



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102016009 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 20

(21) 申请号 200980113395. 3

(22) 申请日 2009. 04. 08

(30) 优先权数据

0806746. 4 2008. 04. 14 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 10. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2009/000917 2009. 04. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/127809 EN 2009. 10. 22

(73) 专利权人 UCL 商业股份有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 彼得·科菲 林登·DA·克鲁兹

凯伦·奇塔姆

(74) 专利代理机构 上海信好专利代理事务所

(普通合伙) 31249

代理人 张静洁 徐雯琼

(51) Int. Cl.

A61L 27/16(2006. 01)

A61L 27/18(2006. 01)

A61L 27/38(2006. 01)

A61L 27/34(2006. 01)

A61L 27/54(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1739813 A, 2006. 03. 01, 说明书第 2 页第 3 段至第 3 页第 1 段.

CN 1739813 A, 2006. 03. 01, 说明书第 2 页第 3 段至第 3 页第 1 段.

Susanne Binder et al.. Transplantation of the RPE in AMD. 《Progress in Retinal and Eye Research》. 2007, 第 26 卷 516 - 554.

Susanne Binder et al.. Transplantation of the RPE in AMD. 《Progress in Retinal and Eye Research》. 2007, 第 26 卷 516 - 554.

审查员 张凌

权利要求书2页 说明书13页 附图7页

(54) 发明名称

膜

(57) 摘要

本发明涉及一种支持细胞的膜, 尤其是视网膜色素上皮细胞的细胞膜。该膜在例如年龄相关黄斑变性的治疗情况下有用。

1. 一种用于支持细胞生长的膜,其特征在于,该膜具有非生物降解、可渗透性,该膜上至少一面涂有由糖蛋白组成的涂层,该膜上的孔密度在每平方厘米 1×10^7 和 3×10^8 之间。

2. 如权利要求 1 所述的膜,其特征在于,该膜上还具有一层细胞。

3. 一种用于支持细胞生长的膜,其特征在于,该膜具有非生物降解、可渗透性,该膜的孔径在 $0.2 \mu\text{m}$ 至 $0.5 \mu\text{m}$ 之间,孔密度在每平方厘米 1×10^7 和 3×10^8 之间;该膜上还具有视网膜色素上皮细胞或视网膜色素上皮细胞的前体细胞。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的膜,其特征在于,所述细胞是通过除了破坏人类胚胎以外的其他方式获得的。

5. 如权利要求 2 至 4 中任意一项权利要求所述的膜,其特征在于,所述的细胞为视网膜衍生细胞。

6. 如权利要求 5 所述的膜,其特征在于,所述的细胞为人类视网膜色素上皮细胞。

7. 如权利要求 2 至 6 中任意一项权利要求所述的膜,其特征在于,所述的细胞为永生细胞或多能干细胞或自体细胞。

8. 如权利要求 1 或 2 所述的膜,其特征在于,膜上的孔径在 $0.2 \mu\text{m}$ 至 $0.5 \mu\text{m}$ 之间。

9. 如权利要求 1 至 8 中任意一项权利要求所述的膜,其特征在于,该膜的导水率大于 $50 \times 10^{-10} \text{m sec}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ 。

10. 如权利要求 1 至 9 中任意一项权利要求所述的膜,其特征在于,该膜可经伽马射线、环氧乙烷、高压蒸汽或紫外线灭菌,且不会发生降解。

11. 如权利要求 1 至 10 中任意一项权利要求所述的膜,其特征在于,该膜可经超声热合、射频封接或镶嵌塑型进行封接。

12. 如权利要求 1 至 11 中任意一项权利要求所述的膜,其特征在于,该膜的最大厚度大约为 $11 \mu\text{m}$ 。

13. 如权利要求 1 至 12 中任意一项权利要求所述的膜,其特征在于,该膜的最大质量大约为 $1.5 \text{mg}/\text{cm}^2$ 。

14. 如权利要求 1 至 13 中任意一项权利要求所述的膜,其特征在于,该膜具有亲水性。

15. 如权利要求 1 至 14 中任意一项权利要求所述的膜,其特征在于,该膜的 pH 值为 4-8。

16. 如权利要求 1 或 2 所述的膜,其特征在于,该涂层是层粘连蛋白或纤连蛋白。

17. 如权利要求 1 或 16 所述的膜,其特征在于,药用或生物制剂可结合于涂层组分。

18. 如权利要求 1 至 17 中任意一项权利要求所述的膜,其特征在于,该膜由亲水聚集体制成,亲水聚集体为:聚酯纤维、聚氨酯、聚(脲)氨酯、聚酰胺、聚醚酯、聚碳酸酯、聚丙烯酸酯、聚四氟乙烯、聚硅氧烷、聚烯烃和多聚甲醛。

19. 如权利要求 1 至 18 中任意一项权利要求所述的膜,其特征在于,该膜可用于治疗与衰老相关的黄斑退化类疾病。

20. 一种将细胞接种至如权利要求 1 所述的膜上的方法,包括将细胞以每平方厘米 200000 个细胞甚至更多的密度接种。

21. 如权利要求 18 所述的膜,其特征在于,所述亲水聚集体是一种聚酯纤维。

22. 一种用于支持细胞生长的膜,其特征在于,该膜由聚酯纤维制成且具有非生物降解、可渗透性;该膜的最大厚度大约为 $11 \mu\text{m}$,且至少一面涂有糖蛋白组成的涂层;该膜上

的孔径大约为 $0.4\ \mu\text{m}$, 孔密度为每平方厘米 1×10^8 ; 该膜上还具有视网膜色素上皮细胞或视网膜色素上皮细胞的前体细胞。

膜

技术领域

[0001] 本发明设计一种用于支持细胞生长的膜。同时,本发明还涉及用于细胞生长、制造膜并利用细胞的相关方法。尤其是这些细胞可以用于治疗与年龄有关的黄斑退化。

背景技术

[0002] 与年龄有关的黄斑退化 (AMD) 多发于老年人,其视网膜的黄斑区域变薄、萎缩、出血。这将会导致视觉中央区域的视觉丧失,特别是不能看清精致的细节、不能阅读或识别对方面部。

[0003] 黄斑退化 (AMD) 可归类为萎缩型 / 干性 (非 - 新生血管型) 或渗出型 / 湿性 (新生血管型)。渗出型黄斑退化 (AMD) 是由于视网膜下血管新生。萎缩型黄斑退化 (AMD) 较渗出型更为常见,大约 85-90% 诊断为黄斑退化 (AMD) 的患者都属于萎缩型。渗出型黄斑退化 (AMD) 往往会导致更为严重的视力损伤。

[0004] 萎缩型黄斑退化 (AMD) 属于该病症的早期阶段,可能会因衰老、黄斑组织变薄、黄斑区色素沉积引起的,或是两种过程的综合。萎缩型黄斑退化 (AMD) 通常因称为脉络膜小疣的黄色斑点开始沉淀积累而确诊,或是因黄斑区的恶化组织碎片而确诊。

[0005] 萎缩型黄斑退化 (AMD) 会演变成渗出型黄斑退化 (AMD),其视网膜下出现新生血管,血管渗漏及出血。血管渗漏会引起光敏视网膜细胞的永久性损伤,导致失明或某些视觉区出现盲点。

[0006] 目前,黄斑退化 (AMD) 症的治疗方法极为有限,某些疗法可能会延迟症状的恶化或可以提高视力。黄斑退化 (AMD) 症的治疗依赖于患者是否处于发病的早期阶段,或属于萎缩型或其他阶段,或属于能够导致严重视力丧失的渗出型黄斑退化 (AMD)。其中一种治疗方法就是将渗出型黄斑退化 (AMD) 症患者眼睛健康区域的细胞移植到病变区域。虽然该法比较有效,但能够治疗的受损区域的面积有限,治疗过程过长,且不适合大多数老年患者。所以有必要进一步提高这两种黄斑退化 (AMD) 病症的治疗方法。

