



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107427534 A

(43)申请公布日 2017. 12. 01

(21)申请号 201580076318.0

0 • 博哈纳-卡什坦 N • 内泽尔

(22)申请日 2015.04.30

C • S • 欧文

(30)优先权数据

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

62/097,753 2014.12.30 US

62/116,980 2015.02.17 US

62/116,972 2015.02.17 US

代理人 陈文平

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.08.16

(51)Int.Cl.

A61K 35/30(2015.01)

A61P 27/02(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

A61M 35/00(2006.01)

A61F 9/007(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2015/050456 2015.04.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/108219 EN 2016.07.07

(71)申请人 细胞治疗神经科学有限公司

地址 以色列耶路撒冷

(72)发明人 E • 班宁 B • E • 鲁宾奥夫

权利要求书3页 说明书24页 附图2页

(54)发明名称

治疗视网膜疾病的方法

(57)摘要

本发明公开了一种治疗具有干性年龄相关性黄斑变性(AMD)的受试者的方法。该方法包括向受试者的视网膜下施用治疗有效量的包含人RPE细胞的药物组合物,其中至少95%的细胞共表达前黑素体蛋白(PMEL17)和细胞视黄醛结合蛋白(CRALBP),其中该细胞的跨上皮细胞电阻大于100欧姆,由此治疗受试者。



1. 一种治疗具有干性年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的受试者的方法, 其包括向所述受试者的视网膜下施用治疗有效量的包含人RPE细胞的药物组合物, 其中至少95%的所述细胞共表达前黑素体蛋白 (PMEL17) 和细胞视黄醛结合蛋白 (CRALBP), 其中所述细胞的跨上皮细胞电阻大于100欧姆, 由此治疗所述受试者。

2. 一种治疗具有视网膜疾病或病症的受试者的方法, 其包括向所述受试者的视网膜中施用治疗有效量的包含人多角形RPE细胞的药物组合物, 其中至少95%的所述细胞共表达前黑素体蛋白 (PMEL17) 和细胞视黄醛结合蛋白 (CRALBP), 其中所述细胞的跨上皮细胞电阻大于100欧姆, 其中所述治疗有效量为每次施用50,000–5,000,000个细胞, 由此治疗所述受试者。

3. 一种治疗具有视网膜疾病或病症的受试者的方法, 其包括使用装置向所述受试者的视网膜中施用治疗有效量的包含人RPE细胞的药物组合物, 其中通过其施用所述细胞的所述装置的外直径在90–100 μm 之间, 由此治疗所述受试者。

4. 权利要求3所述的方法, 其中所述装置是套管。

5. 权利要求3所述的方法, 其中至少95%的所述细胞共表达前黑素体蛋白 (PMEL17) 和细胞视黄醛结合蛋白 (CRALBP), 其中所述细胞的跨上皮细胞电阻大于100欧姆。

6. 权利要求1或3所述的方法, 其中所述治疗有效量为每次施用50,000–1,000,000个细胞。

7. 权利要求2或6所述的方法, 其中所述治疗有效量选自每次施用50,000个细胞、每次施用200,000个细胞、每次施用500,000个细胞和每次施用1,000,000个细胞。

8. 权利要求1–7中任一项所述的方法, 其中将所述细胞施用到所述受试者的视网膜下腔中。

9. 权利要求1–7中任一项所述的方法, 其中所述细胞在单次施用中施用。

10. 权利要求2或7所述的方法, 其中所述药物组合物包含500个细胞/ μl –10,000个细胞/ μl 。

11. 权利要求2或7所述的方法, 其中当所述量为每次施用50,000个细胞时, 所述药物组合物包含约500–1000个细胞/ μl 。

12. 权利要求2或7所述的方法, 其中当所述量为每次施用200,000个细胞时, 所述药物组合物包含约2,000个细胞/ μl 。

13. 权利要求2或7所述的方法, 其中当所述量为每次施用500,000个细胞时, 所述药物组合物包含约5,000个细胞/ μl 。

14. 权利要求2或7所述的方法, 其中当所述量为每次施用1,000,000个细胞时, 所述药物组合物包含约10,000个细胞/ μl 。

15. 权利要求2或3所述的方法, 其中所述视网膜疾病或病症选自色素性视网膜炎、视网膜脱离、视网膜发育不良、视网膜萎缩、视网膜病变、黄斑营养不良、视锥细胞营养不良、视锥–视杆细胞营养不良、Malattia Leventinese、多英蜂窝状营养不良、眼底营养不良、模式/蝶状营养不良、Best卵黄样营养不良、北卡罗来纳营养不良、中央晕轮状脉络膜营养不良、血管样条纹、中毒性黄斑病变、斯特格氏病、病理性近视、色素性视网膜炎和黄斑变性。

16. 权利要求15所述的方法, 其中所述疾病是年龄相关性黄斑变性。

17. 权利要求16所述的方法, 其中所述年龄相关性黄斑变性是干性年龄相关性黄斑变

性。

18. 权利要求1或17所述的方法,其中所述受试者符合选自以下的标准中的至少一项:

(i) 55岁或以上;

(ii) 眼底镜检查发现在黄斑中具有地图样萎缩的干性AMD,在至少一只眼睛中大于0.5视盘面积;

(iii) 能够在受监测的麻醉下进行玻璃体视网膜外科手术;和

(iv) 不具有免疫缺陷疾病。

19. 权利要求18所述的方法,其中所述受试者不具有AMD以外的视网膜疾病。

20. 权利要求18或19中任一项所述的方法,其中所述受试者符合标准(i)-(iv)中的每一项。

21. 权利要求1或2所述的方法,其中通过其施用所述细胞的所述装置的外孔径在90-100 μm 之间。

22. 权利要求21所述的方法,其中所述装置是套管。

23. 权利要求4或22所述的方法,其中所述装置还包括针。

24. 权利要求4或22所述的方法,其中所述套管的规格为25G。

25. 权利要求1-24中任一项所述的方法,其中群体中Oct4⁺TRA-1-60⁺细胞的数量低于1:250,000。

26. 权利要求1-25中任一项所述的方法,其中如通过免疫染色测量的,至少80%的所述细胞表达卵黄状黄斑病蛋白1。

27. 权利要求1-26中任一项所述的方法,其中如通过免疫染色测量的,至少80%的所述细胞表达小眼畸形相关转录因子(MITF)。

28. 权利要求1-27中任一项所述的方法,其中如通过FACS测量的,超过80%的所述细胞表达配对盒基因6(PAX-6)。

29. 权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述细胞分泌大于500ng的色素上皮衍生因子(PEDF)/ml/天。

30. 权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述细胞以极化方式分泌PEDF和血管内皮生长因子(VEGF)。

31. 权利要求30所述的方法,其中PEDF的顶部分泌:PEDF的基底部分泌的比率大于1。

32. 权利要求31所述的方法,其中所述比率在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育8小时后保持大于1。

33. 权利要求1、2或5中任一项所述的方法,其中所述细胞的所述跨上皮细胞电阻在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育8小时后保持大于100欧姆。

34. 权利要求30或31所述的方法,其中VEGF的基底部分泌:VEGF的顶部分泌的比率大于1。

35. 权利要求34的方法,其中所述比率在2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育8小时后保持大于1。

36. 权利要求1-35中任一项所述的方法,其中所述细胞在视网膜下施用后能够挽救RCS大鼠的视敏度。

37. 权利要求1-35中任一项所述的方法,其中所述细胞在视网膜下施用后能够挽救RCS大鼠的光感受器至多180天。

38. 权利要求1-37中任一项所述的方法,其中所述细胞通过人胚胎干细胞的离体分化

产生。

39. 权利要求1-38中任一项所述的方法,其中所述细胞通过以下产生:

(a) 在包含烟酰胺的培养基中培养人胚胎干细胞或诱导多能干细胞以产生分化细胞,其中所述培养基不含激活素A;

(b) 在包含烟酰胺和激活素A的培养基中培养所述分化细胞以产生进一步朝向RPE谱系分化的细胞;和

(c) 在包含烟酰胺的培养基中培养进一步朝向RPE谱系分化的所述细胞,其中所述培养基不含激活素A。

40. 权利要求39所述的方法,其中所述胚胎干细胞或诱导多能干细胞在包含bFGF和 TGF β 的培养基中繁殖。

41. 权利要求39所述的方法,其中所述胚胎干细胞在人脐带成纤维细胞上培养。

42. 权利要求39-41中任一项所述的方法,其中步骤(a)-(c)在其中环境氧水平低于约10%的条件下进行。

43. 权利要求42所述的方法,其中所述方法还包括在步骤(a)之前,在存在烟酰胺的情况下,在其中环境氧水平大于约10%的条件下,在培养基中培养胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

44. 权利要求42或43所述的方法,其中所述方法还包括在步骤(c)之后,在存在烟酰胺的情况下,在其中环境氧水平大于约10%的条件下,在培养基中培养所述分化细胞。

治疗视网膜疾病的方法

技术领域

[0001] 本发明在其一些实施方式中涉及治疗视网膜疾病,更特别地是年龄相关性黄斑变性(AMD)的方法。

背景技术

[0002] 十多年前,hESC的获得已经引起对于通过这些细胞用作治疗性细胞的起始材料而用于再生的潜在临床用途的极大兴趣。虽然尚未批准hESC衍生的细胞用于临床应用,但多年来朝着实现这一目标已经取得显著进展。重要的进展包括对hESC的生物学的更好理解、在使其分化为各种细胞类型的能力方面的技术改进以及其在疾病特异性动物模型中的治疗效果的临床前证据。

[0003] RPE是位于神经视网膜与脉络膜毛细血管层之间的单层色素细胞。RPE特征在于顶部至基底侧的结构和功能的极性。在顶部侧,细胞与光感受器直接接触。在它们的侧壁上,它们形成紧密的、粘附的间隙连接,并且在它们的基底侧面上,它们接触下面的布鲁赫氏基底膜,该基底膜将它们与脉络膜血管分开。RPE细胞在视网膜及其光感受器的维持和功能中发挥关键作用。这些包括血-视网膜屏障的形成、杂散光的吸收、对神经视网膜的营养供应、视觉色素的再生以及脱落的光感受器外段的摄取和再循环。

[0004] RPE细胞的功能障碍、退化和丧失是AMD、Best病和色素性视网膜炎(RP)亚型的突出特征。AMD是西方世界中的视觉障碍的主要原因。在75岁以上年龄的人群中,25-30%受到年龄相关性黄斑变性(AMD)的影响,伴随进行性中心视力丧失,这导致6-8%的患者失明。视网膜变性主要涉及黄斑,其为负责精细视觉细节和色觉的视网膜中心部分。干性AMD由RPE的增生和RPE下方或布鲁赫氏膜内由代谢终产物构成的玻璃膜疣沉积的形成所引起。干性AMD可能逐渐进展到地图样萎缩(GA)的晚期阶段,具有在黄斑的大面积上RPE细胞和光感受器的退化,导致中心视力丧失。10%的干性AMD患者将进展到新生血管(湿性)AMD,其中血管通过布鲁赫氏膜生长且随后具有出现眼内渗漏和/或出血,从而加速中心视力的丧失。虽然可以用抗VEGF剂治疗并发的新生血管形成,但目前没有有效的治疗以停止RPE和光感受器退化,因而许多患者将最终失去其视力。

[0005] 在动物和人类中的移植研究都提供了将RPE细胞移植到AMD患者中的潜在治疗效果的证据。在人类中,黄斑移位到更加外周的RPE上,以及外周RPE作为RPE和脉络膜的细胞悬浮液或补片的自体移植,提供了在相对更加健康的RPE细胞上设置黄斑可以在一些AMD患者中改善视觉功能的原理论证。然而,自体移植的外科手术程序具有挑战性,并且与严重的并发症相关。通常,RPE细胞通过标准3口玻璃体切除术后的小型视网膜切开术递送到在黄斑区域中沿着在GA和更好地保持的中央凹外视网膜的区域与RPE层之间的边界产生的视网膜下腔(subretinal space)。这样的细胞置换策略在治疗AMD方面的成功取决于建立能够使移植细胞存活和发挥功能并使视网膜损伤最小化的安全递送系统。

