



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2209888 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/079 (2010.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.02.10
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2019.12.04
(86)	European Application Nr.	08839134.7
(86)	European Filing Date	2008.10.10
(87)	The European Application's Publication Date	2010.07.28
(30)	Priority	2007.10.12, US, 998668 P 2007.10.12, US, 998766 P 2008.01.02, US, 9908 P 2008.01.02, US, 9911 P
(84)	Designated Contracting States:	AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; SE ; SI ; SK ; TR
(73)	Proprietor	Astellas Institute for Regenerative Medicine, 33 Locke Drive, Marlborough, MA 01752, USA
(72)	Inventor	MALCUIT, Christopher, 48 Old Belchertown Road, Ware, MA 01082, USA LEMIEUX, Linda, 35 Kruse Road, Hubbardston, MA 01452, USA HOLMES, William, 355 May St., Worcester, MA 01602, USA HUERTAS, Pedro, 283 Simon Willard Road, Concord, MA 01742, USA VILNER, Lucy, 5 Carlisle Avenue, Johnston, RI 02919, USA
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	IMPROVED METHODS OF PRODUCING RPE CELLS AND COMPOSITIONS OF RPE CELLS
(56)	References Cited:	WO-A1-98/30679 US-A1- 2004 018 617 US-A1- 2007 031 386 WO-A2-2006/080952 LU BIN ET AL: "Embryonic Stem Cells/Induced Pluripotent Stem Cells Long-Term Safety and Function of RPE from Human Embryonic Stem Cells in Preclinical Models of Macular Degeneration", STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US, vol. 27, no. 9, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 2126-2135, XP002545384, ISSN: 1066-5099, DOI: DOI:10.1002/STEM.149 KLIMANSKAYA IRINA: "Retinal pigment epithelium", METHODS IN ENZYMOLOGY; [METHODS IN ENZYMOLOGY], ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, vol. 418, 1

January 2006 (2006-01-01), pages 169-194, XP009122575, ISSN: 0076-6879

LUND RAYMOND D ET AL: "Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats", CLONING AND STEM CELLS, MARY ANN LIEBERT, LARCHMONT, US, vol. 8, no. 3, 1 October 2006 (2006-10-01) , pages 189-199, XP002528361, ISSN: 1536-2302, DOI: DOI:10.1089/CLO.2006.8.189

CHUNG YOUNG ET AL: "Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction", CELL STEM CELL, ELSEVIER, CELL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 2, no. 2, 7 February 2008 (2008-02-07), pages 113-117, XP002604696, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/J.STEM.2007.12.013

TAKAHASHI K ET AL: "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 126, no. 4, 25 August 2006 (2006-08-25), pages 663-676, XP003013968, ISSN: 0092-8674, DOI: DOI:10.1016/J.CELL.2006.07.024

LU ET AL.: 'Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells' NATURE METHODS vol. 4, no. 6, June 2007, pages 501 - 509, XP008133153

BREWER G J ET AL: "OPTIMIZED SURVIVAL OF HIPPOCAMPAL NEURONS IN B27-SUPPLEMENTED NEUROBASAL, A NEW SERUM-FREE MEDIUM COMBINATION", JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, WILEY-LISS, US, vol. 35, no. 5, 1 August 1993 (1993-08-01) , pages 567-576, XP001097842, ISSN: 0360-4012, DOI: DOI:10.1002/JNR.490350513

HORI ET AL.: 'Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells' PNAS vol. 99, no. 25, 10 December 2002, pages 16105 - 16110, XP002392968

NIMET MAHERALI ET AL: "Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution", CELL STEM CELL, CELL PRESS, US, vol. 1, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 55-70, XP009091847, ISSN: 1934-5909, DOI: DOI:10.1016/J.STEM.2007.05.014

R E Ledesma ET AL: "PROTEINS OF BOVINE SERUM", Journal of Animal Sciences, 1 January 1968 (1968-01-01), pages 1368-1372, XP055116404, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.journalofanimalscience.org/content/27/5/1368.full.pdf> [retrieved on 2014-05-06]

IKEDA H ET AL: "Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES (PNAS), NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, US, vol. 102, no. 32, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 11331-11336, XP002991777, ISSN: 0027-8424, DOI: DOI:10.1073/PNAS.0500010102

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for fremstilling av retinale pigmentepitelceller (RPE) celler fra humane pluripotente celler, *karakterisert ved at* metoden består av:

a) dyrking av humane pluripotente celler i 7-14 dager for å danne embryoidlegemer i en suspensjonskultur i et medium som inneholder mindre enn 5% animalsk avledet protein;

b) dyrking av embryoidlegemene som en adherent kultur i et medium som omfatter mindre enn 5% animalsk avledet protein, hvorved RPE-celler opptre innen 14-28 dager i adherent kultur;

c) valg av RPE-celler fra kulturen i trinn (b);

d) dyrking av RPE-celler valgt fra trinn (c) i et medium omfattende en eller flere faktorer valgt fra gruppen bestående av EGF, bFGF, VEGF og rekombinant insulinlignende vekstfaktor; og

e) dyrking av RPE-celler fra trinn (d) for å fremme deres modning, og derved fremstille en kultur omfattende RPE-celler.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, videre omfattende å dyrke RPE-celler fra trinn (e) for å fremstille en kultur av modne RPE-celler.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, hvor mediet i trinn (a) inneholder serumfritt B-27-supplement og mediet fra trinn (b) ikke inneholder serumfritt B-27-supplement.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor mediet i trinn (d) videre omfatter en eller flere faktorer valgt fra gruppen bestående av: heparin, hydrokortison og askorbinsyre.

5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, hvor embryoidlegemene i trinn (b) er dyrket i 28 dager eller mer.

6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5, hvor trinn (c) omfatter å bringe kulturen i trinn (b) i kontakt med et enzym som får RPE-celler til å løsrive seg fra den vedheftede kulturen og velge frittliggende pigmenterte celler eller løsgjorte celleklynger som inneholder pigmenterte celler.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 6, hvor nevnte enzym er valgt fra gruppen bestående av kollagenase IV og dispase.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor de humane pluripotente stamceller er valgt fra gruppen bestående av induserte pluripotente stam (iPS) celler og embryonale stamceller.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 7, hvor trinn (c) videre omfatter dissosiering av de utvalgte celleklynger som inneholder pigmenterte celler, og derved danner en enkeltcellesuspensjon omfattende RPE-celler.