

【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 1 2 N 5/071 (2010.01)

A 6 1 K 35/545 (2015.01)

A 6 1 K 35/30 (2015.01)

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/071

A 6 1 K 35/545

A 6 1 K 35/30

A 6 1 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 S M A D 阻害剤および第 2 の S M A 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、B M P 経路活性化剤の存在下ならびに第 1 および第 2 の S M A 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(R P E)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 S M A D 阻害剤が、B M P 1 型受容体 A L K 2 および / または A L K 3 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 - ( ピペラジン - 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 ( L D N 1 9 3 1 8 9 ) 、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 S M A D 阻害剤の濃度が 0 . 5 n M ~ 1 0 μ M である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

第 2 の S M A D 阻害剤が、

A L K 5 および / または A L K 4 および / または A L K 7 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 ) - 1 H - 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 ) - 1 H - イミダゾ [ 1 , 2 - a ] イミダゾール - 5 - イル ) - 2 H - 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 ) - 1 H - 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 - 4 H - ピロロ [ 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 ) - 1 H - 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 ) - 1 H - 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 ) プテリジン - 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 ( 3 H ) - 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 ) - 1 H - ピラゾール - 1 - カルボチオアミド ( A 8 3 - 0 1 ) ; 2 - ( 5 - ベンゾ [ 1 , 3 ] ジオキソール - 5 - イル - 2 - t e r t - ブチル - 3 H - イミダゾール - 4 - イル ) - 6 - メチルピリジン ( S B - 5 0 5 1 2 4 ) 、

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 - 4 H - ピロロ [ 1 , 2 - b ] ピラゾール - 3 - イル ) キノリン ( L Y 2 1 0 9 7 6 1 ) 、

4 - [ 3 - ( 2 - ピリジニル ) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル ] - キノリン ( L Y 3 6 4 9 4 7 ) 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 ) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル ) ベンズアミド ( S B - 4 3 1 5 4 2 )

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 S M A D 阻害剤の濃度が  $0.5 \text{ nM} \sim 100 \mu\text{M}$  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  $1000 \text{ 個} / \text{cm}^2$  の初期密度あるいは  $100000 \sim 500000 \text{ 個} / \text{cm}^2$  の初期密度で培養する、請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 10】

B M P 経路活性化剤が B M P 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、B M P 経路活性化剤の濃度が  $1 \text{ ng} / \text{mL} \sim 10 \mu\text{g} / \text{mL}$  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 13】

ステップ(c)において、前記細胞を少なくとも細胞1000個/cm<sup>2</sup>の密度で再播種する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 14】

ステップ(c)において、前記細胞をMatrigel(登録商標)、フィブロネクチン、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 15】

(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 16】

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15に記載の方法。

## 【請求項 17】

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15に記載の方法。

## 【請求項 18】

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 19】

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18に記載の方法。

## 【請求項 20】

ステップ(e)において、細胞を少なくとも細胞1000個/cm<sup>2</sup>の密度で再播種する、請求項19に記載の方法。

## 【請求項 21】

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20に記載の方法。

## 【請求項 22】

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 23】

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 24】

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 25】

- 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 26】

細胞を細胞1000 ~ 100000個/cm<sup>2</sup>の密度で再播種する、請求項25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/cm<sup>2</sup>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。