3つの機能グループ:(1)血管形成タンパク質、例えば、VEGFおよびアンジオゲニン、(2)細胞外マトリックス制御因子、例えば、TIMP-1およびTIMP-2、ならびに(3)免疫調節性タンパク質、例えば、IL-6、MIF、sgp130、sTNF-R1、sTRAIL-R3、MC P-1、およびオステオプロテジェリンに分けることができる。受容体型チロシンキナーゼA x1もRPE細胞によって分泌されることが見出された。ELISAによって検証するために、高レベルの分泌を示した、および/または極性分泌(頂端側/基底側)パターンを示した6種類のタンパク質(アンジオゲニン、TIMP-2、MIF、sgp130、sTNF-R1、およびsTRAIL-R3)を選択した。アレイデータからも、極性化アッセイ法において見られたようなVEGF分泌が証明された。

## 【 0 3 3 5 】

アンジオゲニン:タンパク質アレイデータから、生産工程に沿ってアンジオゲニン分泌が増大することが証明された(表9および表10)。これらの結果はELISAによって確認され、このELISAから、アクチビンAを添加する前にニコチンアミドで処理した分化細胞が分泌したアンジオゲニンのレベルは0.52ng/mLであったのに対して、ニコチンアミドおよびアクチビンAで2週間処理した後のアンジオゲニン(angiogenin)分泌レベルは0.91ng/mLまで増加したことが証明された(図32A)。融解後に、12ウェルプレートに入れて2週間培養したRPE細胞( $0.5 \times 10^6$ 細胞/ウェル; 繼代3代目)はアンジオゲニンを分泌した(図32B)。極性化RPE細胞(トランズウェル上で3週目; TEER>350 、PEDF頂端側/基底側およびVEGF基底側/頂端側の比>1)はアンジオゲニンを基底側に極性化様式で分泌し、頂端側への分泌は少ないか、または無かった(基底側のアンジオゲニンレベルは0.1~0.25ng/mLの範囲であり、頂端側のアンジオゲニンレベルは0.05~0.12ng/mLの範囲であった; 図32B)。Idelsonら、2009に従って作製したRPE7細胞はトランズウェルシステムにおいてバリア機能を生じることができなかったが(TEERは100 より小さい)、VEGFおよびPEDFを分泌することができた。12ウェルプレート中で14日間ブレーティングした場合に、RPE7細胞がアンジオゲニンを分泌する能力を試験した。培養して14日目に、RPE7は、本明細書に記載のように作製したRPE細胞の範囲内のレベルでアンジオゲニンを分泌した(図32C)。

## 【 0 3 3 6 】

TIMP-1およびTIMP-2の分泌:タンパク質アレイスクリーニングから、極性化RPE細胞および非極性化RPE細胞からTIMP-1およびTIMP-2が分泌されることが証明された(図33A~E)。興味深いことに、アレイデータから、TIMP-2が頂端側に、TIMP-1の基底側への極性分泌が示された(図33A)。ELISAデータから、今までに試験された全RPEバッチによって、TIMP-2

は主に頂端側に分泌されることが確認された(図33C～D、69.9～113.3ng/mLの頂端側の範囲および11.9～43.7ng/mLの基底側の範囲)。TIMP-2はまた、正常ヒト胎児RPE細胞(HuRPE、Sciencell)によって分泌されたレベルと同様のレベルで非極性化OpRegen(登録商標)細胞によっても分泌された(図33C～E)。RPE7細胞も、OpRegen(登録商標)細胞と同様のレベルでTIMP-2を分泌した(図33C～E)。興味深いことに、生産工程に沿ってQC3およびQC4チェックポイントで非常に低いレベルのTIMP-2が検出された(図33B)。

### 【0337】

OpRegen(登録商標)細胞によるsgp130分泌:タンパク質アレイデータから、IPC/QCチェックポイント3および4で見られたように、OpRegen(登録商標)生産工程に沿ってsgp130分泌が増大することも証明された(表9および表10)。ELISAデータから、ニコチニアミドで処理した後、アクチビンAを添加する前に細胞によって分泌されたレベル(IPC/QC3; 0.68ng/mL)と比較して、アクチビンAで2週間処理した後に高レベルのsgp130分泌が確認された(IPC/QC4; 1.64ng/mL)(図34A)。融解後に、12ウェルプレートに入れて2週間培養したOpRegen(登録商標)細胞( $0.5 \times 10^6$ 細胞/ウェル; 繰代3代目)はsgp130を分泌した(図34B～C)。同様の条件下において培養したRPE7細胞は、OpRegen(登録商標)細胞の範囲内のレベルのsgp130を分泌した(14日目に1.0ng/mL; 図34D)。胎児HuRPE細胞は4日目および14日目に低いsgp130レベルを分泌した。

10

### 【0338】

極性化OpRegen(登録商標)細胞はsgp130を頂端側に極性化様式で分泌し、基底側には少量分泌したか、または分泌しなかった(頂端側のsgp130分泌レベルは0.93～2.06ng/mLであり、基底側のsgp130レベルは0～0.2ng/mLの範囲であった; 図34B～C)。

20

### 【0339】

放出されたsTNF-R1:分化細胞の上清中に、非常に低いレベルの放出されたsTNF-R1が、ニコチニアミドおよびアクチビンAで2週間処理する前(IPC/QC3 0.01ng/mL)および2週間処理した後(IPC/QC4 0.02ng/mL)にELISAによって検出された(図35A)。融解後に、12ウェルプレートに入れて2週間培養したOpRegen(登録商標)細胞( $0.5 \times 10^6$ 細胞/ウェル; 繰代3代目)は培養14日目の上清中にsTNF-R1を含有した(図35B～C)。同様の条件下において培養したHuRPE細胞の培養上清中には同様のレベルのsTNF-R1があったのに対して、RPE7細胞は比較的低いsTNF-R1レベルを示した(図35D)。

30

### 【0340】

極性化OpRegen(登録商標)細胞は高レベルの放出されたsTNF-R1を頂端側に分泌した(頂端側sTNF-R1レベルは0.22～1.83ng/mLの範囲であり、基底側のsTNF-R1レベルは0.01～0.11ng/mLの範囲であった; 図35C～D)。

### 【0341】

sTRAIL-R3:タンパク質アレイデータによって、sTRAIL-R3がOpRegen(登録商標)細胞の上清中に検出された(表9および表10)。ELISAから、OpRegen(登録商標)生産工程に沿ってsTRAIL-R3が存在することが確認された(QC3では493pg/mL、QC4では238pg/mL)。胎児HuRPE培養物中にはsTRAIL-R3が無く、RPE7培養中には非常に低いレベルのsTRAIL-R3(4pg/mL)があった。

40

### 【0342】

MIFの検出:タンパク質アレイデータによって、MIFがOpRegen(登録商標)細胞の上清中に検出された(表9および表10)。ELISAによって、OpRegen(登録商標)生産工程に沿ってMIFが存在することが確認された(QC3では100.3ng/mL、QC4では44.7ng/mL)。極性化OpRegen(登録商標)細胞から、頂端側に高レベルのMIFがあることが証明された(頂端側のMIFレベルは26.6～138.3ng/mLの範囲であり、基底側のMIFレベルは1.9～30.5ng/mLの範囲であった)。

### 【0343】

#### 実施例10

##### OpRegen(登録商標)とRPE1およびRPE7との比較

目的:OpRegen(登録商標)(RPE細胞)と、Idelsonら、2009のプロトコールに従って作製したRPE細胞を比較すること。

50

## 【0344】

## 材料および方法

OpRegen(登録商標)(RPE細胞)を実施例3に記載のように作製した。

## 【0345】

RPE細胞を、Idelsonら、2009のプロトコールに従って作製し、RPE1およびRPE7と名付けた。

## 【0346】

トランズウェルシステム(図28に示した通り)を用いて、安定したバリア特性とPEDFおよびVEGFの極性分泌による極性化RPE単層を開発することができた。経上皮電気抵抗(TEER)測定を用いてRPE単層のバリア機能を評価し、酵素結合免疫測定法(ELISA)を用いてPEDFおよびVEGFの極性分泌を評価した。細胞を融解し、ニコチニアミドの存在下で14日間培養した。7日目および14日目にPEDF分泌を試験した。次いで、さらに4週間わたって細胞をトランズウェル(Costar 3460、0.4 μm)に移し替えた。この間、TEERを測定し、(サイトカイン分泌を評価するために)上および下のトランズウェルチャンバーから培地を4週間まで毎週収集した。細胞が極性化している場合には、TEERは100 を上回るべきであり、頂端側PEDF分泌と基底側PEDF分泌の比および基底側VEGF分泌と頂端側VEGF分泌の比は1を上回るべきである。

