

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成24年11月15日 (2012.11.15)

【公表番号】特表2011-500024(P2011-500024A)

【公表日】平成23年1月6日 (2011.1.6)

【年通号数】公開・登録公報2011-001

【出願番号】特願2010-528899(P2010-528899)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/0793 (2010.01)

A 6 1 K 35/44 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/16 (2006.01)

A 6 1 P 27/06 (2006.01)

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 K 35/48 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 2 0 2 S

A 6 1 K 35/44

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 25/16

A 6 1 P 27/06

A 6 1 P 27/02

A 6 1 K 35/48

【手続補正書】

【提出日】平成23年10月3日 (2011.10.3)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 7】

本発明は、上述もしくは下述の態様および実施形態の任意の組み合わせを意図している。例えば、分化した R P E 細胞および成熟 R P E 細胞の任意の組み合わせを含む R P E 細胞の製剤は、本明細書で説明される疾患および状態のうちのいずれかの治療で使用する事ができる。同様に、出発材料としてヒト胚幹細胞を使用した、R P E 細胞を生成するための本明細書で説明される方法は、出発材料として任意のヒト多能性幹細胞を使用して同様に実行され得る。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目 1)

実質的に精製した網膜色素上皮 (R P E) 細胞の培養物を生成する方法であって、

a) ヒト胚幹細胞を提供する工程と、

b) 富栄養性で低タンパク質の培地内で、胚様体として前記ヒト性幹細胞を培養する工程と、

c) 富栄養性で低タンパク質の培地内で、付着培養物として前記胚様体を培養する工程と、

d) 培地が無血清の B - 2 7 サプリメントを含有しない、富栄養性で低タンパク質の培

地内で、前記（c）の細胞の付着培養物を培養する工程と、

e）高密度体細胞培養物の成長を支持することができ、それによってR P E細胞が前記細胞の培養物内に現れる培地内で、前記（d）の細胞を培養する工程と、

f）前記（e）の培養物と酵素とを接触させる工程と、

g）前記培養物から前記R P E細胞を選択して、前記R P E細胞を、成長因子を補充した培地を含有する別個の培養物に移入して、R P E細胞の富化培養物を生成する工程と、

h）前記R P E細胞の富化培養物を繁殖させて、実質的に精製したR P E細胞の培養物を生成する工程と、

を含む、方法。

（項目2）

前記R P E細胞は、成熟R P E細胞の培養物を生成するようにさらに培養される、項目1に記載の方法。

（項目3）

前記（b）および／または（c）の培地は、無血清のB - 27サプリメントを含有する、項目1または2に記載の方法。

（項目4）

前記細胞は、V P - S F M、E G M - 2、およびM D B K - M Mから成る群より選択される培地内で培養される、項目2に記載の方法。

（項目5）

前記（g）の成長因子は、E G F、b F G F、V E G F、および組み換え型のインスリン様成長因子から成る群より選択される、項目2に記載の方法。

（項目6）

前記培地は、ヘパリン、ヒドロコルチゾン、もしくはアスコルビン酸のうちの1つ以上を含有する、項目2に記載の方法。

（項目7）

前記（b）の細胞は、7～14日間培養される、項目1～6のうちのいずれか1項に記載の方法。

（項目8）

前記（c）の細胞は、7日間培養される、項目1～7のうちのいずれか1項に記載の方法。

（項目9）

前記（d）の細胞は、7～10日間培養される、項目1～8のうちのいずれか1項に記載の方法。

（項目10）

前記（e）の細胞は、14～21日間培養される、項目1～9のうちのいずれか1項に記載の方法。

（項目11）

前記（b）の培地は、M D B K - G M、O p t i P r o S F M、およびV P S F Mから成る群より選択される、項目1～10のうちのいずれか1項に記載の方法。

（項目12）

前記（c）の培地は、M D B K - G M、O p t i P r o S F M、およびV P S F Mから成る群より選択される、項目1～11のうちのいずれか1項に記載の方法。

（項目13）

前記（d）の培地は、M D B K - G M、O p t i P r o S F M、およびV P S F Mから成る群より選択される、項目1～12のうちのいずれか1項に記載の方法。

