



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102204930 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 03

(21) 申请号 201110132307. 3

biotechnology》. 2000, 第 18 卷 (第 4 期),

(22) 申请日 2005. 01. 24

审查员 程诚

(30) 优先权数据

60/538, 964 2004. 01. 23 US

(62) 分案原申请数据

200580007359. 0 2005. 01. 24

(73) 专利权人 先进细胞技术公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 I · V · 克利曼斯卡亚

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李英

(51) Int. Cl.

C12N 5/0797(2010. 01)

(56) 对比文件

US 2002022268 A1, 2002. 02. 21,

US 2003087859 A1, 2003. 05. 08,

REUBINOFF BENJAMIN E ET AL. 《Embryonic
stem cell lines from human blastocysts:

Somatic differentiation in vitro. 》. 《nature

权利要求书1页 说明书16页 附图10页

(54) 发明名称

用于治疗视网膜变性病的改良模式

(57) 摘要

本发明涉及用于视网膜变性的改良的基于细胞的疗法和用于使人胚胎干细胞和人胚胎衍生细胞分化成视网膜色素上皮 (RPE) 细胞和其它视网膜祖细胞的方法。

1. 由人胚胎干细胞自发分化的分离的 RPE 细胞,其中,所述的分离的 RPE 细胞不含表达 Oct4、Sox2 或 TDGF1 的细胞,且其中所述的分离的 RPE 细胞可以在 RPE 培养基中维持培养,其中所述的 RPE 培养基由 50% MEF 培养基和 50% EB 培养基构成,

其中所述的 MEF 培养基由下述成分构成:高糖 DMEM,2mM GlutaMAX I,和 500 μ g/ml 青霉素,500 μ g/ml 链霉素和 16%胎牛血清,并且

其中所述的 EB 培养基由下述成分构成:去除高糖 DMEM,500 μ g/ml 青霉素,500 μ g/ml 链霉素,1%非必需氨基酸溶液,2mM GlutaMAX I,0.1mM β -巯基乙醇,和 13%的血清替代物。

2. 分离的 RPE 细胞,其是通过包括以下步骤的方法产生的:(a) 于营养细胞上、在缺乏 LIF、FGF 和 Plasmanate 的条件下培养 hES 细胞以形成过度生长的 hES 细胞多层,直至在上述多层中出现有色细胞的黑色的细胞岛,所述有色细胞的黑色的细胞岛包含:在鹅卵石单层中的紧密堆积的多边形细胞,在胞质中有褐色的色素;和 (b) 分离并培养有色细胞,从而获得 RPE 细胞。

3. 分离的 RPE 细胞,其是通过包括以下步骤的方法产生的:(a) 培养 hES 细胞以形成胚状体直至在胚状体中出现有色上皮细胞;和 (b) 分离并培养所述有色上皮细胞,从而获得 RPE 细胞。

4. 权利要求 1-3 中任一项的分离的 RPE 细胞,其中所述的 RPE 细胞表达 CRALBP, RPE65、促贝斯特素和 PEDF。

5. 权利要求 2-4 中任一项的分离的 RPE 细胞,其中所述的有色细胞看上去象典型的上皮细胞鹅卵石单层中紧密堆积的多边形细胞。

6. 权利要求 2-5 中任一项的分离的 RPE 细胞,其中所述的步骤 (a) 的培养包括在不含 bFGF, LIF 和 Plasmanate 的培养基中培养 hES 细胞。

7. 权利要求 2-6 中任一项的分离的 RPE 细胞,其中所述的步骤 (a) 的培养期间至少为 6 周或者约 6 周-约 8 周。

8. 用于获得 RPE 细胞的方法,所述方法包括:(a) 于营养细胞上、在缺乏 LIF、FGF 和 Plasmanate 的条件下培养 hES 细胞以形成过度生长的 hES 细胞多层,直至在上述多层中出现有色细胞的黑色的细胞岛,所述有色细胞的黑色的细胞岛包含:在鹅卵石单层中的紧密堆积的多边形细胞,在胞质中有褐色的色素;和 (b) 分离并培养有色细胞,从而获得 RPE 细胞。

9. 用于获得 RPE 细胞的方法,所述方法包括:(a) 培养 hES 细胞以形成胚状体直至在胚状体中出现有色上皮细胞;和 (b) 分离并培养所述有色上皮细胞,从而获得 RPE 细胞。

10. 权利要求 8-9 任一项的方法,其中有色细胞的出现是自发地发生的。

11. 权利要求 8-10 任一项的方法,其中所述 RPE 细胞表达 CRALBP, RPE65、促贝斯特素和 PEDF。

12. 权利要求 8-11 任一项的方法,其中所述有色细胞看上去象典型的上皮细胞鹅卵石单层中紧密堆积的多边形细胞。

13. 权利要求 8-12 任一项的方法,其中步骤 (a) 中所述的培养包括在不含 bFGF, LIF 和 Plasmanate 的培养基中培养所述 hES 细胞。

14. 权利要求 8-13 任一项的方法,其中步骤 (a) 中所述的培养时间为至少 6 周或者大约 6 至大约 8 周。

用于治疗视网膜变性病的改良模式

[0001] 本申请是申请号为 200580007359.0, 申请日为 2005 年 01 月 24 日的同名申请的分案申请。

[0002] 本申请是以 Advanced Cell Technology 公司和 Irina V. Klimanskaya 的名义于 2005 年 1 月 24 日作为 PCT 国际专利申请提交的, 并要求于 2004 年 1 月 23 日提交的美国临时申请流水号 60/538,964 的优先权。Advanced Cell Technology 公司是一家美国公司, 指定作为除美国外所有国家的申请人; Irina V. Klimanskaya 是一位美国公民, 指定作为仅为美国的申请人。

发明领域

[0003] 本发明主要涉及用于视网膜变性和其它视觉障碍的改良的基于细胞疗法及帕金森氏病治疗和用于使哺乳动物胚胎干细胞和哺乳动物胚胎衍生细胞分化成视网膜色素上皮 (RPE) 细胞和其它眼球组织包括但不限于视杆、视锥、两极、角膜、神经、虹膜上皮、和祖细胞的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 中枢神经系统 (CNS) 的许多部分都呈现出薄层状的组织, 而神经病理学过程通常涉及这些复合细胞层中一层以上的组织。CNS 疾病常常包括神经细胞损失, 而且由于缺乏内源性的再生, CNS 相关疾病后功能的有效恢复非常有限或者没有。具体而言, 常见的视网膜疾病中已知的年龄相关的黄斑变性 (AMD) 是由于光感受器与视网膜色素上皮 (RPE) 一起损失造成的, 另外不定量的涉及内核层 (INL) 的中间 (“传递”) 神经元。因此, 恢复中度至高度敏锐的视觉需要从功能上置换某些或所有的受损细胞层。

[0006] 在解剖学上, 色素性视网膜炎 (RP), 一种遗传性的视网膜病变, 是光感受器细胞核数目持续减少导致视力丧失。尽管大部分形式 RP 之间表型相似, 但它们潜在的细胞机制是不同的, 且是由于许多基因的各种突变造成的。大部分涉及的突变改变了光感受器细胞特异性基因的表达, 其中大约 10% 是由于视紫红质基因的突变造成的。在该疾病的其它类型中, 调控凋亡的基因被改变了 (例如, Bax 和 Pax2)。AMD 是包含分子水平上病因可能有所不同的一系列病变在内的一种临床诊断。所有的 AMD 病例都具有在中央视网膜内光感受器细胞丢失的特征。不过, 这一共同的最终现象似乎是早期 RPE、新血管形成和潜在脉络膜水平异常的次级后果。后者可能涉及光感受器膜翻折困难, 具体机理目前尚不清楚。

[0007] 此外, 视网膜色素上皮是眼睛内最重要的细胞类型之一, 因为它对于维持光感受器功能而言至关重要。它具有几种复杂的功能, 包括对视杆和视锥的脱落外部片段的吞噬作用、维生素 A 的代谢、视网膜底空间内代谢物交换中涉及的黏多糖合成、代谢物的转运、血管发生的调控、光吸收、图像分辨率的增强以及通过诸如蛋白酶和蛋白酶抑制剂等分泌蛋白进行的视网膜内许多其它功能的调控。

[0008] 在 AMD 的某些病例中显现的另一特征是出现异常的血管, 这导致了大家所知道的脉络膜新血管形成 (CNV) 病。这种新血管 (“湿的”) 形式的 AMD 特别具有破坏性, 而且似乎是由于对血管发生缺乏适当的调控所造成的。RPE 功能障碍造成的脉络膜破裂使得新血

管从脉络膜循环进入视网膜底空间,在那它们可破坏外部区段组织并引起血管渗漏或出血导致额外的光感受器损失。

[0009] CNV 可激光定向治疗。因此,激光治疗“湿”AMD 在美国是普遍使用的。不过,这通常存在令人不快的副作用,因此患者不满意治疗效果。这是由于如果发生了激光烧伤,它们会涉及光感受器死亡和视野内相应部分的绝对的、不能挽回的视觉缺失。此外,激光治疗不能使潜在的易患病体质向 CNV 的发展。事实上,激光烧伤已被用作常规方法诱发猴子的 CNV (Archer 和 Gardiner" 1981)。在诸如英国等其它国家内斑点激光治疗 CNV 的使用要保守的多。对于更常见的“干”式 AMD 则没有一般公认的疗法,其中存在与斑点内 RPE 萎缩的不规则碎片重叠的光感受器损失和被称为玻璃疣的相关胞外物质。

[0010] 由于 RPE 在光感受器维护和血管发生的调控中起重要作用,各种体内 RPE 功能障碍都与改变视力的疾病相关,诸如色素性视网膜炎、RPE 脱离、发育不良 (displasia)、萎缩、视网膜病变、黄斑变性或变性,包括年龄相关的黄斑变性,它们可导致光感受器损伤和失明。

[0011] 特别是除了 AMD 之外,影响黄斑的多种其它变性疾病包括,但不局限于:视锥变性、视锥-视杆变性、malattia leventinese、多因蜂窝状萎缩 (Doyme honeycomb dystrophy)、Sorsby' s 变性、Stargardt 病、pattern/butterfly 变性、贝氏卵黄状变性、北卡罗林纳变性、中央网形脉络膜变性、血管样条纹症和毒性黄斑变性。

[0012] 一般可继发地影响黄斑的视网膜病变包括视网膜脱离、病理性近视、色素性视网膜炎、糖尿病性视网膜病变、CMV 视网膜炎、闭塞性视网膜血管病、早熟的视网膜病变 (ROP)、脉络膜破裂、眼组织胞浆综合症 (POHS)、弓形虫病和 Leber' s 先天性黑朦。所有以上列举的都不是穷举的。