[0007] 发明者调查了可以获取且能移植的视网膜上皮细胞的替代方法,尤其是利用肝细胞生产目的细胞的方法。发明者研发出一种能够随移植细胞一起移植到到眼睛里的支持细胞生长的膜。该膜可用于支持视网膜色素上皮细胞 (RPE) 及其衍生细胞生长的膜,但同时其他类型的细胞也可以生长。

[0008] 先前,细胞生长在膜上。Williams 等人 (Journal of Materials Science; Materials in Medicine 16(2005)1087-1092) 曾使用聚氨基甲酸乙酯膜培养 RPE 细胞,但他们发现这种膜的表面需要进行细胞粘附处理。其他研究者则使用过聚酯纤维膜。

发明内容

[0009] 本发明设计一种用于支持细胞生长的膜,该膜大体上是一种非生物降解的多孔膜,这些孔的直径大概在 $0.2\ \mu\text{m}$ 和 $0.5\ \mu\text{m}$ 之间,最好是在 $0.3\ \mu\text{m}$ 和 $0.45\ \mu\text{m}$ 之间。

[0010] 该膜的非生物降解性可保证它能够在移植入眼睛后还能支持细胞生长。非生物降

解是指该膜在植入人体至少 5 年内都不会发生降解,也可能会长达至少 10 年,甚至至少 15 年。

[0011] 如此直径的孔可允许所有营养物质、蛋白质的渗入,同时可以阻止细胞穿过该膜。

[0012] 膜上孔的密度最好在每平方厘米 1×10^7 至 3×10^8 个孔之间,最好在每平方厘米 5×10^7 至 1×10^8 个孔之间。该密度能够提供所需的渗透水平,并允许血管的形成。该尺寸和密度是尤为重要的,因为它有利于营养物质从膜的一侧移动到另一侧,并允许血管穿过该膜生成。这对于后期应用尤为重要。该聚合体能够接收到来自脉络膜生成的血管。这已在眼外的脉络膜床上显示出来 (Cassell et al., 2002; Patrick et al., 1999; Saxena et al., 1999, Peter et al., 1998), 但仅当孔数足够丰富时才会发生 (Menger et al., 1990)。

[0013] 该膜的水力传导力高于 $50 \times 10^{-10} \text{ m sec}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ 。特别是该膜的膜水力传导最好是接近 33 ml/min/cm^2 。这相当于 $801.21 \times 10^{-10} \text{ m sec}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, 这是年轻黄斑尸体布鲁斯膜水力传导力的 8 倍。由于人造膜完全依赖于被动的过程,所以这种过剩的传导力是非常有用的。除了在营养扩散方面能够满足叠加细胞的生长需要,这也不会阻碍流体从视网膜色素上皮细胞 (RPE) 层基质侧的传输,除非视网膜色素上皮细胞 (RPE) 从多聚层解离开。因为老年人布鲁斯膜的水力传导力减少可能会引发黄斑退化 (AMD) 的色素上皮分离症状 (Bird&Marshall, 1986), 所以这一点是非常有意义的。

[0014] 该膜可经伽马射线、环氧乙烷、高压蒸汽或紫外消毒灭菌,而不会发生降解。

[0015] 该膜可经超声热合密封、射频封接或镶嵌塑型等方法密封。这将允许其他各层与膜接触,例如与药层或涂层接触。例如,一种膜可能需要与生物可降解层 (如 PLGA) 接触,以辅助该膜递送。此外,膜还可以与含有药物或生物试剂接触,或与支撑其他细胞的各层接触。

[0016] 该膜的厚度最大可达 $11 \mu\text{m}$, 最好是介于 $9 \mu\text{m}$ 至 $11 \mu\text{m}$ 之间。可选择适当的膜的厚度,以允许营养物质的扩散、血管的形成,还可使该膜能够容易地嵌入眼睛。

[0017] 因此,本发明涉及一种支持细胞生长的膜,该膜能够保证不被生物降解,且具有可渗透性,最大厚度约 $11 \mu\text{m}$ 。该膜大体上是平面的,其最小尺寸约小于 $11 \mu\text{m}$ 。该尺寸可能有所不同,但其厚度最好是介于 $9 \mu\text{m}$ 和 $11 \mu\text{m}$ 。

[0018] 该膜最大质量接近 1.5 mg/cm^2 , 且最好介于 1.0 mg/cm^2 至 1.4 mg/cm^2 之间。最小可拉伸长度为 100bars, 以在手术期间能够承受足够的力量。最大可拉伸长度为 300bars, 同样便于手术操作。爆破强度至少为 10psi。

[0019] 该膜具有亲水性。这赋予该膜良好的湿润能力,并使细胞和其他需要覆盖层能够较容易的附着。

[0020] 该膜的 pH 值介于 4 和 8 之间,这属于生理可接受的 pH 值。

[0021] 该膜至少有一面涂层。该图层可以是蛋白质或是糖蛋白,例如层粘连蛋白、基质胶、胶原蛋白、纤连蛋白和乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA poly)。该涂层也可以由药物制剂或生物制剂组成,结合于涂层组分。例如,该涂层可能含有神经营养因子、抗炎药或抗血管新生剂。

[0022] 该涂层含有层粘连蛋白,特别是层粘连蛋白-1 或其片段,例如, IgVAV。此外,与其他蛋白或糖蛋白相比,该涂层最好含有层粘连蛋白-1,且至少含有 30% 的层粘连蛋白,特别是层粘连蛋白-1,其含量最好不小于 40%。该涂层上的层粘连蛋白-1 在膜上的浓度应

接近于 $40\text{--}45\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0023] 相应的,该膜可用于支持细胞生长,由非生物降解和可渗透的支持层组成,膜上至少有一面涂有含层粘连蛋白-1的涂层。

[0024] 该膜由疏水的聚合体经紫外光照射而亲水。聚合体包括聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚对苯二甲酸丁二醇酯;聚氨酯类和聚脲氨基甲酸乙酯,特别是那些含有聚碳酸酯和聚硅氧烷,以及聚酯纤维或聚醚;聚酰胺,如尼龙;聚醚酯,如新保适防水材料(sympatex);聚碳酸酯,如模克隆 Makrolon;聚丙烯酸酯,如珀思配克斯(Perspex);聚四氟乙烯(PTFE);聚矽氧烷(Polysiloxanes);聚烯烃(polyolefins),如聚乙烯和聚丙烯;以及聚甲醛 polyformaldehyde(POM),杜邦公司的迭尔林(聚甲醛树酯)(Delrin)产品。该膜最好是由聚对苯二甲酸乙二醇酯或聚对苯二甲酸丁二酯组成。在另一个具体实施例中,该膜是由聚酯纤维制成。

[0025] 该膜用于单层细胞的生长。膜上含有一层细胞。这些细胞可以根据膜与细胞的用途选择任何细胞。能够以单层细胞生长在膜上的细胞类型包括视网膜细胞、皮肤细胞和内皮细胞,还包括多能干细胞。这些细胞可能来源于不同组织,例如可以是来源于自体的细胞,用于自体移植,或是具有特定目的的培养细胞。来源于胚胎干细胞的细胞可以是非胚胎来源的,例如一个细胞库。这些细胞是如 ARP-19 一类的永生细胞。本发明可用于治疗退化性疾病,尤其是视网膜相关眼疾。因此,这类细胞可以是视网膜色素上皮细胞(RPEs)或相关细胞,例如可以分化为 RPE 细胞的细胞,或是可由 RPE 细胞分化而来的细胞(视网膜衍生细胞)或其前体细胞。这类细胞可能包括光感受细胞、星形细胞、无长突细胞或视网膜神经细胞。同样也可以使用其他高度分化的细胞。

[0026] 该膜和细胞层的长宽至少为 $3\text{mm}\times 5\text{mm}$,最好为 $4\text{mm}\times 6\text{mm}$ 。

[0027] 当将细胞附着于膜上时,其细胞密度最好较高,这样可以减少细胞发生去分化的可能。理想的情况是,细胞的种植密度至少为每平方厘米 200000 个细胞,最好是每平方厘米 250000 个细胞,甚至可高达每平方厘米 300000 或 350000 个细胞。