（項目14）

前記（e）の培地は、M D B K - M M、O p t i P r o S F M、およびV P S F Mから成る群より選択される、項目1～13のうちのいずれか1項に記載の方法。

（項目15）

前記（g）の培地は、E G M - 2およびM D B K - M Mから成る群より選択される、項目

1 ～ 1 4 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6)

前記 (g) の成長因子は、E G F、b F G F、V E G F、および組み換え型のインスリン様成長因子から成る群より選択される、項目 1 ～ 1 5 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 7)

前記 (g) の培地は、ヘパリン、ヒドロコルチゾン、もしくはアスコルビン酸のうちの 1 つ以上を含有する、項目 1 ～ 1 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 8)

前記 (f) の酵素は、トリプシン、コラゲナーゼ、およびディスパーゼから成る群より選択される、項目 1 ～ 1 7 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 9)

前記 h E S 細胞は、複雑さを低減した H L A 抗原を有する、項目 1 ～ 1 8 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 0)

前記方法は、適正製造基準 (G M P) に従って実施される、項目 1 ～ 1 9 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 1)

成熟網膜色素上皮 (R P E) 細胞を生成する方法であって、

a) ヒト胚幹細胞を提供する工程と、

b) 富栄養性で低タンパク質の培地内で、胚様体として前記ヒト胚幹細胞を培養する工程と、

c) 富栄養性で低タンパク質の培地内で、付着培養物として前記ヒト胚幹細胞を培養する工程と、

d) 培地が無血清の B - 2 7 サプリメントを含有しない、富栄養性で低タンパク質の培地内で、前記工程 (c) の細胞の付着培養物を培養する工程と、

e) 高密度体細胞培養物の成長を支持することができ、それによって R P E 細胞が前記細胞の培養物内に現れる培地内で、前記 (d) の細胞を培養する工程と、

f) 前記 (e) の培養物と酵素とを接触させる工程と、

g) 前記 R P E 細胞を選択して、前記 R P E 細胞を、成長因子を補充した培地を含有する別個の培養物に移入して、R P E 細胞の富化培養物を生成する工程と、

h) 前記 R P E 細胞の富化培養物を繁殖させる工程と、

i) 前記 R P E 細胞の富化培養物を培養して、成熟網膜色素上皮細胞を生成して、成熟 R P E 細胞を生成する工程と、

を含む、方法。

(項目 2 2)

前記 (b) および / または (c) の培地は、無血清の B - 2 7 サプリメントを含有する、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記 (b) の細胞は、7 ～ 1 4 日間培養される、項目 2 1 もしくは 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記 (c) の細胞は、7 日間培養される、項目 2 1 ～ 2 3 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 5)

前記 (d) の細胞は、7 ～ 1 0 日間培養される、項目 2 1 ～ 2 4 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 6)

前記 (e) の細胞は、(e) 1 4 ～ 2 1 日間培養される、項目 2 1 ～ 2 5 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 7)

前記 (b) の培地は、M D B K - G M、O p t i P r o S F M、および V P S F M から成る群より選択される、項目 2 1 ~ 2 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 8)

前記 (c) の培地は、M D B K - G M、O p t i P r o S F M、および V P S F M から成る群より選択される、項目 2 1 ~ 2 7 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 9)

前記 (d) の培地は、M D B K - G M、O p t i P r o S F M、および V P S F M から成る群より選択される、項目 2 1 ~ 2 8 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 0)

前記 (e) の培地は、M D B K - M M、O p t i P r o S F M、および V P S F M から成る群より選択される、項目 2 1 ~ 2 9 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 1)

前記 (g) の培地は、E G M - 2 および M D B K - M M から成る群より選択される、項目 2 1 ~ 3 0 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 2)

前記 (g) の成長因子は、E G F、b F G F、V E G F、および組み換え型のインスリン様成長因子から成る群より選択される、項目 2 1 ~ 3 1 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 3)

前記 (i) の細胞は、V P - S F M、E G M - 2、および M D B K - M M から成る群より選択される培地内で培養される、項目 2 1 ~ 3 2 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 4)

