

【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RPE細胞および成熟RPE細胞の任意の組み合わせを含むRPE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ことができる。同様に、出発材料としてヒト胚幹細胞を使用した、RPE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(RPE)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-27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RPE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RPE細胞を選択して、前記RPE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、RPE細胞の富化培養物を生成する工程と、

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

を含む、方法。

(項目2)

前記RPE細胞は、成熟RPE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、VP-SFM、EGM-2、およびMDBK-MM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、EGF、bFGF、VEGF、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、MDBK-GM、OptiPro SFM、およびVP-SFM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、MDBK-GM、OptiPro SFM、およびVP-SFM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、MDBK-GM、OptiPro SFM、およびVP-SFM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、MDBK-MM、OptiPro SFM、およびVP-SFM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、EGM-2およびMDBK-MMから成る群より選択される、項目

1～14のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目16)

前記(g)の成長因子は、EGF、bFGF、VEGF、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1～15のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目17)

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1～16のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目18)

前記(f)の酵素は、トリプシン、コラゲナーゼ、およびディスパーーゼから成る群より選択される、項目1～17のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目19)

前記hES細胞は、複雑さを低減したHLA抗原を有する、項目1～18のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目20)

前記方法は、適正製造基準(GMP)に従って実施される、項目1～19のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目21)

成熟網膜色素上皮(RPE)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-27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RPE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RPE細胞を選択して、前記RPE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、RPE細胞の富化培養物を生成する工程と、

h)前記RPE細胞の富化培養物を繁殖させる工程と、

i)前記RPE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RPE細胞を生成する工程と、

を含む、方法。

(項目22)

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21に記載の方法。

(項目23)

前記(b)の細胞は、7～14日間培養される、項目21もしくは22に記載の方法。

(項目24)

前記(c)の細胞は、7日間培養される、項目21～23のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目25)

前記(d)の細胞は、7～10日間培養される、項目21～24のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目26)

前記(e)の細胞は、(e)14～21日間培養される、項目21～25のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目27)

前記(b)の培地は、M D B K - G M、Opt i Pro 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21～26のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目28)

前記(c)の培地は、M D B K - G M、Opt i Pro 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21～27のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目29)

前記(d)の培地は、M D B K - G M、Opt i Pro 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21～28のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目30)

前記(e)の培地は、M D B K - M M、Opt i Pro 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21～29のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目31)

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21～30のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目32)

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21～31のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目33)

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21～32のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目34)

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21～33のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目35)

前記(f)の酵素は、トリプシン、コラゲナーゼ、およびディスパーーゼから成る群より選択される、項目21～34のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目36)

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21～35のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目37)

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21～36のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目38)

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、項目1～37もしくは53～76のうちのいずれか1項に記載の方法による、ヒト多能性幹細胞に由来する、方法。

(項目39)

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38に記載の方法。

(項目40)

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38もしくは39に記載の方法。

(項目41)

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38～40のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目42)

約10⁴～約10⁶個のR P E 細胞が前記対象に投与される、項目38～41のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目43)

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38～42のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目44)

有効量のRPE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、RPE細胞が、項目1～37もしくは53～76のうちのいずれか1項に記載の方法による、ヒト多能性幹細胞に由来する、医薬製剤。

(項目45)

前記状態は、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44に記載の製剤。

(項目46)

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44もしくは45に記載の製剤。

(項目47)

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44～46のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目48)

前記組成物は、少なくとも 10^4 個のRPE細胞を含む、項目44～47のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目49)

前記組成物は、少なくとも 10^5 個のRPE細胞を含む、項目44～48のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目50)

前記組成物は、少なくとも 10^6 個のRPE細胞を含む、項目44～49のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目51)

前記RPE細胞は、成熟RPE細胞を含む、項目44～50のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目52)

前記RPE細胞は、本質的に成熟RPE細胞で構成される、項目44～51のうちのいずれか1項に記載の製剤。

(項目53)

実質的に精製した網膜色素上皮細胞(RPE)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-27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) 高密度細胞培養物の成長を支持することができ、それによってRPE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RPE細胞を選択して、前記RPE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、RPE細胞の富化培養物を生成する工程と、
 - h) 前記RPE細胞の富化培養物を繁殖させて、実質的に精製したRPE細胞の培養物を生成する工程と、
- を含む、方法。

(項目54)

前記RPE細胞は、成熟RPE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55)

前記ヒト多能性幹細胞は、人工多能性幹(iPS)細胞である、項目53もしくは54に記載の方法。

(項目56)

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55に記載の方法。

(項目57)

前記ヒト多能性幹細胞は、ヒト胚幹細胞である、項目53～56のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目58)

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57に記載の方法。

(項目59)

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53～58のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目60)

前記細胞は、V р - SFM、EGM-2、およびMDBK-MMから成る群より選択される培地内で培養される、項目54に記載の方法。

(項目61)

前記(g)の成長因子は、EGF、bFGF、VEGF、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54に記載の方法。

(項目62)

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54に記載の方法。

(項目63)

前記(b)の細胞は、7～14日間培養される、項目53～62のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目64)

前記(c)の細胞は、7日間培養される、項目53～63のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目65)

前記(d)の細胞は、7～10日間培養される、項目53～64のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目66)

前記(e)の細胞は、14～21日間培養される、項目53～65のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目67)

前記(b)の培地は、MDBK-GM、OptiPro-SFM、およびV р SFMから成る群より選択される、項目53～66のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目68)

