

【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30年1月25日(2018.1.25)

【公表番号】特表2017-504311(P2017-504311A)

【公表日】平成29年2月9日(2017.2.9)

【年通号数】公開・登録公報2017-006

【出願番号】特願2016-538000(P2016-538000)

【国際特許分類】

C 12 N 5/071 (2010.01)

A 61 K 35/545 (2015.01)

A 61 K 35/30 (2015.01)

A 61 P 27/02 (2006.01)

【F I】

C 12 N 5/071

A 61 K 35/545

A 61 K 35/30

A 61 P 27/02

【手続補正書】

【提出日】平成29年12月6日(2017.12.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 多能性細胞を第1のSMA-D阻害剤および第2のSMA-D阻害剤の存在下で培養するステップと、

(b) ステップ(a)の細胞を、BMP経路活性化剤の存在下ならびに第1および第2のSMA-D阻害剤の非存在下で培養するステップと、

(c) ステップ(b)の細胞を再播種するステップと
を含む、網膜色素上皮(RPE)細胞を生成する方法。

【請求項2】

ステップ(a)において、細胞を単層としてあるいは懸濁培養で培養する、ステップ(b)において、細胞を単層としてあるいは懸濁培養で培養する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

多能性細胞が胚性幹細胞または人工多能性幹細胞から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

第1のSMA-D阻害剤が、BMP1型受容体ALK2および/またはALK3の阻害剤、ドルソモルフィン誘導体、ノギン、コーディンおよび4-(6-(4-(ビペラジン-1-イル)フェニル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル)キノリン(LDN193189)、またはその塩もしくは水和物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5】

ステップ(a)において、第1のSMA-D阻害剤の濃度が0.5nM~10μMである、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

第2のSMA阻害剤が、

ALK5および/またはALK4および/またはALK7の阻害剤、
 4-(4-(ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)-5-(ピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-2-イル)ベンズアミド、
 2-メチル-5-(6-(m-トリル)-1H-イミダゾ[1,2-a]イミダゾール-5-イル)-2H-ベンゾ[d][1,2,3]トリアゾール、
 2-(6-メチルピリジン-2-イル)-N-(ピリジン-4-イル)キナゾリン-4-アミン、
 2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン、
 4-(2-(6-メチルピリジン-2-イル)-5,6-ジヒドロ-4H-ピロ口[1,2-b]ピラゾール-3-イル)フェノール、
 2-(4-メチル-1-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-5-イル)チエノ[3,2-c]ピリジン、
 4-(5-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-1-(2-ヒドロキシフェニル)-1H-ピラゾール-3-イル)ベンズアミド、
 2-(5-クロロ-2-フルオロフェニル)-N-(ピリジン-4-イル)ブテリジン-4-アミン、
 6-メチル-2-フェニルチエノ[2,3-d]ピリミジン-4(3H)-オン、
 3-(6-メチル-2-ピリジニル)-N-フェニル-4-(4-キノリニル)-1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド(A 83-01); 2-(5-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル-2-tert-ブチル-3H-イミダゾール-4-イル)-6-メチルピリジン(SB-505124)、
 7-(2-モルホリノエトキシ)-4-(2-(ピリジン-2-イル)-5,6-ジヒドロ-4H-ピロ口[1,2-b]ピラゾール-3-イル)キノリン(LY2109761)、
 4-[3-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル]-キノリン(LY364947)および
 4-(4-(ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)-5-(ピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-2-イル)ベンズアミド(SB-431542)
 またはその塩もしくは水和物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7】

ステップ(a)において、第2のSMA阻害剤の濃度が0.5nM~100μMである、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

ステップ(a)において、多能性細胞を少なくとも1、3、4、5、6、7、8、9または10日間培養する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

ステップ(a)の前に、細胞を単層として少なくとも細胞1000個/cm²の初期密度あるいは100000~50000個/cm²の初期密度で培養する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