[0006] 背景技术包括W02013/114360、W02013/074681、W02008/129554和W02013/184809、美国专利申请号62/116,972和美国专利申请号62/116,980。

发明内容

[0007] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了治疗具有干性年龄相关性黄斑变性(AMD)的受试者的方法,其包括向受试者的视网膜下(subretina)施用治疗有效量的包含人RPE细胞的药物组合物,其中至少95%的该细胞共表达前黑素体蛋白(PMEL17)和细胞视黄醛结合蛋白(CRALBP),其中细胞的跨上皮细胞电阻(trans-epithelial electrical resistance)大于100欧姆,由此治疗受试者。

[0008] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了治疗具有视网膜疾病或病症的受试者的方法,其包括向受试者的视网膜中施用治疗有效量的包含人多角形RPE细胞的药物组合物,其中至少95%的该细胞共表达前黑素体蛋白(PMEL17)和细胞视黄醛结合蛋白(CRALBP),其中细胞的跨上皮细胞电阻大于100欧姆,其中治疗有效量为每次施用50,000-5,000,000个细胞,由此治疗受试者。

[0009] 根据本发明的一些实施方式的一个方面,提供了治疗具有视网膜疾病或病症的受试者的方法,其包括使用装置向受试者的视网膜中施用治疗有效量的包含人RPE细胞的药物组合物,其中细胞通过其施用的装置的外直径在90-100 μ m之间,由此治疗受试者。

[0010] 根据本发明的一些实施方式,所述装置是套管。

[0011] 根据本发明的一些实施方式,至少95%的该细胞共表达前黑素体蛋白(PMEL17)和细胞视黄醛结合蛋白(CRALBP),其中细胞的跨上皮细胞电阻大于100欧姆。

[0012] 根据本发明的一些实施方式,治疗有效量为每次施用50,000-1,000,000个细胞。

[0013] 根据本发明的一些实施方式,治疗有效量选自每次施用50,000个细胞、每次施用200,000个细胞、每次施用500,000个细胞和每次施用1,000,000个细胞。

[0014] 根据本发明的一些实施方式,将细胞施用到受试者的视网膜下腔中。

[0015] 根据本发明的一些实施方式,细胞在单次施用中施用。

[0016] 根据本发明的一些实施方式,药物组合物包含500个细胞/ μ l-10,000个细胞/ μ l。

[0017] 根据本发明的一些实施方式,当所述量为每次施用50,000个细胞时,药物组合物包含约500-1000个细胞/ μ l。

[0018] 根据本发明的一些实施方式,当所述量为每次施用200,000个细胞时,药物组合物包含约2,000个细胞/ μ l。

[0019] 根据本发明的一些实施方式,当所述量为每次施用500,000个细胞时,药物组合物包含约5,000个细胞/ μ l。

[0020] 根据本发明的一些实施方式,当所述量为每次施用1,000,000个细胞时,药物组合物包含约10,000个细胞/ μ l。

[0021] 根据本发明的一些实施方式,视网膜疾病或病症选自色素性视网膜炎、视网膜脱离、视网膜发育不良、视网膜萎缩、视网膜病变、黄斑营养不良、视锥细胞营养不良、视锥-视杆细胞营养不良、Malattia Leventinese、多英蜂窝状营养不良、眼底营养不良(Sorsby's dystrophy)、模式/蝶状营养不良(pattern/butterfly dystrophies)、Best卵黄样营养不良、北卡罗来纳营养不良、中央晕轮状脉络膜营养不良、血管样条纹、中毒性黄斑病变、斯特格氏病、病理性近视、色素性视网膜炎和黄斑变性。

[0022] 根据本发明的一些实施方式,疾病是年龄相关性黄斑变性。

- [0023] 根据本发明的一些实施方式,年龄相关性黄斑变性是干性年龄相关性黄斑变性。
- [0024] 根据本发明的一些实施方式,受试者符合选自以下的标准中的至少一项:
- [0025] (i) 55岁或以上;
- [0026] (ii) 眼底镜检查发现在黄斑中具有地图样萎缩的干性AMD,在至少一只眼睛中大于0.5视盘面积(disc area);
- [0027] (iii) 能够在受监测的麻醉下进行玻璃体视网膜外科手术;和
- [0028] (iv) 不具有免疫缺陷疾病。
- [0029] 根据本发明的一些实施方式,受试者不具有AMD以外的视网膜疾病。
- [0030] 根据本发明的一些实施方式,受试者符合标准(i)-(iv)中的每一项。
- [0031] 根据本发明的一些实施方式,细胞通过其施用的装置的外孔在90-100 μ m之间。
- [0032] 根据本发明的一些实施方式,装置是套管。
- [0033] 根据本发明的一些实施方式,装置还包括针。
- [0034] 根据本发明的一些实施方式,套管的规格为25G。
- [0035] 根据本发明的一些实施方式,群体中Oct4⁺TRA-1-60⁺细胞的数量低于1:250,000。
- [0036] 根据本发明的一些实施方式,如通过免疫染色测量的,至少80%的细胞表达卵黄状黄斑病蛋白(Bestrophin)1。
- [0037] 根据本发明的一些实施方式,如通过免疫染色测量的,至少80%的细胞表达小眼畸形(Microphthalmia)相关转录因子(MITF)。
- [0038] 根据本发明的一些实施方式,如通过FACS测量的,超过80%的细胞表达配对盒基因6(PAX-6)。
- [0039] 根据本发明的一些实施方式,细胞分泌大于500ng色素上皮衍生因子(PEDF)/ml/天。
- [0040] 根据本发明的一些实施方式,细胞以极化方式分泌PEDF和血管内皮生长因子(VEGF)。
- [0041] 根据本发明的一些实施方式,PEDF的顶部分泌(apical secretion):PEDF的基底部分泌(basal secretion)的比率大于1。
- [0042] 根据本发明的一些实施方式,该比率在2-8℃下孵育8小时后保持大于1。
- [0043] 根据本发明的一些实施方式,细胞的跨上皮细胞电阻在2-8℃下孵育8小时后保持大于100欧姆。
- [0044] 根据本发明的一些实施方式,VEGF的基底部分泌:VEGF的顶部分泌的比率大于1。
- [0045] 根据本发明的一些实施方式,该比率在2-8℃下孵育8小时后保持大于1。
- [0046] 根据本发明的一些实施方式,细胞在RCS大鼠中视网膜下施用后能够挽救视敏度。
- [0047] 根据本发明的一些实施方式,细胞在RCS大鼠中视网膜下施用后能够挽救光感受器至多180天。
- [0048] 根据本发明的一些实施方式,细胞通过人胚胎干细胞的离体分化产生。
- [0049] 根据本发明的一些实施方式,细胞通过以下产生:
- [0050] (a) 在包含烟酰胺的培养基中培养人胚胎干细胞或诱导多能干细胞以产生分化细胞,其中培养基不含激活素A;
- [0051] (b) 在包含烟酰胺和激活素A的培养基中培养分化细胞以产生进一步朝向RPE谱系

分化的细胞;和

[0052] (c) 在包含烟酰胺的培养基中培养进一步朝向RPE谱系分化的细胞,其中培养基不含激活素A。

[0053] 根据本发明的一些实施方式,胚胎干细胞或诱导多能干细胞在包含bFGF和 TGF β 的培养基中繁殖。

[0054] 根据本发明的一些实施方式,胚胎干细胞在人脐带成纤维细胞上培养。

[0055] 根据本发明的一些实施方式,步骤(a)-(c)在其中环境氧水平低于约10%的条件下进行。

[0056] 根据本发明的一些实施方式,该方法还包括在步骤(a)之前,在存在烟酰胺的情况下,在其中环境氧水平大于约10%的条件下,在培养基中培养胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

[0057] 根据本发明的一些实施方式,该方法还包括在步骤(c)之后,在存在烟酰胺的情况下,在其中环境氧水平大于约10%的条件下,在培养基中培养分化细胞。

[0058] 除非另有规定,否则本文使用的所有技术和/或科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管类似于或等同于本文所述的那些的方法和材料可以用于本发明的实施方式的实践或测试中,但下文描述了示例性方法和/或材料。在冲突的情况下,将以本专利说明书(包括定义)为准。此外,材料、方法和实施例仅是说明性的,而非旨在必定是限制性的。

附图说明

[0059] 本文仅通过示例的方式参照附图描述本发明的一些实施方式。现在具体参考附图,应当强调的是,所示细节是作为示例并且是出于说明性地讨论本发明的实施方式的目的。在这方面,结合附图的描述使得对于本领域技术人员而言可以如何实施本发明的实施方式是显而易见的。

[0060] 在附图中:

[0061] 图1是视网膜下注射方案的示意图。注意在该图中,手术口的设置在解剖学上不是精确的(Stout和Francis,2011,Human Gene Ther.2011年5月,22(5):531-5)。

[0062] 图2A-C是说明递送和加载配制细胞的装置的组装的照片。A.连接至18G钝头填充针的注射器。B.用延长管代替18G钝头填充针。C.组装的递送装置。

具体实施方式

[0063] 本发明在其一些实施方式中涉及治疗视网膜疾病,更特别地是年龄相关性黄斑变性(AMD)的方法。

[0064] 在详细说明本发明的至少一个实施方式之前,应当理解,本发明在其应用中不一定限于下文说明书中阐述的或实施例中例示的细节。本发明能够具有其他实施方式或以各种方式实施或执行。

[0065] AMD是中心视网膜的进行性慢性疾病,并且是世界范围内的视力丧失的主要原因。由于以下两种进程之一,大多数视力丧失发生在该疾病的晚期阶段:新生血管(“湿性”)AMD和地图样萎缩(GA,“干性”)。在新生血管性年龄相关性黄斑变性中,脉络膜新血管生成突破

至RPE下或视网膜下腔,从而渗漏液体、脂质和血液并导致纤维性瘢痕形成。在GA中,出现了视网膜色素上皮细胞、脉络膜毛细血管层和光感受器的进行性萎缩。干性AMD更为常见(占所有病例的85-90%),但可能进展到“湿”性,其如果不经治疗,则导致快速和严重的视力丧失。

[0066] AMD在美国和其他发达国家中的估计患病率为2000人中1人。该流行率预期与普通人群中的老年人的比例一起增加。该疾病的风险因素包括环境和遗传因素二者。

[0067] 该疾病的发病机制涉及四种功能相关组织(即视网膜色素上皮(RPE)、布鲁赫氏膜、脉络膜毛细血管层和光感受器)的异常。然而,RPE细胞功能的受损是导致临床相关的AMD变化的分子途径中的早期和关键事件。

[0068] 目前对于干性AMD没有有效或获批的疗法。预防措施包括维生素/矿物质补充剂。这些降低了发生湿性AMD的风险,但不影响出现地图样萎缩的进展。

[0069] 目前,具有约二十种处于临床开发的各个阶段中的疗法。其中包括补体系统抑制剂和皮质类固醇、视觉周期调节剂、抗氧化剂、神经保护剂、血管增强剂以及细胞和基因疗法-参见例如Dugel等,2014,Retina Today,第70-72页;和Patel等,2015,Practical Retina,2015年1月,Vol.46,No.1,第8-13页。

[0070] 已经提议人胚胎干细胞作为产生RPE细胞的细胞来源。已经使用两种一般途径从hESC获得RPE细胞:自发分化和定向分化。在自发分化中,允许扁平集落或类胚体(EB)中的hESC自发分化成含有色素性RPE细胞的细胞群。定向分化方法使用许多因素来驱动hESC到RPE细胞的分化,参见例如WO2008/129554。

[0071] 本发明人现在已经发现用PRE细胞进行临床治疗的最佳条件,包括剂量和治疗方案以及用于递送细胞的装置。本发明还提供了将通过用细胞进行治疗而获得益处的患者群体的选择标准。