前記 (g) もしくは (i) の培地は、ヘパリン、ヒドロコルチゾン、もしくはアスコルビン酸のうちの 1 つ以上を含有する、項目 2 1 ~ 3 3 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 5)

前記 (f) の酵素は、トリプシン、コラゲナーゼ、およびディスパーゼから成る群より選択される、項目 2 1 ~ 3 4 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 6)

前記 h E S 細胞は、複雑さを低減した H L A 抗原を有する、項目 2 1 ~ 3 5 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 7)

前記方法は、適正製造基準 (G M P) に従って実行される、項目 2 1 ~ 3 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 8)

網膜変性の特徴とする状態を治療もしくは予防する方法であって、R P E 細胞を含む有効量の製剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、R P E 細胞が、項目 1 ~ 3 7 もしくは 5 3 ~ 7 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法による、ヒト多能性幹細胞に由来する、方法。

(項目 3 9)

前記状態は、スタルガルト黄斑ジストロフィ、加齢性黄斑変性症、もしくは網膜色素変性症から成る群より選択される、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記製剤は、懸濁液、マトリクス、もしくは基質内に移植される、項目 3 8 もしくは 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記製剤は、注射によって眼の網膜下腔内に投与される、項目 3 8 ~ 4 0 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 2)

約 10^4 ~ 約 10^6 個の R P E 細胞が前記対象に投与される、項目 3 8 ~ 4 1 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 3)

対象における網膜電図応答、視運動視力閾値、もしくは輝度閾値を測定することによって、治療もしくは予防の有効性を監視する工程をさらに含む、項目 3 8 ~ 4 2 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 4)

有効量の R P E 細胞を含む、網膜変性を特徴とする状態を治療もしくは予防するための医薬製剤であって、R P E 細胞が、項目 1 ~ 3 7 もしくは 5 3 ~ 7 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法による、ヒト多能性幹細胞に由来する、医薬製剤。

(項目 4 5)

前記状態は、スタルガルト黄斑ジストロフィ、加齢性黄斑変性症、もしくは網膜色素変性症から成る群より選択される、項目 4 4 に記載の製剤。

(項目 4 6)

組成物は、眼の網膜下腔への投与のために製剤化される、項目 4 4 もしくは 4 5 に記載の製剤。

(項目 4 7)

前記組成物は、懸濁液、マトリクス、もしくは基質の形態である、項目 4 4 ~ 4 6 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 4 8)

前記組成物は、少なくとも 10^4 個の R P E 細胞を含む、項目 4 4 ~ 4 7 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 4 9)

前記組成物は、少なくとも 10^5 個の R P E 細胞を含む、項目 4 4 ~ 4 8 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 5 0)

前記組成物は、少なくとも 10^6 個の R P E 細胞を含む、項目 4 4 ~ 4 9 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 5 1)

前記 R P E 細胞は、成熟 R P E 細胞を含む、項目 4 4 ~ 5 0 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 5 2)

前記 R P E 細胞は、本質的に成熟 R P E 細胞で構成される、項目 4 4 ~ 5 1 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 5 3)

実質的に精製した網膜色素上皮細胞 (R P E) の培養物を生成する方法であって、

a) ヒト多能性幹細胞を提供する工程と、

b) 富栄養性で低タンパク質の培地内で、前記ヒト多能性幹細胞を培養する工程と、

c) 富栄養性で低タンパク質の培地内で、付着培養物として前記ヒト多能性幹細胞を培養する工程と、

d) 培地が無血清の B - 2 7 サプリメントを含有しない、富栄養性で低タンパク質の培地内で、前記 (c) の細胞の付着培養物を培養する工程と、

e) 高密度体細胞培養物の成長を支持することができ、それによって R P E 細胞が前記細胞の培養物内に現れる培地内で、前記 (d) の細胞を培養する工程と、

f) 前記 (e) の培養物と酵素とを接触させる工程と、

g) 前記培養物から前記 R P E 細胞を選択して、前記 R P E 細胞を、成長因子を補充した培地を含有する別個の培養物に移入して、R P E 細胞の富化培養物を生成する工程と、

h) 前記 R P E 細胞の富化培養物を繁殖させて、実質的に精製した R P E 細胞の培養物を生成する工程と、

を含む、方法。

(項目 5 4)