[0028] 用于支持细胞克隆生长的多孔的非生物降解膜应至少有一面覆盖有一层细胞,并且该细胞的密度至少为每平方厘米 200000 个细胞。

[0029] 本发明还涉及一种在膜上种植每平方厘米 200000 个细胞甚至更高细胞密度的方法。

[0030] 本发明所涉及的这种膜上种植有高度分化的细胞,例如 RPE 细胞。

[0031] 本发明所涉及的这种膜也可以用于支持细胞克隆的生长。

[0032] 此外,本发明所涉及的这种膜可用于疾病的治疗。特别是,该膜可用于治疗与衰老相关的黄斑退化、视网膜裂孔、黄斑营养不良、无脉络膜、先天性利伯氏黑蒙、斯特格病变。

[0033] 本发明所涉及的细胞培养方法包括以下几步:

[0034] a) 将人类胚胎干细胞与丝裂霉素 C 非活化的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)一起以至少 $1.2\times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度种植,或将人成纤维细胞以至少 $6\times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度种植。

[0035] b) 将上述细胞培养在含有以下组分或等同组分的培养基中:高浓度葡萄糖(4.8g/L)的 DMEM 细胞培养基(DMEM, Invitrogen)、含有 20% 的 knockout 血清替代品(Invitrogen)、1% 的非必需氨基酸溶液、1mM L-谷氨酸(Invitrogen)、4ng/ml 人基本的成纤维细胞生长因子(bFGF)(Invitrogen)和 0.1mM 的 β -巯基乙醇(Sigma)。

[0036] 细胞每两天换一次培养基。每 10 天传一代,根据每天的培养方法调整培养基重量,使用不含有基本成纤维细胞生长因子。

[0037] 细胞培养至少 30 天,最好是至少 35 天。

[0038] 培养基含有至少 15%,或至少 18%,或最好是至少 20%的 KSR。此外,该培养基不含有血浆蛋白粉、人 LIF 和 / 或 bFGF。

[0039] 细胞形成色素沉积点。最好及时除去这些沉积点,并置于细胞外基质,以使单层培养细胞的附着和延伸。

[0040] 根据所附图示将以示例的方式对本发明进行详细描述。

附图说明

[0041] 图 1 显示了猪眼原位移植附有 HESC-RPE 的生物聚合物修补块一个月后的情况 (A)。B :是图 A 的光镜照片,显示了在生物聚合膜上,与内 / 外色素一起附着到 HESC-RPE 上的光敏受体。C :单独移植到猪眼的聚合体,光敏受体已发升退化。染色剂 :甲酚紫。标尺长度分别为 :A,1mm ;B,100 μ m。这说明体内聚合物的生物兼容性,以及单层 RPE 细胞对于维持光受体存活是必需的 ;

[0042] 图 2 是猪眼中生物聚合膜上的 HESC-RPE 细胞的激光扫描共焦照片,1 个月存活。HESC-RPE 细胞形成一个一致的色素片,与猪光敏受体 (视紫质,FITC) 相连,附着于猪 RPE。某些光敏受体材料是在 HESC-RPE 细胞内的 (A)。B 图显示了表达有 RPE65 的供体 RPE 细胞 (TRITC) ;

[0043] 这说明移植的 HESC-RPE 发挥着其在活体内的正常作用 ;

[0044] 图 3 显示了移植入 3 周龄的环孢霉素处理三周后的营养不良 RCS 大鼠体内的游离 HESC-RPE。所移植的人细胞由专一的人表面标记 (HSM) 抗体标识。HESC-PRE 衍生细胞的标记过程绕开了外部有限的膜,并整合入宿主突触层。图 A 中所框的区域放大于图 B。这说明移植的细胞能够在移植的眼睛里保持良好的视觉功能 (与统一动物的非移植眼睛相比)。使用视动检测设备测定视觉灵敏度,单位为 :赫 / 度 (c/d) ;

[0045] 图 4 显示了在不同种类膜上的细胞生长。

具体实施方式

[0046] 实施例 1

[0047] 膜的制备

[0048] 薄的聚酯薄膜暴露于来自核反应堆的准直的带电粒子。当这些粒子穿过聚酯材料时,它们离开敏感轨道。然后聚合体与蚀刻溶液一起溶化形成间孔。随着蚀刻溶液的温度、强度和暴露时间的不同,将产生大小精确控制的孔。

[0049] 这样产生的膜很薄,呈半透明状,是一种具微孔的聚酯薄膜,其表面光滑平整,含有孔径一致且数量一定的孔。

[0050] 来自人胚胎干细胞 (hESC) 的人视网膜色素上皮细胞 (hRPE) 的增殖

[0051] 细胞培养

[0052] 人胚胎干细胞培养在附有 0.1%胶质的细口瓶中,接种于对有丝裂霉素 C 钝化的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 培养基或等同的人纤维原细胞培养基,接种密度为 1.2×10^4 /

cm²。细胞培养在基础 HESC 培养基中,该培养基含有以下成分:高浓度葡萄糖(4.8g/L)的 DMEM 细胞培养基(DMEM, Invitrogen)、含有 20% 的 knockout 血清替代品(Invitrogen)、1% 的非必需氨基酸溶液、1mM L-谷氨酸(Invitrogen)、4ng/ml 人基本的成纤维细胞生长因子(bFGF)(Invitrogen)和 0.1 mM 的 β -巯基乙醇(Sigma)。HESC 细胞株一旦从低温储藏复苏,便需要每 2 天传代一次,连续传代 74 代。细胞按比例稀释(1 : 5),以保持未分化的 HESC 细胞克隆(这通过对标志物 SSEA3、SSEA4, TRA-1-60 和 TRA-181 进行染色来鉴定。在舍菲尔德大学进行的常规扫描可确定所使用的 HESC 的染色体正常(Shef1(46XY) 和 Shef7(46XX)))。

[0053] HESC-RPE 的分化和增殖

[0054] 我们发现,当 hESC 克隆在 MEFs 上成为超级融合体时,hESC-hRPE 即构成可信赖的形式。当每个 hESC 克隆的边缘融合在一起时(传代后 10 天),使用上述的基础 hESC 培养基(不含 bFGF)从每两天更换一次变为每天一次。由于有文献记载 bFGF 与 RPE 特异性的抑制有关,因而去除了该因子。每天更换培养基的 1 至 2 周内,在 hESC 培养物的超级融合中出现色素沉积斑。

[0055] 在出现色素沉积斑后,用玻璃吸管和显微操作刀片除去色素沉积斑。该操作仅当色素沉积斑直径至少达 1mm 时进行。在该操作期间,每个步骤都是为了切去周围的非色素物质,而不是取代含有无生长因子的 Matrigel™(BD 生物科学公司,1 : 30 稀释)或层粘连蛋白的 35mm 组织培养皿中的色素沉积斑。每个培养皿中共含有 10 个色素沉积斑,并且 RPE 细胞可以在基质胶上继续生长 35 天(例如,在不含 bFGF 的基础 HESC 培养基中生长 5 周)。期间,每 2-3 天更换一次培养基。这可获得 2-3mm 大小的单层色素细胞。通过该方法,RPE 薄片(大约 1cm)可在我们实验室的体外存活长达 4 个月。

[0056] 该领域的其他不同的方法和技术也可用于培养感兴趣的细胞,包括从 khES-1 和 khES-3 细胞株中衍生出 RPE 细胞的方法(Osakada 等,2008,Nat Biotechnol,26,215-224),以及从 H1、H7 和 H9 细胞中衍生出 RPE 的方法(Klimanskaya 等,2004,Clothing and stem cells,6,217-245)。

[0057] 将人胚胎干细胞(ES)种植到膜上及后续培养方法

[0058] 细胞收集:

[0059] 在组织培养皿中,使用灭过菌的手术刀,围绕着色的细胞簇进行切割,使之与未着色的细胞群分开。然后用移液器枪头或灭过菌的玻璃吸管转移切下来的细胞簇。在一些实施例中,可同时用吸管抽吸加以辅助。