[0072] 因此,根据本发明的一个方面,提供了治疗具有视网膜疾病(例如干性年龄相关性黄斑变性(AMD))的受试者的方法,其包括向受试者的视网膜下施用治疗有效量的包含人RPE细胞的药物组合物,其中至少95%的该细胞共表达前黑素体蛋白(PMEL17)和细胞视黄醛结合蛋白(CRALBP),其中细胞的跨上皮细胞电阻大于100欧姆,由此治疗受试者。

[0073] 药物组合物用作治疗剂的眼睛病症包括但不限于总体与视网膜功能障碍、视网膜损伤和/或视网膜色素上皮的损失相关的视网膜疾病或紊乱。根据本发明可以治疗的病症的非限制性列表包括色素性视网膜炎、利伯先天性黑朦、遗传性或获得性黄斑变性、年龄相关性黄斑变性(AMD)、Best病、视网膜脱离、回旋状萎缩、无脉络膜症、模式营养不良以及其它RPE的营养不良、斯特格氏病,由光性、激光、炎症、感染、辐射、新生血管或创伤性损伤中的任一种引起的伤害所导致的RPE和视网膜损害。

[0074] 根据一个特别实施方式,疾病是干性年龄相关性黄斑变性。

[0075] 可以治疗的受试者包括灵长类(包括人类)、犬科动物、猫科动物、有蹄类动物(例如马科动物、牛科动物、猪类动物(swine)(例如猪))、鸟类和其他受试者。人类和具有商业重要性的非人类动物(例如,牲畜和家养动物)特别令人感兴趣。可以治疗的示例性哺乳动物包括犬科动物;猫科动物;马科动物;牛科动物;绵羊类动物;啮齿动物等及灵长类,特别是人类。非人动物模型,特别是哺乳动物,例如,灵长类、鼠科动物、兔形目动物等可用于实验研究。

[0076] 根据一个实施方式,被治疗的受试者年龄为55岁或以上。

[0077] 根据另一个实施方式,被治疗的受试者的眼底镜检查发现在黄斑中具有地图样萎缩的干性AMD,在至少一只眼睛中大于0.5视盘面积(1.25mm^2 ,并且至多 17mm^2)。

[0078] 根据又一个实施方式,被治疗的受试者处于使得他能够在受监测的麻醉下进行玻璃体视网膜外科手术的状态。

[0079] 根据又一个实施方式,受试者不具有免疫缺陷疾病。

[0080] 根据又一个实施方式,受试者不具有大于-6屈光度的轴向近视。

[0081] 根据又一个实施方式,受试者不具有视网膜脱离修复的历史。

[0082] 根据又一个实施方式,受试者不具有AMD以外的视网膜疾病。

[0083] 优选地,被治疗的受试者符合上述标准中的至少一项、两项、三项、四项、五项、六项或所有。

[0084] 如本文所述产生的RPE细胞可以移植到受试者眼睛内的各种靶位点。根据一个实施方式,RPE细胞是移植到眼睛的视网膜下腔,其是RPE的正常解剖学位置(在光感受器外段与脉络膜之间)。此外,取决于细胞的迁移能力和/或积极旁分泌作用,可以考虑移植到另外的眼部区室中,包括玻璃体腔、内部或外部视网膜、视网膜周边和脉络膜内。

[0085] 可以施用于受试者的活细胞的数量通常在每次注射 $50,000$ – 5×10^6 之间、 $50,000$ – 4×10^6 之间、 $50,000$ – 3×10^6 之间、 $50,000$ – 2×10^6 之间、 $50,000$ – 1×10^6 之间、 $50,000$ – $500,000$ 之间。

[0086] 本发明考虑单次施用或多次施用。优选地,第一次施用于眼睛和第二次施用于同一眼睛之间的时间为至少一个月。

[0087] 根据一个具体实施方式,受试者的每只眼睛可以施用的活细胞的数量在 $50,000$ – 2×10^6 之间、 $50,000$ – 1×10^6 之间、 $50,000$ – $500,000$ 之间。示例性剂量包括每只眼睛 $50,000$ 个细胞、每只眼睛 $100,000$ 个细胞、每只眼睛 $200,000$ 个细胞、每只眼睛 $300,000$ 个细胞、每只眼睛 $400,000$ 个细胞、每只眼睛 $500,000$ 个细胞和每只眼睛 1×10^6 个细胞。

[0088] 细胞通常配制在载体(例如等渗溶液和/或盐水)如BSS plus™中。载体可以任选地包含支持RPE植入、整合、存活、效力等的另外的因子。

[0089] 包含 $50,000$ 个细胞的药物组合物的示例性浓度为约 500 个细胞/ μl 或 $1,000$ 个细胞/ μl 。包含 $200,000$ 个活细胞的药物组合物的示例性浓度为约 500 个活细胞/ μl 或 $1,000$ 个活细胞/ μl 。包含 $500,000$ 个细胞的药物组合物的示例性浓度为约 $5,000$ 个活细胞/ μl 或约 $10,000$ 个活细胞/ μl 。包含 1×10^6 个细胞的药物组合物的示例性浓度为约 $10,000$ 个活细胞/ μl 。

[0090] 移植可以通过本领域已知的各种技术进行。用于进行RPE移植的方法描述于例如美国专利号 $5,962,027$ 、 $6,045,791$ 和 $5,941,250$ 中以及Eye Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol,1997年3月;235(3):149–58;Biochem Biophys Res Commun,2000年2月24日;268(3):842–6;Ophthalmic Surg,1991年2月;22(2):102–8中。用于进行角膜移植的方法描述于例如美国专利号 $5,755,785$ 中以及Eye 1995;9(Pt 6Su):6–12;Curr Opin Ophthalmol,1992年8月;3(4):473–81;Ophthalmic Surg Lasers,1998年4月;29(4):305–8;Ophthalmology,2000年4月;107(4):719–24;和Jpn J Ophthalmol,1999年11–12月;43(6):502–8中。如果主要利用旁分泌作用,则细胞也可以包封在半渗透性容器内被递送并保持在

眼睛中,这也将减少细胞暴露于宿主免疫系统(Neurotech USA CNTF delivery system; PNAS,2006年3月7日,vol.103(10)3896-3901)。

[0091] 施用步骤可以包括将RPE细胞眼内施用到有需要的眼睛中。眼内施用可以包括将RPE细胞注射到视网膜下腔中。

[0092] 根据一个实施方式,移植通过扁平部玻璃体切除手术,然后将细胞经小的视网膜开口递送到视网膜下腔中进行,或者通过直接注射进行。

[0093] RPE细胞可以以各种形式移植。例如,RPE细胞可以以细胞悬浮液的形式引入到靶位点中,细胞悬浮液具有基质或粘附到基质或膜、细胞外基质或基底如可生物降解聚合物或组合上。RPE细胞也可以与其他视网膜细胞(如与光感受器)一起移植(共移植)。

[0094] 根据一个特别实施方式,将水性溶液(例如等渗溶液和/或盐水)或空气施用到视网膜下腔中,由此形成初始的泡(bleb)。然后将作为悬浮液或在支架上的RPE细胞施用到同一视网膜下腔中。注射可以是通过针或注射套管。

[0095] 根据一个特别实施方式,使用外直径在90-100 μ m之间的递送装置(例如针或注射套管)递送作为细胞悬浮液的细胞。根据另一个实施方式,使用内孔直径在65-75 μ m之间的递送装置(例如针或注射套管)递送作为细胞悬浮液的细胞。

[0096] 根据本发明的这个方面的实施方式,使用18G针将在70,000- 1.4×10^6 个活细胞/100 μ l浓度的最终制剂中的RPE细胞装载到递送装置(例如1mL注射器)中(70,000个细胞是装载用于50,000的剂量,700,000个细胞是装载用于500,000的剂量,且 1.4×10^6 个细胞是装载用于 1×10^6 的剂量)。然后可以用延长管(例如5-10cm之间)替换18G针,并且通过延长管去除空气。然后可以将具有外直径在90-100 μ m之间的尖端(例如41G)的注射套管附接到延长管的末端。根据另一个实施方式,尖端的孔的内直径为约65-75 μ m(例如约70 μ m)。

[0097] 装载到针或注射套管中时,RPE细胞的浓度可以在约2,000个活细胞/ μ l和约14,000个活细胞/ μ l之间。从针或注射套管递送的活RPE细胞的浓度可以在约1,000个活细胞/ μ l和约10,000个活细胞/ μ l之间。

[0098] 根据一个特别实施方式,套管包括41G尖端(如由Peregrine制造的实例)。根据又一个实施方式,套管是25G套管。

[0099] 本发明提供包括18G针和25G/41G套管的制品。这样的装置可用于RPE细胞的摄取和RPE细胞的后续眼内施用。

[0100] 该装置还可包括延长管(例如约5和15cm之间)和注射器(例如1-2mL注射器)。

[0101] 根据另一个方面,提供了包括25G/41G套管、注射器(例如1-2mL注射器)和延长管(例如约5和15cm之间)的制品。该制品还可包括18G针。

[0102] 治疗的有效性可以通过视觉和眼部功能和结构的不同测量来评估,包括尤其是最佳矫正视力(BCVA),如通过在暗和光适应状态下的视野测量或微视野检查所测量的视网膜对光的敏感性,全视野、多焦点、焦点或图形视网膜电图(ERG),对比敏感度,阅读速度,色觉,临床生物显微镜检查,眼底照相,光学相干断层扫描(OCT),眼底自发荧光(FAF),红外和多色成像,荧光素或ICG血管造影术,以及用于评估视力功能和眼部结构的另外的手段。

[0103] 受试者可以在施用RPE细胞之前或同时施用皮质类固醇,例如泼尼松龙或甲泼尼龙、百力特(Predforte)。

[0104] 根据另一个实施方式,受试者在施用RPE细胞之前或同时不施用皮质类固醇,例如

泼尼松龙或甲泼尼龙、百力特。

[0105] 免疫抑制药物可以在治疗之前、同时和/或之后施用于受试者。

[0106] 免疫抑制药物可以属于以下类别：

[0107] 糖皮质激素、细胞生长抑制剂(例如烷化剂或抗代谢物)、抗体(多克隆或单克隆)、作用于免疫亲和素的药物(例如环孢素、他克莫司或西罗莫司)。另外的药物包括干扰素、阿片类、TNF结合蛋白、麦考酚酯和小的生物药剂。

[0108] 免疫抑制药物的实例包括：间充质干细胞、抗淋巴细胞球蛋白(ALG)多克隆抗体、抗胸腺细胞球蛋白(ATG)多克隆抗体、硫唑嘌呤、BAS1 **L1X1MAB®** (抗-IL-2Ra受体抗体)、环孢菌素(环孢菌素A)、**DACLIZUMAB®** (抗-IL-2Ra受体抗体)、依维莫司、霉酚酸、**RITUX1MAB®** (抗CD20抗体)、西罗莫司、他克莫司、大环哌喃和/或麦考酚酯。

[0109] 抗生素可以在治疗之前、同时和/或之后施用于受试者。抗生素的实例包括Oflox、庆大霉素、氯霉素、Tobrex、Vigamox或任何其他批准用于眼部使用的局部抗生素制剂。

[0110] 当上下文允许时可以互换使用的“视网膜色素上皮细胞”、“RPE细胞”、“RPE”是指功能上类似于形成视网膜的色素上皮细胞层的天然RPE细胞的细胞类型的细胞(例如在移植到在眼内时,它们表现出与天然RPE细胞相似的功能活性)。因此,根据本公开,术语“视网膜色素上皮细胞”、“RPE细胞”或“RPE”可以用于指视网膜色素层的天然RPE细胞和直接从人干细胞(hSC)分化的RPE细胞二者。