前記 R P E 細胞は、成熟 R P E 細胞の培養物を生成するようにさらに培養される、項目 5

3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記ヒト多能性幹細胞は、人工多能性幹 (i P S) 細胞である、項目 5 3 もしくは 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

工程 (b) において、前記ヒト多能性幹細胞が、凝集物として培養される、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記ヒト多能性幹細胞は、ヒト胚幹細胞である、項目 5 3 ~ 5 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 8)

工程 (b) において、前記ヒト胚幹細胞が、胚様体として培養される、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記 (b) および / または (c) の培地は、無血清の B - 2 7 サプリメントを含有する、項目 5 3 ~ 5 8 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 0)

前記細胞は、V P - S F M、E G M - 2、および M D B K - M M から成る群より選択される培地内で培養される、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記 (g) の成長因子は、E G F、b F G F、V E G F、および組み換え型のインスリン様成長因子から成る群より選択される、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記培地は、ヘパリン、ヒドロコルチゾン、もしくはアスコルビン酸のうちの 1 つ以上を含有する、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記 (b) の細胞は、7 ~ 1 4 日間培養される、項目 5 3 ~ 6 2 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 4)

前記 (c) の細胞は、7 日間培養される、項目 5 3 ~ 6 3 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 5)

前記 (d) の細胞は、7 ~ 1 0 日間培養される、項目 5 3 ~ 6 4 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 6)

前記 (e) の細胞は、1 4 ~ 2 1 日間培養される、項目 5 3 ~ 6 5 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 7)

前記 (b) の培地は、M D B K - G M、O p t i P r o S F M、および V P S F M から成る群より選択される、項目 5 3 ~ 6 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 8)

前記 (c) の培地は、M D B K - G M、O p t i P r o S F M、および V P S F M から成る群より選択される、項目 5 3 ~ 6 7 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 9)

前記 (d) の培地は、M D B K - G M、O p t i P r o S F M、および V P S F M から成る群より選択される、項目 5 3 ~ 6 8 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 0)

前記 (e) の培地は、M D B K - M M、O p t i P r o S F M、および V P S F M から成る群より選択される、項目 5 3 ~ 6 9 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 1)

前記 (g) の培地は、E G M - 2 および M D B K - M M から成る群より選択される、項目 5 3 ~ 7 0 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 2)

前記 (g) の成長因子は、E G F、b F G F、V E G F、および組み換え型のインスリン様成長因子から成る群より選択される、項目 5 3 ~ 7 1 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 3)

前記 (g) の培地は、ヘパリン、ヒドロコルチゾン、もしくはアスコルビン酸のうちの 1 つ以上を含有する、項目 5 3 ~ 7 2 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 4)

前記 (f) の酵素は、トリプシン、コラゲナーゼ、およびディスパーゼから成る群より選択される、項目 5 3 ~ 7 3 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 5)

前記多能性細胞は、複雑さを低減した H L A 抗原を有する、項目 5 3 ~ 7 4 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 6)

前記方法は、適正製造基準 (G M P) に従って実行される、項目 5 3 ~ 7 5 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 7)

網膜変性を特徴とする状態を治療もしくは予防する方法であって、R P E 細胞を含む有効量の製剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、R P E 細胞が、ヒト人工多能性幹 (i P S) 細胞に由来する、方法。

(項目 7 8)

前記状態は、スタルガルト黄斑ジストロフィ、加齢性黄斑変性症、もしくは網膜色素変性症から成る群より選択される、項目 7 7 に記載の方法。

(項目 7 9)

前記製剤は、懸濁液、マトリクス、もしくは基質内に移植される、項目 7 7 もしくは 7 8 に記載の方法。

(項目 8 0)

前記製剤は、注射によって前記眼の前記網膜下腔内に投与される、項目 7 7 ~ 7 9 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8 1)

約 10^4 ~ 約 10^6 個の R P E 細胞が前記対象に投与される、項目 7 7 ~ 8 0 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8 2)