## 【0347】

試験したOpRegen(登録商標)バッチは全て、バリア機能を生じる能力(TEERは368 ~ 688 の範囲)と、PEDFおよびVEGFを極性化様式で分泌する能力(頂端側PEDF/基底側PEDFの比は3.47 ~ 8.75であり、基底側VEGF/頂端側VEGFの比は1.39 ~ 2.74であった)を示した(表11を参照されたい)。

## 【0348】

(表11)

試験	試験方法	リリースの判断基準	OpRegen(登録商標)臨床グレードバッチ			OpRegen(登録商標)GMP生産、研究グレードバッチ					非GMP模擬試験 生産OpRegen (登録商標) バッチ	Idelsonら、 2009による GMP生産 RPE	
			2A	2B	6	5A	5B	5C	5D	#4	#5		
RPE 純度 % CRLBP <sup>1</sup> PM EL17 <sup>2</sup>	AM-RPE-04	≥ 95%	98.8 5%	98.2 6%	99. 08	98.9 1%	99.0 1%	99.2 4%	99.2 9%	99.6 1%	99.7 6%	99.9 1%	96.2 9%
有効性	AM-RPE-15	参考まで	532 Ω	458 Ω	411 Ω	451 Ω	468 Ω	368 Ω	543 Ω	688 Ω	616 Ω	<100 Ω	<100 Ω
			8.75	6.12	5.7 7	3.47	4.46	3.86	4.16	6.78	3.93	ND	ND
			2.27	2.35	2.5 1	1.86	1.39	1.86	1.97	2.57	2.74	ND	ND
			3033	2158	288 1	1562	1255	1551	1370	2462	3936	2279	2556

ND:TEERが100 より小さかったので測定されなかった。培養物には大きな穴が認められた。

## 【0349】

Idelsonら(2009)に従ってGMP条件下において生産されたRPE1およびRPE7は3つの独立した研究においてバリア機能を生じることができなかつた(TEER<100 )。トランズウェル上に播種した細胞は均質な閉じた多角単層を生じることができず、大きな穴が認められた(図36)。これらの細胞はバリア機能を生じることができなかつたが、RPE1およびRPE7はPEDF(表11を参照されたい)およびVEGF(示さず)をOpRegen(登録商標)と同様のレベルで分泌する

10

20

30

40

50

ことができた。これらのCRALBP<sup>+</sup>PMEL17<sup>+</sup>純度のレベルはそれぞれ99.91%および96.29%であり、OpRegen(登録商標)と同様であった(図37)。

### 【0350】

これらのデータに基づいて、RPE1およびRPE7は密着結合を生じる能力に欠陥があると結論づけられる。

### 【0351】

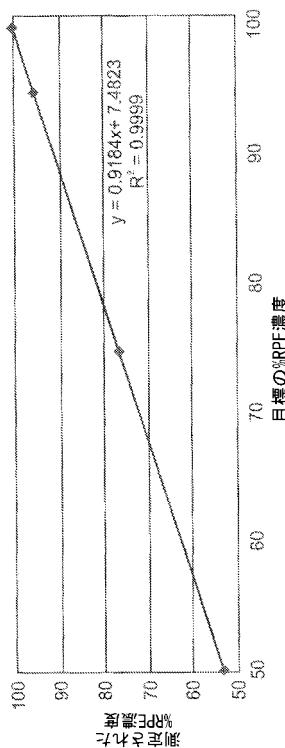
本発明は本発明の特定の態様と共に説明されたが、多くの選択肢、変更、およびバリエーションが当業者に明らかなことは明白である。従って、添付の特許請求の範囲の精神内および広い範囲内のこののような全ての選択肢、変更、およびバリエーションを含むことが意図される。

### 【0352】

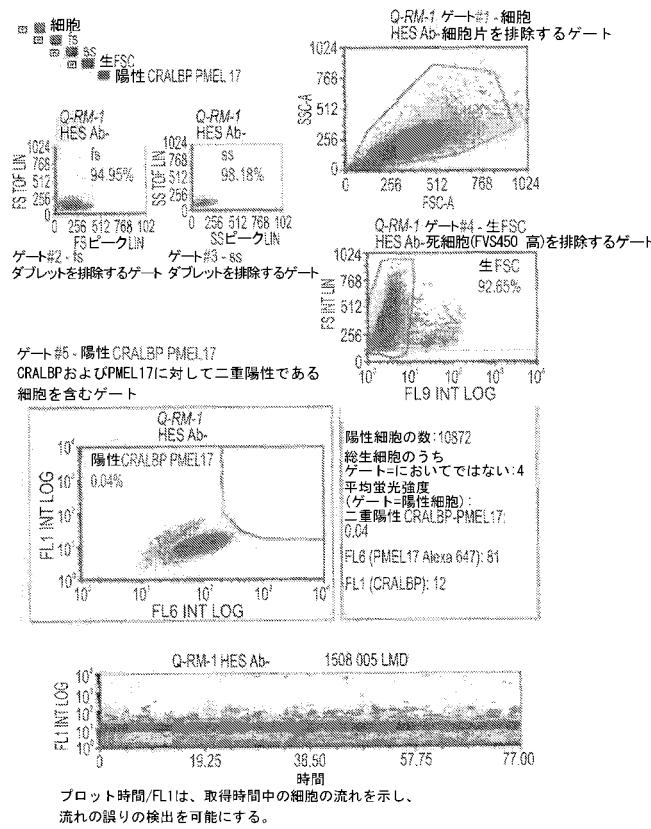
本明細書において述べられた刊行物、特許、および特許出願は全て、それらの全体が、それぞれの個々の刊行物、特許、または特許出願が本明細書に参照により組み入れられるように詳細かつ個別に示されるのと同じ程度に本明細書に参照により組み入れられる。さらに、本願における任意の参考文献の引用または特定は、このような参考文献が本発明の先行技術として利用できることが認められると解釈されないものとする。セクションの見出しが用いられる範囲内で、これらは必ず限定するものであると解釈してはならない。