[0013] 所有以上病征均涉及光感受器的损失,因此,可供选择的治疗方法是不多的且不够的。

[0014] 因为它的伤口修复能力,RPE 已被广泛试验用于移植治疗中。2002 年,进入试验的一年,患者显示出 30-50% 的改善。在几种动物模型和人中都显示出 (Gouras 等,2002, Stanga 等,2002, Binder 等,2002, Schraermeyer 等,2001, 由 Lund 等综述,2001) RPE 移植具有良好的视觉恢复潜能。不过,即使在诸如眼部等免疫特许的位置,也存在移植物排斥反应的问题,阻碍了在异源移植时利用此方法。尽管新的光感受器 (PRCs) 已通过移植被从实验上引入,但被移植的 PRC 在与宿主视网膜原存活神经元之间的连接非常勉强。对胚胎组织来源的 RPE 细胞的依赖是另一问题,因为这些细胞已显示出非常低的增殖潜能。Emory 大学的研究者进行了一个试验,即他们将来自人眼供体的 RPE 细胞进行体外培养并移植给 6 名晚期帕金森症患者。尽管移植一年后发现症状减轻了 30-50%,但因眼睛供体不足,仍未经 FDA 核准,并会依然存在超过捐赠眼组织所能提供的需求。

[0015] 迄今为止,利用异位 RPE 细胞的疗法已显现出类似成纤维细胞的作用,并且与许多破坏性视网膜并发症相关,包括轴突损失 (Villegas-Perez 等,1998) 和具视网膜脱离现象的增殖性玻璃体视网膜病变 (PVR) (Cleary 和 Ryan,1979)。以松散的片状形式运送的 RPE 趋向于卷起来。这导致光感受器不能有效覆盖以及多层具有错误极性的 RPE,可能造成囊肿形成或黄斑水肿。

[0016] 有关运送神经视网膜移植物至患者眼睛的视网膜下 (黄斑下) 空间的情况可参阅

文献:Kaplan 等(1997),Humayun 等(2000)和 del Cerro 等(2000)。其中存在的一个严重问题是神经视网膜移植物通常在功能上不能与宿主视网膜一体化。此外,缺乏完整的 RPE 单层意味着 RPE 功能障碍或脉络膜的破坏未被矫正。二者都是视觉丧失的基本前提条件。

[0017] 因此,在任一目前的治疗方法中都不存在有效的重组 RPE 的方式,因此各种方法都仍有不足,尤其是在移植物和宿主视网膜之间存在的功能不连贯的基本问题。

[0018] 因此需要有改进的视网膜治疗方法。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明的目的是提供用于由干细胞衍生眼球细胞的改良方法,所述细胞包括但不限于神经细胞包括水平细胞和无长突细胞、视网膜细胞诸如视杆和视锥、角膜细胞、血管细胞、及 RPE 和 RPE 样细胞,和提供用于治疗视网膜变性的改良方法和疗法。具体而言,这些方法牵涉由人胚胎干细胞衍生的 RPE 和 RPE 样细胞的使用。

[0021] 本发明的一个实施方案提供了使用衍生自哺乳动物胚胎干细胞的 RPE 细胞、RPE 样细胞、这些细胞的祖细胞或任何两种或三种上述细胞的组合的视网膜变性疗法生成细胞的改良方法,以治疗多种状况,包括但不限于色素性视网膜炎和黄斑变性及相关状况。可使用本发明生成的细胞类型包括但不限于 RPE、RPE 样细胞、和 RPE 祖细胞。还可生成的细胞包括虹膜有色上皮(IPE)细胞。视觉相关的神经细胞包括中间神经元(例如,内核层(INL)的“传递”神经元)和无长突细胞(在垂直方向第二突触水平上相互作用的中间神经元,所述途径由光感受器-两极-神经节细胞链组成,它们在内网织层(IPL)内突触水平上活跃并用于将呈递给神经节细胞的视觉信息整合、调整并放入一暂时的区域内)也可利用本发明产生。此外,还可产生视网膜细胞、视杆、视锥和角膜细胞。在本发明的另一实施方案中,还可产生提供眼睛脉管系统的细胞。本发明的细胞可利用玻璃体切割术被移植入视网膜底空间。

[0022] 非限制性的例子包括将这些细胞在悬浮液、基质或基底中进行移植。可治疗的色素形视网膜炎的动物模型包括啮齿动物(rd小鼠、RPE-65 敲除小鼠、桶状样小鼠、RCS 大鼠、猫(阿比西尼亚猫),以及狗(视锥病变"cd"狗、进行性视杆-视锥病变"prcd"狗,早期视网膜病变"erd"狗、1型和2型和3型视杆-视锥发育异常"rcd1, rcd2 & rcd3"狗、光感受器发育异常"pd"狗和 Briard"RPE-65"(狗)。用行为试验、荧光血管造影术、组织学或功能检测进行评估,所述的功能检测有诸如检测细胞完成吞噬作用的能力(光感受器片段)、维生素A的代谢、紧密连接点传导性等,或者用电子显微镜进行检查。与只局限于使用眼睛供体组织可能治疗的患者人数相比,此处所提出方法的众多优势之一在于它的生产能力和能治疗更多的患者。

[0023] 本发明的另一实施方案提供了使 hES 细胞自发分化成具有无数 RPE 特征的细胞的方法。这些 PRE 制品能在培养中表现有所变化并在多次传代中仍保持 RPE 的特征。本发明还提供了使已建立的 RPE 细胞系分化成预备的神经元细胞系、角膜细胞、视网膜细胞的方法,非限制性的例子是通过使用 bFGF 或 FGF。

[0024] 本发明的另一实施方案是从现存的和新的 ES 细胞系中衍生出新的 RPE 细胞系和祖细胞的方法。当它们来自不同 ES 细胞系时,它们在特性上可能有所变化,诸如 RPE 样细胞的生长速率、色素表达或培养中的去分化和再分化。它们在功能和核型稳定性上可能有某些变化,因此希望能提供针对新 RPE 系列和新 ES 细胞系衍生物的方法,使得可以挑选具

有预期特性的细胞系,能被无性繁殖选择,以产生纯的高质量的 RPE 样细胞群。

[0025] 也可来源于现存的和新的 ES 细胞系的细胞包括虹膜有色上皮 (IPE) 细胞。在另一实施方案中,包括中间神经元 (例如,内核层 (INL) 的“传递”神经元) 和无长突细胞在内的视觉相关神经细胞也可利用本发明产生。此外,可产生视网膜细胞、视杆、视锥和角膜细胞。在本发明的另一实施方案中,还可产生提供眼睛脉管系统的细胞。

[0026] 本发明的另一实施方案是产生具有增强的预防新血管形成能力的 RPE 细胞系衍生物或 RPE 细胞前体的方法。所述细胞可通过如下方式产生,即使来自患者的体细胞老化,从而使端粒酶缩短,其中细胞正常复制寿命的 10% 被跨越,然后使用所述体细胞作为核转移供体细胞产生过表达诸如色素上皮衍生因子 (PEDF/EPC-1) 等血管发生抑制剂的细胞。或者所述细胞可用抑制新血管形成的外源基因遗传修饰。

[0027] 本发明的另一实施方案利用了 HLA 区域具有纯合性的 ES 或胚胎来源细胞库,从而使所述细胞在其 HLA 抗原上的复杂性降低。

[0028] 因此,本发明的另一实施方案包括 ES 来源 RPE 样细胞的定性。尽管 ES 来源的有色上皮细胞在其形态学、行为和分子标记上都非常类似 RPE,但它们的治疗价值取决于它们发挥 RPE 作用且不致癌的能力。因此,用以下一种或多种技术对 ES 来源 RPE 细胞进行表征:(i) 评估它们的功能性,即光感受器片段的吞噬能力、维生素 A 的代谢、伤口愈合能力;(ii) 通过动物模型 (作为非限制性的例子,此处可用 SCID 小鼠) 移植评估 RPE 样 ES 细胞衍生物的多能性;(iii) RPE 样细胞的表型和核型;(iv) 通过基因表达图谱评估 ES 细胞来源 RPE 样细胞和 RPE 组织;(v) 在蛋白质水平评估 RPE 分子标记物的表达,包括促贝斯特素 (bestrophin)、CRALBP、RPE-65、PEDF。也可基于细胞中眼睛发育通常所需的转录激活剂的表达对其进行评估,包括 rx/rax、chx10/vsx-2/alx、ots-1、otx-2、six3/optx、six6/optx2、mitf、pax6/mitf 和 pax6/pax2 (Fischer 和 Reh, 2001, Baumer 等, 2003)。

[0029] 本发明的另一实施方案是用至少以下一种技术对 ES 来源 RPE 样细胞进行定性的方法:(i) 评估 ES 来源 RPE 样细胞的功能性;(ii) 通过动物模型移植评估 RPE 样 ES 细胞衍生物的多能性;(iii) RPE 样细胞的表型和核型;(iv) 评估基因表达图谱;(v) 在蛋白质水平评估 RPE 的分子标记物的表达;以及 (vi) 眼睛发育正常需要的转录激活剂的表达。在另一实施方案中,这些技术可被用于评估多重 hES 细胞来源的细胞类型。

[0030] 本发明的另一实施方案是不产生 ES 细胞系,直接从人和非人动物桑椹胚或胚泡期胚胎 (EDCs) 衍生 RPE 细胞和 RPE 前体细胞。

[0031] 胚胎干细胞 (ES) 在未分化阶段可体外不确定的维持并实质上能分化成任一细胞类型。因此人的胚胎干细胞 (hES) 可用于研究人细胞的分化,并被考虑作为移植疗法的可能来源。迄今为止,已有关于人和小鼠 ES 细胞分化成许多细胞类型的报道 (由 Smith 综述, 2001), 所述细胞类型包括心肌细胞 [Kehat 等, 2001, Mummery 等, 2003 Carpenter 等, 2002]、神经元和神经前体 (Reubinoff 等, 2000, Carpenter 等, 2001, Schuldiner 等, 2001)、脂肪细胞 (Bost 等, 2002, Aubert 等, 1999)、肝细胞样细胞 (Rambhatla 等, 2003)、造血细胞 (Chadwick 等, 2003)、卵母细胞 (Hubner 等, 2003)、胸腺细胞样细胞 (Lin RY 等, 2003)、胰岛细胞 (Kahan, 2003) 和造骨细胞 (Zur Nieden 等, 2003)。

[0032] 本发明的另一实施方案是鉴定来源于胚胎、胚胎干细胞系或其它胚胎细胞并通过比较体内来源细胞和所述细胞的信使 RNA 转录物发现它具有分化成有用的细胞类型的能