前記(c)の培地は、MDBK-GM、OptiPro-SFM、およびV р SFMから成る群より選択される、項目53～67のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目69)

前記(d)の培地は、MDBK-GM、OptiPro-SFM、およびV р SFMから成る群より選択される、項目53～68のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目70)

前記(e)の培地は、MDBK-MM、OptiPro-SFM、およびV р SFMから成る群より選択される、項目53～69のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目71)

前記(g)の培地は、EGM-2およびMDBK-MMから成る群より選択される、項目53～70のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目72)

前記(g)の成長因子は、EGF、bFGF、VEGF、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53～71のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目73)

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53～72のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目74)

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53～73のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目75)

前記多能性細胞は、複雑さを低減したHLA抗原を有する、項目53～74のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目76)

前記方法は、適正製造基準(GMP)に従って実行される、項目53～75のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目77)

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、RPE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、RPE細胞が、ヒト人工多能性幹(iPS)細胞に由来する、方法。

(項目78)

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77に記載の方法。

(項目79)

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77もしくは78に記載の方法。

(項目80)

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77～79のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目81)

約 10^4 ～約 10^6 個のRPE細胞が前記対象に投与される、項目77～80のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目82)

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77～81のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目83)

有効量のRPE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、RPE細胞が、ヒト人工多能性幹(iPS)細胞に由来する、医薬製剤。

(項目84)

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83に記載の製剤。

(項目85)

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83もしくは84に記載の製剤。

(項目86)

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83～85のうち

のいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 87)

前記組成物は、少なくとも 10^4 個の RPE 細胞を含む、項目 83 ~ 86 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 88)

前記組成物は、少なくとも 10^5 個の RPE 細胞を含む、項目 83 ~ 87 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 89)

前記組成物は、少なくとも 10^6 個の RPE 細胞を含む、項目 83 ~ 88 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 90)

前記 RPE 細胞は、成熟 RPE 細胞を含む、項目 83 ~ 89 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 91)

前記 RPE 細胞は、本質的に成熟 RPE 細胞で構成される、項目 83 ~ 90 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 92)

実質的に精製したヒト RPE 細胞の製剤であって、前記 RPE 細胞が、RPE-65、ベストロフィン、PEDF、CRALBP、Octx2、およびMift-F のうちの 1 つ以上を発現する、製剤。

(項目 93)

前記製剤は、少なくとも 75 % の RPE 細胞を含む、項目 92 に記載の製剤。

(項目 94)

前記 RPE 細胞は、少なくとも 30 % の成熟 RPE 細胞を含む、項目 92 に記載の製剤。

(項目 95)

前記 RPE 細胞は、RPE-65、ベストロフィン、PEDF、CRALBP、Octx2、およびMift-F のうちの 2 つ以上を発現する、項目 92 ~ 94 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 96)

前記 RPE 細胞は、RPE-65、ベストロフィン、PEDF、CRALBP、Octx2、およびMift-F のうちの 3 つ以上を発現する、項目 95 に記載の製剤。

(項目 97)

前記 RPE 細胞は、RPE-65、ベストロフィン、PEDF、CRALBP、Octx2、およびMift-F のうちの 4 つ以上を発現する、項目 96 に記載の製剤。

(項目 98)

前記 RPE 細胞は、RPE-65、ベストロフィン、PEDF、CRALBP、Octx2、およびMift-F のうちの 5 つ以上を発現する、項目 97 に記載の製剤。

(項目 99)

前記 RPE 細胞は、RPE-65、ベストロフィン、PEDF、CRALBP、Octx2、およびMift-F を発現する、項目 98 に記載の製剤。

(項目 100)

前記 RPE 細胞は、ES 細胞遺伝子 Oct-4、nanog、および / または Rex-1 の実質的な発現が不足する、項目 92 ~ 99 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 101)

前記発見は、mRNA 発見である、項目 92 ~ 100 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

。

(項目 102)

前記発見は、タンパク質発見である、項目 92 ~ 100 のうちのいずれか 1 項に記載の製剤。

(項目 103)

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、CRALBP、Octx2、およびMi

t - F を発現する、製剤。

(項目 120)

前記ヒト R P E 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 R P E 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 R P E 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、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、R P E 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 10⁴ ~ 約 10⁶ 個の R P E 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 R P E 細胞の製剤であって、前記 R P E 細胞は、m R N A およびタンパク質レベルにおいて、R P E - 65、ベストロフィン、P E D F、C R A L B P、O t x 2 を発現し、前記細胞は、O c t - 4、n a n o g およびR e x - 1 の実質的な発現が不足する、製剤。

(項目 131)

前記 R P E 細胞は、分化した R P E 細胞と成熟分化した R P E 細胞とを含み、少なくとも前記分化した R P E 細胞は、m R N A およびタンパク質レベルにおいて、p a x - 2、p a x - 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 R P E 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 R P E 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 R P E 細胞は、分化した R P E 細胞と成熟分化した R P E 細胞とを含み、少なくとも前記分化した R P E 細胞は、m R N A およびタンパク質レベルにおいて、p a x - 2、p a x - 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RPE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PREF細胞を選択する工程と、

e) PREF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PREF細胞を培養する工程と、

f) PREF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PREF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RPE細胞を培養して、成熟RPE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-27サブリメントを含有し、工程(b)の培地は、無血清のB-27サブ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、EGF、bFGF、VEGF、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、14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、PREF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IV、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(iPS)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PREF細胞を含む单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】

網膜変性を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、タルガルト黄斑ジストロフィー、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。