10

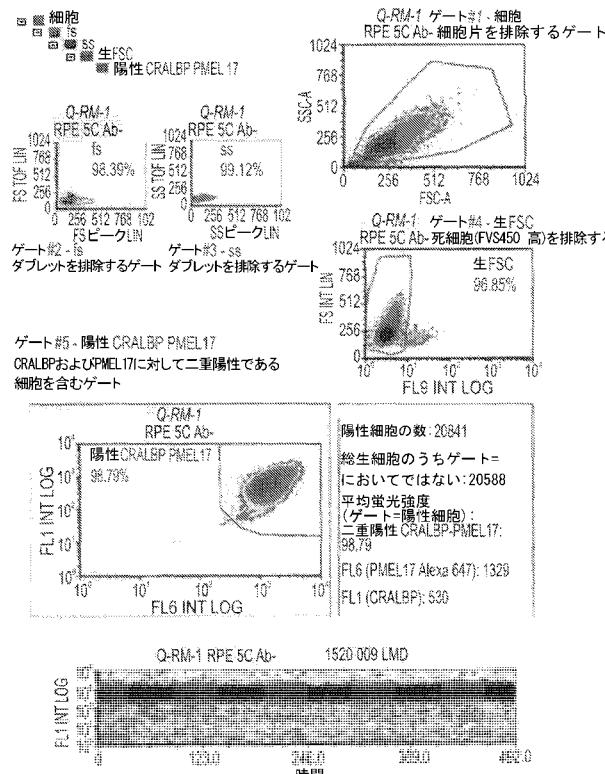
【図1】



【図2】



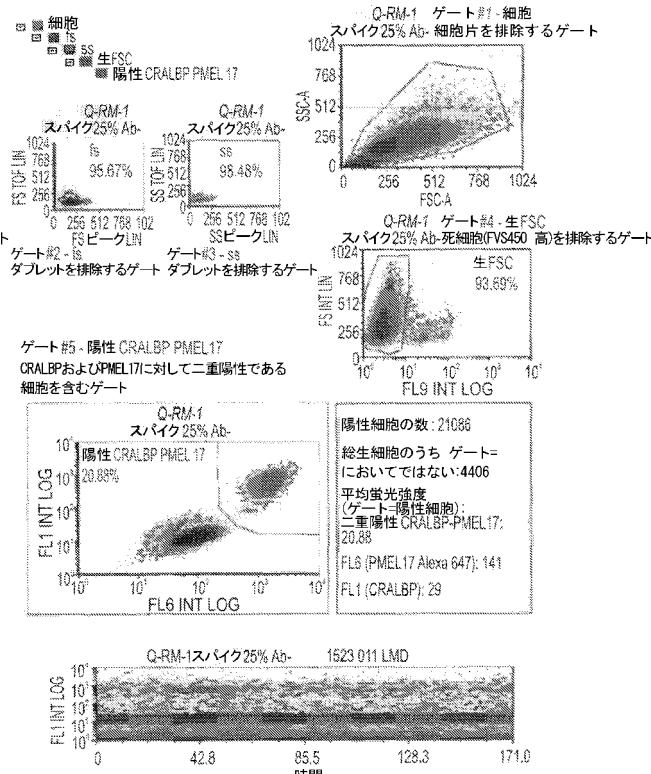
〔 図 3 〕



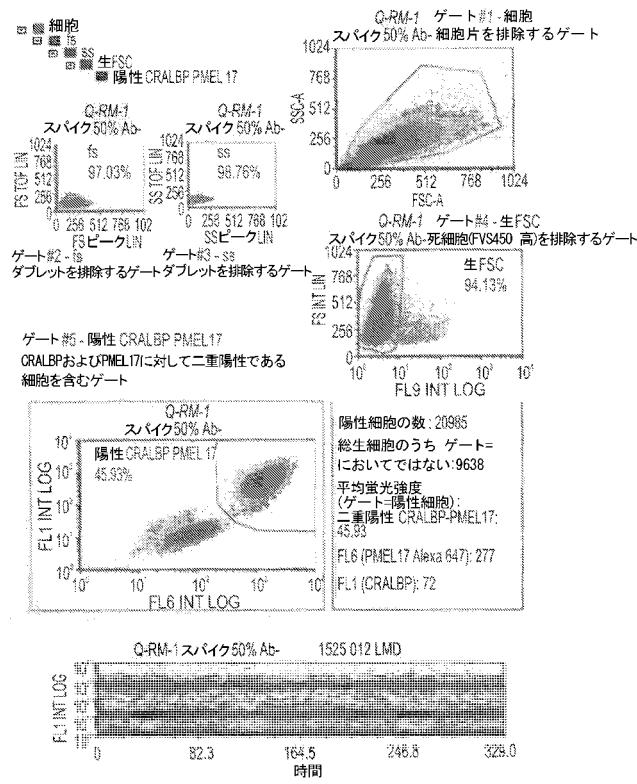
時間

プロット時間/FL1は、取得時間中の細胞の流れを示し、流れの誤りの検出を可能にする。

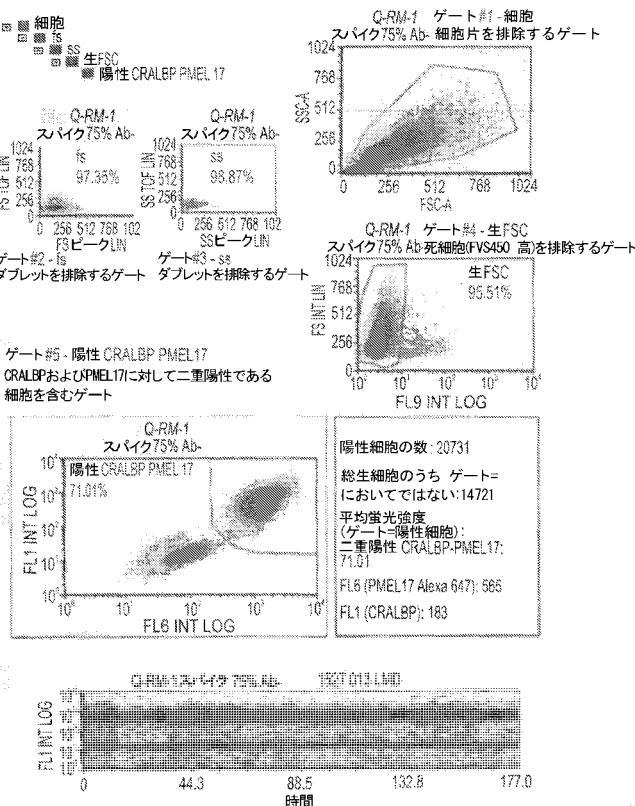
【 図 4 】



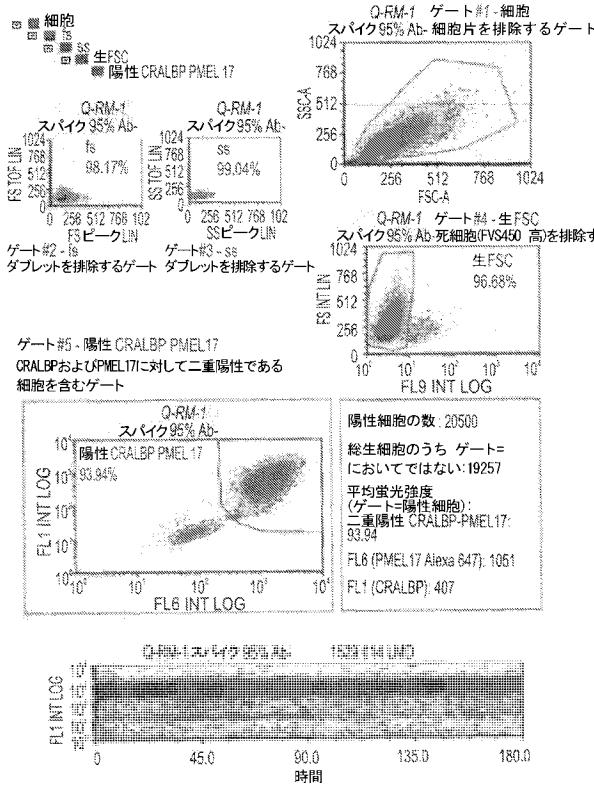
〔 図 5 〕



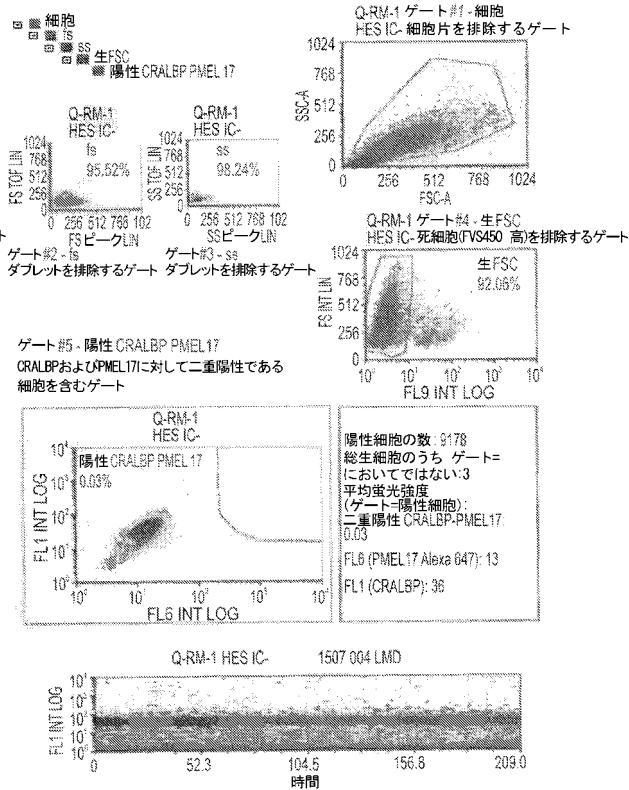
( 6 )