[0060] 与培养基一起收集着色细胞簇,并移入离心管中。在 12000-13500rpm 离心 3-5 分钟后,弃上清培养基,加入解离液。该分离液的组分如下:溶于不含钙离子或镁离子的 PBS 缓冲液中的 90% 非酶细胞解离溶液(Sigma-Aldrich),0.25% 的胰蛋白酶。其余部分是不含钙镁离子的 Dulbecco 磷酸盐缓冲液。细胞簇在上述解离液中于 37℃ 孵育 5-15 分钟。

[0061] 用吸管充分吹吸细胞簇,直到着色细胞簇充分解离开。于 12000-13500rpm 离心 5 分钟。小心的吸出上清解离液。然后加入细胞生长培养基,重悬沉淀的细胞。用血细胞计数器计算细胞密度,从而计算相应的接种量。

[0062] 膜的制备:

[0063] 在层流净化罩/柜的紫外灯照射下将膜灭菌 30 分钟,然后置于一个培养皿中,并

用适当的插入物使膜沉入底部。然后将覆有 1 : 30 基质胶 (BD 生命科学公司) 的膜于 37℃ 孵育 30 分钟 (厚胶) 或与 4℃ 孵育过夜 (薄胶)。层粘连蛋白的表面浓度保持 1-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。用层粘连蛋白的好处是人层粘连蛋白是商业有售的, 因此可采用无异源体系的方法, 这对于实现临床使用标准是非常重要的 (Lei 等, 2007)。

[0064] 一块膜已经被移植到猪和大鼠的眼睛里。移植结果见图 1 至图 3 所示。图 1 显示了附着有 HESC-RPE 的生物聚合膜移植到猪眼一个月后的体内状态。这说明该聚合物的生物适配性, 以及单层的 RPE 细胞对于维持光受体的作用是必不可少的。

[0065] 图 2 显示了生物聚合膜移植入猪眼一个月后的 HESC-RPE 的图像。这说明移植后的 HESC-RPE 在体内保持正常功能。

[0066] 图 3 显示了解离的 HESC-RPE 在含有环孢霉素的情况下移植到三周大营养不良 RCS 大鼠体内五周后的情况。这说明移植的细胞能够在眼睛里保持良好的视觉功能 (与同一动物的另一只非移植眼睛相比)。使用视动检测设备测定视觉灵敏度, 单位为赫 / 度 (c/d)。

[0067] 实例 2

[0068] 接种膜

[0069] RPE 细胞以不同的密度接种到膜上, 从而确定高度分化细胞的最优接种密度。观察 RPE 细胞的特征, 例如着色性和鹅卵石样的形态。结果如下表所示:

[0070]

接种密度 (细胞数/cm ²)	裸眼可见着色性	显微镜检测	
		40 倍物镜下, 每个视野里的着色细胞数	常规形态 (正六边形=0) *
70000	无	16	细胞过于稀少而无法计数
212000	浅色	>400	0.023
270000	深色 (正常)	>400	0.024
391000	颜色非常深	>500	0.0175

[0071] 实例 3

[0072] 在不同膜上的细胞生长

[0073] 测试不同材料的膜支持细胞生长的能力。结果如下表所示:

[0074]

	TC 聚苯乙 烯	PLGA(聚乳 酸聚乙醇酸 共聚物)	TEFLON PTFE (特富龙)	聚氨酯	达克龙聚 酯
正面	非常好的 细胞生长	良好的细胞 生长表面	牢固、柔韧、 可渗透的	牢固、柔 韧、可渗透	较强的柔 韧性、充

[0075]

	表面			的	分的可渗透性，非常好的细胞生长表面。孔径大小足以允许供体和受体免疫细胞的迁移。虽然非常薄，但仍然是非常方便进行外科手术的膜（见厚度）
厚度	不可成为薄膜	700-900 $\mu\text{m}+$	90-150 μm	60-200 μm	5-12 μm
孔径大小	N/A	17-50 μm	大约为 0.3-0.5 μm	20-200 μm	0.4 μm
孔密度	N/A	高	高	低	$1 \times 10^8/\text{cm}^2$
疏水性	无	无	强	无	无
细胞亲和性	高	高	非常低	低-中等	高

[0076] 实例 4

[0077] RPE 细胞生长

[0078] 形态：我们使用倒置显微镜的实时相位对比成像系统拍摄实时图片，从而评估透明高聚物。利用结合免疫标记（通常是 ZO-1）评估非透明的高聚物形态。

[0079] 检测细胞生长：

[0080] 结合光学显微镜、激光扫描共焦显微镜的免疫化学染色、电子显微镜，以及细胞成活率分析来评估细胞生长情况。

[0081] 细胞成活率检测（阿尔玛蓝（Alamar Blue）检测）：

[0082] 对于 PLGA 来说，各种聚氨酯聚合物对组织培养的商业化插入物是必要的。简单地说，最初的过滤器被切除，剩余的材料用粘沙钢纸打磨的。在用 PBS 缓冲液彻底冲洗实验聚合物后，该聚合物被腈基丙烯酸酯粘合剂（汉高乐泰，Avon，俄亥俄）粘在嵌入物上。为了检测聚氨酯的适用性，如下所述的 Alamar Blue 法测定活细胞密度：使用含血浆的培养基，将细胞以较低密度接种在不同材质表面，从而达到最优化附着。细胞在 37℃ 孵育 24 小时，使之能够充分附着。用不含血浆的培养基漂洗两次，从而洗去游离细胞，然后在不含血清的培养基中孵育至少 12-24 个小时，使细胞同步化。随后培养细胞达一定的时间。检测时，在将一定体积的培养物溶于 10% Alamar Blue 用不含酚红的 Hanks 平衡盐缓冲溶液（HBSS）（PRF-HBSS）之前，需要先用 PRF-HBSS 溶液漂洗一次细胞。细胞培养物在 37℃ 孵育 45 分钟。之后，一定比例的活细胞的蓝色上清将转变为红色荧光。将上清收集至 96 孔板，并且在荧光下对 96 孔板进行分析（激发光 530-560nm，辐射光 590nm）。

[0083] 不同材料的 Alamar Blue 细胞活性检测结果见下表所示。此外，对比了在聚氨酯和聚酯纤维上生长的细胞，该比较结果列于图 4。与本发明所有的聚酯纤维膜相比，所有的聚氨酯类聚合物上的细胞生长有下降的趋势。

[0084]

	TC 聚苯 乙烯	PLGA (聚乳	TEFLON PTFE	聚氨酯	商业化 培养梯	聚酯纤 维
--	-------------	-------------	----------------	-----	------------	----------

[0085]

		酸聚乙醇酸共聚物)	(特富龙)		度聚酯纤维	
细胞生长	非常好	非常好	不好	中等	非常好	非常好
形态	不好	不好	N/A	好	好	好
电镜	-	-	分开独立的细胞	分开或卷曲的细胞片,有待进一步的证据证明细胞之间较少的连接	融合连接的细胞	融合连接的细胞
连接点染色(激光扫描共焦)	是	是	N/A	是(仅固体聚合物)	是	是
渗透性(多孔性)	是	是	N/A	局部?(仅固体聚合物)	是	是

[0086] 利用免疫细胞化学技术和激光扫描共焦显微镜确定研究结果,绝大多数聚氨酯聚合物中的细胞数极少。一种聚氨酯的聚合物(固态聚合物)中细胞能够很好的生长,并被连接点染色,但细胞薄层能够轻易的从聚合物表面剥离。

[0087] 上表中的测试结果表明聚合纤维较其他可能的膜材料具有更大的优势。

[0088] 乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)方法:

[0089] 乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)制膜是由 E. B. Lavik 和 R. Langer(曼彻斯特,剑桥,麻省理工大学,化学工程系)发明的。乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)材料最初作为

Resomer[®] 503H (德国殷格翰 (Ingelheim) 公司生产) 购置的, 不对称的 PLGA 膜根据文献 (Lu 等, 2000a 和 2000b ; Lavik 等, 2001 和 2002) 中的方法合成。该不对称面使细胞能够附着在光滑的上表面上, 还可使细胞通过聚合物下面的可渗透一侧与基础环境连通。