対象における網膜電図応答、視運動視力閾値、もしくは輝度閾値を測定することによって、治療もしくは予防の有効性を監視する工程をさらに含む、項目 7 7 ~ 8 1 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8 3)

有効量の R P E 細胞を含む、網膜変性を特徴とする状態を治療もしくは予防するための医薬製剤であって、R P E 細胞が、ヒト人工多能性幹 (i P S) 細胞に由来する、医薬製剤。

(項目 8 4)

前記状態は、スタルガルト黄斑ジストロフィ、加齢性黄斑変性症、もしくは網膜色素変性症から成る群より選択される、項目 8 3 に記載の製剤。

(項目 8 5)

前記組成物は、眼の網膜下腔への投与のために製剤化される、項目 8 3 もしくは 8 4 に記載の製剤。

(項目 8 6)

前記組成物は、懸濁液、マトリクス、もしくは基質の形態である、項目 8 3 ~ 8 5 のうち

のいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 8 7)

前記組成物は、少なくとも 10^4 個の R P E 細胞を含む、項目 8 3 ~ 8 6 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 8 8)

前記組成物は、少なくとも 10^5 個の R P E 細胞を含む、項目 8 3 ~ 8 7 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 8 9)

前記組成物は、少なくとも 10^6 個の R P E 細胞を含む、項目 8 3 ~ 8 8 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 9 0)

前記 R P E 細胞は、成熟 R P E 細胞を含む、項目 8 3 ~ 8 9 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 9 1)

前記 R P E 細胞は、本質的に成熟 R P E 細胞で構成される、項目 8 3 ~ 9 0 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 9 2)

実質的に精製したヒト R P E 細胞の製剤であって、前記 R P E 細胞が、R P E - 6 5、ベストロフィン、P E D F、C R A L B P、O t x 2、および M i t - F のうちの 1 つ以上を発現する、製剤。

(項目 9 3)

前記製剤は、少なくとも 7 5 % の R P E 細胞を含む、項目 9 2 に記載の製剤。

(項目 9 4)

前記 R P E 細胞は、少なくとも 3 0 % の成熟 R P E 細胞を含む、項目 9 2 に記載の製剤。

(項目 9 5)

前記 R P E 細胞は、R P E - 6 5、ベストロフィン、P E D F、C R A L B P、O t x 2、および M i t - F のうちの 2 つ以上を発現する、項目 9 2 ~ 9 4 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 9 6)

前記 R P E 細胞は、R P E - 6 5、ベストロフィン、P E D F、C R A L B P、O t x 2、および M i t - F のうちの 3 つ以上を発現する、項目 9 5 に記載の製剤。

(項目 9 7)

前記 R P E 細胞は、R P E - 6 5、ベストロフィン、P E D F、C R A L B P、O t x 2、および M i t - F のうちの 4 つ以上を発現する、項目 9 6 に記載の製剤。

(項目 9 8)

前記 R P E 細胞は、R P E - 6 5、ベストロフィン、P E D F、C R A L B P、O t x 2、および M i t - F のうちの 5 つ以上を発現する、項目 9 7 に記載の製剤。

(項目 9 9)

前記 R P E 細胞は、R P E - 6 5、ベストロフィン、P E D F、C R A L B P、O t x 2、および M i t - F を発現する、項目 9 8 に記載の製剤。

(項目 1 0 0)

前記 R P E 細胞は、E S 細胞遺伝子 O c t - 4、n a n o g、および / または R e x - 1 の実質的な発現が不足する、項目 9 2 ~ 9 9 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 1 0 1)

前記発現は、m R N A 発現である、項目 9 2 ~ 1 0 0 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 1 0 2)

前記発現は、タンパク質発現である、項目 9 2 ~ 1 0 0 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 1 0 3)

前記発現は、mRNAおよびタンパク質発現の両方を含む、項目92～100のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目104)

前記RPE細胞は、pax-2、pax-6、チロシナーゼのうちの1つ以上を発現する、項目92～100のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目105)