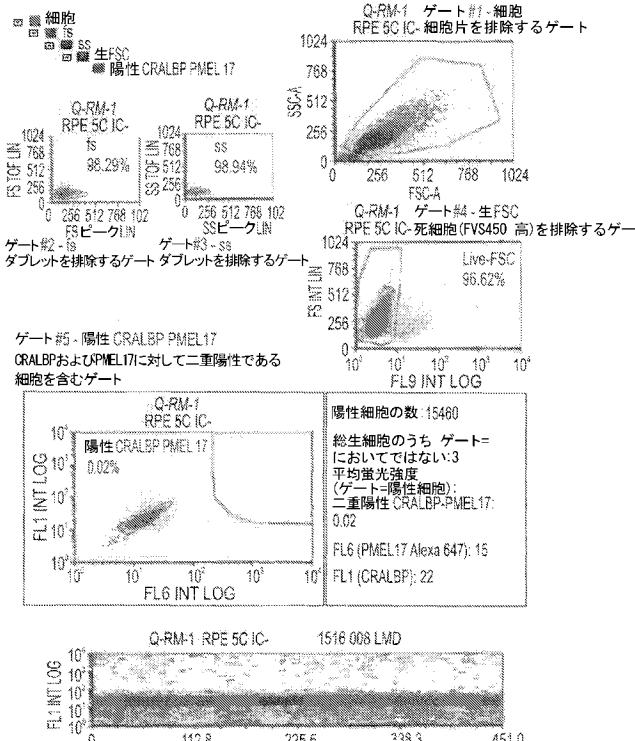
【図7】



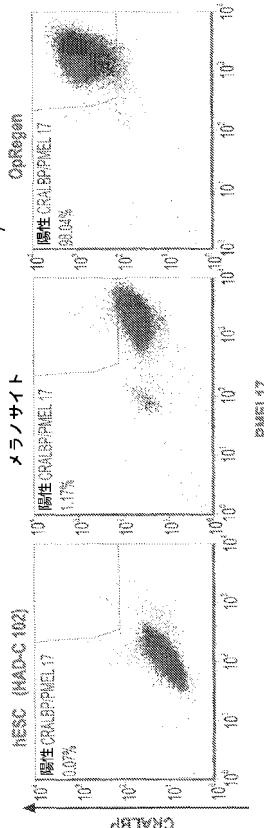
【図8】



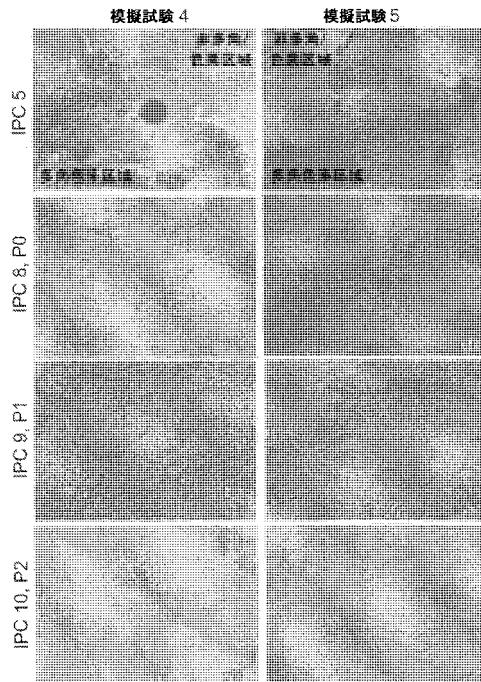
【図9】



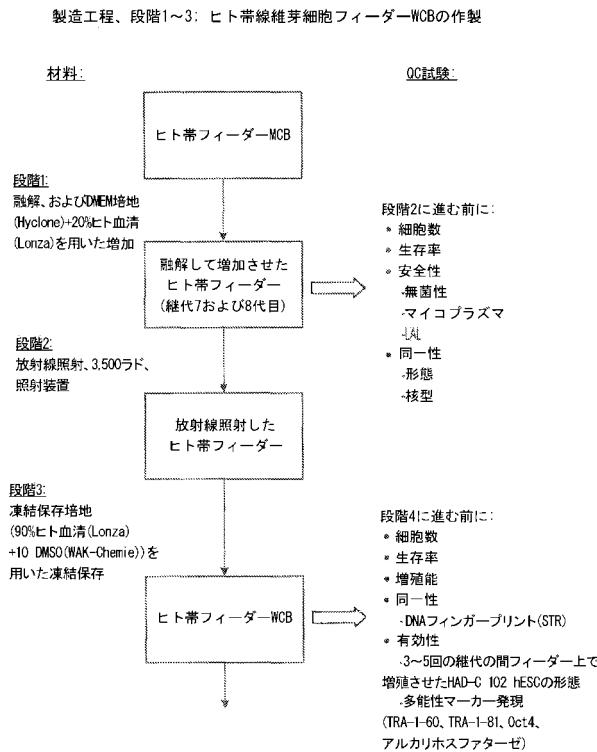
【図10】



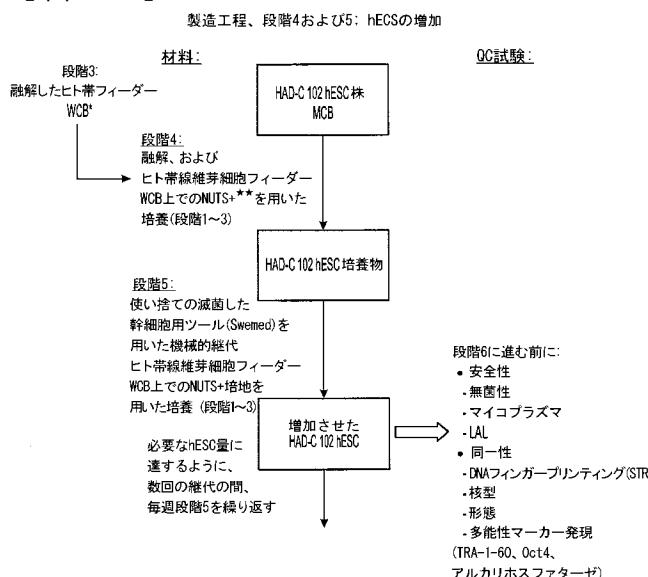
【 図 1 1 】



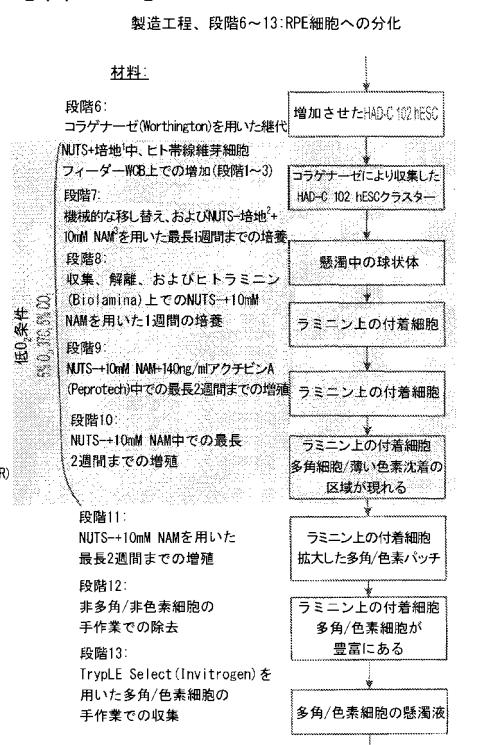
【図12】



( 义 1 3 )



( 四 14 )



\*DMEM培地(Hyclone)+20%ヒト血清(Lonza)中のヒト帯フィーダーの融解、および1~4日間の増殖  
\*\*NUTS+ - Nutristem<sup>TM</sup> Plus 培地は増殖因子bFGFおよびTGF $\beta$ (Biological Industries)を含有する

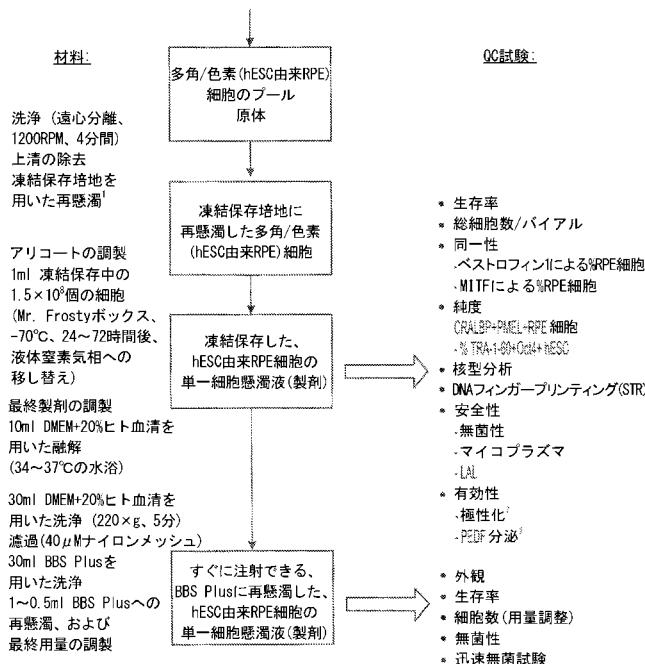
NOTS+ - NutriSystem Plus] 培地は増殖因子DFRおよびDFR(Biological Industries)を含有する。

<sup>1</sup> NUTS+ = Nutristem「Plus」培地は増殖因子bFGF-2とTATGE-β(Biological Industries)を含有する。

<sup>1</sup> NUTS+ - Nutristem「Plus」培地は増殖因子bFGFおよびTGF- $\beta$  (Biological Industries 特別注文)を含有しない。

<sup>3</sup> NAH = ニコモ・アミド(Sigma)