力的细胞的方法,所述细胞诸如 RPE 细胞、造血细胞、肌肉细胞、肝细胞、胰腺 β 细胞、神经元、内皮、祖细胞或细胞疗法或研究中有用的其它细胞。此方法方便了正常表型细胞的鉴定,并可优化细胞用于细胞疗法和研究中。

[0033] 本发明为人 ES 细胞分化成神经元系列中的特化细胞、视网膜色素屏障上皮 (RPE) 提供了准备条件。RPE 是脉络膜和神经中枢视网膜之间的一层浓密有色上皮单层。它是血流和视网膜之间屏障的一部分,它的功能包括对脱落视杆和视锥外部区段的吞噬作用、杂散光的吸收、维生素 A 的代谢、视黄醛衍生物的再生和组织修复。(Grierson 等,1994,Fisher 和 Reh,2001,Marmorstein 等,1998)。通过其黑色细胞且鹅卵石状的细胞形态很容易识别 RPE。此外,有数种已知的 RPE 标记物,包括细胞视黄醛结合蛋白 (CRALBP),一种同样发现于顶突处的胞质细胞 (Bunt-Milam 和 Saari,1983);RPE65,视黄醛衍生物代谢中涉及的胞质蛋白 (Ma 等,2001,Redmond 等,1998);促贝斯特素,贝斯特卵黄状黄斑变性基因的产物 (VMD2,Marmorstein 等,2000) 和色素上皮衍生因子 (PEDF),具有制管张特性的 48kD 分泌蛋白 (Karakousis 等,2001,Jablonski 等,2000)。

[0034] RPE 的不寻常特性是其表观可塑性。RPE 细胞在有丝分裂期通常是静止的,但受损伤或光凝固后可开始分裂。RPE 细胞邻近受损平面并增殖形成新的单层 (Zhao 等,1997)。几种试验已表明 RPE 单层可产生纤维细胞外观的细胞,它稍后能恢复成其最初的 RPE 形态 (Grierson 等,1994,Kirchhof 等,1988,Lee 等,2001)。目前仍不清楚分裂的细胞和有色上皮层是否来自同一世系,因为分离出了两种 RPE 细胞群:上皮状的和纺锤状的 (McKay 和 Burke,1994)。在体外,取决于生长因子的组合和基质,RPE 可作为上皮保持或快速去分化并变成增殖性的 (Zhao 1997,Opas 和 Dziak,1994)。有趣的是,在长期的静止培养中可重新出现上皮的表型 (Grierson 等,1994)。

[0035] 在哺乳动物发育中,RPE 与神经中枢视网膜-眼泡神经上皮具有相同的祖先。在某些情况下,有人提出 RPE 可反式分化成神经元祖细胞 (Opas 和 Dziak,1994)、神经元 (Chen 等,2003,Vinorez 等,1995) 和晶状体上皮 (Eguchi,1986)。可刺激 RPE 变成神经元的因子之一是 bFGF (Opas 和 Dziak,1994,与眼睛发育通常所需的转录激活剂表达相关的过程,包括 rx/rax、chx10/vsx-2/alx、ots-1、otx-2、six3/optx, six6/optx2、mitf 和 pax6/pax2 (Fischer 和 Reh,2001,Baumer 等,2003)。最近,研究显示小鸡视网膜边缘包含神经干细胞 (Fischer 和 Reh,2000) 且在该区域内表达 pax6/mitf 的有色细胞能响应 FGF 形成神经细胞 (Fisher 和 Reh,2001)。

[0036] 本发明为从 hES 衍生小梁网细胞以及为遗传修饰小梁网细胞用于青光眼治疗提供了条件。

[0037] 本发明还为从 RPE 祖细胞和 RPE 样细胞衍生出小梁网细胞以及为遗传修饰小梁网细胞用于青光眼治疗提供了条件。

[0038] 本发明包括不产生 ES 细胞系、直接从人和非人动物桑椹胚或胚泡期胚胎 (EDCs) 产生 RPE 细胞和 RPE 前体细胞的方法,包括 a) 体外维持未分化状态的 ES 细胞;b) 使 ES 细胞分化成 RPE 和 RPE 前体细胞;并 c) 通过比较所述细胞和体内来源细胞的信使 RNA 转录物鉴别 RPE 细胞。

[0039] 本发明另外提供了 RPE 系或 RPE 细胞前体的衍生方法,所述 RPE 细胞具有增强的防止新血管形成的能力,所述方法包括:a) 使来自动物的体细胞老化,从而使端粒酶缩

短,其中细胞正常复制寿命的 10%被跨越;和 b) 使用所述体细胞作为核转移供体细胞产生过表达血管发生抑制剂的细胞,其中的血管发生抑制剂可以是色素上皮衍生因子(PEDF/EPC-1)。

[0040] 本发明提供了用 hES 细胞来源 RPE、RPE-样和/或 RPE 祖细胞治疗帕金森症的方法。这些可通过立体定位性内条纹植入或微载体递送。或者,它们可不使用微载体递送。也可通过本领域技术人员已知的任何方法扩大培养细胞并用于治疗帕金森症。

[0041] 本发明的其它特征和优势将由以下详述体现。

[0042] 附图描述

[0043] 图 1A-F 是显示自然分化 hES 细胞内有色区外观(RPE 细胞的特征)的一组照片。图 1A 是在 6 孔板中黏附培养 2.5 个月后有色区的照片;图 1B 是在 EB 中培养 2.5 个月后有有色区的照片,放大倍数 45x;图 1C 是黏附培养的有色区的照片;图 1D 是 EB 培养的有色区的照片;图 1E 是有色区和其它培养物之间边界的照片,x200;图 F 与图 E 相同,除了放大倍数是 x400 之外。A 和 B 中的箭头指向有色区。

[0044] 图 2A-F 是显示培养过程中色素沉积和上皮形态丧失和恢复的一组照片。图 2A 是显示初级 EB 生长晕的照片,1 周;图 2B 是显示用胰酶分离的原代培养细胞照片,1 周;图 2C 是显示被增殖细胞环绕的上皮岛的照片;图 2D 是显示培养 1 个月后色素沉积和上皮形态恢复的照片;图 2E 是显示传 3 代后培养物的照片,放大倍数为 x200;图 2F 显示的培养物与 E 相同,放大倍数为 x400。Hoffman 显微镜。黑箭头指向有色细胞,白箭头显示无色素的生长细胞。

[0045] 图 3 左组图(A-D)和右边组图是一组照片和一张曲线图-显示了 hES 细胞来源有色上皮细胞中 RPE 的标志。图 3A 和 3B 是显示 RPE 标志促贝斯特素免疫定位的照片和相应的相位显微镜视野,放大倍数为 x200;图 3C 和 3D 是显示 CRALBP 和相应相差显微镜视野的照片,放大倍数为 x400。箭头显示的是促贝斯特素(A)和 CRALBP(C)对有色细胞的共定位(C,D);箭头状物指向无色区内无这些蛋白质(A,B)的着色(C,D)。图 3 右组图显示用促贝斯特素(a)和 CRALBP(b)抗体进行的细胞裂解物(系 hES#36)蛋白质印迹分析的照片和图表;c,d-未分化的 hES 细胞,c--抗 CRALBP 抗体的对照,d-抗促贝斯特素抗体的对照。图 4 显示的照片证明了标志物 Pax6(图 4A)、Pax2(图 4E)和 mitf(图 4B、图 4F)在长期静止培养的 RPE 样细胞中的表达。图 4C、图 4G-相差,图 4D、图 4H-Pax6/mitf/相差(图 4A、图 4B、图 4C)和 Pax2/mitf/相差(图 4E、图 4F、图 4G)的合并图像。

[0046] 图 5A-B 显示了人胚胎来源细胞培养中 RPE 分化的照片:绕过了 ES 细胞系衍生阶段。

[0047] 图 6 显示了 RPE 制品的转录比较,图 6A-F-基于本体论的注释,此表代表了 RPE 相关基因针对 hES 细胞来源视网膜色素上皮(hES-RPE)、hES 细胞来源反式分化细胞(hES-RPE-TD)、ARPE-19 和 D407 和新鲜分离的人 RPE(fe-RPE)的表达。图 6G-显示已知的 RPE 特异性存在的更多资料,诸如黑色素的生物合成、视觉-视黄醇结合,只在胎儿 RPE 和 ES-RPE 中有,但在 ARPE-19 中没有。

[0048] 发明详述

[0049] 本发明的多种实施方案详述于此并可能通过所提供的实施例进行了进一步的说明。当应用于本说明书和以下全部权利要求中时,除非上下文明确指出,否则“一个”、“一

种”和“这个”的意思包括多于一个的涵义。此外,当用于本说明书中时,除非上下文中明确指出,否则“在里面 (in)”的意思包括“在里面 (in)”和“在上面 (on)”。

[0050] 在本发明的上下文和使用各术语的特殊上下文中,用于此说明书的术语通常具有其在本领域内的普通涵义。在下文或说明书的其它部分对某些用于描述本发明的术语进行了说明,以便为实践者在描述本发明的组合物和方法以及如何制备和使用它们时提供附加的指引。为了方便,可能利用例如斜体字和 / 或引用语标志等使某些术语突出显示。使用突出标示对某一术语的范围和意思没有影响,在同一上下文中,无论它是否被突出标示,某一术语的范围和意思都是相同的。可以理解为同样的事情可以以一种以上的方式叙述。因此,对本文所论述的任一个或多个术语都可使用选择性的语言和同义词,无论该术语是否详述或讨论于此,对其都没有任何特殊的意义。本文提供了某些术语的同义词。描述一个或多个同义词并不排斥使用其它的同义词。在本说明书中任何部分所使用的实施例,包括本文所论述的任何术语的例子,都只具有说明的目的,决非限制了本发明的范围和领域,不考虑任何具体的理论或功能设置,只要数据的加工、收集、转换等是依照本发明进行的就应属于本发明的范围。

[0051] 定义

[0052] “胚胎”或“胚胎的”意指还未植入母体子宫膜的正在发育的细胞团。“胚胎细胞”分离自胚胎或包含于胚胎中的细胞。这也包括卵裂球,早到两细胞阶段获得的卵裂球和聚集的卵裂球。

[0053] 术语“胚胎干细胞”指胚胎来源细胞。更具体而言是指分离自胚泡或桑椹胚的内细胞团且已作为细胞系连续传代的细胞。

[0054] 术语“人胚胎干细胞”(hES 细胞)指人胚来源的细胞。更具体而言 hES 指分离自人胚泡或桑椹胚的内细胞团并且已作为细胞系连续传代的细胞,还可以包括卵裂球和聚集的卵裂球。