[0090] 在移去原始膜后, 乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 不对称膜装配有 6.5mm 的 Corning **Transwell**[®] 嵌入物。由家用氰基丙烯酸盐粘合剂 (汉高乐泰生产) 固定。该嵌入物通过在层流罩内经紫外灯下照射 30-60 分钟进行灭菌。Passage28 ARPE-19 细胞以 90000 个细胞 /cm² 的密度种植于该膜上。

[0091] 另一系列中, 乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 不对称膜位于上述空插入物。该插入物和聚苯乙烯组织培养皿 (对照用) 覆有标准工作浓度的层粘连蛋白 (sigma 公司生产的, 取自霍尔姆-群小鼠肉瘤)。培养瓶和嵌入物以每厘米平方 180000 个细胞的高密度接种 p30 ARPE19 细胞, 以减少融合的时间。每周更换两次 RPE 培养基, 以维持 DMEM 高葡萄糖。

[0092] 实例 5

[0093] 涂层

[0094] HESC 培养方法:

[0095] HESC 细胞株 Shef1 和 Shef7 培养在附有 0.1% 明胶的培养瓶中, 并接种有非活性小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 补给者 (Draper 等, 2002)。细胞培养在基础 HESC 培养基中, 具有 Knockout 高糖由 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM, Invitrogen 公司), 含 20% 的 Knockout 血清替代品 (Invitrogen)、1% 的非必需氨基酸溶液、1mM L-谷氨酰胺 (Invitrogen)、4ng/ml 人 bFGF (Invitrogen) 和 0.1mM β -巯基乙醇 (Sigma)。一旦从液氮中移出, HESC 细胞株便每两天更换一次培养基, 传代达 74 次。细胞以 1 : 4 的比例稀释, 从而维持未分化 HESC 克隆。

[0096] 下列涂层根据标准的制造方法制造: 基质胶 (1 : 30)、层粘连蛋白、胶原蛋白 IV、人胶原蛋白 I、**Puramatrix**[®]、人血浆蛋白粉、聚合-L-赖氨酸, 以及无涂层的作为对照。简单地说, 每个涂层在 4℃ 解冻, 并用 PBS 缓冲液或无血清培养基稀释。根据每个操作指南, 在 4℃、室温或 37℃ 向平板 / 嵌入物涂上涂层。弃去基质溶液, 按照标准方法清洗或风干平板。从培养瓶中切去 HESC-RPE 克隆 (主要的克隆), 并接种于具相应培养基的平板 / 嵌入物上。

[0097] 直接观察培养物用于评估 HESC 克隆的粘合和散布。观察接种后 24 小时至 72 小时的 HESC, 结果显示仅基质胶和层粘连蛋白会引起 HESC-RPE 克隆的粘合, 例如克隆固定非常牢固, 甚至冲洗培养基时也不易分开。HESC-RPE 克隆的人胃蛋白胎盘层粘连蛋白处理可固定, 而其他则不固定。所有其他涂层 (胶原蛋白 IV、人胶原蛋白 I、聚合-L-赖氨酸、**Puramatrix**[®]、人血浆蛋白粉) 在这一方面则完全失败。

[0098] 实例 6

[0099] 来自 Shef1 HESC 细胞株的 RPE 培养

[0100] 细胞培养

[0101] Shef1 HESC 细胞株培养于 T25 培养瓶中, 附有 0.1% 的胶质, 并接种有人纤维原培养基 (最佳的接种密度为每 T25 (9×10³/cm²) 有 2.25×10⁵ 个细胞)。细胞培养于基础 HESC

培养基,其中包括以下组分:高浓度葡糖(4.8g/L)Knockout 由 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM, Invitrogen 公司),含 20%的 Knockout 血清替代品(Invitrogen)、1%的非必需氨基酸溶液、1mM L-谷氨酰胺(Invitrogen)、4ng/ml 人 bFGF(Invitrogen)和 0.1mM β -巯基乙醇(Sigma)。一旦从液氮中移出,Shef1 HESC 细胞株便每两天更换一次培养基,传代达 74 次。细胞以 1 : 4 的比例稀释,从而维持未分化 HESC 克隆(由对标志物 SSEA3、SSEA4、TRA-1-60 和 TRA-181 进行染色来估计)。

[0102] HESC-RPE 的分化和扩展

[0103] 当 Shef1 HESC 克隆形成培养基上的超级融合时,可形成可靠的 HESC-RPE。当每个 HESC 克隆的边界融合在一起时(大约传代后十天),使用上述基础 HESC 培养基(不含 bFGF)从每两天更换一次变为每天更换一次。由于 bFGF 因子会引起 bFGF 和 RPE 特异抑制,故而除去该因子。每天更换培养基后的 1 至 2 周期间,在超级融合 HESC 培养物中出现色素沉积。

[0104] 在用玻璃吸管头和显微外科刀片除去色素沉积后继续细胞培养 5 周。这仅当色素沉积直径达到至少 1mm 时可行,因此细胞培养超过 5 周后可达到是有用的。在这个过程中,每个操作都是为了除去周围的非色素物质,而不是将色素沉积置换到 35mm 的附有层粘连蛋白的组织培养皿中。10-20 个色素沉积可分别置于每个皿中,RPE 细胞可在 2ml 培养基中进一步培养 35 天(例如,在除去 bFGF 的基础 HESC 培养基中培养 5 周)。在此期间,每 2-3 天更换一次培养基。这个时间段足够获得 2-3mm 的单层色素细胞。

[0105] 本方法与已发表的方法有以下不同:1. 高于标准浓度的 KSR(20%,相对于 Lanza 组 8-15%变量)。2. 在来自超级融合 HESC 培养物的 RPE 细胞培养过程不使用人血浆蛋白粉、人 LIF 或 bFGF 因子。

[0106] HESC-RPE 的解离和重悬

[0107] 收集自含 HESC-RPE 克隆的 T25 培养瓶(0 代)或扩展 HESC-RPE 层(1 代)的具色素的 HESC-RPE。用灭过菌的微刀片切割,用灭过菌的枪头去移走的细胞。经抽吸过程重悬 HESC 克隆/片层于 HES 培养基-bFGF(不含 bFGF),以备进一步的使用。

[0108] 一定数量的细胞簇与培养基一同移至一个管子中,于 2400 至 3600rpm 离心 5 分钟,从而移去上层培养基。重复离心,并更换溶液:用 PBS 清洗细胞 2 次,然后在溶于 PBS 的 90%的细胞解离缓冲液(Sigma#C5914)和 10%的胰蛋白酶(10 $\times$, PBS)(猪胰脏胰蛋白酶, Sigma;胰蛋白酶终浓度为 0.25%)中,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。随后,再次离心,弃去解离缓冲液,并重悬于 HES 培养基-bFGF,并置于 37 $^{\circ}$ C 孵育备用。

[0109] 将聚合片层装配到培养嵌入物上

[0110] 使用生物级乙烯基硅氧烷弹性体(Kwik-Sil,世界精密仪器公司,萨拉索塔,佛罗里达)将孔径 0.4 μ m,孔密度约 1×10^8 个/ cm^2 的 13mm 的聚酯纤维过滤皿附于最初的跨膜嵌入物。该嵌入物约 5 至 12 μ m 厚。聚酯纤维的重量为 1.2mg/ cm^2 。嵌入物用 PBS 冲洗一次,风干,在层流柜中用紫外灯照射每一面 30 分钟灭菌。灭菌过的嵌入物储存在灭过菌的层流净化柜中。

[0111] 预备培养嵌入物的涂层和接种

[0112] 已灭菌的嵌入物在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟附以 1 : 30 稀释的层粘连蛋白-1。层粘连蛋白(浓度为 43 μ g/ cm^2 , 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟)。在细胞接种之前立刻抽吸层粘连蛋白。用

Neubauer®血 I 球计数器和台盼蓝 1 : 1 稀释溶液检测 HESC-RPE 悬液的细胞密度。台盼蓝染色用于确定细胞活性,在每个实验组的细胞活性均大于 93%。细胞的最优接种密度为 200000-400000 个细胞 /cm²。在第一次更换培养基前,需要使细胞附着至少 24 个小时,最好是 48 小时。之后每周更换 3 次培养基。