BMP経路活性化剤がBMPを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

ステップ(b)において、BMP経路活性化剤の濃度が1ng/mL~10μg/mLである、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

ステップ(b)において、前記細胞を少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20日間培養する、請求項1に記載の方法。

【請求項 1 3】

ステップ(c)において、前記細胞を少なくとも細胞 1 0 0 0 個 / cm² の密度で再播種する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

ステップ(c)において、前記細胞を Matrigel (登録商標)、フィプロネクチン、または Cellstart (登録商標) 上に再播種する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

(d) ステップ(c)の再播種した細胞をアクチビン経路活性化剤の存在下で培養するステップと、

(e) ステップ(d)の細胞を再播種するステップと、

(f) ステップ(e)の再播種した細胞を培養するステップと
をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

ステップ(d)において、アクチビン経路活性化剤の濃度が 1 ng / mL ~ 10 µg / mL である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

ステップ(d)において、細胞を cAMP の存在下で培養する、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

ステップ(b)は、細胞を BMP 経路活性化剤の存在下で培養した後、細胞を少なくとも 10 日間、BMP 経路活性化剤の非存在下で培養することをさらに含み、

ステップ(c)は、敷石状の形態を有するステップ(b)の細胞を再播種することを含み、前記方法は、

(d) ステップ(c)の再播種した細胞を培養するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

以下の追加のステップ：

(e) ステップ(d)の細胞を再播種するステップと、

(f) ステップ(e)の再播種した細胞を培養するステップと
をさらに含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

ステップ(e)において、細胞を少なくとも細胞 1 0 0 0 個 / cm² の密度で再播種する、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

ステップ(f)において、細胞を少なくとも 10 日間培養する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

RPE 細胞を回収するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

RPE 細胞を精製するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

蛍光活性化細胞選別(FACS)または磁気活性化細胞選別(MACS)によって RPE 細胞を精製するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

- RPE 細胞を再播種することと、

- 再播種した RPE 細胞を培養することと

を含む方法によって RPE 細胞を拡大する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

細胞を細胞 1 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 個 / cm² の密度で再播種する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 27】

細胞を少なくとも 7 日間、少なくとも 14 日間、少なくとも 28 日間、または少なくとも 42 日間培養する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

(a) RPE 細胞を少なくとも細胞 1000 個 / cm² の密度で播種するステップと、
(b) 前記 RPE 細胞を、SMAD 阻害剤、cAMP、または cAMP の細胞内濃度を
増加させる薬剤の存在下で培養するステップと
を含む、RPE 細胞を拡大する方法。

【請求項 29】

RPE 細胞であって、
(a) 多能性細胞を第 1 の SMAD 阻害剤および第 2 の SMAD 阻害剤の存在下で培養
するステップと、
(b) ステップ (a) の細胞を、BMP 経路活性化剤の存在下ならびに第 1 および第 2
の SMAD 阻害剤の非存在下で培養するステップと、
(c) ステップ (b) の細胞を再播種するステップと
を含む、網膜色素上皮 (RPE) 細胞を生成する方法によって得られた、前記 RPE 細胞
。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の RPE 細胞を含む医薬組成物。

【請求項 31】

請求項 29 に記載の RPE 細胞または当該 RPE 細胞を含む医薬組成物を対象に投与す
ることを含む、前記対象において網膜疾患を処置する方法。

【請求項 32】

a) RPE 細胞および非 RPE 細胞を含む細胞集団を提供するステップと、
b) 細胞集団を、CD59 を発現する細胞について濃縮することによって、細胞集団中
の RPE 細胞のパーセンテージを増加させるステップと
を含む、RPE 細胞を精製する方法。

【請求項 33】

ステップ b) が、FACS または MACS を使用して、CD59 を発現する細胞につい
て濃縮する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

非 RPE 細胞が多能性細胞または RPE 前駆体である、請求項 33 に記載の方法。