前記製剤は、成熟RPE細胞を含み、前記成熟RPE細胞は、pax-2、pax-6、およびチロシナーゼを発現する、項目92～100のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目106)

前記RPE細胞は、表2に列記される遺伝子のうちの1つ以上を発現し、ヒトES細胞での発現と比較して、前記RPE細胞で前記1つ以上の遺伝子の発現が増加する、項目92～105のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目107)

前記RPE細胞は、表3に列記される遺伝子のうちの1つ以上を発現し、ヒトES細胞での発現と比較して、前記RPE細胞で前記1つ以上の遺伝子の発現が減少する、項目92～106のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目108)

前記製剤は、少なくとも 1×10^5 個のRPE細胞を含む、項目92～107のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目109)

前記製剤は、少なくとも 1×10^6 個のRPE細胞を含む、項目108に記載の製剤。

(項目110)

前記製剤は、ヒトES細胞から分化される、項目92～109のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目111)

前記製剤は、ヒト人工多能性幹細胞から分化される、項目92～109のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目112)

前記製剤は、項目1～37もしくは53～76のうちのいずれか1項に記載の方法を使用して、ヒト多能性幹細胞から分化される、項目92～109のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目113)

前記製剤は、実質的にウイルス、細菌、および/または菌類の汚染もしくは感染が無い、項目92～112のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目114)

前記製剤は、GMPに準拠する、項目92～113のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目115)

薬剤として許容される担体内で製剤化される、項目92～114のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目116)

前記眼への投与のために製剤化される、項目115に記載の製剤。

(項目117)

前記網膜下腔または角膜への投与のために製剤化される、項目116に記載の製剤。

(項目118)

前記RPE細胞は、移植の際に前記網膜内に組み込むことができる、機能RPE細胞である、項目92～117のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目119)

少なくとも 1×10^5 個のヒトRPE細胞を含む凍結保存製剤であって、前記製剤は、ヒト多能性幹細胞に由来する実質的に精製したヒトRPE細胞の製剤であり、前記RPE細胞は、RPE-65、ベストロフィン、PEDF、CRAFBP、Otx2、およびMi

t - Fを発現する、製剤。

(項目120)

前記ヒトRPE細胞は、ヒト胚幹細胞に由来する、項目119に記載の製剤。

(項目121)

前記ヒトRPE細胞は、人工多能性幹細胞に由来する、項目119に記載の製剤。

(項目122)

前記RPE細胞のうちの少なくとも65%は、解凍後も生存度を維持する、項目119～121のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目123)

治療を必要とする患者の状態を治療する薬物の製造における、項目92～118のうちのいずれか1項に記載の製剤の使用。

(項目124)

網膜変性の特徴とする状態を治療もしくは予防する方法であって、項目92～118のうちのいずれか1項に記載の有効量の製剤を、それを必要とする対象に投与する工程を含み、RPE細胞が、ヒト多能性幹細胞に由来する、方法。

(項目125)

前記状態は、スタルガルト黄斑ジストロフィ、加齢性黄斑変性症、もしくは網膜色素変性症から成る群より選択される、項目124に記載の方法。

(項目126)

前記製剤は、懸濁液、マトリクス、もしくは基質内に移植される、項目124もしくは125に記載の方法。

(項目127)

前記製剤は、注射によって前記眼の前記網膜下腔内に投与される、項目124～126のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目128)

約 10^4 ～約 10^6 個のRPE細胞が前記対象に投与される、項目124～127のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目129)

対象における網膜電図応答、視運動視力閾値、もしくは輝度閾値を測定することによって、治療もしくは予防の有効性を監視する工程をさらに含む、項目124～128のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目130)

ヒト多能性幹細胞から分化される実質的に精製したヒトRPE細胞の製剤であって、前記RPE細胞は、mRNAおよびタンパク質レベルにおいて、RPE-65、ベストロフィン、PEDF、CRA LB P、Otx2を発現し、前記細胞は、Oct-4、nanog、およびRex-1の実質的な発現が不足する、製剤。

(項目131)