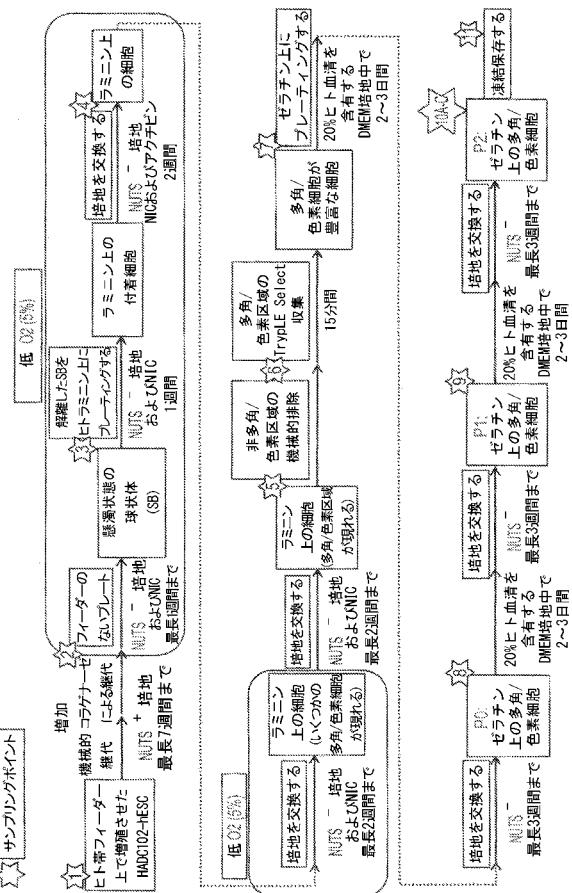
【 図 15 】



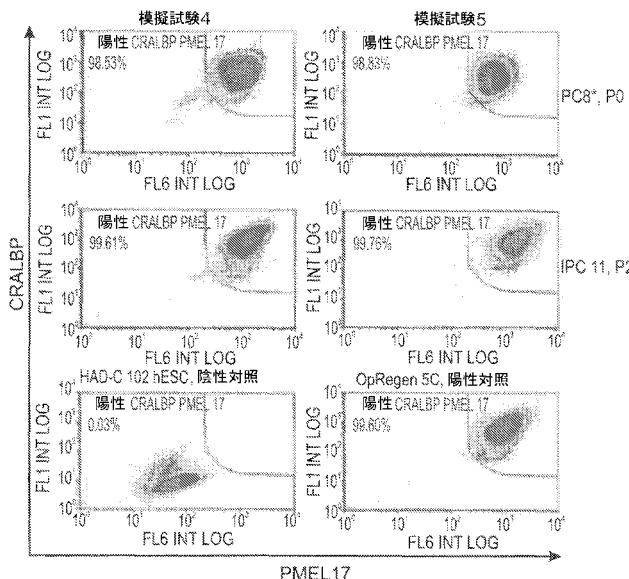
<sup>1</sup>凍結保存培地 - 90%ヒト血清+10%DMSO (WAK-DMSO-10、WAK-Chemie)  
<sup>2</sup>アッセイ法は参考までに行われ、リリース基準は設けられていない。