[0113] 尽管本发明的内容已经通过上述优选实施例作了详细介绍,但应当认识到上述的描述不应被认为是对本发明的限制。在本领域技术人员阅读了上述内容后,对于本发明的多种修改和替代都将是显而易见的。因此,本发明的保护范围应由所附的权利要求来限定。

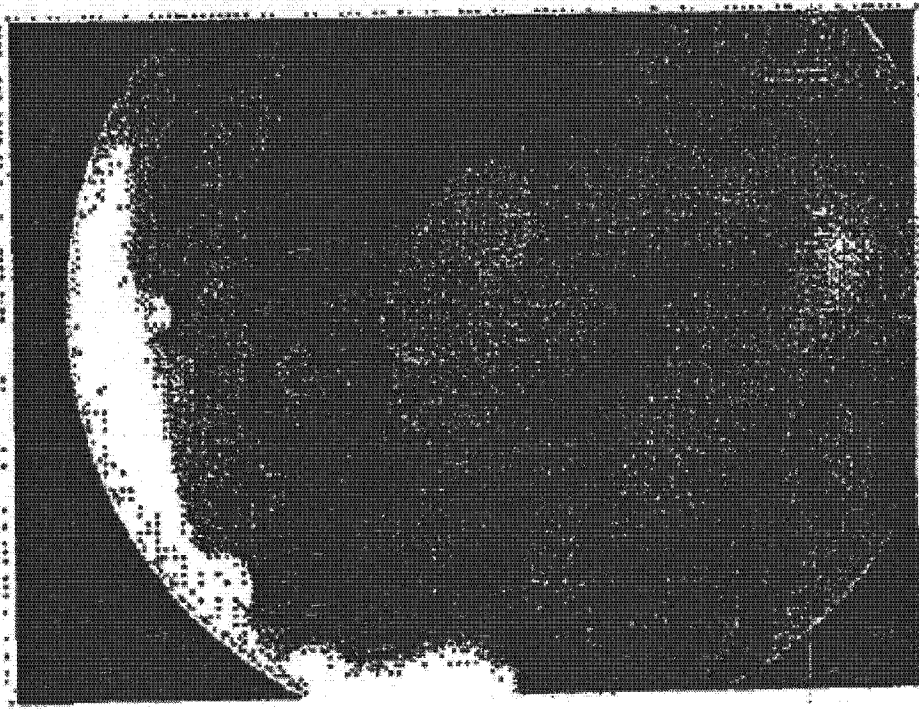


图 1A