[0111] 术语“hSC衍生的RPE细胞”在本文中用于表示通过从hSC定向分化获得的RPE细胞。根据一个优选实施方式,hSC衍生的RPE细胞是如通过下文定义的参数所表现的功能性RPE细胞。术语“定向分化”与术语“RPE诱导分化”可互换使用并且被理解为意指在诱导/促进分化为RPE细胞类型的培养条件下操纵hSC的过程。

[0112] 根据一个特别实施方式,RPE细胞通过在TGFβ超家族的一个或多个成员的存在下hSC的定向分化而获得,并且表现出以下特征中的至少一个：

[0113] -在分化期间,培养的细胞响应TGFβ信号传导；

[0114] -RPE细胞表达指示终末分化的标志物,例如卵黄状黄斑病蛋白1、CRALBP和/或RPE65；

[0115] -在移植后(即原位),RPE细胞表现出支持与RPE细胞相邻的光感受器的营养作用；

[0116] -另外,作为这些光感受器的正常更新过程的部分,RPE细胞能够原位地通过吞噬脱落的光感受器外段发挥作用；

[0117] 另外,RPE细胞能够原位地产生视网膜屏障并且在视觉周期中起作用。

[0118] 如本文所用的,短语“干细胞”是指能够在培养物中延长的时间段内保持未分化状态(例如多能或多潜能干细胞)直至被诱导分化为具有特定、专门功能的其它细胞类型(例如,完全分化的细胞)的细胞。优选地,短语“干细胞”包括胚胎干细胞(ESC)、诱导多能干细胞(iPSC)、成体干细胞、间充质干细胞和造血干细胞。

[0119] 根据一个特别实施方式,从ESC产生RPE细胞。

[0120] 短语“胚胎干细胞”是指能够分化为所有三个胚胎胚层(即内胚层、外胚层和中胚层)的细胞或保持未分化状态的胚胎细胞。短语“胚胎干细胞”可以包括从在怀孕之后(例如胚胎)、植入胚胎之前(即,植入前胚胎)形成的胚胎组织获得的细胞,从植入后/原肠胚形成前阶段胚胎获得的扩展胚胎细胞(EBC)(参见W02006/040763),以及在妊娠期间的任何时

间,优选在妊娠第10周之前从胎儿的生殖器组织获得的胚胎生殖(EG)细胞。本发明的一些实施方式的胚胎干细胞可以使用公知的细胞培养方法获得。例如,人胚胎干细胞可以从人胚泡分离。人胚泡通常从人体内植入前胚胎或从体外受精(IVF)胚胎获得。或者,单细胞人胚胎可以扩展到胚泡阶段。为了分离人ES细胞,从胚泡中去除透明带,并通过其中将滋养外胚层细胞裂解并通过温和吸打从完整内细胞团(ICM)除去的程序分离ICM。然后将ICM接种在含有使其能够长出的适当培养基的组织培养瓶中。在9至15天之后,通过机械解离或通过酶促降解将ICM衍生的生长物解离成团块,然后将细胞再接种在新鲜组织培养基上。通过微量移液管单独选择显示未分化形态的集落,将其机械解离成团并再接种。然后每4-7天常规分割所得ES细胞。关于制备人ES细胞的方法的进一步细节参见Reubinoff等, *Nat Biotechnol*, 2000年5月:18(5):559; Thomson等, [美国专利号5,843,780; *Science* 282:1145, 1998; *Curr. Top. Dev. Biol.* 38:133, 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844, 1995]; Bongso等, [*Hum Reprod* 4:706, 1989]; 和Gardner等, [*Fertil. Steril.* 69:84, 1998]。

[0121] 将理解,根据本发明的一些实施方式,市售干细胞也可以使用。人ES细胞可以从NIH人胚胎干细胞注册处购买[Hypertext Transfer Protocol://grants(dot)nih(dot)gov/stem_cells/registry/current(dot)htm]。市售胚胎干细胞系的非限制性实例是HAD-C102、ESI、BG01、BG02、BG03、BG04、CY12、CY30、CY92、CY10、TE03、TE32、CHB-4、CHB-5、CHB-6、CHB-8、CHB-9、CHB-10、CHB-11、CHB-12、HUES 1、HUES 2、HUES 3、HUES 4、HUES 5、HUES 6、HUES 7、HUES 8、HUES 9、HUES 10、HUES 11、HUES 12、HUES 13、HUES 14、HUES 15、HUES 16、HUES 17、HUES 18、HUES 19、HUES 20、HUES 21、HUES 22、HUES 23、HUES 24、HUES 25、HUES 26、HUES 27、HUES 28、CyT49、RUES3、WA01、UCSF4、NYUES1、NYUES2、NYUES3、NYUES4、NYUES5、NYUES6、NYUES7、UCLA 1、UCLA 2、UCLA 3、WA077 (H7)、WA09 (H9)、WA13 (H13)、WA14 (H14)、HUES 62、HUES 63、HUES 64、CT1、CT2、CT3、CT4、MA135、Eneavour-2、WIBR1、WIBR2、WIBR3、WIBR4、WIBR5、WIBR6、HUES 45、Shef 3、Shef 6、BJNhem19、BJNhem20、SA001、SA001。

[0122] 根据一个具体实施方式,胚胎干细胞系是HAD-C102或ESI。

[0123] 此外,ES细胞也可以从其他物种获得,包括小鼠(Mills和Bradley, 2001)、金仓鼠[Doetschman等, 1988, *Dev Biol.* 127:224-7]、大鼠[Iannaccone等, 1994, *Dev Biol.* 163:288-92]、兔[Giles等, 1993, *Mol Reprod Dev.* 36:130-8; Graves&Moreadith, 1993, *Mol Reprod Dev.* 1993, 36:424-33]、多种家畜物种[Notarianni等, 1991, *J Reprod Fertil Suppl.* 43:255-60; Wheeler, 1994, *Reprod Fertil Dev.* 6:563-8; Mitalipova等, 2001, *Cloning.* 3:59-67]和非人类灵长类物种(猕猴和狨猴)[Thomson等, 1995, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7844-8; Thomson等, 1996, *Biol Reprod.* 55:254-9]。

[0124] 扩展胚泡细胞(EBC)可以在原肠胚形成之前的阶段,从受精后至少9天的胚泡获得。在培养胚泡之前,透明带被消化[例如通过Tyrode酸性溶液(Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)]以暴露内细胞团。然后在体外使用标准胚胎干细胞培养方法将胚泡作为全胚胎培养受精后至少9天并且不超过14天(即,在原肠胚形成事件之前)。

[0125] Chung等, *Cell Stem Cell*, Volume 2, Issue 2, 113-117, 2008年2月7日中描述了另一种用于制备ES细胞的方法。该方法包括在体外受精过程中从胚胎移除单个细胞。胚胎在该过程中不被破坏。

[0126] 又一种用于制备ES细胞的方法是通过单性生殖。胚胎在该过程中也没有被破坏。

[0127] 目前实践的ES培养方法主要基于使用分泌干细胞增殖所需要的因子而同时抑制其分化的饲养细胞层。示例性的饲养层包括人胚胎成纤维细胞、成体输卵管上皮细胞、原代小鼠胚胎成纤维细胞(PMEF)、小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)、小鼠胎儿成纤维细胞(MFF)、人胚胎成纤维细胞(HEF)、从人胚胎干细胞的分化获得的人成纤维细胞、人胎儿肌细胞(HFM)、人胎儿皮肤细胞(HFS)、人成体皮肤细胞、人包皮成纤维细胞(HFF)、从脐带或胎盘获得的人成纤维细胞,以及人骨髓基质细胞(hMSC)。可以将生长因子添加到培养基中以使ESC维持在未分化状态。这样的生长因子包括bFGF和/或TGFβ。

[0128] 无饲养细胞系统也已经用于ES细胞培养,这样的系统利用补充有血清替代物、细胞因子、IL6、可溶性IL6受体嵌合体和/或生长因子的基质作为饲养细胞层的替代物。干细胞可以在培养基的存在下在固体表面例如细胞外基质(例如,Matrigel^{RTM}或层粘连蛋白)上生长。不同于需要饲养细胞和干细胞的同时生长并且可能导致混合细胞群体的基于饲养细胞的培养物,生长在无饲养细胞的系统上的干细胞容易从表面分离。用于生长干细胞的培养基含有有效抑制分化并促进其生长的因子,例如MEF条件培养基和bFGF。然而,常用的无饲养细胞培养系统利用补充有小鼠或牛血清,或MEF条件培养基的基于动物的基质(例如Matrigel^{RTM}) [Xu C等(2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 19:971-4],其呈现动物病原体交叉转移到人ES细胞的风险,因此危及未来的临床应用。

[0129] 已知有许多方法使ESC朝向RPE谱系分化,并且包括诸如WO2008/129554、2013/184809中描述的那些的定向分化方案和诸如美国专利号8,268,303和美国专利申请20130196369中描述的那些的自发分化方案二者,其各自内容通过引用并入。

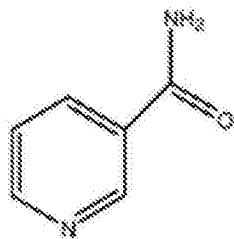
[0130] 根据一个特别实施方式,使用定向分化方案从ESC细胞产生RPE细胞。

[0131] 在一个示例性的分化方案中,使用第一分化剂使胚胎干细胞朝向RPE细胞谱系分化,然后使用转化生长因子-β(TGFβ)超家族的成员(例如,TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3亚型、以及同源配体,包括激活素(例如激活素A、激活素B和激活素AB)、结节、抗缪勒氏管激素(AMH)、一些骨形态发生蛋白(BMP),例如BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6和BMP7,以及生长和分化因子(GDF))使其进一步朝向RPE细胞分化。根据一个具体实施方式,转化生长因子-β(TGFβ)超家族的成员是激活素A,例如20-200ng/ml之间,例如100-180ng/ml。

[0132] 根据一个特别实施方式,第一分化剂是烟酰胺(NA),例如1-100mM、5-50mM、5-20mM之间,例如10mM。

[0133] NA,也称为“尼克酰胺”,是被认为保留和改善β细胞功能的维生素B3(烟酸)的酰胺衍生物形式。NA具有化学式C₆H₆N₂O。NA对于生长和将食物转化为能量是必不可少的,并且已经用于关节炎治疗以及糖尿病治疗和预防。

[0134]



烟酰胺 (NA)

[0135] 在本公开的上下文中,术语NA还表示NA的衍生物和烟酰胺模拟物。如本文所用的

术语“烟酰胺 (NA) 的衍生物”表示作为天然NA的化学修饰衍生物的化合物。化学修饰可以包括例如基本NA结构的吡啶环上的取代 (经由环的碳或氮成员), 经由酰胺部分的氮或氧原子, 以及删除或替换基团, 例如以形成NA的硫代苯甲酰胺类似物, 所有这些都是在有机化学中的熟练人员所理解的。本发明的情况中的衍生物还包括NA的核苷衍生物 (例如烟酰胺腺嘌呤)。描述了NA的各种衍生物, 一些也与PDE4酶的抑制活性有关 (W003/068233; W002/060875; GB2327675A), 或作为VEGF-受体酪氨酸激酶抑制剂 (W001/55114)。例如, 制备4-芳基-烟酰胺衍生物的方法 (W005/014549)。

[0136] 烟酰胺模拟物可以在培养基中代替烟酰胺。烟酰胺模拟物包括重现烟酰胺在RPE细胞从多能细胞分化和成熟的方面的作用的任何化合物。

[0137] 烟酰胺模拟物包括烟酰胺的修饰形式和烟酰胺的化学类似物。示例性烟酰胺模拟物包括苯甲酸、3-氨基苯甲酸和6-氨基烟酰胺。可以用作烟酰胺模拟物的另一类化合物是聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 的抑制剂。示例性PARP抑制剂包括3-氨基苯甲酰胺、依尼帕尼 (Iniparib) (BSI 201)、奥拉帕尼 (AZD-2281)、Rucaparib (AG014699, PF-01367338)、维利帕尼 (Veliparib) (ABT-888)、CEP 9722、MK 4827和BMN-673。