[0055] 术语“人胚胎来源细胞”(hEDC)指桑椹胚来源细胞、胚泡来源细胞,包括内细胞团、胚盾或上胚层的细胞,或者早期胚胎的其它全能或多能性干细胞,包括原始内胚层、外胚层和中胚层以及它们的衍生物,还包括卵裂球和来自聚集的单个卵裂球的细胞块或来自不同发育阶段的胚胎,但不包括已作为细胞系传代的人胚胎干细胞。

[0056] 具有分化成人体几乎任何组织的能力的胚胎干 (ES) 细胞为移植疗法提供了能再生且具组织相容性的细胞的无限来源,因为免疫排斥的问题可通过核转移和孤雌生殖技术克服。

[0057] Hirano 等人 (2003) 最近的发现显示小鼠 ES 细胞可在体外分化实验中产生眼睛样的结构。其中对有色上皮细胞进行了描述,类似视网膜色素上皮。

[0058] 在 Advanced Cell Technology 上用灵长类和人 ES 细胞系进行的预备实验显示在专门的培养系统中这些细胞分化成可分离和传代的 RPE 样细胞。人和小鼠 NT, Cyno parthenote ES 细胞衍生物具有 RPE 的多种特性:这些有色上皮细胞表达 RPE 的 4 种分子标志 - 促贝斯特素、CRALBP、PEDF 和 RPE65;象 RPE 一样,它们在培养中增殖的同时也伴随着去分化,即色素和上皮形态的丢失,在细胞形成单层并静止后这两种特征都恢复了。所述 RPE 样细胞很容易传代、冻结和融化,因此允许它们的扩充。

[0059] 本发明的发明者进一步证明了人 ES 细胞在体外分化实验中也产生多种眼睛 (玻

璃体)样结构。

[0060] 这些结构的组织学分析显示细胞的模式与早期视网膜发育一致,包括类似于视杆和视锥的细胞聚集体。

[0061] RPE 移植

[0062] 目前,对 RPE 同种异体移植物的长期缓慢的排斥反应阻碍了科学家确定该 RPE 移植的疗效。有数种方法被考虑用于克服此障碍。最简单的方法是采用全身性的免疫抑制,这伴随着诸如癌症和感染等严重的副作用。第二条途径是移植患者自身的 RPE,即自体移植,但这种方法的缺点在于是用旧的、不健康的 RPE 去置换更不健康的 RPE。还有第三条途径是利用来自同一患者的虹膜上皮(IPE),但该方法的缺点在于 IPE 可能完成不了 RPE 的所有视觉相关功能。最终需要发现一种能消除排斥反应且研究者因此能确定在 AMD 和 ARMD 中 RPE 移植的真正疗效的方法。核转移和孤雌生殖提高了被移植 RPE 细胞和祖细胞的组织相容性。色素性视网膜炎中的 RPE 缺陷

[0063] 色素性视网膜炎是一类遗传病,其中视觉感受器由于异常的遗传程序而逐渐被破坏。某些形式引起患者在相对年轻的时候就全部失明,而其它形式则显示出对视觉有少许损伤的特征性“骨针”视网膜变化。在全世界范围内该疾病患者大约有一百五十万人。在专门表达于 RPE 的基因中发现了引起常染色体隐性 RP 的两个基因缺陷:一个是由维生素 A 代谢中所涉及的 RPE 蛋白质(顺式视黄醛结合蛋白)造成的,第二个涉及 RPE 独特的另一种蛋白质 RPE65。一旦排斥反应被克服,这两种形式的 RP 都应能直接通过 RPE 移植进行治疗。这种治疗在几年前是难以想象的,那时候 RP 是一种没有希望治愈且了解甚少的失明症。

[0064] 有关 RPE 移植的新研究显示有希望对视网膜病变进行治疗,包括黄斑变性在内。而且,许多晚期 RP 患者在进行胎儿视网膜细胞移植后重新获得了一定程度的有效视力。例如,一名患者从几乎看不见光改善到能数出放在离其脸部约 6 英尺距离处的手指。在第二个病例中,患者视力提高到能通过管状视野看见字母。在这些研究中移植是通过注射进行的,在现存的神经中枢视网膜下引入了新的视网膜细胞。尽管确定存活的细胞与其它神经元形成连接并在它们周围开始发挥类似光感受器的功能,但是因为所移植的胎儿细胞是异源的(即,非遗传匹配的),所以不是所有的细胞都能存活的。前 8 名患者接受移植后大约一年,其中 4 名患者恢复了一定程度的视觉功能,而第五名患者表现出正在恢复的迹象。

[0065] 三种新来源的人胚胎干细胞系在特性上与早先所述的相似(Thomson 等 1998, Reibunoff 等,2000, Richards 等,2000, Lanzendorf 等,2001):它们在传了 45 代或超过 130x2 个种群后仍保持未分化的表型并表达未分化 hES 细胞的已知标志 Oct-4、碱性磷酸酶、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81。在 EB 或长期黏附培养基中以及在畸胎瘤内所有的 hES 细胞系都分化成三个胚芽层的衍生物。以以下标准判断,其中一个 hES 细胞分化衍生物与视网膜色素上皮相似:从形态学上看,它们具有典型的上皮鹅卵石单层外观并且在其胞质部分包含黑褐色的色素,这已知在人体内只存在于黑素细胞、角质形成细胞、视网膜和虹膜色素上皮(IPE)中。不过,黑素细胞是非上皮细胞,而角质形成细胞不分泌而只是积聚黑色素。这些细胞中存在一批 RPE 特异蛋白质—促贝斯特素、CRALBP、PEDF,表明它们可能与 RPE 而非 IPE 相似。另一相似处是被分离所色素细胞在培养中的行为,在正在增殖的细胞中观察到很少或没有色素,但在紧密堆积的上皮岛中则保留了色素,或者在细胞静止

后新建立的鹅卵石单层中重新表达了色素。这样的现象在有关 RPE 细胞培养的文献中也有描述 (Zhao 等综述, 1997), 且原先已报道过 (Vinores 等, 1995) 神经元标志物微管蛋白 β III 在体外特异定位于正在分化的 RPE 细胞中, 而不是具有典型 RPE 形态的细胞中, 这反映了 RPE 的可塑性和其去分化成神经系统细胞系的能力。本发明的发明者观察到微管蛋白 β III 以相同模式定位于原代和传代培养的 RPE 和 RPE 样细胞中, 这反映了所述细胞在培养中的去分化作用或表明分开的细胞群最终分化成神经元, 在长期培养的 hES 细胞整个分化过程中, 它们最初的定位邻近有色细胞并可以与 RPE 样细胞一起被共同分离。

[0066] 在正在生长的眼泡内, RPE 和神经视网膜共有同一种双潜能神经上皮祖细胞, 且它们的命运据显示是由 Pax2、Pax6 和 Mitf 决定的 (Baumer 等, 2003), 后者是前两者的靶目标。Pax6 在早期用作原神经基因的激活剂, 而进一步发育后在 RPE 中有所下调, 在成熟视网膜的无长突细胞和神经节细胞内保持一定的水平 (Ashery-Padan 和 Gruss 综述, 2001)。在金鱼中, 也发现了在有丝分裂期间活跃的再生神经元的祖细胞 (Hitchcock 等, 1996)。本发明的发明者已发现许多 RPE 样细胞以类似于微管蛋白 β III 的模式表达 mitf 和 Pax6, 并且只发现于长期培养的有色上皮岛周围的非上皮形态的非有色细胞中或具“部分”RPE 表型的细胞中 (轻微着色和松散堆积)。在新传代的增殖细胞中, 几乎每个细胞中都能发现所有这些标志物, 显示出或者 RPE 样细胞在增殖开始时向祖细胞阶段逆转, 或者视网膜祖细胞大量增殖。有趣的是, 在同样发现了上皮形态有色细胞岛的畸胎瘤中, Pax6 表达于邻近有色区的无色细胞中 (资料未显示)。先前的多种研究已显示了 RPE 在培养中的去分化及其它们的反分化成以下类型细胞: 神经元表型细胞 (Reh 和 Gretton, 1987, Skaguchi 等, 1997, Vinores 等, 1995, Chen 等, 2003)、神经元、无长突细胞和光感受器细胞 (Zhao 等, 1995)、神经胶质细胞 (Skaguchi 等, 1997)、神经视网膜 (Galy 等, 2002) 和神经祖细胞 (Opas 和 Dziak, 1993)。所述的祖细胞可轮流与 RPE 样细胞共存于培养物中或作为 RPE 样细胞去分化的结果出现。同时, 神经视网膜细胞在体外可反分化成 RPE (Opas 等, 2001), 因此选择性的, 微管蛋白 β III 和 Pax6 阳性细胞可代表共分离的神经细胞或神经祖细胞反分化成 RPE 样细胞的瞬时阶段。

[0067] 使用以下实施例所述方法可使 hES 细胞自发分化成 RPE 样细胞, 且本发明的发明者注意到有色上皮细胞确实出现于 6-8 周以上的培养物中, 且它们的数量随时间增加 - 在 3-5 个月内几乎每个 EB 都有一个大的有色区。除了所述的 hES 细胞系之外, 还有 6 个更新的衍生 hES 细胞系转变成 PRE 样细胞, 这表明由于 ES 细胞通常自发选择神经系统的方向, 通过将默认设置为所述途径的高级阶段可产生 RPE 样细胞。还可能在所述的长期培养中, 正在分化的 hES 细胞形成了一个多层的外环境, 被许可的 / 或有益的分化信号来自细胞外基质和 hES 细胞分化衍生物所产生的生长因子。HES 细胞分化成 RPE 样细胞的模型可作为有效的工具用于研究所述的微环境如何协调 RPE 分化和反分化。

[0068] RPE 在光感受器的维护中起重要的作用, 而体内的各种 RPE 障碍与许多视觉改变的疾病有关, 诸如 RPE 脱离、营养不良、萎缩、视网膜病变、色素性视网膜炎、黄斑萎缩或变性, 包括年龄相关的黄斑变性, 它可导致光感受器受损和失明。由于它所具有的伤口愈合能力, RPE 被广泛研究应用于移植疗法中。

[0069] 研究表明在多种动物模型和人中 (Gouras 等, 2002, Stanga 等, 2002, Binder 等, 2002, Schraermeyer 等, 2001, Lund 等综述, 2001), RPE 移植具有良好的视觉修复潜能。最

近另一有关 RPE 移植的预期生态位被提出并甚至达到了临床试验阶段：因为这些细胞分泌多巴胺，它们可用于治疗帕金森症 (Subramanian, 2001)。不过，即使在免疫特许的眼睛内，如果使用异源移植物，也存在移植的排斥反应的问题，从而阻碍了此方法的进步。另一问题是对胎儿组织的依赖性问题，因为成年 RPE 的增殖潜能非常低。