<sup>2</sup>アッセイ法は参考までに行われ、リリース基準は設けられていない。

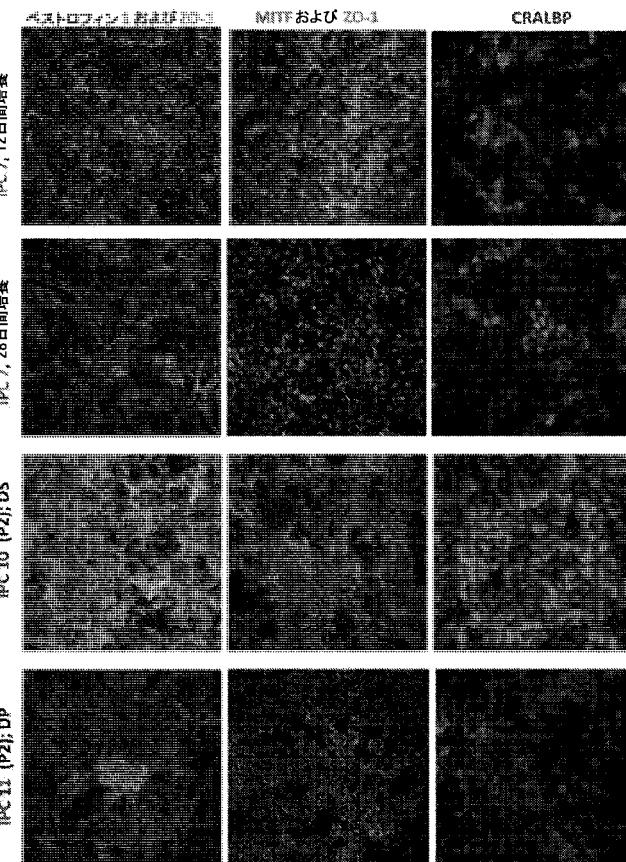
【 図 1 6 】



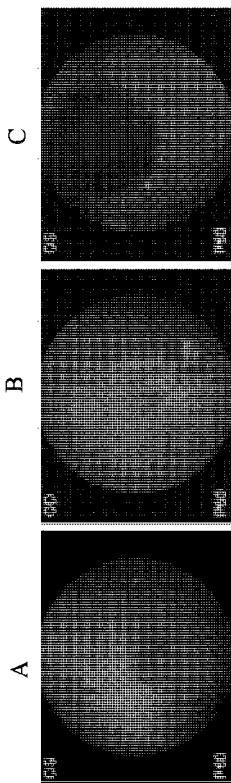
【 図 17 】



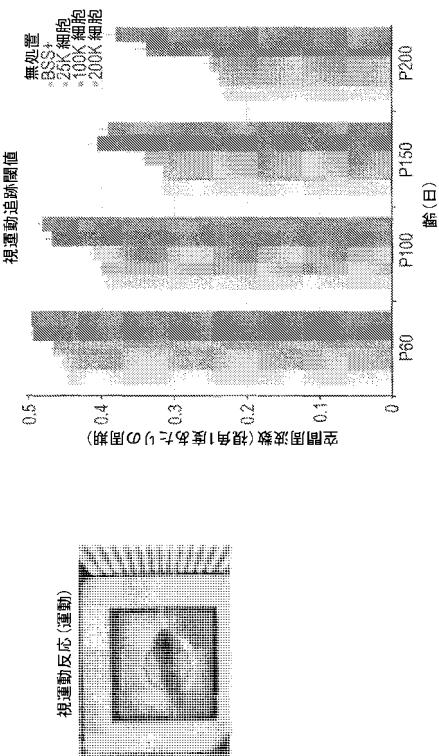
【 図 1 8 】



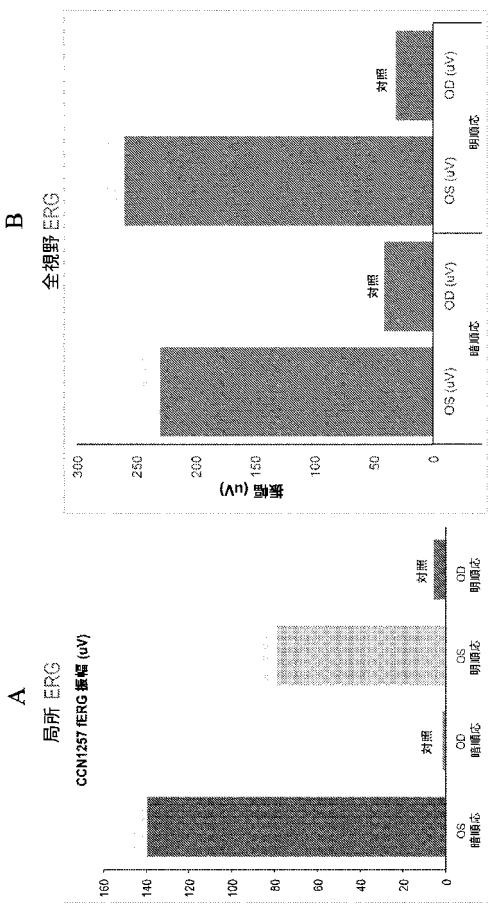
【図19】



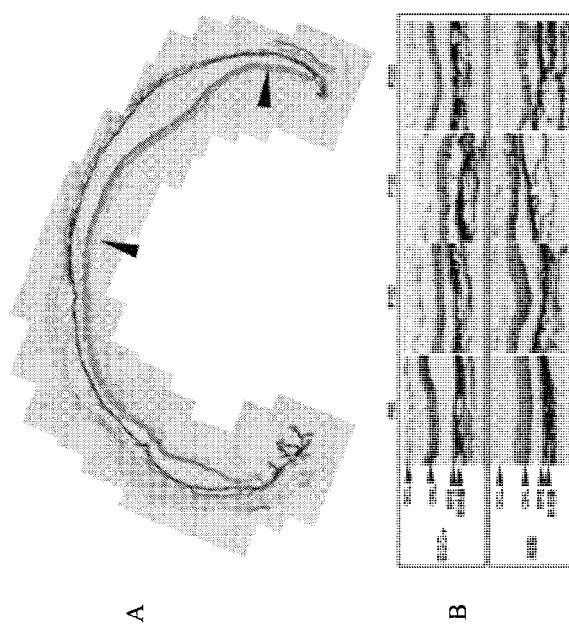
【図20】



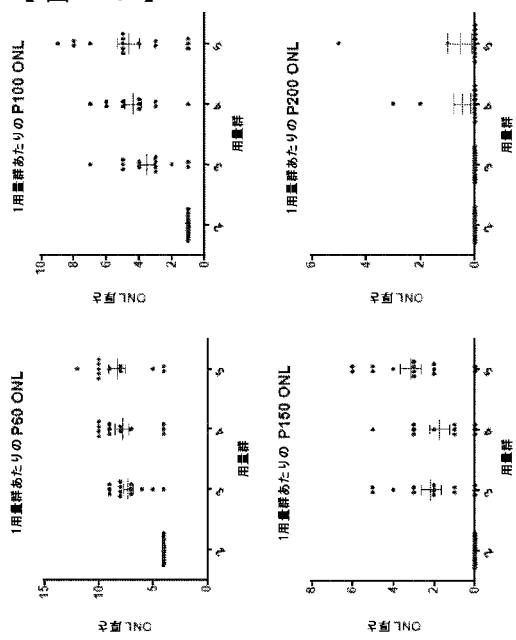
【図21】



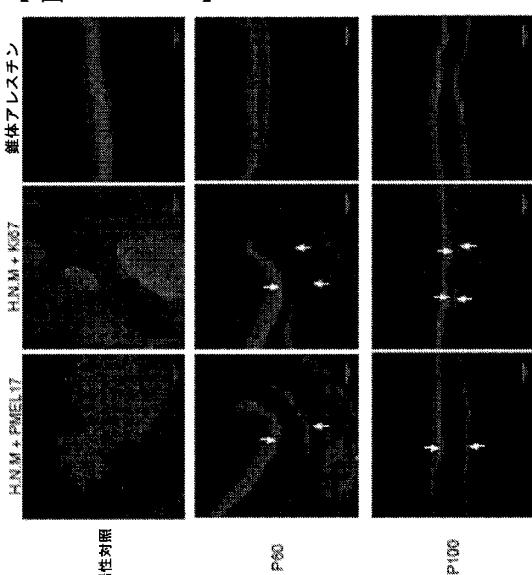
【図22】



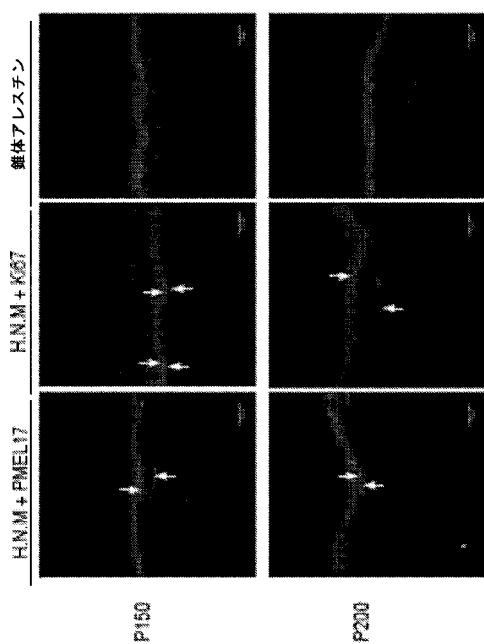
【図23】



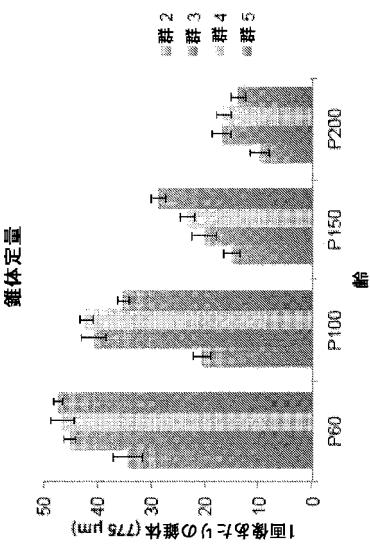
【図24-1】



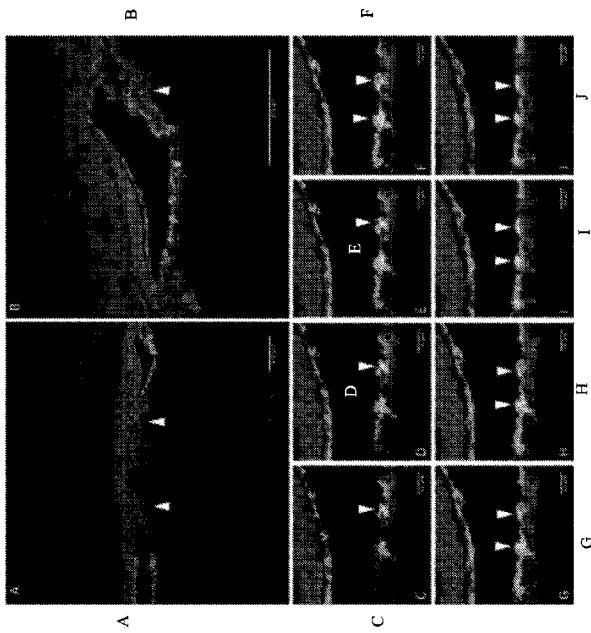
【図24-2】



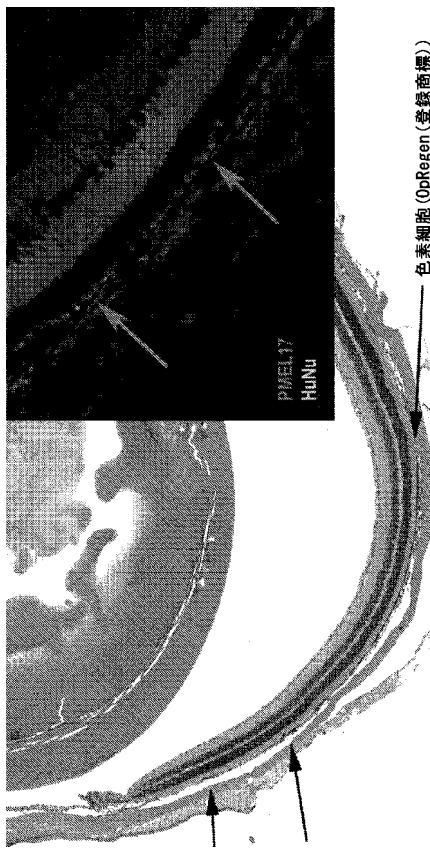
【図25】



【図 26】



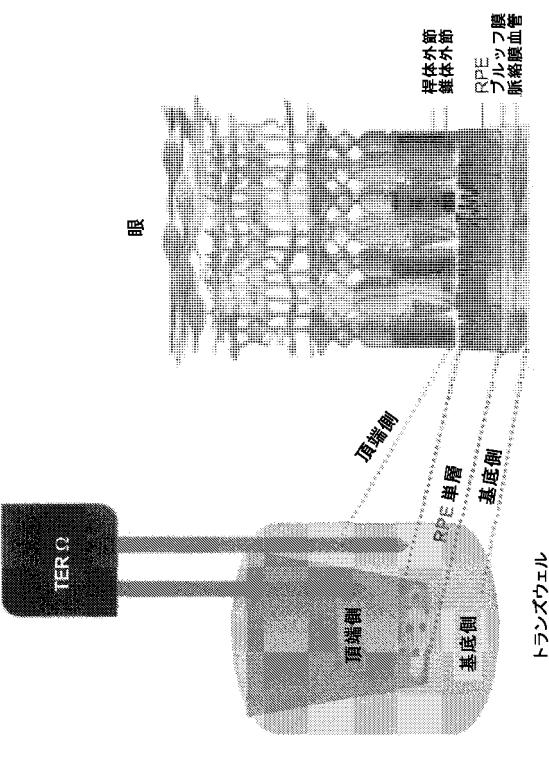
【図 27 A】



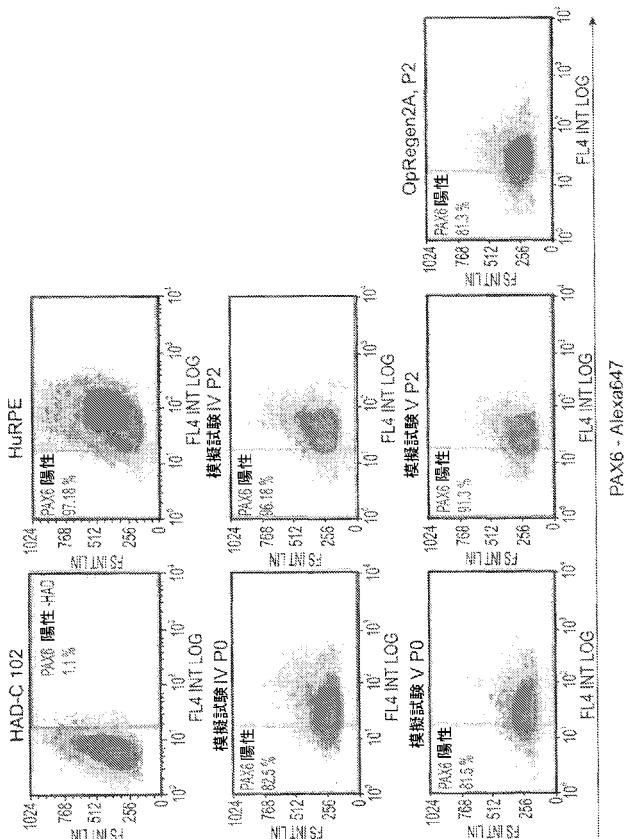
【図 27 B】



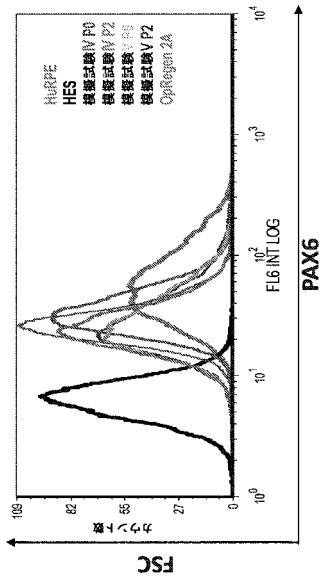
【図 28】



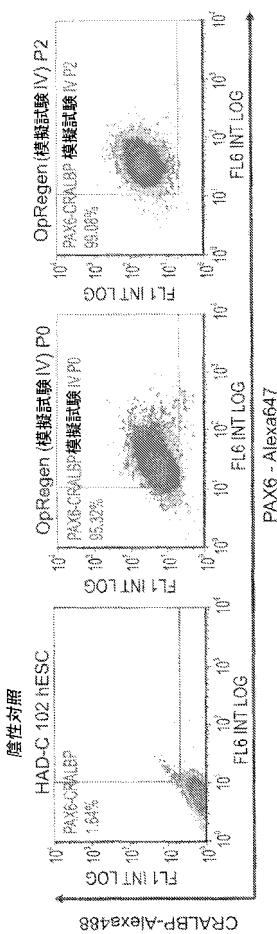
【図 29】



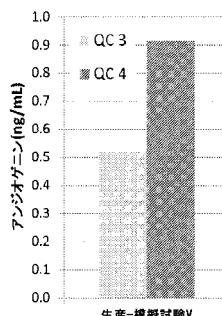
【図 30】



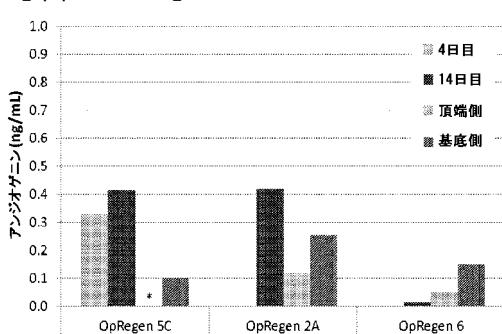
【図 31】



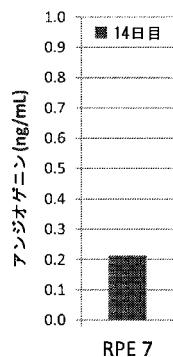
【図 32A】



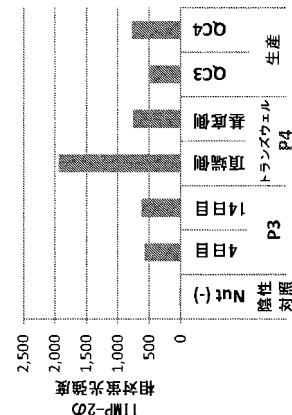
【図 32B】



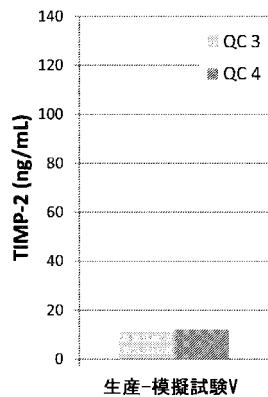
【図 3 2 C】



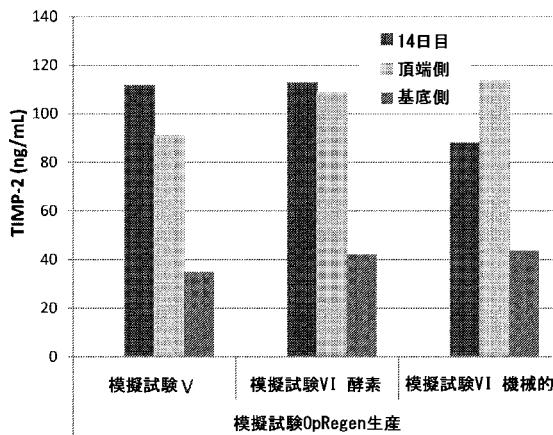
【図 3 3 A】



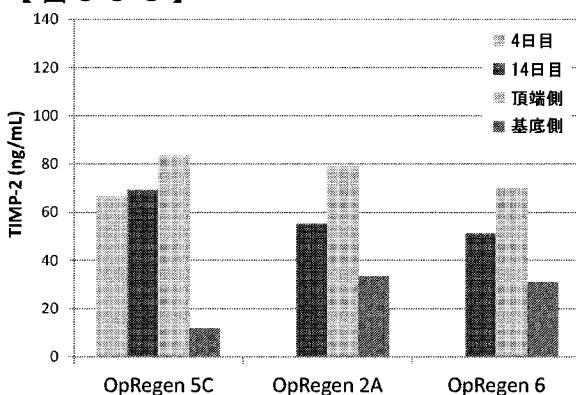
【図 3 3 B】



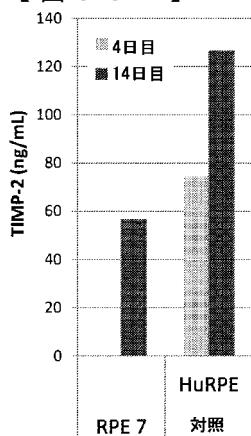
【図 3 3 D】



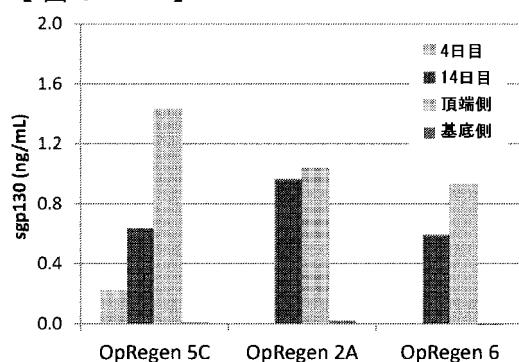
【図 3 3 C】



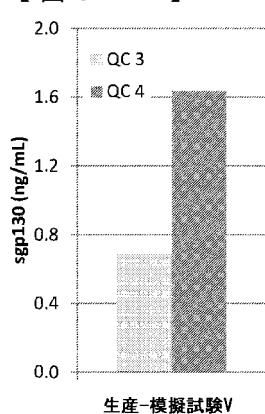
【図 3 3 E】



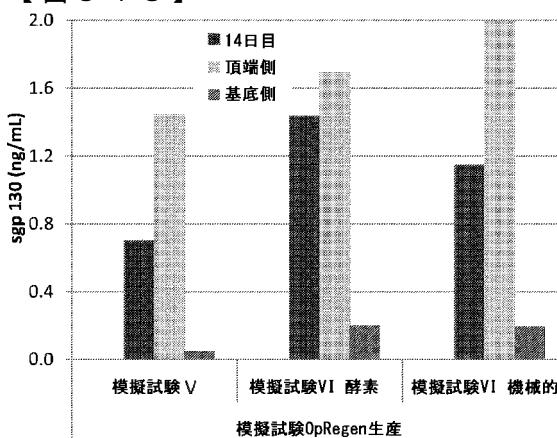
【図 3 4 B】



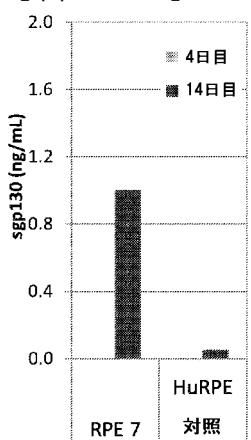
【図 3 4 A】



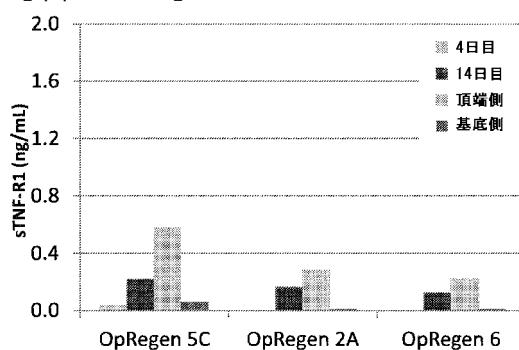
【図 3 4 C】



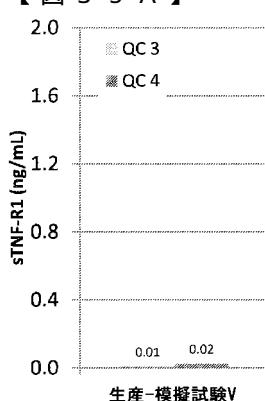
【図 3 4 D】



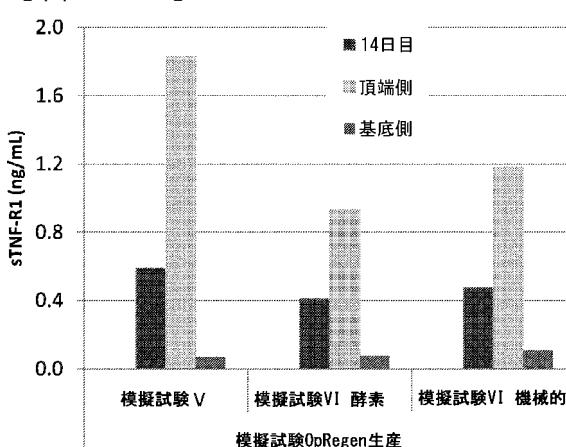
【図 3 5 B】



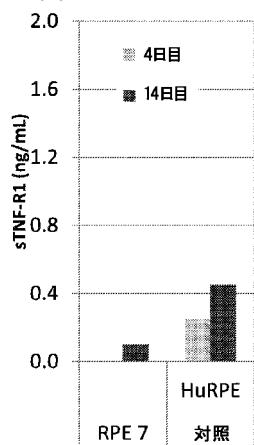
【図 3 5 A】



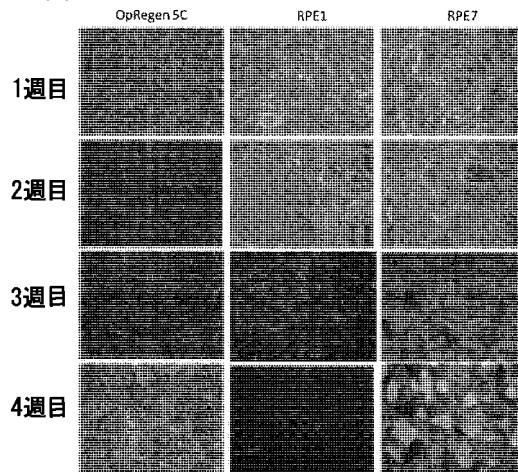
【図 3 5 C】



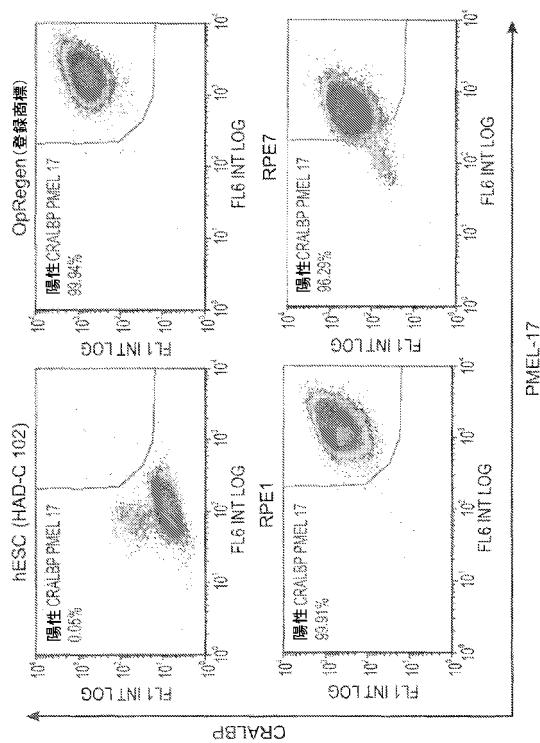
【図 3 5 D】



【図 3 6】



【図 3 7】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IL2015/051270