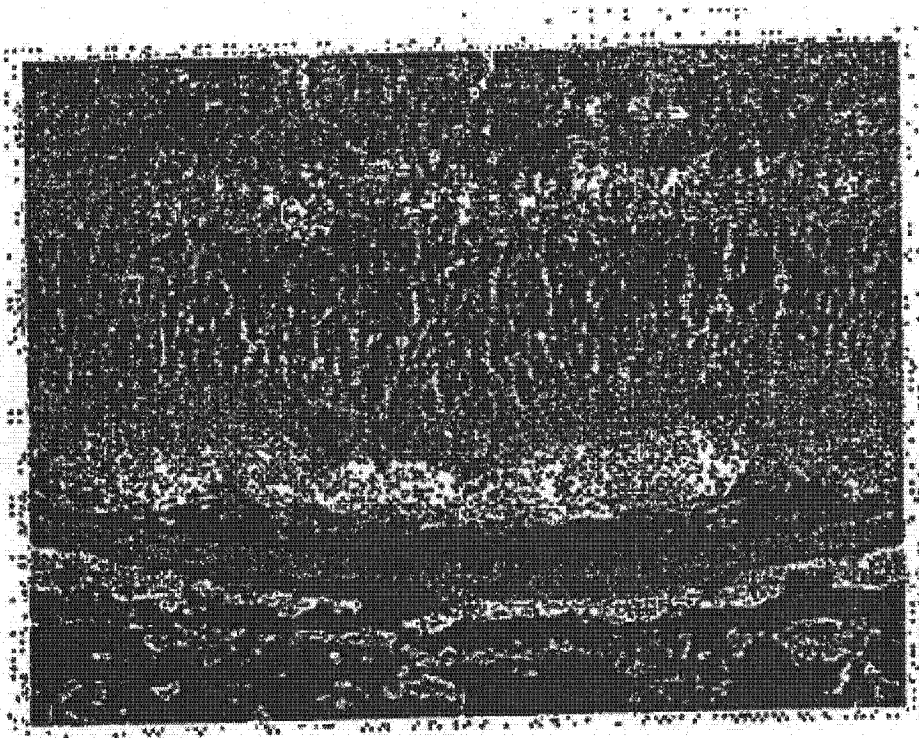


图 1B

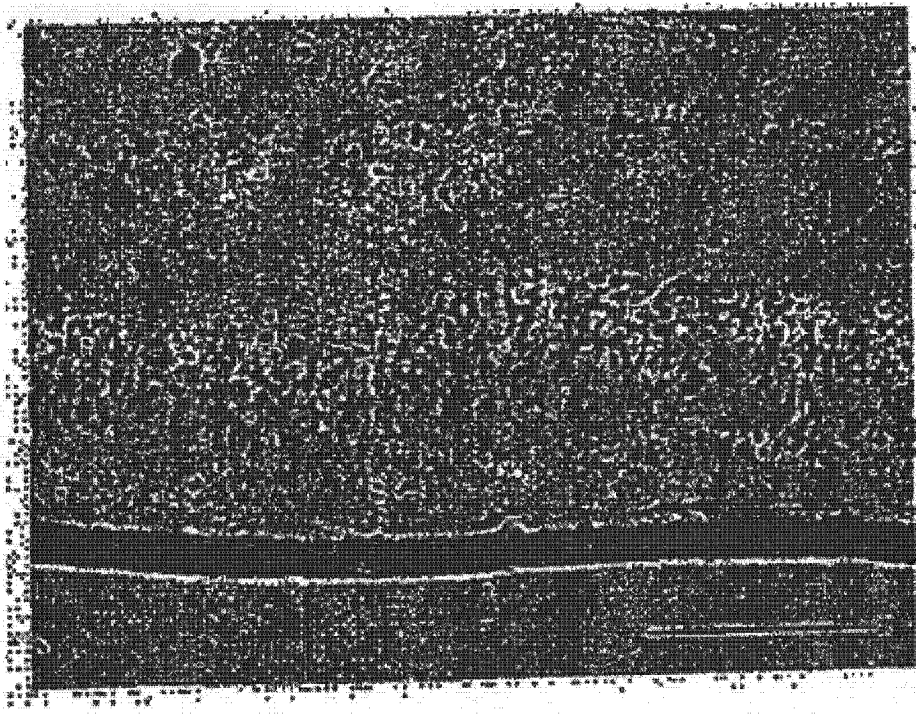


图 1C

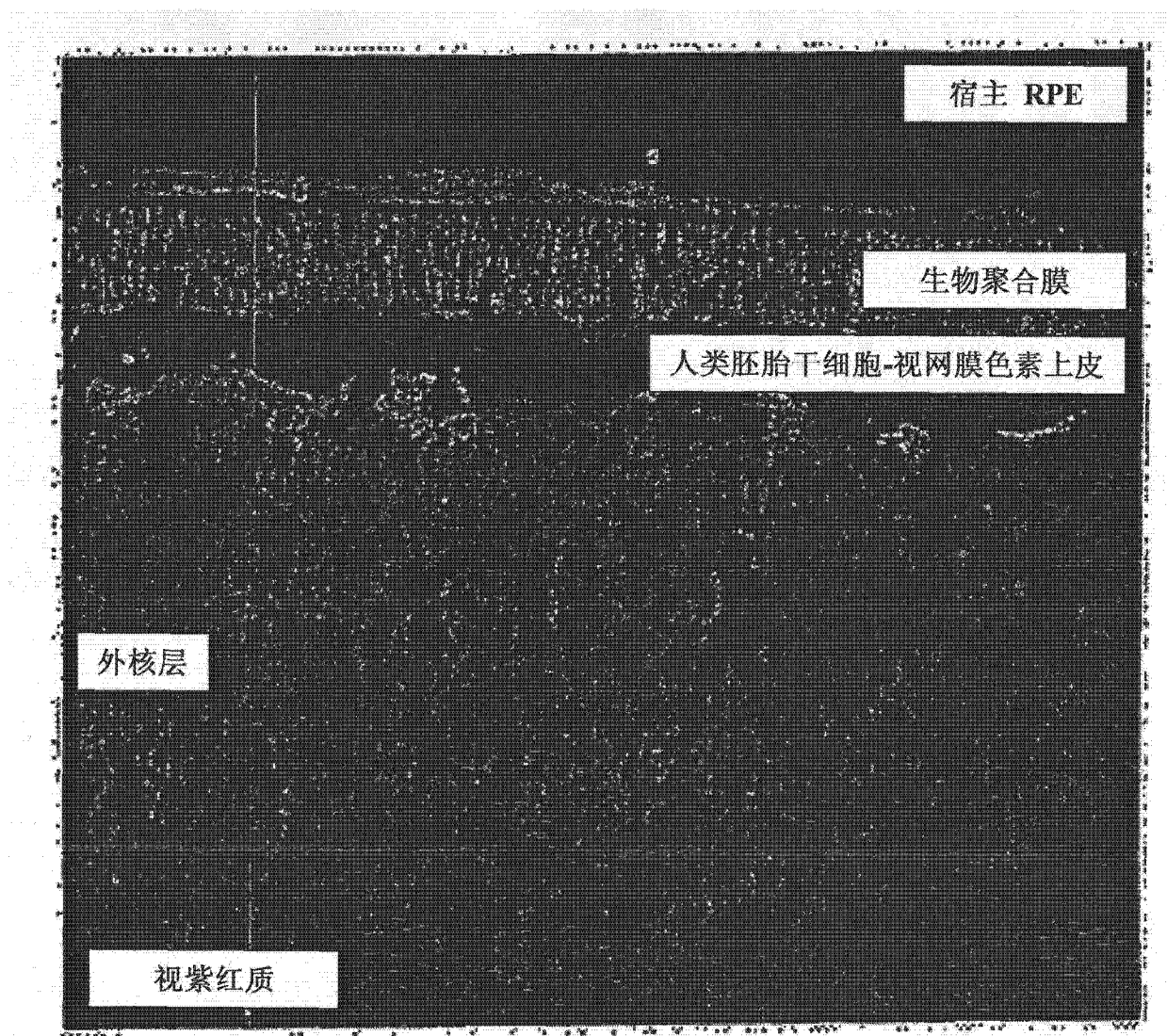


图 2A

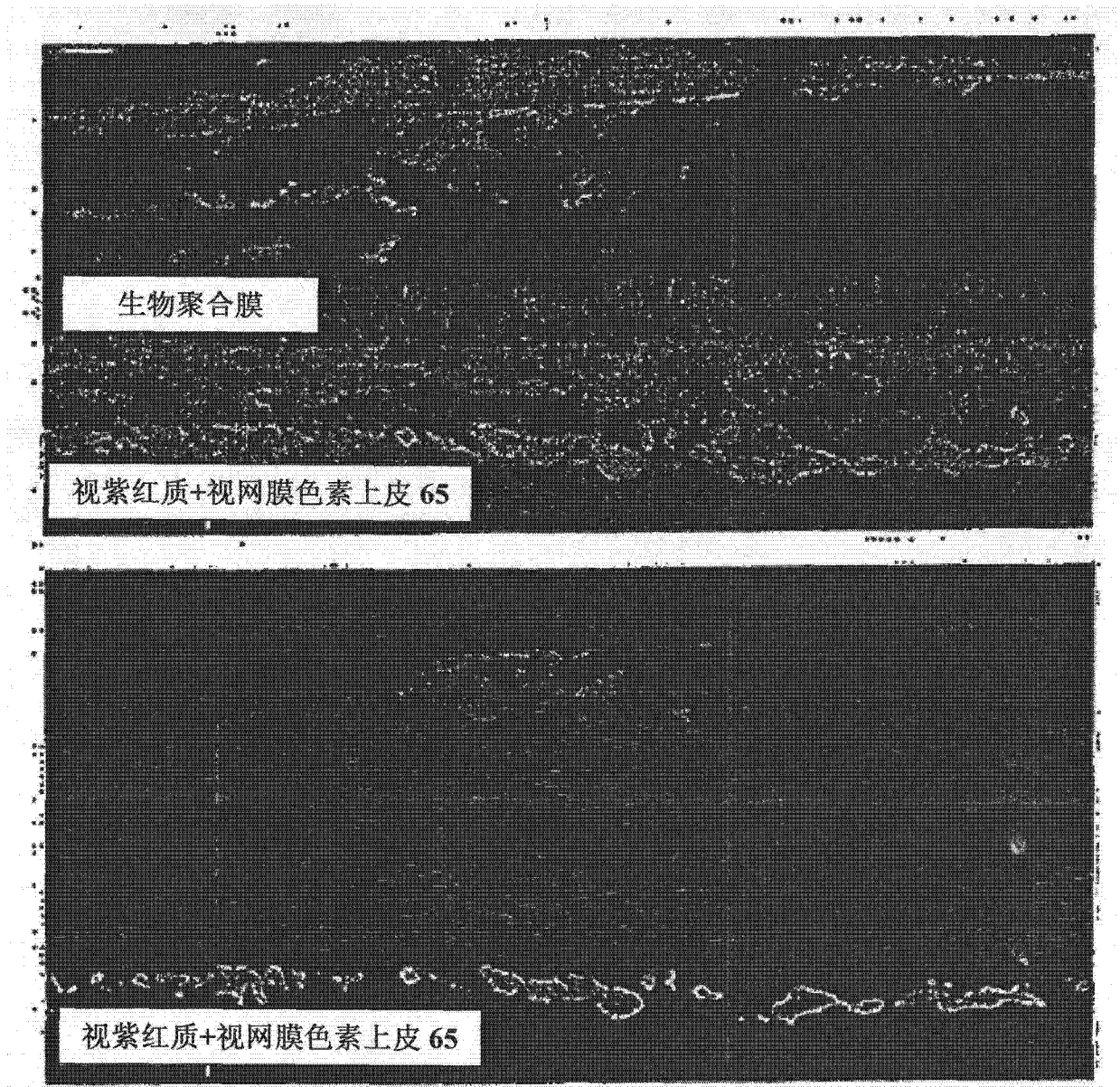