[0070] 作为免疫相容性组织的来源，hES 细胞被期望用于移植疗法中，因为免疫排斥的问题可用核转移即使克服。人 ES 细胞新分化衍生物 - 视网膜色素上皮样细胞以及所述分化体系的可靠性和简单性可能为移植提供了有吸引力的 RPE 细胞潜在来源。

实施例

[0071] 实施例 1

[0072] 在长期培养中自发分化成有色上皮细胞

[0073] 在缺乏 LIF、FGF 和 Plasmanate 的条件下当 hES 细胞在 MEF 中培养过满时，它们形成了厚的多层细胞。约 6 周后，在较大的细胞丛中出现了黑色的细胞岛（图 1）。这些黑色细胞可以用肉眼很容易观察到并且在图 1A 所示的细胞板中看起来象“雀斑”。在较高的放大倍数上，这些细胞岛看上去象典型的上皮细胞鹅卵石单层中紧密堆积的多边形细胞，在胞质中有褐色的色素（图 1C）。细胞内的色素量有差异，岛中心部位具有最多的色素，而靠近边缘的最少（图 1E、F）。

[0074] 在前 6-8 周，当 hES 细胞形成胚状体 (EB) 时，有色上皮细胞出现于大约 1-2% 的 EB 中（图 1B）。随时间推移，越来越多的 EB 发育成有色细胞，到 3 个月的时候几乎每个 EB 都有有色上皮区（图 1D）。EB 有色区内的细胞形态类似于黏附培养细胞（图 1D）。

[0075] 实施例 2

[0076] 有色上皮细胞的分离和培养

[0077] 本发明的发明者从黏附的 hES 细胞培养物和 EB 二者中分离有色上皮细胞。用酶（胰酶和 / 或胶原酶和 / 或 ordispase）消化有色的多边形细胞，用玻璃毛细管选择性的从这些有色岛中挑选细胞。尽管小心的只挑选有色细胞，但分离的细胞群总是包含某些非有色细胞。将细胞在明胶或层粘连蛋白上铺 1-2 天后，这些细胞被认为是原代培养细胞 (P0)。

[0078] 原代培养物包含有色多边形细胞岛以及某些单个的有色细胞。培养 3-4 天后，看上去已失去了上皮细胞的形态（变得更平且细胞具有扁平状伪足）的无色细胞出现在某些细胞岛的外周（图 2）。所述外周细胞数目随时间推移而增加，表明这些细胞正在增殖，2 周后，新形成的单层细胞中大部分细胞不含或含很少的色素。继续培养 2-3 周后，有色上皮细胞开始重新出现，与最初的培养物没有明显的区别（图 2）。

[0079] 实施例 3

[0080] RPE 标志物的检测

[0081] 将这些分化的人细胞初步定性为 RPE 是基于它们与先前所描述的 RPE 培养物的相似性，主要是，它们的上皮形态和含有色素。人体中有三种有色上皮细胞：视网膜和虹膜有色上皮和角质形成细胞，但后者不分泌色素。上皮结构和鹅卵石的形态也不是其它有色细胞所共有的，例如黑素细胞。

[0082] 还值得注意的是 RPE 细胞在培养过程中表现为丢失而后重新获得它们的色素和上皮形态 (Zhao 1997, Opas 和 Dziak, 1994)，而且有色细胞也有相似方式的表现，由此检验

ES 衍生细胞可能是 RPE 的假设,它们可以用针对已知 RPE 标志物促贝斯特素和 CRALBP 的抗体进行染色。图 4(左边组图)显示了促贝斯特素(A)和 CRALBP(C)的膜定位,在有色上皮岛中都能找到。不是所有的细胞都被这些抗体染色,而且染色的强度与色素表达和群落“紧密度”相关 – 在细胞更大且更松散堆积的各 有色岛的边界处两种蛋白质都显示出较低的表达。

[0083] 为了进一步表征可能的 RPE 细胞,用蛋白质印迹法分析了促贝斯特素、CRALBP 的表达。图 4(右侧组图)显示了细胞裂解物中相应于促贝斯特素,68kD(a)、CRALBP,36kD(b)的条带。所有这些蛋白质均在两种原代培养物中发现并随后被传代。

[0084] 用实时 RT-PCR 在 RPE 样细胞中找到了另一已知的 PRE 标志物, RPE65(图 4,右侧组图,底部), PEDF ELISA 检测显示了 PEDF 存在于所有假定 RPE 培养物的细胞裂解物中,而蛋白质印迹分析显示了一条大约 48kD 的条带(未显示)。

[0085] RPE 样培养物中神经元和视网膜祖细胞标志物的检测

[0086] 图 4 显示了 PAX-6、Pax2、mitf 和微管蛋白 β III 在新传代和旧培养的 hES 细胞衍生 RPE 中的定位。在增殖培养物中(胰酶消化 3 天后,未显示),增殖细胞丧失了 RPE 样形态,几乎每个细胞都显示出存在 mitf、Pax6、微管蛋白 β III 和 nestin(未显示)。Pax2 只在一小类呈现 mitf 阴性的细胞中找到,而存在很大程度的 Pax6/mitf、mitf/微管蛋白 β III 和 Pax6/微管蛋白 β III 共定位。在旧的培养物静止培养 21 天,有色上皮岛复原后, PAX-6 和 mitf 大部分发现于有色上皮岛之间的非上皮形态的无色细胞中(图 4, A-C),而微管蛋白 β III 则具有相似模式的分布(未显示)。不过,存在 mitf 阳性和 Pax6 阴性细胞群,定位接近有色岛的外周(图 4, A-C)。Pax2 只在很少的 mitf 阴性细胞中找到(图 4, E-H)。在“成熟”的有色上皮岛细胞中曾发现检测不到这些蛋白质中任何一种的存在。不过,在只具有某些 RPE 特征的细胞内的这些标记物通常是明显的,即,或者看上去象上皮但无色素,或者在某些远离有色上皮岛的单个有色细胞中。

[0087] 实施例 4

[0088] 来自 hES 细胞系 H9 的 RPE 样细胞和来自 Cyno-1 ES 细胞的 ACT J-1 和来自现存 hES 细胞系 H1 和 H7 的 RPE 样细胞衍生物的表征

[0089] 扩充培养 RPE 样细胞系,并为了冻存和复苏进行检测,用以下方法和 RPE 细胞的分子标记物进行定性:用蛋白质印迹法和免疫荧光检测促贝斯特素和 CRALBP,用 ELISA 和蛋白质印迹法检测 PEDF,以及用 RT-PCR 检测 REP65。将细胞注入 SCID 小鼠,以未分化的 hES 或 Cyno-1 细胞作为对照评估肿瘤发生率。在商用临床实验室中研究角化类型的 RPE 样细胞。然后如本申请书中另外描述的进行 RPE 样细胞功能特性的定性和它们移植潜能的研究,同时使用了本领域技术人员已知的那些技术。

[0090] 用 Affymetrix 人类基因组芯片完成了基因表达图谱的检测。比较了来自 ES 细胞的 RPE 样细胞和来自尸检的视网膜样品中基因的表达情况。用数种动物模型验证移植 RPE 样细胞的有效性,包括但不限于,恒河猴、大鼠和兔子。

[0091] 实施例 5

[0092] 保证 RPE 样细胞的高产量的分化培养体系的优化

[0093] ES 细胞培养于营养细胞层上或作为胚状体(EB)在 bFGF、胰岛素、TGF- β 、IBMX、bmp-2、bmp-4 或它们的组合物存在的条件下培养,包括逐步添加营养成分。或者,将 ES 细

胞培养于多种胞外基质包被的平板上（层粘连蛋白、纤连蛋白、胶原蛋白 I、胶原蛋白 IV、Matrigel 等），用来评估 ECM 在 RPE 形成中的作用。在不同的时间间隔利用实时 RT-PCR 检测早期 RPE 祖细胞的分子标志物（Pax6、Pax2、mitf）和 RPE 细胞的分子标志物（CRALBP、促贝斯特素、PEDF、REP65）的表达，以证实和确定上文所提及试剂的成功组合和在 RPE 样细胞或其祖细胞中产生富集的逐步过程。此方法还可用于产生 RPE 和其它眼睛组织共同的祖细胞，诸如光感受器和神经视网膜，它们由于其分化潜能而被分离和进一步定性并用于移植试验中。

[0094] 实施例 6

[0095] 来自现存的和新的 ES 细胞系的 RPE 和其它眼睛组织祖细胞的衍生物

[0096] 利用基因表达图谱的数据，将 RPE 祖细胞标志物的表达与表面蛋白的表达联系起来，以发现针对 RPE 祖细胞的表面标志物的独特组合。如果发现了这样的标志物，可用抗表面蛋白质的抗体分离纯的 RPE 祖细胞群，然后进行培养并进一步在培养中分化，或者用于移植试验中使其在移植后再分化。

[0097] 如果来自基因表达图谱的资料不够充分，为了分离 RPE 祖细胞，可以使用以下方法。在以 Pax6 启动子作为对照的条件下用 GFP 转染 ES 细胞和 RPE 样细胞，挑选稳定的转染子。从被转染的分化 ES 细胞或增殖（去分化）RPE 细胞培养物中，通过 FACS 分离 GFP/Pax6 阳性细胞并用作抗原注射小鼠以产生针对 Pax6 阳性细胞表面分子的单克隆抗体。因为 Pax6 只存在于 RPE 祖细胞中，用几种策略可完成筛选（通过 FACS）：a) 抗正在增殖的 RPE 样细胞，b) 抗 Pax2 阳性 RPE 细胞，c) 抗 mitf 阳性 RPE 细胞。对于 b) 和 c) 而言，将在相应启动子控制下用 GFP 转染 RPE 细胞；使用无这些抗原的 RPE 或 ES 细胞作为阴性对照。扩充培养经上述所有三种策略选定的阳性克隆后，检测抗体对筛选中所用的所有类型细胞的反应并进行进一步分析：因为此方法可产生识别特异和非特异于 RPE 祖细胞细胞表面抗原的抗体，就可检测来自正在分化的 ES 细胞群总体的细胞或用这些抗体选定的 RPE 细胞的 RPE 祖细胞分子标志物和它们产生 RPE 的能力。

[0098] 利用优化的确定的阶梯式步骤产生 RPE 或其它眼组织早期祖细胞以及它们独特表面标志物的抗体，可从已分化的 ES 细胞中分离所述祖细胞并进行体外培养。用目标 2 中所述策略研究它们分化成各种眼睛组织的能力。