[0138] 根据一个特别实施方式, 分化如下进行:

[0139] a) 在包含第一分化剂 (例如烟酰胺) 的培养基中培养ESC; 和

[0140] b) 在包含TGFβ超家族成员 (例如激活素A) 和第一分化剂 (例如烟酰胺) 的培养基中培养从步骤a) 获得的细胞。

[0141] 优选地, 在不存在TGFβ超家族成员的情况下进行步骤 (a)。

[0142] 可以通过在包含第一分化剂 (例如烟酰胺), 但不含TGFβ超家族成员 (例如激活素A) 的培养基中培养步骤b) 中获得的细胞而继续上述方案。该步骤在本文中称为步骤 (c)。

[0143] 现在采用另外的实施方式更详细地描述上述方案。

[0144] 步骤 (a): 一旦获得足够数量的ESC, 分化过程就开始。它们通常被从粘附细胞培养物除去 (例如通过使用胶原酶A、分散酶、TrypLE选择、EDTA) 并在存在烟酰胺的情况下 (并且在不存在激活素A的情况下) 接种到非粘附基质 (例如细胞培养板) 上。一旦将细胞铺板到非粘附基质 (例如细胞培养板) 上, 细胞培养物可被称为细胞悬浮液, 优选悬浮培养物中的自由漂浮簇, 即源自人胚胎干细胞 (hESC) 的细胞的聚集体。自由漂浮干细胞的来源先前在W006/070370中描述, 其全部内容通过引用并入本文。该阶段可以进行最少1天, 更优选2天、3天、1周或甚至10天。优选地, 细胞与烟酰胺一起 (并且在不存在激活素的情况下) 在悬浮液中培养不超过2周。

[0145] 根据一个优选实施方式, 当细胞在非粘附基质例如细胞培养板上培养时, 操控环境氧条件使得百分比小于约20%、15%、10%, 更优选小于约9%、小于约8%、小于约7%、小于约6%且更优选约5%。

[0146] 根据一个特别实施方式, 细胞最初在正常环境氧条件下在非粘附基质上培养, 然后降低至低于正常环境氧条件。

[0147] 非粘附基质的实例包括但不限于纤连蛋白、层粘连蛋白、聚D-赖氨酸和明胶。

[0148] 非粘附细胞培养板的实例包括由Hydrocell (例如产品编号174912)、Nunc等制造的那些。

[0149] 步骤 (b): 在定向分化的第一阶段 (步骤a; 即, 在低或正常环境氧条件下, 在非粘附

培养条件下,在存在烟酰胺的情况下(例如10mM)培养)之后,接着使半分化细胞在粘附基质上经历进一步的分化阶段——在存在烟酰胺(例如10mM)和激活素A(例如140ng/ml、150ng/ml、160ng/ml或180ng/ml)的情况下培养。该阶段可以进行至少一天、至少两天、至少三天、至少5天、至少一周、至少两周、至少三周、至少四周、至少五周、至少六周、至少七周、至少八周、至少九周、至少十周。优选地,该阶段进行约两周。如上文详述的,该分化阶段可以在低或正常环境氧条件下进行。

[0150] 步骤(c):在定向分化的第二阶段(即,在粘附基质上,在存在烟酰胺和激活素A的情况下培养;步骤(b))之后,任选地使进一步分化的细胞在粘附基质上经历后续分化阶段——在不存在激活素A的情况下,在存在烟酰胺(例如10mM)的情况下培养。该阶段可以进行至少一天、两天、五天、至少一周、至少两周、至少三周或甚至四周。优选地,该阶段进行约一周。如上文详述的,该分化阶段也可以在低或正常环境氧条件下进行。

[0151] 在该分化步骤之后,环境氧气条件可以任选地返回到正常大气条件,并且在存在烟酰胺(例如10mM)和不存在激活素A的情况下再培养至少一天、至少2天、至少5天、至少一周(例如至多两周)。

[0152] 根据本发明的基础培养基是本领域已知用于体外支持细胞生长的任何已知细胞培养基,通常是包含规定基础溶液的培养基,其包含盐、糖、氨基酸和使培养物中的细胞维持在具有生活力的状态所需的任何其它营养物。可以根据本发明使用的市售基础培养基的非限制性实例包括Nutristem(不具有用于ESC分化的bFGF和TGFβ,具有用于ESC扩增的bFGF和TGFβ)、Neurobasal™、KO-DMEM、DMEM、DMEM/F12、Cellgro™干细胞生长培养基或X-Vivo™。基础培养基可以补充有本领域已知处理细胞培养物的各种试剂。以下是可以包含在根据本公开使用的培养系统中的各种补充剂的非限制性参考:

[0153] -血清或含血清替代物培养基,例如但不限于:敲除血清替代物(KOSR)、Nutridoma-CS、TCH™、N2、N2衍生物或B27,或组合;

[0154] -细胞外基质(ECM)组分,例如但不限于纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白和明胶。ECM然后可用于携带生长因子的TGFβ超家族的一个或多个成员;

[0155] -抗菌剂,例如但不限于青霉素和链霉素;

[0156] -非必需氨基酸(NEAA),

[0157] -已知在促进培养物中的SC的存活中发挥作用的神经营养因子例如但不限于BDNF、NT3、NT4。

[0158] 根据一个优选实施方式,用于分化ESC的培养基是Nutristem培养基(Biological Industries,05-102-1A或05-100-1A)。

[0159] 根据一个特别实施方式,在无异种(xeno-free)条件下进行ESC的分化。

[0160] 根据一个实施方式,增殖/生长培养基没有异种污染物,即不含动物源组分,如血清、动物源生长因子和白蛋白。因此,根据该实施方式,在不存在异种污染物的情况下进行培养。

[0161] 美国专利申请号20130196369中提供了用于在无异种条件下培养ESC的其它方法,其全部内容并入本文。

[0162] 包含RPE细胞的制备物可以根据良好生产规范(GMP)(例如,制剂符合GMP)和/或当前的良好组织规范(current Good Tissue Practices)(GTP)(例如,制剂符合GTP)制备。

[0163] 在分化步骤期间,可以监测胚胎干细胞的分化状态。细胞分化可以通过检查已知指示分化的细胞或组织特异性标志物而确定。

[0164] 可以使用本领域公知的免疫学技术检测组织/细胞特异性标志物[Thomson JA等,(1998).Science 282:1145-7]。实例包括但不限于用于膜结合或细胞内标志物的流式细胞术、用于细胞外和细胞内标志物的免疫组织化学和用于分泌的分子标志物(例如PEDF)的酶免疫测定。

[0165] 因此,根据本发明的另一个方面,提供了产生视网膜上皮细胞的方法,其包括:

[0166] (a) 在包含分化剂的培养基中培养多能干细胞以产生分化细胞,其中该培养基不含转化生长因子 β (TGF β) 超家族的成员;

[0167] (b) 在包含转化生长因子 β (TGF β) 超家族的成员和分化剂的培养基中培养分化细胞以产生进一步朝向RPE谱系分化的细胞;

[0168] (c) 分析进一步朝向RPE谱系分化的细胞的色素上皮衍生因子 (PEDF) 分泌;和

[0169] (d) 在包含分化剂的培养基中培养进一步朝向RPE谱系分化的细胞以产生RPE细胞,其中该培养基不含转化生长因子 β (TGF β) 超家族的成员,其中步骤(d) 在PEDF的量高于预定水平时进行。

[0170] 优选地,当PEDF的水平高于100ng/ml/天、200ng/ml/天、300ng/ml/天、400ng/ml/天或500ng/ml/天时进行步骤(d)。

[0171] 在分化过程期间或之后测定细胞效能的另一种方法是通过分析屏障功能及极化的PEDF和VEGF分泌。

[0172] 一旦细胞被推动到RPE命运中,则可以选择和/或扩增RPE细胞。

[0173] 根据一个特别实施方式,选择是基于负向选择——即除去非RPE细胞。这可以通过除去非色素细胞或通过利用表面标志物而机械地完成。

[0174] 根据另一个实施方式,选择是基于正向选择,即选择色素细胞。这可以通过视觉分析或利用表面标志物而完成。

[0175] 根据又一个实施方式,选择首先是基于负向选择,然后是基于正向选择。

[0176] RPE细胞的扩增可以在额外的细胞基质上进行,例如,明胶或胶原蛋白、层粘连蛋白和聚-D-赖氨酸。为了扩增,可以在无血清KOM、含血清培养基(例如DMEM+20%)或Nutristem培养基(06-5102-01-1A Biological Industries)中培养细胞。在这些培养条件下,色素细胞减少色素沉着并获得纤维样形态。在进一步延长的培养和增殖成高密度培养物之后,细胞重新获得特征性的多角形形态并增加RPE细胞的色素沉着。

[0177] RPE细胞可以在悬浮液中或单层中扩增。RPE细胞在单层培养物中的扩增可以通过本领域技术人员熟知的方法改变成在生物反应器中的大规模扩增。

[0178] 根据本文所述的方法生成的RPE细胞群体可以根据多个不同参数表征。

[0179] 因此,例如,获得的RPE细胞的形状为多角形并且发生色素沉着。

[0180] 根据一个实施方式,所获RPE细胞群体的至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或甚至100%的细胞共表达前黑素体蛋白(PMEL17)和细胞视黄醛结合蛋白(CRALBP)二者。

[0181] 根据一个特别实施方式,细胞共表达PMEL17(SwissProt No.P40967)和选自以下的至少一种多肽:细胞视黄醛结合蛋白(CRALBP;SwissProt No.P12271),卵磷脂视黄醇酰

基转移酶 (LRAT; SwissProt No.095327) 和性别决定区Y盒9 (SOX 9; P48436)。

[0182] 根据一个特别实施方式, 如通过本领域技术人员已知的方法 (例如FACS) 测定的, 群体的至少80%的细胞表达可检测水平的PMEL17和上述多肽之一 (例如CRALBP), 更优选地, 群体的至少85%的细胞表达可检测水平的PMEL17和上述多肽之一 (例如CRALBP), 更优选地, 群体的至少90%的细胞表达可检测水平的PMEL17和上述多肽之一 (例如CRALBP), 更优选地, 群体的至少95%的细胞表达可检测水平的PMEL17和上述多肽之一 (例如CRALBP), 更优选地, 群体的100%的细胞表达可检测水平的PMEL17和上述多肽之一 (例如CRALBP)。

[0183] 根据另一个实施方式, CRALBP和上述多肽之一 (例如PMEL17) 共表达的水平 (例如如通过平均荧光强度测量的) 与未分化ESC相比增加至少2倍、更优选至少3倍、更优选至少4倍, 且甚至更优选至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍。

[0184] 在一个实施方式中, RPE是终末分化的, 并且不表达Pax6。

[0185] 在另一个实施方式中, RPE细胞是终末分化的, 并且表达Pax6。

[0186] 本文所述的RPE细胞也可以在移植后作为功能性RPE细胞发挥作用, 其中RPE细胞在接受移植细胞的患者感觉神经视网膜与脉络膜之间形成单层。RPE细胞还可以向相邻的光感受器提供营养物质, 并通过吞噬作用处理脱落的光感受器外段。

[0187] 根据一个实施方式, 单层中细胞的跨上皮细胞电阻大于100欧姆。

[0188] 优选地, 细胞的跨上皮细胞电阻大于150、200、250、300、300、400、500、600、700、800或甚至大于900欧姆。

[0189] 用于测量跨上皮细胞电阻 (TEER) 的装置是本领域已知的, 并且包括例如EVOM2上皮伏欧计 (World Precision Instruments)。

[0190] 将理解, 本文公开的细胞群体没有未分化的人胚胎干细胞。根据一个实施方式, 例如通过FACS测量的, 小于1:250,000的细胞是Oct4⁺TRA-1-60⁺细胞。如通过PCR测量的, 细胞还具有下调 (超过5,000倍) 的GDF3或TDGF的表达。