图 2B

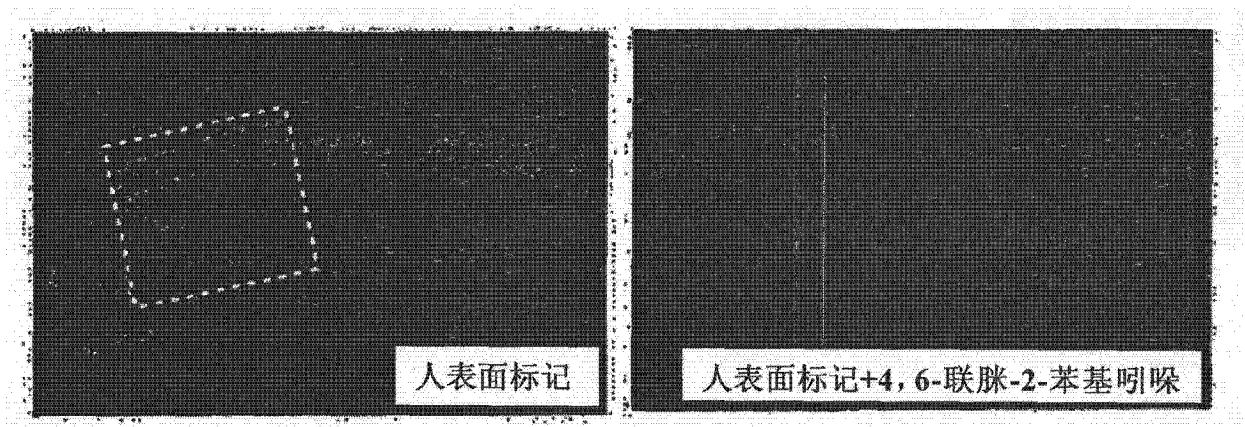


图 3A

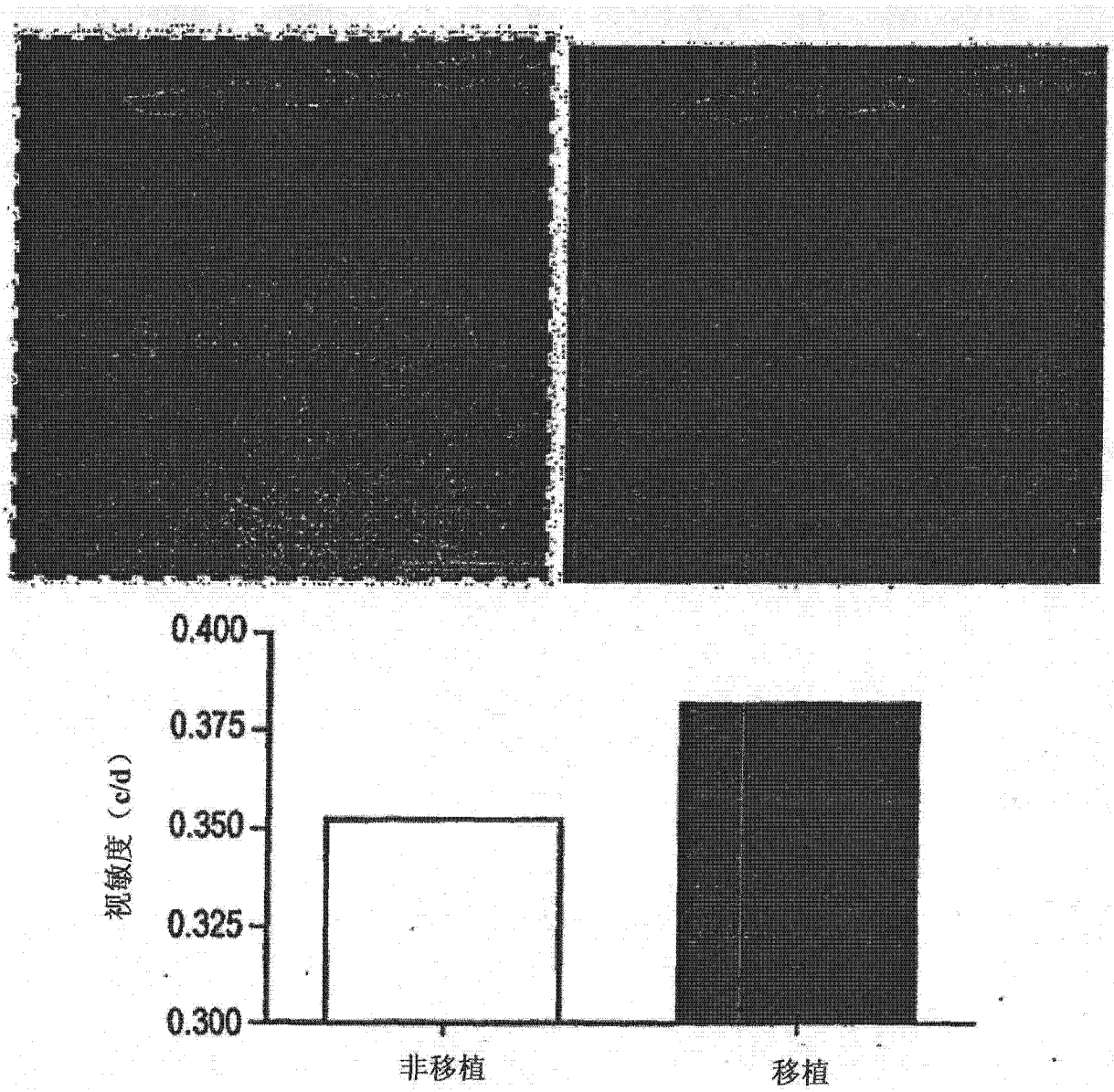


图 3B

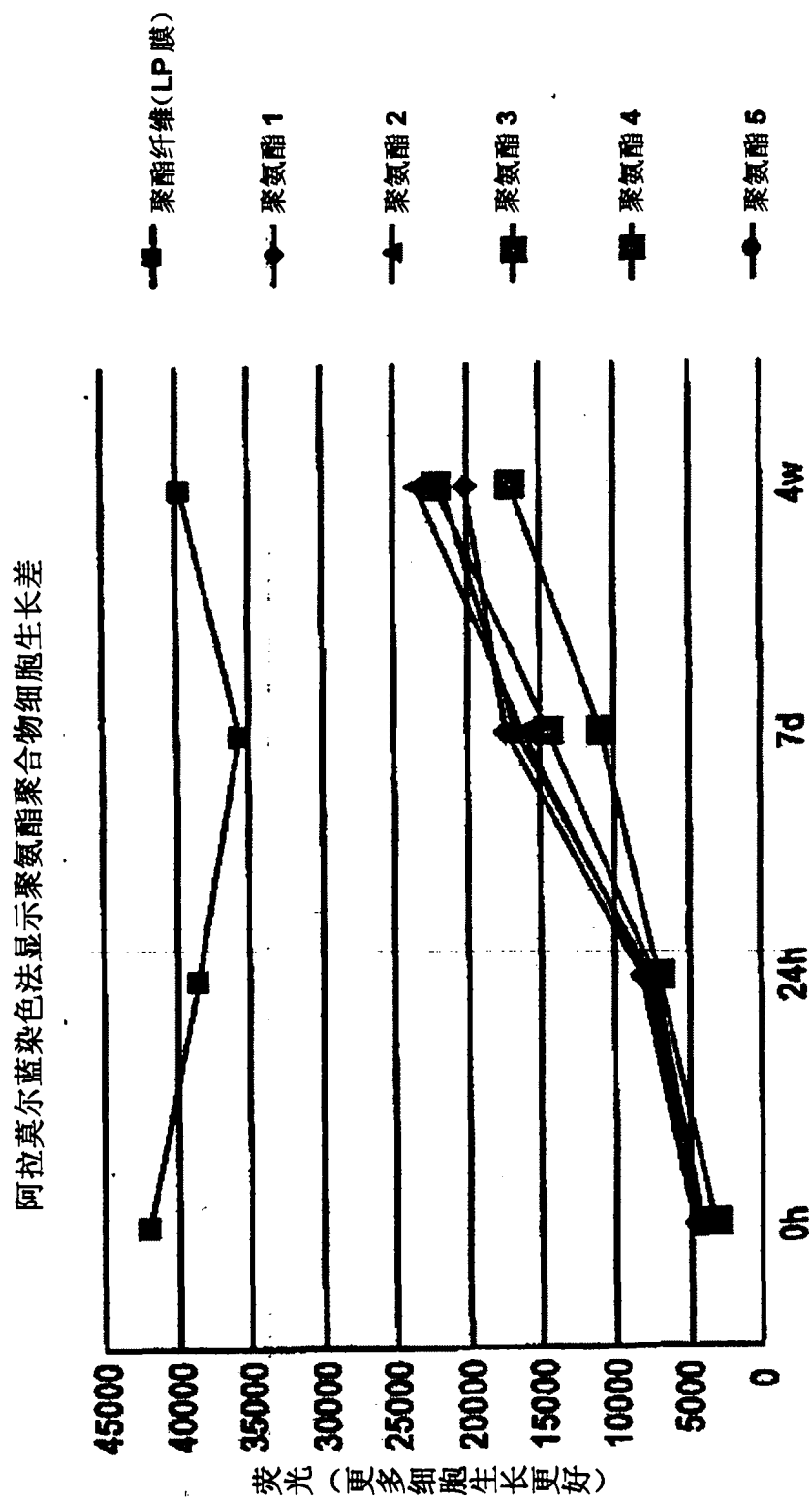


图 4