[0099] 已产生 RPE 样细胞的三个 ES 细胞系（H9、ACT J-1、Cyno-1）、RPE- 样细胞将被用于继续产生如目标 1 和目标 2 中所述的 RPE 样细胞和它们的祖细胞，而 HI 和 H7 hES 细胞系将被用于产生新的 RPE 样细胞系。在扩充培养并对 RPE 的分子标志物进行定性后，将这些细胞系进行单一的克隆，对所产生的系列如目标 1 所述进行鉴定。符合 RPE 细胞标准的细胞系将用于移植试验。新的人 ES 细胞系将来自未用过的 IVF 胚胎，来自捐赠者的卵母细胞，受刺激后不受精即发育（孤雌），应用核转移技术从所产生的获自捐赠卵母细胞并正在发育的胚泡中产生新的人 ES 细胞系。RPE 样细胞和常见的眼睛祖细胞将用目标 2 中的方法获自这些细胞系，依照目标 1 鉴定所产生的细胞系。[任选的] 从无病毒体系中产生新的人 ES 细胞系、鉴定并提交临床试验。

[0100] 实施例 7

[0101] 在各种动物模型中 RPE 样细胞和祖细胞对色素性视网膜炎和黄斑变性的治疗潜能

[0102] 在 cynomologus 猴（短尾猿）中检测灵长类 ES 细胞。开始，进行玻璃体切除术并将细胞移植入动物的视网膜下空间处。第一步移植悬浮液形式的细胞，然后移植基底或基质形式的细胞，以产生单层移植。这也可利用衍生自人 ES 细胞的细胞在免疫抑制的患色素性视网膜炎的兔子或多种其它动物模型中完成，包括啮齿动物（rd 小鼠、RPE-65 敲除小鼠、桶状小鼠、RCS 大鼠、猫（阿比西尼亚猫）和狗（视锥病变“cd”狗、进行性视杆-视锥病变“prcd”狗、早期视网膜病变“erd”狗、1、2 和 3 型视杆-视锥发育异常“rcd1、rcd2 和 rcd3”狗、光感受器发育异常“pd”狗和 Briard“RPE-65”狗）。用荧光血管造影术、组织学方法（是否存在光感受器恢复）和可能的 ERG 进行检查。也可进行功能检查，包括吞噬作用（光感受器片段）、维生素 A 代谢、紧密连接的传导性和电子显微镜。

[0103] 实施例 8

[0104] 来自人的胚胎来源细胞的 RPE 细胞的直接分化

[0105] 在使用或不使用免疫外科手术去除滋养外胚层的条件下将人胚泡期胚胎放在小鼠或小鸡的胚胎成纤维细胞上或者直接放在胞外基质蛋白包被的组织培养器皿中。细胞直接分化，而不是培养和传代产生人 ES 细胞系。

[0106] 在缺乏 LIF、FGF 和 Plasmanate 的条件下当 hES 细胞在 MEF 中培养过满时，它们形成了厚的多层细胞。（或者如本领域技术人员所已知的可以用生长因子、培养基和 FBS 改变直接分化。）约 6 周后，在较大的细胞丛中出现了黑色的细胞岛。这些黑色细胞可以用肉眼很容易观察到并且在图 5B 所示的细胞板中看起来象“雀斑”。在较高的放大倍数上，这些细胞岛看上去象典型的上皮细胞鹅卵石单层中紧密堆积的多边形细胞，在胞质中有褐色的色素（图 5A）。细胞内的色素量有差异，岛中心部位具有最多的色素，而靠近边缘的最少（图 5B）。

[0107] 尽管通常不会，但当 hES 细胞直接分化时它们可能形成胚状体（EB）。在前 6-8 周，有色上皮细胞出现于大约 1-2% 的这些分化细胞和 / 或 EB 中。随时间推移，越来越多的 EB 发育成有色细胞，到 3 个月的时候几乎每个 EB 都有有色上皮区。EB 有色区内的细胞形态非常类似于黏附培养的细胞。

[0108] 材料和方法：

[0109] MEF 培养基：高葡萄糖 DMEM，补充了 2mM GlutaMAXI 和 500u/ml 青霉素、500ug/ml 链霉素（均来自 Invitrogen）和 16% FCS (HyCLone)。HES 细胞生长培养基：基因敲除用高糖 DMEM，补充了 500u/ml 青霉素、500ug/ml 链霉素、1% 非基本氨基酸溶液、2mM GlutaMAXI、0.1mM β -巯基乙醇、4ng/ml bFGF (Invitrogen)、1-ng/ml 的人 LIF (Chemicon, Temecula, CA)、8.4% 的血清替代物 (SR, Invitrogen) 和 8.4% Plasmanate (Bayer)。衍生培养基包含与生长培养基同样的组分，不同之处在于与生长培养基相比，它具有较低浓度的 SR 和 Plasmanate（各 4.2%）以及 8.4% FCS 和 2 倍浓度的人 LIF 和 bFGF。EB 培养基：除了 bFGF、LIF 和 Plasmanate 之外与生长培养基相同；SR 浓度是 13%。RPE 培养基：50% EB 培养基和 50% MEF 培养基。

[0110] HES 细胞系

[0111] 用于这些试验的细胞系 hES35、36、45 是改进先前所报道方法的方法产生的 (Thomson 等, 1998, Reubinoff 等, 2000, Lanzendorf 等, 2001)。经两个制度审查委员会的批准，人冻存的胚泡（系列 hES35）或裂开的胚胎（系列 hES36 和 hES45）由已完成生育力

治疗的夫妇捐赠用于研究。

[0112] 用黏附的 hES 细胞或胚状体 (EBs) 进行分化实验。对于黏附分化而言, hES 细胞可以在 MEF 中长满, 直至 hES 细胞失去它们的紧密边缘, 此时用 EB 培养基置换原培养基 (通常是在传代 8-10 天后)。

[0113] 每 1-2 天换一次培养基。为了 EB 形成, 将 hES 细胞用胰酶消化并在低黏附平板 (Costar) 上培养于 EB 培养基中。

[0114] 免疫染色

[0115] 将细胞固定于 2% 多聚甲醛, 用 0.1% NP-40 使其可渗透以便胞内抗原的定位, 用 PBS (Invitrogen) 配制的 10% 山羊血清、10% 的驴血清 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 封闭至少 1 小时。在 4℃ 与一抗保温过夜, 加入二抗 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 一小时。在所有保温操作之间用 PBS 配制的 0.1% Tween-20 (Sigma) 洗涤样品 3-5 次, 每次 10-15 分钟。用带 DAPI 的 Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 为样品着色并在荧光显微镜下 (Nikon) 观察。碱性磷酸酶的定位或是用 Vector Red (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 定位于活细胞或是依照制造商的说明在免疫染色期间的第二次洗涤后进行定位。所用的抗体: 促贝斯特素 (Novus Biologicals, Littleton, CO)、抗 CRALBP 抗体由 Dr. Saari, University of Washington 惠赠。二抗来自 Jackson ImmunoResearch Laboratories, 而链霉亲和素-FITC 购自 Amersham。

[0116] RPE 样细胞的分离和传代

[0117] 用 PBS 漂洗黏附培养的 hES 细胞或 EB 两次并在 0.25% 胰酶 / 1mM EDTA (Invitrogen) 中 37℃ 保温直至细胞单层松散。用玻璃毛细管将有色区的细胞刮下, 转移到 MEF 培养基中, 200xg 离心, 并放到明胶包裹平板内的 RPE 培养基中。细胞附着后更换培养基 (通常在 1-2 天内), 之后每 5-7 天换一次; 每 2-4 周用 0.05% 胰酶 / 0.53mM EDTA (Invitrogen) 将细胞传代。

[0118] 蛋白质印迹分析和 ELISA

[0119] 用 Laemmli 缓冲液 (Laemmli, 1970) 制备样品, 缓冲液中补充有 5% 的巯基乙醇和混合蛋白酶抑制剂 (Roche), 煮沸 5 分钟并用 Mini-Protean 装置加到 8-16% 梯度凝胶 (Bio-Rad, Hercules, CA) 上; 每块胶在 25-30mA 进行电泳; 以 20 伏电压过夜将蛋白质转移到 0.2 的硝酸纤维素膜 (Schleicher and Shull, Keene, NH) 上。用 Ponceau Red (Sigma) 对印迹膜进行暂时染色使条带可见, 用 Milli-Q 水进行洗涤, 并用溶于 0.1% TBST (Bio-Rad) 的 5% 脱脂奶粉封闭 1 小时。加入抗促贝斯特素、CRALBP 或 PEDF (Chemicon) 的一抗 2 小时, 然后用 TBST 洗 3 次, 每次 15 分钟; 加入过氧化物酶缀合的二抗 1 小时, 并重复上述洗涤。用 Super-Signal 试剂 (Pierce) 通过 ECL 体系检测印迹。依照制造商的说明用 PEDF ELISA 试剂盒 (Chemicon) 对细胞裂解物进行 PEDF ELISA 分析。

[0120] 实时 RT-PCR

[0121] 通过两步法从分化的 ES 培养物中提纯总 RNA。用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 分离天然 RNA 并进一步用 Rneazy 小柱 (Qiagen) 进行纯化。用商品化的用于 RPE65 检测的引物对 (Assay on Demand & Hs00165642ml, Applied Biosystems) 和 Quantitect Probe RT-PCR 试剂 (Qiagen), 依照制造商的 (Qiagen) 说明通过实时 PCR 监测 RPE65 转录物的水

平。

[0122] 未分化 hES 细胞系的衍生和表征

[0123] 这些试验中用了两个雌性、一个雄性 hES 细胞系。有关这些 hES 细胞系衍生的细节在别处也有报导。所有细胞系已传代超过 50 次,在此期间它们保持未分化的集落形态、高碱性磷酸酶活性且表达 Oct-4、SSEA-3、SSEA-4、TRA I-60 和 TRA I-81(数据未显示)。其中两个细胞系具有标准的核型(hES36, hES35),而在 hES45 中即有标准的也有非整倍体的亚群。由于在体外以及在畸胎瘤中的自发分化,所有细胞系均表达三胚芽层的标志-肌肉肌动蛋白、 α -胎蛋白和微管蛋白 β III。

[0124] 实施例 9

[0125] 利用转录基因组鉴定离体分化的正常分化细胞

[0126] Transcriptomics-hES- 细胞衍生物可能在未来的再生医学中扮演着重要的角色。这些衍生物和其它干细胞衍生物的定性检测仍然是一个挑战,可以用功能性基因组的方式进行处理。我们比较了 hES-RPE 相对于体内同等物-胎儿 RPE 细胞的转录图谱,研究者已对它的移植价值进行了广泛的研究。然后将两个图谱都与先前所报导的(Rogojina 等, 2003) 有关人 RPE 细胞系转录物组的资料进行比较。