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12N5/079 A61K35/36  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/196369 A1 (HIKITA SHERRY [US] ET AL) 1 August 2013 (2013-08-01) paragraph [0083] - paragraph [0085] ----- A T. MASUDA ET AL: "SOX9, through Interaction with Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF) and OTX2, Regulates BEST1 Expression in the Retinal Pigment Epithelium", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 35, 27 August 2010 (2010-08-27), pages 26933-26944, XP055257501, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.130294 page 26936, right-hand column, paragraph 2 ----- - / --	1-16,25
A		1-16,25

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

11 March 2016

29/03/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lanzrein, Markus

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IL2015/051270
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARIA IDELSON ET AL: "Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Functional Retinal Pigment Epithelium Cells", CELL STEM CELL, vol. 5, no. 4, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 396-408, XP055046648, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2009.07.002 page 405, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 4 figures 4 E, F, I, J, L -----	18-24
A	HANNA VAAJASAARI ET AL: "Toward the defined and xeno-free differentiation of functional human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells.", MOLECULAR VISION, vol. 17, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 558-575, XP055108414, ISSN: 1090-0535 page 562, left-hand column, paragraph 2 page 569, last paragraph - page 570, paragraph 1 -----	1-25
A	BUZHOR ELLA ET AL: "Cell-based therapy approaches: the hope for incurable diseases", REGENERATIVE MEDICINE, FUTURE MEDICINE, UK, vol. 9, no. 5, 1 January 2014 (2014-01-01) , pages 649-672, XP009188959, ISSN: 1746-076X, DOI: 10.2217/RME.14.35 page 656, right-hand column, paragraph 3 - page 657, left-hand column, paragraph 2 -----	1-25