[0191] 本发明的这个方面的RPE细胞不表达胚胎干细胞标志物。所述的一种或多种胚胎干细胞标志物可以包括OCT-4、NANOG、Rex-1、碱性磷酸酶、Sox2、TDGF- β 、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60和/或TRA-1-81。

[0192] 相对于非RPE细胞, RPE制备物可以为基本上纯化的, 其包含至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的RPE细胞。RPE细胞制备物可以基本上不含非RPE细胞或由RPE细胞组成。例如, 基本上纯化的RPE细胞制备物可以包含少于约25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的非RPE细胞类型。例如, RPE细胞制备物可以包含少于约25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001%的非RPE细胞。

[0193] 相对于非RPE细胞和相对于具有其他成熟水平的RPE细胞二者, RPE细胞制备物可以是基本上纯的。相对于非RPE细胞, 制备物可以是基本上纯化的, 并是成熟RPE细胞富集的。例如, 在针对成熟RPE细胞富集的RPE细胞制备物中, 至少约30%、40%、45%、50%、

55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99%或100%的RPE细胞是成熟RPE细胞。相对于非RPE细胞,制备物可以是基本上纯化的,并且针对分化RPE细胞而非成熟RPE细胞富集的。例如,至少约30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的RPE细胞可以是分化RPE细胞而非成熟RPE细胞。

[0194] 本文所述的制备物可以基本上不含细菌、病毒或真菌污染或感染,包括但不限于HIV 1、HIV 2、HBV、HCV、HAV、CMV、HTLV 1、HTLV 2、细小病毒B 19、爱泼斯坦-巴尔病毒、或疱疹病毒1和2、SV40、HHV5、HHV6、HHV7、HHV8、CMV、多瘤病毒、HPV、肠病毒的存在。本文所述的制备物可以基本上不含支原体污染或感染。

[0195] 表征本文公开的细胞群体的另一种方式是通过标志物表达。因此,例如,如通过免疫染色测量的,至少80%、85%、90%、95%或100%的细胞表达卵黄状黄斑病蛋白1。根据一个实施方式,85-100%的细胞表达卵黄状黄斑病蛋白。

[0196] 根据另一个实施方式,如通过免疫染色测量的,至少80%、85%、87%、89%、90%、95%、97%或100%的细胞表达小眼畸形相关转录因子(MITF)。例如,85-100%的细胞表达MITF。

[0197] 根据另一个实施方式,如通过FACS测量的,至少80%、85%、87%、89%、90%、95%、97%或100%的细胞表达配对盒基因6(PAX-6)。

[0198] 本文所述的细胞也可以根据它们分泌的因子的数量和/或类型进行表征。因此,根据一个实施方式,如通过ELISA测量的,细胞优选分泌超过500、1000、2000、3000或甚至4000ng/ml/天的色素上皮衍生因子(PEDF)。根据一个特别实施方式,细胞分泌约1250-4000ng/ml/天的色素上皮衍生因子(PEDF)。

[0199] 将理解,本文产生的RPE细胞以极化方式分泌PEDF和血管内皮生长因子(VEGF)。根据特别的实施方式,PEDF的顶部分泌:PEDF的基底部分泌的比率大于1。根据特别的实施方式,PEDF的顶部分泌:PEDF的基底部分泌的比率大于2。根据特别的实施方式,PEDF的顶部分泌:PEDF的基底部分泌的比率大于3,大于4,大于5,大于6,大于7或甚至大于8。此外,VEGF的基底部分泌:VEGF的顶部分泌的比率大于1。根据特别的实施方式,VEGF的基底部分泌:VEGF的顶部分泌的比率大于1.5、2或2.5。

[0200] 细胞的稳定性是另一个表征特征。因此,例如,在2-8℃下孵育6小时、8小时、10小时、12小时或甚至24小时(当将细胞配制在BSS+缓冲液中时)后,PEDF分泌量在细胞中保持稳定。另外,在2-8℃下孵育6小时、8小时、10小时、12小时或甚至24小时(当将细胞配制在BSS+缓冲液中时)后,PEDF和VEGF的极化分泌保持稳定。另外,在2-8℃下孵育6小时、8小时、10小时、12小时或甚至24小时(当将细胞配制在BSS+缓冲液中时)后,细胞的TEER在细胞中保持稳定。

[0201] 在另一个实施方式中,细胞的特征在于其治疗效果。因此,例如,本发明人已经证明,细胞群体在视网膜下施用后能够挽救RCS大鼠的视敏度。此外,细胞群体在视网膜下施用后能够挽救RCS大鼠的光感受器(例如视锥细胞光感受器)至多180天。

[0202] 本领域技术人员将很好理解,RPE细胞的获得具有很大的益处。它们可用作开发新药物以促进其生存、再生和功能的体外模型。RPE细胞可用于高通量筛选对RPE细胞具有毒性或再生作用的化合物。它们可用于揭示对光感受器细胞的发育、分化、维持、存活和功能

来说重要的机制、新基因、可溶性的或膜结合的因子。

[0203] RPE细胞还可以用作用于视网膜退化中功能异常或退化的RPE细胞的移植、补充和支持的RPE细胞的无限制来源。此外,遗传修饰的RPE细胞可以在移植后用作在眼睛和视网膜中携带和表达基因的载体。

[0204] 通过本公开的方法产生的RPE细胞可以用于这样的细胞的大规模和/或长期培养。为此,本发明的方法要在适合于大规模细胞生产的生物反应器中进行,且其中未分化hSC根据本发明培养。在生物反应器中培养细胞的一般要求是本领域技术人员所熟知的。

[0205] 细胞的收获可以通过本领域已知的各种方法进行。非限制性实例包括机械解离和用木瓜蛋白酶或胰蛋白酶(例如TrypLE选择)解离。本领域已知的其它方法也适用。

[0206] 如本文所用的“有效量”广泛地指当施用于患者以治疗疾病时足以实现疾病的这种治疗的化合物或细胞的量。有效量可以是对预防(prophylaxis)有效的量和/或对防止(prevention)有效的量。有效量可以是有效减少体征/症状发生、有效预防体征/症状发生、有效减少体征/症状发生的严重度、有效消除体征/症状的发生、有效减缓出现体征/症状的发生、有效预防出现体征/症状的发生、和/或有效预防体征/症状的发生的量。“有效量”可以根据疾病及其严重度以及待治疗的患者的年龄、体重、病史、易感性和预先存在的状况而变化。出于本公开的目的,术语“有效量”与“治疗有效量”是同义的。

[0207] 预期在从本申请获得的专利的有效期内,将开发许多相关技术用于产生RPE细胞,并且术语RPE细胞旨在假定包括所有这样的新技术。

[0208] 如本文所用的术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。

[0209] 术语“包含”、“含有”、“包括”、“包括有”、“具有”及其同根词意思是“包括但不限于”。

[0210] 术语“由……组成”是指“包括且限于”。

[0211] 术语“基本上由……组成”是指组合物、方法或结构可以包括另外的成分、步骤和/或部件,但前提是所述另外的成分、步骤和/或部件不实质性改变所要求保护的组合物、方法或结构的基本和新颖特性。

[0212] 如本文所用的,单数形式“一”,“一个”和“该”包括复数引用,除非上下文另有明确规定。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可以包括多种化合物,包括其混合物。

[0213] 在本申请全文中,本发明的各种实施方式可以以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是出于方便和简洁,而不应解释为对本发明范围的刻板限制。因此,范围的描述应看做是已经具体公开了所有可能子范围以及该范围内的单个数值。例如,范围描述如1至6应看做是具体公开了子范围如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3到6等,以及该范围内的单个数值,例如1、2、3、4、5和6。这适用任何范围的宽度。

[0214] 如本文所用的术语“方法”是指用于完成给定任务的方式、手段、技术和程序,包括但不限于化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的从业者已知的或者容易从已知方式、手段、技术和程序开发的那些方式、手段、技术和程序。

[0215] 如本文所用的术语“治疗”包括消除、基本上抑制、减缓或逆转病症的进展,基本上改善病症的临床或美学症状或基本上预防病症的临床或美学症状的出现。

[0216] 应当理解,出于清楚的目的在单独的实施方式的情况中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施方式中组合地提供。相反地,出于简洁的目的而在单一实施方式的情况

中描述的本发明的各种特征也可以单独地提供或以任何合适的子组合提供或在合适的情况下在本发明的任何其它所述实施方式中提供。在各种实施方式的上下文中描述的某些特征不被认为是那些实施方式的必要特征,除非该实施方式在没有那些要素的情况下不起作用。

[0217] 如上所述的和如下权利要求书部分中请求保护的本发明的各种实施方式和方面在以下实施例中找到实验支持。

[0218] 实施例

[0219] 现在参考以下实施例,其与以上描述一起以非限制性方式说明本发明的一些实施方式。

[0220] 通常,本文使用的命名法和本发明中使用的实验室程序包括分子、生化、微生物和重组DNA技术。这样的技术在文献中详细解释。参见,例如,“Molecular Cloning: A laboratory Manual”Sambrook等,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”,第I-III卷,Ausubel,R.M.编(1994);Ausubel等,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”,John Wiley&Sons,New York(1988);Watson等,“Recombinant DNA”,Scientific American Books,New York;Birren等(编)“Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”,第1-4卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998);美国专利号4,666,828;4,683,202;4,801,531;5,192,659和5,272,057中所述的方法;“Cell Biology:A Laboratory Handbook”,第I-III卷,Cellis,J.E.编(1994);“Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique”,Freshney,Wiley-Liss,N.Y.(1994),第3版;“Current Protocols in Immunology”,第I-III卷,Coligan J.E.编(1994);Stites等(编),“Basic and Clinical Immunology”(第8版),Appleton& Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell和Shiigi(编),“Selected Methods in Cellular Immunology”,W.H.Freeman and Co.,New York(1980);可用的免疫测定法在专利和科学文献中广泛描述,参见,例如,美国专利号3,791,932;3,839,153;3,850,752;3,850,578;3,853,987;3,867,517;3,879,262;3,901,654;3,935,074;3,984,533;3,996,345;4,034,074;4,098,876;4,879,219;5,011,771和5,281,521;“Oligonucleotide Synthesis”,Gait,M.J.编(1984);“Nucleic Acid Hybridization”,Hames,B.D.和Higgins S.J.编(1985);“Transcription and Translation”,Hames,B.D.和Higgins S.J.编(1984);“Animal Cell Culture”,Freshney,R.I.编(1986);“Immobilized Cells and Enzymes”,IRL Press,(1986);“A Practical Guide to Molecular Cloning”,Perbal,B.,(1984)和“Methods in Enzymology”,第1-317卷,Academic Press;“PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications”,Academic Press,San Diego,CA(1990);Marshak等,“Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual”,CSHL Press(1996);所有这些如其完全在本文中阐述那样通过引用并入。其他一般参考文献在本文全文中提供。据信其中的程序在本领域中是众所周知的,并且为了读者的便利而提供。其中包含的所有信息都通过引用并入本文。

[0221] 实施例1

[0222] 递送装置

[0223] 研究目的:比较两种视网膜套管的性能:具有38G柔性套管的MedOne PolyTip 25号(G)针头与具有41G柔性套管的Peregrine 25(G)针。

[0224] 实验设计:将冷冻保存的RPE细胞小瓶(1.5×10^6 个细胞/小瓶/1ml冷冻细胞悬浮液)解冻,将内容物温和地转移到含有20%人血清的DMEM中,过滤,用含有20%人血清的DMEM再次洗涤,然后用BSS Plus洗涤。然后将细胞沉淀重悬于0.5-1ml BSS Plus中,并通过台盼蓝拒染法进行活细胞计数。将细胞以不同细胞密度重悬,其随后通过递送装置注射将产生 50×10^3 、 200×10^3 或 500×10^3 个活细胞/100-150 μ l BSS Plus的预期I/IIa期临床剂量。在装载到递送装置中之前,测试配制的RPE细胞的外观以证实不存在可见外来颗粒。使用无菌18G针将在其最终制剂中的RPE细胞加载到无菌1ml注射器中(图2A)。然后将18G针替换为无菌10cm延长管(图2B),通过延长管除去空气,并将无菌25G/38G套管(MedOne)或25G/41G套管(Peregrine)附接到延长管的末端(图2C)。然后从套管中除去空气,直至套管尖端出现细胞滴。根据一种选择,将柱塞推回并使10-20 μ l的空气插入套管的末端中。