[0127] 将我们数据组中的基因表达图谱与两种人 RPE 细胞系(未转化的 ARPE-19 和已转化的 D407, Rogojina 等, 2003) 进行比较以确定 hES-RPE 是否具有相似的普遍转录特征。为了说明表达于所有细胞中的共同的持家基因,我们使用了来自未分化 hES 细胞(H1 系列, h1-hES, --sato 等, 2003) 和支气管上皮细胞(BE, Wright 等, 2004)、公认可利用的 Affymetrix 数据组作为对照,因为它们具有共同的上皮来源,从而可以排除共同的持家基因和上皮基因并确定 RPE 特异性基因。

[0128] 在 hES-RPE、hES-RPE-TD、ARPE-19、D407 之间存在相似性和差异性。通过分析存在于 hES-RPE/ARPE-19 但不存在于 BE(1026 个基因)中的那些基因之间唯一的交叉点进一步证实了它们的相似性。为了说明背景,我们将这与存在于 BE/hES-RPE 但不存在于 ARPE-19(186 个基因)中的唯一交叉点进行了比较,这样产生的 hES-RPE 和 ARPE-19 中的相似性比用 BE 进行比较所产生的要高 5 倍到 6 倍。D407/ARPE19 看上去丢失了 RPE 特异性基因,诸如 RPE65、促贝斯特素、CRALBP、PEDF,它是典型的长期传代细胞(图 6)。进一步的资料库显示已知的 RPE 特异存在处,诸如黑色素生物合成、视觉、维生素 A 结合等,只存在于胎儿 RPE 和 ES-RPE 中,但不存在于 ARPE19 中。

[0129] 将 hES-RPE、ARPE-19 和 D407 与它们的体内同等物-新鲜分离的人胎儿 RPE(feRPE) 进行比较,结果与我们早先的资料一致,证明了 hES-RPE 与人 feRPE 之间的转录同一性显著高于 D407 与 fe RPE 之间(2.3 倍差异-849 个基因/373 个基因)和 ARPE-19 与 feRPE 之间(1.6 倍差异-588 个基因/364 个基因)的同一性(图 5c/5d)。以上鉴定的只存在于 hES-RPE 中而不存在于 ARPE-19 或 D407 中的 RPE 特异性标志也存在于 feRPE 中,表明 hES-RPE 与其体内同等物之间的相似程度比培养的 RPE 细胞系之间的相似程度要高。

[0130] hES-RPE 中的 784 个基因在 feRPE 和 ARPE-19 数据组中没有。由于保持“滋生”基因可能在移植入患者体内时潜在的引起 hES 衍生物转化成恶性的畸胎瘤,所以我们利用目前可利用的 Affymetrix 点阵数据组(Abeyta 等 2004 Sato 2003) 建立了保守的潜在“滋生”基因数据。这产生了出现于所有 12 个数据组中的 3806 个基因的列表(包括共同的持

家基因)。存在于 hES-RPE 数据组但不存在于 feRPE-ARPE-19 中的 784 个基因中只有 36 个是与 3806 个潜在滋生基因是相同的。这些基因中没有一个是诸如 Oct4、Sox2、TDGF1 等已知的滋生性基因。

[0131] 实施例 10

[0132] 利用 RPE 细胞治疗帕金森症

[0133] 因为 hRPE 分泌 L-DOPA, 所以它们可作为备选细胞来源用于帕金森症细胞疗法中。研究显示所述的附着于明胶包被微载体上的细胞可成功的被移植入一侧患帕金森症的猴子中并产生并显著改善症状(每个靶目标移植 1 万至 5 万个细胞), 而在 FDA 核准的试验中, 开始在接受 hRPE 条纹内移植的 2000 名患者中均未观察到有不利效果。使用 hES 细胞来源 RPE 的许多优势之一是它避开了捐赠的眼组织不足的问题。同时还促进了基因疗法的应用。