前記RPE細胞は、分化したRPE細胞と成熟分化したRPE細胞とを含み、少なくとも前記分化したRPE細胞は、mRNAおよびタンパク質レベルにおいて、pax-2、pax-6、チロシナーゼをさらに発現する、項目130に記載の製剤。

(項目132)

前記RPE細胞は、ヒト胚幹細胞から分化される、項目130もしくは131に記載の製剤。

(項目133)

前記RPE細胞は、ヒト人工多能性幹細胞から分化される、項目130もしくは131に記載の製剤。

(項目134)

前記RPE細胞は、分化したRPE細胞と成熟分化したRPE細胞とを含み、少なくとも前記分化したRPE細胞は、mRNAおよびタンパク質レベルにおいて、pax-2、pax-6、チロシナーゼをさらに発現する、項目130～133のうちのいずれか1項に

記載の製剤。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 富栄養性で低タンパク質の培地内で、ヒト多能性細胞を培養して、胚様体を形成する工程と、

b) 富栄養性で低タンパク質の培地内で、付着培養物として前記胚様体を培養する工程と、

c) 高密度体細胞培養物の成長を支持することができ、それによって R P E 細胞が前記細胞の培養物内に現れる培地内で、工程 (b) の細胞を培養する工程と、

d) 工程 (c) の培養物から P R E 細胞を選択する工程と、

e) P R E 前駆細胞の増殖を促進する一つ以上の因子を含む培地内で、工程 (d) で選択された前記 P R E 細胞を培養する工程と、

f) P R E 細胞の形成を促進する培地内で、工程 (e) の培養物を培養して、それにより P R E 細胞を含む培養物を生成する工程と、

を含む、方法。

【請求項 2】

工程 (f) の R P E 細胞を培養して、成熟 R P E 細胞の培養物を生成する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 (a) の培地は、無血清の B - 2 7 サプリメントを含有し、工程 (b) の培地は、無血清の B - 2 7 サプリメントを含有しない、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 (c) の培養培地は、低タンパク質の培地または無タンパク質の培地である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (e) の因子は、E G F、b F G F、V E G F、インスリン様成長因子、ヘパリン、ヒドロコルチゾン、およびアスコルビン酸から成る群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (c) の細胞は、1 4 日間以上培養される、請求項 1 ~ 5 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

工程 (d) が、工程 (c) の培養物を、P R E 細胞を前記付着培養物から剥離させる酵素と接触させる工程、および剥離された色素細胞または色素細胞を含む剥離された細胞クラスターを選択する工程を含む、請求項 1 ~ 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記酵素は、コラゲナーゼ I V、およびディスパーゼから成る群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ヒト多能性幹細胞は、人工多能性幹 (i P S) 細胞および胚性幹細胞からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 (d) が、色素細胞を含む前記選択された細胞クラスターを解離させて、それにより P R E 細胞を含む単一の細胞懸濁物を形成する工程をさらに含む、請求項 8 に記載の方法

°

【請求項 1 1】

工程 (a)、(b)、(c)、(e) および (f) のうちの一つ以上における培地が、ア
クチビン A を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

網膜変性の特徴とする状態を治療もしくは予防するための組成物であって、R P E 細胞を
含む有効量の製剤を含み、前記 R P E 細胞が、請求項 1 ~ 9 のうちのいずれか 1 項に記載
の方法による、ヒト多能性細胞に由来する、組成物。

【請求項 1 3】

前記状態は、スタルガルト黄斑ジストロフィ、加齢性黄斑変性症、もしくは網膜色素変性
症から成る群より選択される、請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 9 のうちのいずれか 1 項に記載の方法による、ヒト多能性細胞に由来するヒト
P R E 細胞を含む、組成物。

【請求項 1 5】

前記製剤中の P R E 細胞が、R P E - 6 5、ベストロフィン、P E D F、C R A L B P、
O t x 2、M i t - F、p a x - 2、p a x - 6、およびチロシナーゼからなる群から選
択される一つ以上のマーカーを発現し、該 P R E 細胞は、O c t - 4、n a n o g、およ
び R e x - 1 からなる群から選択される一つ以上の E S 細胞遺伝子の実質的な発現が不足
する、請求項 1 4 に記載の組成物。