[0225] 以50 μ l/分钟的近似速率递送100-150 μ l部分的RPE细胞。在每次研究中测定细胞浓度、体积、递送后存活力和递送速率(体积/分钟)并进行比较。

[0226] 测定RPE细胞在通过装置递送前和递送后的活力和功能活性。

[0227] 由3个测试者对每个预期临床剂量(即 50×10^3 、 200×10^3 或 500×10^3 个活细胞/100-150 μ l BSS Plus)评估每次注射递送的实际细胞剂量的重现性。

[0228] 结果

[0229] MedOne套管的内直径和外直径分别为99 μ m和120 μ m。具有41G柔性套管的视网膜套管Peregrine 25(G)针具有更小的内直径和外直径,分别为71 μ m和96.5 μ m。采用MedOne和Peregrine套管观察到相似的细胞回收(参见下文表1)。

[0230] 表1

[0231]

参数 \ 套管	MedOne 25G/38G (均值 $\pm$ SD, n=3)	Peregrine 25G/41G (均值 $\pm$ SD, n=3)
初始存活力(%)	84 $\pm$ 2.4	84 $\pm$ 3.7
递送后存活力(%)	79.3 $\pm$ 6.8	85 $\pm$ 3.5
初始剂量 (#细胞/100 μ L)	500,000	500,000
递送后剂量 (#细胞/100 μ L)	380,417 $\pm$ 110,894	394,167 $\pm$ 73,126
剂量回收率(%)	76.1 $\pm$ 22.2	78.8 $\pm$ 14.6
递送速率 (μ L/分钟)	67.3 $\pm$ 12.7	85.7 $\pm$ 35.3
递送体积 (μ L)	107.7 $\pm$ 9.3	117.3 $\pm$ 27.2

[0232] 测定使用Peregrine 25G/41G的高、中等和低临床剂量回收的初始细胞剂量:

[0233] 根据以上数据,采用Peregrine 25G/41G的高临床细胞剂量(500,000个细胞/100 μ l)的回收率为78.8 $\pm$ 14.6% (均值 $\pm$ SD)。为得到500,000个细胞/100 μ l的预期高临床细胞剂量,测试了多种初始细胞剂量,其中选择使用得到507,296 $\pm$ 81,803个细胞/100 μ l (均值 $\pm$ SD, n=6, 3名测试者)的700,000个细胞/100 μ l的初始细胞剂量。下表2汇总了由3名不同测试者获得的数据。

[0234] 表2

[0235]

参数 \ 套管	测试者1 (均值 $\pm$ SD, n=3)	测试者2 (均值 $\pm$ SD, n=2)	测试者3 (n=1)	测试者1-3 (均值 $\pm$ SD, n=6)
初始存活力(%)	90 $\pm$ 1.5	94 $\pm$ 1.6	91	92 $\pm$ 2
递送后存活力(%)	83 $\pm$ 7	89 $\pm$ 2.8	89	86 $\pm$ 5.7
初始剂量 (#细胞/100 μ L)	700,000	700,000	700,000	700,000
递送后剂量 (#细胞/100 μ L)	460,508 $\pm$ 70,313	592,375 $\pm$ 40,481	477,500	507,296 $\pm$ 81,803
剂量回收率(%)	67.7 $\pm$ 12.9	77.2 $\pm$ 4.7	68.2	70.9 $\pm$ 9.7
递送速率 (μ L/分钟)	64 $\pm$ 7.1	80 $\pm$ 4.7	110.8	77 $\pm$ 19
递送体积 (μ L)	115 $\pm$ 20	120 $\pm$ 0	122	118 $\pm$ 13

[0236] 为得到200,000个细胞/100 μ l的预期中等临床细胞剂量,选择使用得到191,250 $\pm$ 67,511个细胞/100 μ l (均值 $\pm$ -SD, n=6, 3名测试者)的270,000个细胞/100 μ l (范围为247,000-292,000个细胞/100 μ l)的初始细胞剂量。下表3汇总了由3名不同测试者获得的数据。

[0237] 表3

[0238]

参数 \ 套管	测试者1 (均值 $\pm$ SD, n=3)	测试者2 (n=1)	测试者3 (均值 $\pm$ SD, n=2)	测试者1-3 (均值 $\pm$ SD, n=6)
初始存活力(%)	92 $\pm$ 3	94	94 $\pm$ 1.5	93 $\pm$ 2.2
递送后存活力(%)	89 $\pm$ 0	92	88 $\pm$ 4.2	89 $\pm$ 2.4
初始剂量 (#细胞/100 μ L)	260,333 $\pm$ 12,220	292,000	262,000 $\pm$ 8,485	266,167 $\pm$ 15,327
递送后剂量 (#细胞/100 μ L)	178,333 $\pm$ 12,829	250,000	161,875 $\pm$ 62,755	191,250 $\pm$ 67,511
剂量回收率(%)	68.7 $\pm$ 8.3	85.6	61.4 $\pm$ 21.9	84.9 $\pm$ 28.7
递送速率 (μ L/分钟)	67 $\pm$ 2.3	140	84.1 $\pm$ 11.4	81.5 $\pm$ 32.5
递送体积 (μ L)	100 $\pm$ 4	140	81 $\pm$ 16	105 $\pm$ 23

[0239] 为得到50,000个细胞/100 μ l的预期低临床细胞剂量,选择使用得到50,688 $\pm$ -6,533个细胞/100 μ l (均值 $\pm$ -SD, n=5, 3名测试者)的70,000个细胞/100 μ l的初始细胞剂量。下表4汇总了由3名不同测试者获得的数据。

[0240] 表4

[0241]

参数 \ 套管	测试者1 (均值 $\pm$ SD, n=3)	测试者2 (n=1)	测试者3 (n=1)	测试者1-3 (均值 $\pm$ SD, n=5)
初始存活力(%)	91 $\pm$ 3	91	94	91 $\pm$ 2.7
递送后存活力(%)	83 $\pm$ 6	93	91	87 $\pm$ 6.5
初始剂量 (#细胞/100 μ L)	70,000	70,000	70,000	70,000
递送后剂量 (#细胞/100 μ L)	51,042 $\pm$ 5,610	57,500	42,813	50,688 $\pm$ 6,553
剂量回收率(%)	72.9 $\pm$ 8	82.1	61.1	72.4 $\pm$ 9.3
递送速率 (μ L/分钟)	64.7 $\pm$ 1.9	95.2	118.4	82.6 $\pm$ 23.5
递送体积 (μ L)	115 $\pm$ 5	108	80	107 $\pm$ 16

[0242] 通过Peregrine 25G/41G递送后的RPE效力:

[0243] 为了证明Peregrine 26G/41G套管合格,在递送后测试在700,000个细胞/ μ l的高

初始临床剂量下配制的RPE细胞的效力。使用极化分析评估效力,其中使用跨室(transwell)系统测试RPE细胞的屏障功能以及以极化方式分泌色素上皮衍生因子(PEDF)和血管内皮衍生因子(VEGF)的能力。从表5A可以看出。递送前和递送后的屏障功能/跨上皮细胞电阻(TEER)以及PEDF和VEGF的极化分泌是相似的。递送后的存活力和细胞浓度在预期范围内(表5B)。

[0244] 表5A

[0245]

实验#47	第14天的PEDF (ng/mL/天)	TEER (Ω)	PEDF 顶部/基底部	VEGF 基底部/顶部
递送前	1,501	384	4.74	2.58
递送后	1,812	492	4.85	2.99
OpRegen 5C对照	1,858	314	4.3	2.61

[0246] 表5B

[0247]

结果测量	测试结果
初始存活力(%)	95
递送后存活力(%)	91
初始剂量(#细胞/100 μ L)	700,000
递送后剂量(#细胞/100 μ L)	621,000
剂量回收率(%)	73.9
递送速率(μ L/分钟)	76.6
递送体积(μ L)	120

[0248] 除了维持极化能力外,还保留了递送后的RPE细胞生活力(数据未显示)。

[0249] 上文提供的数据支持以50,000、200,000和500,000个细胞/100 μ l的预期临床剂量使用Peregrine 25G/41G套管。为达到这些最终临床剂量,可以分别制备最终浓度为70,000、270,000和700,000个活细胞/100 μ l的RPE细胞。

[0250] 测定用于50,000细胞/50 μ l的低临床剂量回收的初始RPE细胞剂量:

[0251] 初始测试70,000个RPE细胞/50 μ l的细胞剂量得到50,000个细胞/50 μ l的预期低临床细胞剂量的能力。如表6所示,制备了得到 $38,697 \pm 5,505$ 个细胞/50 μ l(均值 $\pm$ SD,n=3,3名测试者)的70,000个细胞/50 μ l的初始细胞剂量。由于平均回收率为 $55\% \pm 7.8\%$ (均值 $\pm$ SD,n=3,3名测试者)且由于未达到50,000个细胞/50 μ l的预期剂量,因此第二组实验中测试100,000个细胞/50 μ l的初始细胞密度。如表7所示,100,000个细胞/50 μ l的初始细胞剂量得到 $62,517 \pm 4,625$ 个细胞/50 μ l(均值 $\pm$ SD,n=3,3名测试者;OpRegen[®] Batch 5D)。平均回收率为 $61\% \pm 4.5\%$ (均值 $\pm$ SD,n=3,3名测试者)。

[0252] 表6

[0253]

套管 参数	测试者1	测试者2	测试者3	测试者 1-3 (均值 $\pm$ SD, n=3)
初始存活力(%)	95	95	92	94 $\pm$ 1.7
递送后存活力(%)	88	85	90	88 $\pm$ 2.5
初始剂量 (#细胞/50 μ L)	70,000	70,000	70,000	70,000
递送后剂量 (#细胞/50 μ L)	44,842	34,218	37,030	38,697 $\pm$ 5,505
剂量回收率(%)	64	49	53	55 $\pm$ 7.8
递送速率 (μ L/分钟)	97	85	94	92 $\pm$ 6.2
递送体积 (μ L)	35	61	60	52 $\pm$ 14.7

[0254] 表7

[0255]

套管 参数	测试者1	测试者2	测试者3	测试者 1-3 (均值 $\pm$ SD, n=3)
初始存活力(%)	88	91	96	92 $\pm$ 4
递送后存活力(%)	88	88	90	89 $\pm$ 1.2
初始剂量 (#细胞/50 μ L)	100,000	100,000	100,000	100,000
递送后剂量 (#细胞/50 μ L)	57,343	66,250	63,958	62,517 $\pm$ 4,625
剂量回收率(%)	57	66	64	61 $\pm$ 4.5
递送速率 (μ L/分钟)	87	111	110	103 $\pm$ 14
递送体积 (μ L)	53	65	60	59 $\pm$ 6

[0256] 实施例2

[0257] 临床实验

[0258] 研究设计:单中心I/IIa期研究,将15名具有晚期干性AMD和地图样萎缩(GA)的患者分为4个同龄组:每组由最佳矫正视力为20/200或更低的3名法定失明的患者组成的前3个同龄组将分别使用每同龄组 50×10^3 、 200×10^3 和 500×10^3 个细胞的连续递增剂量接受单次视网膜下RPE细胞注射。第四同龄组将包括最佳矫正视力为20/100或更低的6名患者,其将接受500,000个RPE细胞的单次视网膜下注射。将采用组内和组间的交错间隔(staggering intervals)。