A	Ruchira Singh ET AL: "Retinal Cell Biology Functional Analysis of Serially Expanded Human iPS Cell- Derived RPE Cultures", 1 October 2013 (2013-10-01), pages 6767-6778, XP055188833, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2202986">http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2202986</a> [retrieved on 2015-05-12] page 6771, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 3 -----	1-25
X,P	WO 2015/175504 A1 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]) 19 November 2015 (2015-11-19) claims 1, 18; figure 10C -----	1-25
	-/-	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No PCT/IL2015/051270
---

**C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2015/087231 A1 (PFIZER LTD [GB]) 18 June 2015 (2015-06-18) example 3.1 page 11, line 19 - line 27 -----	1-25

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/IL2015/051270

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013196369 A1	01-08-2013	NONE	
WO 2015175504 A1	19-11-2015	NONE	
WO 2015087231 A1	18-06-2015	TW 201538726 A WO 2015087231 A1	16-10-2015 18-06-2015

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>G 01 N 33/15 (2006.01)</b>	<b>G 01 N 33/15</b>	<b>Z</b>

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74) 代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光  
 (74) 代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
 (74) 代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦  
 (74) 代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀  
 (74) 代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人  
 (74) 代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘  
 (74) 代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥  
 (72) 発明者 ボハナ - カシュタン オスナット  
イスラエル国 4060000 テル - モンド ハアルガマン ストリート 47 ピー.オーエ.  
ボックス 7290  
 (72) 発明者 ローゼンベルグ ベルメイカー リオル アン  
イスラエル国 6081457 ショハム アドュラム ストリート 59  
 (72) 発明者 ウィセル オフェル  
イスラエル国 9371422 エルサレム イエフダ ブルラ ストリート 22 アパートメント 25

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA40 BB24 CB01 DA36 FA37 FB03  
4B063 QA18 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS07 QS33 QS36 QS39 QX01  
4B065 AA91X AA93X AC14 AC20 BA25 BB34 BB40 CA44 CA46