[0259] 在玻璃体切除术后,通过小型视网膜切开术经由套管将细胞递送到黄斑区域中的视网膜下腔中。将至多50-150 μ L细胞悬浮液的总体积注射到具有GA扩张风险的区域中。

[0260] 伴随外科手术,患者将接受轻度免疫抑制和抗生素治疗,其由以下组成:

[0261] 1.在玻璃体切除术后按照惯例进行局部类固醇和抗生素治疗:在6周过程中的局部类固醇疗程(每天4-8次Predforte滴剂,逐渐减量)和局部抗生素滴剂(每天4次Oflox或等同物)的过程。

[0262] 2.每天0.01mg/kg全身性(PO)他克莫司(将调整剂量以达到3-7ng/ml血药浓度),

从移植前一周开始持续至移植后6周。

[0263] 3. 全身性 (P0) 麦考酚酯, 总共2克/天, 从移植前2周开始给予并在移植后持续1年。

[0264] 在施用细胞后12个月的过程中将以预定间隔对患者进行评估。研究后随访将在术后15个月, 2、3、4和5年时发生。在出现与免疫抑制治疗相关的副作用的患者中, 将尝试控制这些副作用 (例如, 如果出现高血压, 则改善血压控制)。在无法控制的副作用的情况下, 经与研究内科医师协商, 成为病因的免疫抑制剂的治疗将作出改变。

[0265] 入选标准:

[0266] 1. 年龄为55岁及以上;

[0267] 2. 在两只眼睛中都诊断出干性 (非新生血管性) 年龄相关性黄斑变性;

[0268] 3. 眼底镜检查发现在黄斑中具有地图样萎缩的干性AMD, 在研究眼中的尺寸大于0.5视盘面积 (1.25mm^2 , 且至多 17mm^2), 且在对侧眼中大于0.5视盘面积;

[0269] 4. 通过ETDRS视力测试, 同龄组1-3中的最佳矫正中心视力等于或小于20/200, 且同龄组4中的最佳矫正中心视力等于或小于20/100;

[0270] 5. 非手术眼的视力必须好于或等于手术眼的视力;

[0271] 6. 患者健康状况足够良好以允许参与所有研究相关程序并完成研究 (医疗记录);

[0272] 7. 在受监测的麻醉下进行玻璃体视网膜外科手术程序的能力;

[0273] 8. 正常血细胞计数、血液化学、凝血和尿分析;

[0274] 9. HIV、HBC和HCV阴性, CMV IgM和EBV IgM阴性;

[0275] 10. 基于年龄匹配的筛选检查 (由研究医师自行决定), 患者没有当前的恶性肿瘤或恶性肿瘤史 (除了成功治疗的皮肤基底/鳞状细胞癌);

[0276] 11. 手术前7天, 允许患者中止服用阿司匹林、含阿司匹林产品和任何其他凝血改变药物;

[0277] 12. 愿意推迟所有未来的血液和组织捐献;

[0278] 13. 能够理解并愿意签署知情同意书。

[0279] 排除标准:

[0280] 1. 根据历史, 以及根据临床检查、荧光素血管造影 (FA) 或眼相干断层扫描 (OCT) 在任一眼睛中基线处的新生血管性AMD的证据;

[0281] 2. 糖尿病性视网膜病变、血管阻塞、葡萄膜炎、Coat病、青光眼、白内障或防止后极可视化的间质混浊或已经危害或可能危害研究眼的视力并使主要结果的分析混乱的AMD以外的任何重要眼部疾病的历史或存在;

[0282] 3. 研究眼中的视网膜脱离修复的历史;

[0283] 4. 轴向近视大于-6屈光度;

[0284] 5. 过去3个月中研究眼的眼睛手术;

[0285] 6. 认知障碍或痴呆的历史;

[0286] 7. 全身性免疫抑制的禁忌症;

[0287] 8. 与研究眼中的脉络膜新血管形成相关的AMD以外的任何病症的历史 (例如病理性近视或推测的眼睛组织胞浆菌病);

[0288] 9. 以下疾病的活动或历史: 癌症、肾脏疾病、糖尿病、前12个月中的心肌梗塞、免疫缺陷;

[0289] 10. 女性;怀孕或哺乳;

[0290] 11. 目前参与另一项临床研究。过去 (在6个月内) 参与全身性施用或施用至眼的药物的任何临床研究。

[0291] 将分别评估外科手术程序的安全性和耐受性以及细胞移植的安全性。手术安全性评估将包括以下测量:

[0292] 1. 未愈合的视网膜脱离;

[0293] 2. 增殖性玻璃体视网膜病变 (PVR);

[0294] 3. 视网膜下、视网膜或玻璃体内出血;

[0295] 4. 对手术部位处仍相对健康的视网膜的损伤。

[0296] 将使用以下不良事件评估细胞移植的安全性和耐受性,所述不良事件将根据国家癌症研究所 (NCI) 分级系统进行分级:

[0297] 1. 畸胎瘤和/或肿瘤和/或异位组织形成;

[0298] 2. 感染;

[0299] 3. 葡萄膜炎、血管炎或PVR;

[0300] 4. GA的加速进展;

[0301] 5. 研究眼中向着新生血管性AMD的进展;

[0302] 6. 针对同种异体移植细胞的严重炎症反应。

[0303] 次要探索性功效终点将通过移植物存活的持续时间和通过以下检查而测量:

[0304] 1. GA进展速率;

[0305] 2. 移植区域的视网膜敏感性,中心盲点的程度和深度;

[0306] 3. 视敏度的变化。

[0307] 外科手术程序:

[0308] 选择用于RPE施用的眼睛是具有较差视觉功能的眼睛。手术将通过眼球后或眼球周麻醉阻滞,伴随受监测的静脉内镇静或全身麻醉进行,这由外科医师判断并与患者商议。根据机构方案,进行手术的眼睛将以无菌方式进行准备并用布帘遮盖。在放置开睑器 (lid speculum) 后,进行标准的3口玻璃体切除术。这包括放置23G输液套管和两个23G口。在目视检查玻璃体腔中的输液套管后,打开输液管线以确保在整个手术过程中保持眼球的结构。然后用标准23G仪器进行细心的核心玻璃体切割术,随后脱离后玻璃体面。这将允许无阻碍地达到后极。

[0309] RPE将被引入到后极中的预定位置处的视网膜下腔中,优选在仍然相对保持靠近GA边界的区域中穿透视网膜。避开血管。细胞将经由形成小泡而递送到视网膜下腔,其体积为50-150 μ l。

[0310] 递送系统由1mL注射器组成,其通过10cm延长管连接到Peregrine 25G/41G柔性视网膜套管。

[0311] 将除去任何回流到玻璃体腔中的细胞并将进行流体-空气交换。在移除输液套管之前,将进行仔细检查以确保没有产生医源性视网膜撕裂或断裂。然后将移除输液套管。施用结膜下抗生素和类固醇。将在眼睛上覆盖眼罩和塑料防护物。将记录手术进行程序。

[0312] 剂量:将使用50,000个细胞/50 μ l或50,000个细胞/100 μ l的低剂量、200,000个细胞/100 μ l的中剂量和500,000个细胞/100 μ l的高剂量。剂量选择是基于在临床前研究中测

试的最大可行剂量的安全性以及基于眼睛和泡尺寸计算的人体等效剂量。

[0313] 终点参数：

[0314] 1. 外科手术的安全性；

[0315] 持续性/复发性视网膜脱离

[0316] 增殖性玻璃体视网膜病变 (PVR)

[0317] 出血

[0318] 对手术部位处仍相对健康的视网膜的损伤

[0319] 2. 产品安全性：

[0320] 畸胎瘤、肿瘤和/或异位组织生长

[0321] 增殖细胞的大块移植

[0322] 感染

[0323] 对移植物的严重炎症免疫反应

[0324] GA的加速进展

[0325] 研究眼中向着新生血管性AMD的进展

[0326] 3. 功效：

[0327] 移植物存活的持续时间

[0328] 减小的GA进展速率

[0329] 移植区域中视网膜对光的敏感度和盲点的深度

[0330] 视敏度

[0331] 虽然已经结合本发明的具体实施方式描述本发明，但明显的是，许多替代、修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。因此，旨在包括落入所附权利要求的精神和广泛范围内的所有这样的替代，修改和变化。

[0332] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请都以与具体和单独指出每个个体出版物、专利或专利申请都通过引用并入本文的相同程度以其整体通过引用并入本说明书。此外，本申请中对任何参考文献的引用或识别不应被解释为承认这样的参考文献可用作本发明的现有技术。在章节标题被使用的程度上，其不应被解释为必然的限制。

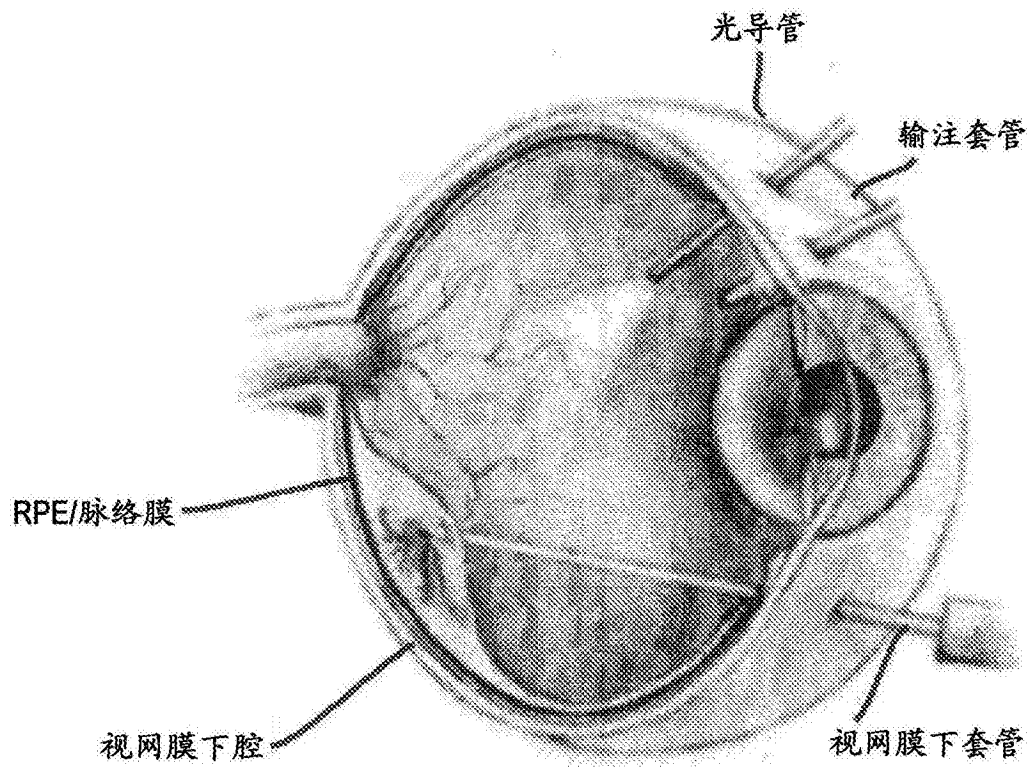


图1

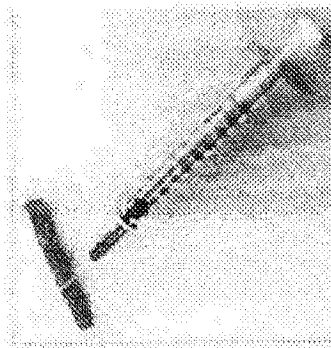


图2A

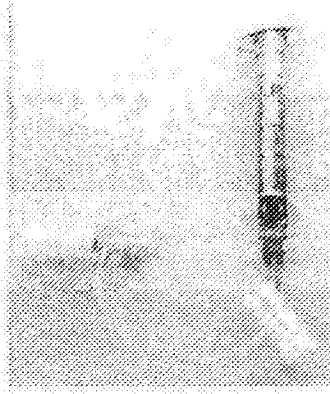


图2B



图2C