[0134] 其它实施方案

[0135] 从前文的叙述中, 显而易见可对本文所述的本发明进行变更和修饰以使其适应不同的用途和条件。

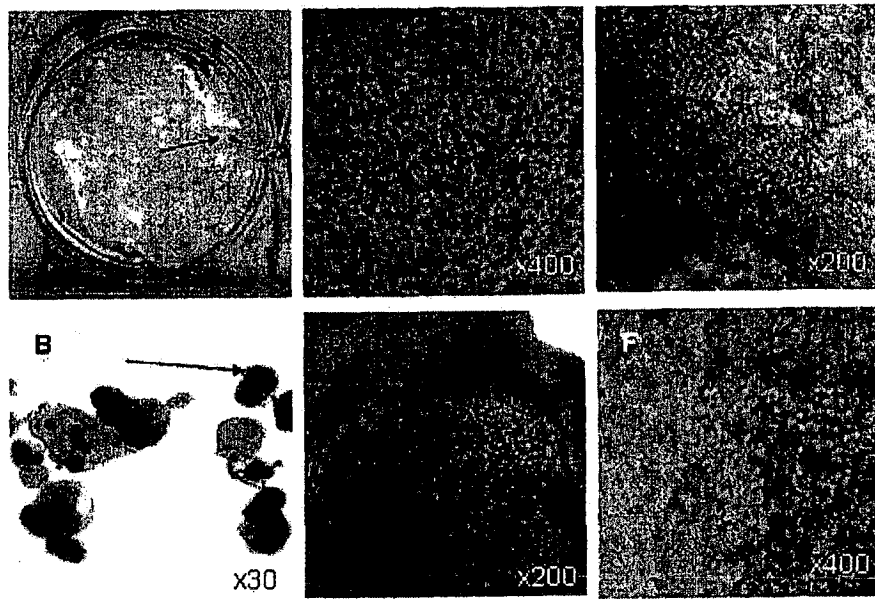


图 1

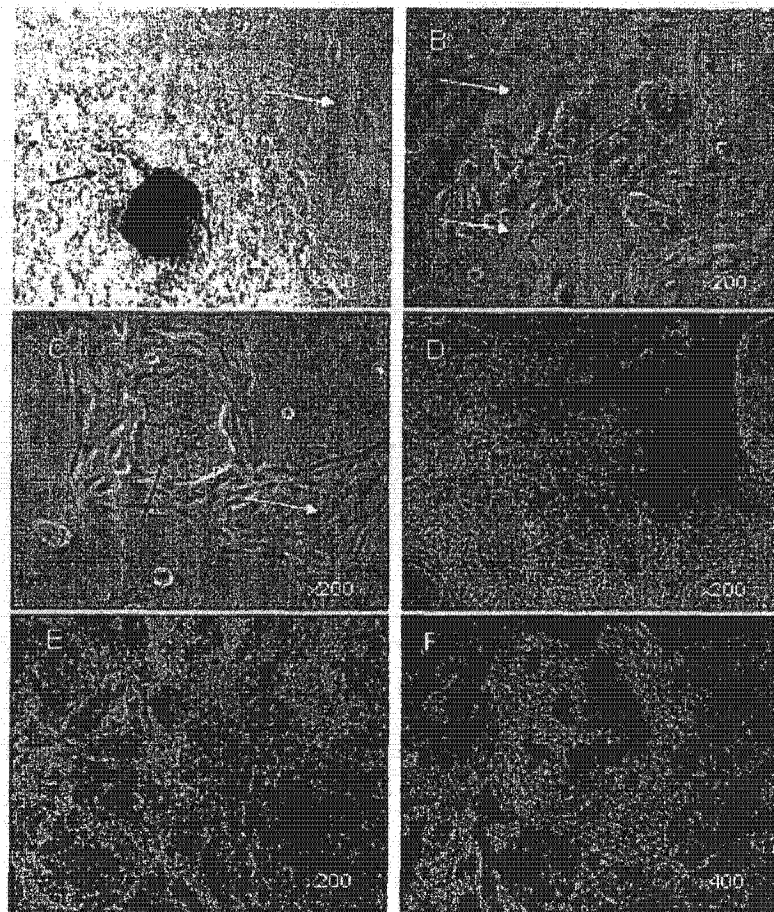


图 2

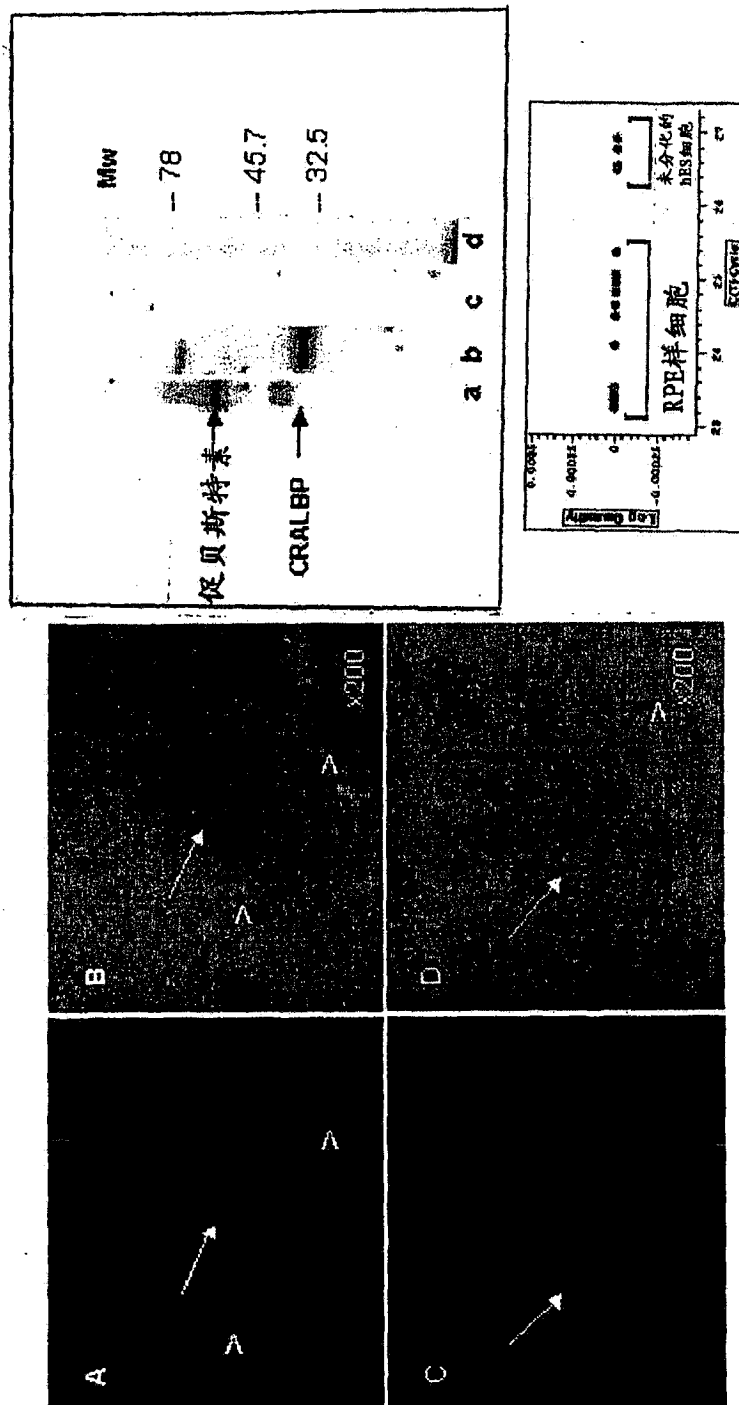


图 3

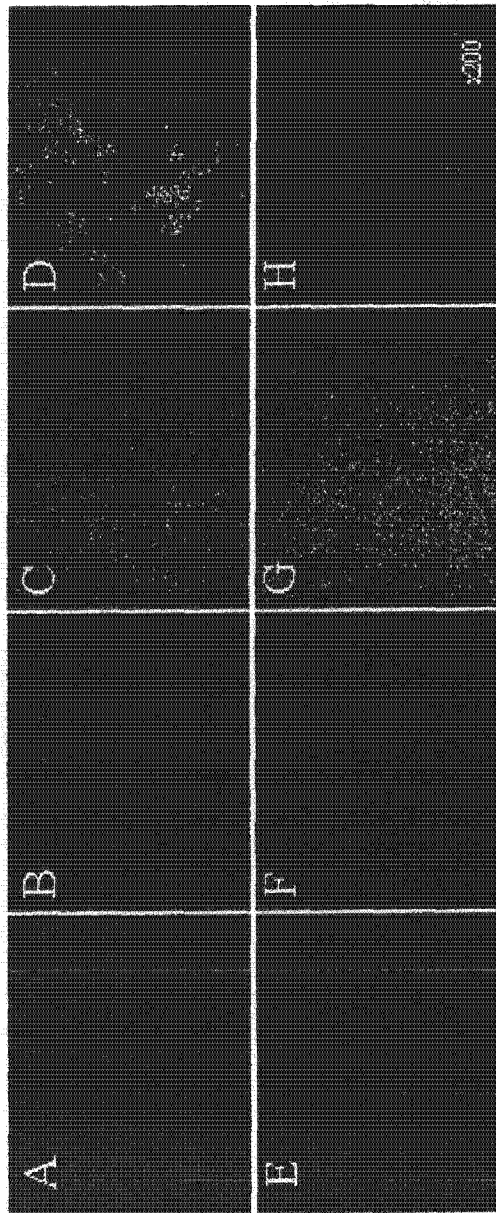


图 4

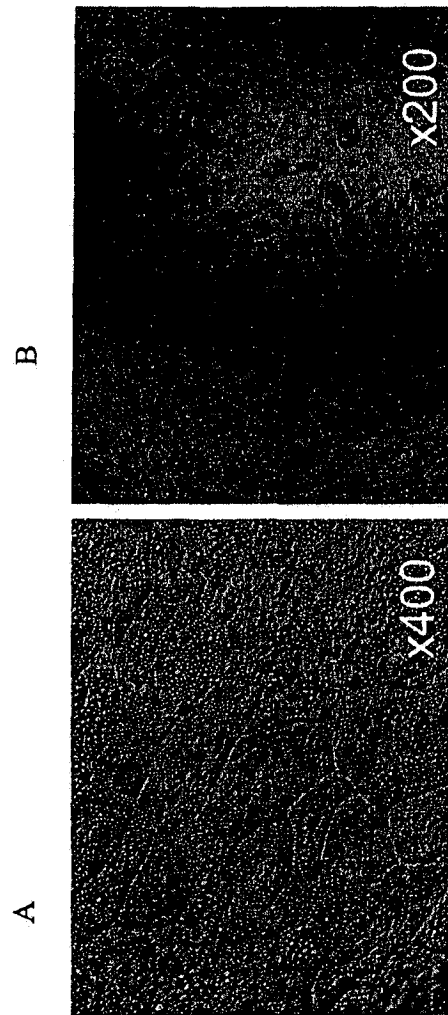


图 5

胚胎 RPE	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
促贝斯特素	促贝斯特素	-	-	促贝斯特素
组织蛋白酶 D	组织蛋白酶 D	组织蛋白酶 D	组织蛋白酶 D	组织蛋白酶 D
聚集素样 1 (视黄醛)	聚集素样 1 (视黄醛)	-	-	-
-	细胞视黄酸 结合蛋白 1	-	-	-
半胱氨酸蛋 白酶抑制剂 C	半胱氨酸蛋 白酶抑制剂 C	半胱氨酸蛋 白酶抑制剂 C	半胱氨酸蛋 白酶抑制剂 C	半胱氨酸蛋 白酶抑制剂 C
晶状体内膜 蛋白 2, 19kDA	晶状体内膜 蛋白 2, 19kDA	-	-	-
视网膜磷脂 酰胆碱酰基 转移酶(磷脂 酰胆碱-视黄 醇 O-乙酰转 移酶)	视网膜磷脂 酰胆碱酰基 转移酶(磷脂 酰胆碱-视黄 醇 O-乙酰转 移酶)	-	-	-
小眼畸形相 关转录因子	小眼畸形相 关转录因子	小眼畸形相 关转录因子	小眼畸形相 关转录因子	小眼畸形相 关转录因子
-	NCAM1	-	-	NCAM1
NCAM2	NCAM2	NCAM2	-	-
眼发育相关 基因	眼发育相关 基因	眼发育相关 基因	眼发育相关 基因	眼发育相关 基因
眼皮肤白化 病 II (粉眼稀 释同系物, 小 鼠)	眼皮肤白化 病 II (粉眼稀 释同系物, 小 鼠)	-	-	-
视蛋白 3	视蛋白 3	视蛋白 3	视蛋白 3	视蛋白 3
-	-	PAX4	-	-

图 6A

PAX6	PAX6	PAX6	-	-
PAX8	PAX8	PAX8	PAX8	PAX8
PDF	PDF	-	-	PDF
光传感因子-样	光传感因子	-	-	-
-	Prominin 1	-	-	-
视网膜 G 蛋白 偶联受体	视网膜 G 蛋白偶 联受体	-	-	-
视网膜向外部 分膜蛋白 1	视网膜向外部 分膜蛋白 1)	-	视网膜向外 部分膜蛋白 1	-
-	视网膜色素上 皮衍生视紫质 同系物	-	-	-
-	-	-	-	视紫质
视网膜色素上 皮特异蛋白 65kDa	视网膜色素上 皮特异蛋白 65kDa	-	-	-
视黄醛结合蛋 白 1	视黄醛结合蛋 白 1	-	-	-
视黄醇脱氢酶 5 (11-顺式和 9- 顺式)	视黄醇脱氢酶 5 (11-顺式和 9- 顺式)	-	-	-
SOX10	SOX10			
SOX11	SOX11	-	-	SOX11
SOX12	SOX12	SOX12	SOX12	SOX12
-	-	SOX13	SOX13	-
SOX15	-	-	SOX15	-

图 6B

胚胎 RPE	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
SOX17	SOX17	-	SOX17	-
SOX4	SOX4	SOX4	SOX4	SOX4
SOX9	SOX9	SOX9	-	SOX9
甲状腺转运蛋白	甲状腺转运蛋白	-	-	-
-	视觉系统同源框 1 同系物, CHX10 样 (斑马鱼)	-	-	视觉系统同源框 1 同系物, CHX10 样 (斑马鱼)
网状钙结合素 1, EF-手钙结合结构域	网状钙结合素 1, EF-手钙结合结构域	网状钙结合素 1, EF-手钙结合结构域	网状钙结合素 1, EF-手钙结合结构域	网状钙结合素 1, EF-手钙结合结构域
网状钙结合素 2, EF-手钙结合结构域	网状钙结合素 2, EF-手钙结合结构域	网状钙结合素 2, EF-手钙结合结构域	网状钙结合素 2, EF-手钙结合结构域	网状钙结合素 2, EF-手钙结合结构域
-	-	网状素 1	-	-
网状素 2	网状素 2	网状素 2	网状素 2	网状素 2
网状素 3	网状素 3	网状素 3	网状素 3	网状素 3
网状素 4	网状素 4	网状素 4	网状素 4	网状素 4
视网膜短链脱氢酶/还原酶 2	视网膜短链脱氢酶/还原酶 2	视网膜短链脱氢酶/还原酶 2	视网膜短链脱氢酶/还原酶 2	视网膜短链脱氢酶/还原酶 2
视网膜短链脱氢酶/还原酶 3	视网膜短链脱氢酶/还原酶 3	视网膜短链脱氢酶/还原酶 3	-	视网膜短链脱氢酶/还原酶 3

图 6C

胚胎 RPE	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
视网膜短链 脱氢酶/还原 酶 4	视网膜短链 脱氢酶/还原 酶 4	视网膜短链 脱氢酶/还原 酶 4	视网膜短链 脱氢酶/还原 酶 4	视网膜短链 脱氢酶/还原 酶 4
色素性视网 膜炎 2(X-连 锁隐性)	色素性视网 膜炎 2(X-连 锁隐性)	色素性视网 膜炎 2(X-连 锁隐性)	色素性视网 膜炎 2(X-连 锁隐性)	色素性视网 膜炎 2(X-连 锁隐性)
色素性视网 膜炎 GTPase 调节器	色素性视网 膜炎 GTPase 调节器	色素性视网 膜炎 GTPase 调节器	-	-
-	-	色素性视网 膜炎 GTPase 调节器作用 蛋白 1	色素性视网 膜炎 GTPase	-
视网膜母细 胞瘤 1(包括 骨肉瘤)	视网膜母细 胞瘤 1(包括 骨肉瘤)	视网膜母细 胞瘤 1(包括 骨肉瘤)	调节器作用 蛋白 1	-
-	-	类视网膜母 细胞瘤 1 (p107)	视网膜母细 胞瘤 1(包括 骨肉瘤)	视网膜母细 胞瘤 1(包括 骨肉瘤)
视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 1	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 1	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 1, 细胞的	类视网膜母 细胞瘤 1 (p107)	-
视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 1 样 1	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 1 样 1	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 1 样 1	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 1	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 1, 细胞的
视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 2	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 2	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 2	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 1 样 1	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 1 样 1
视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 4	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 4	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 4	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 2	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 2
视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 5	-	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 5	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 4	视网膜母细 胞瘤结合蛋 白 4

图 6D

胚胎 RPE	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
视网膜母细胞瘤结合蛋白 6	视网膜母细胞瘤结合蛋白 6	视网膜母细胞瘤结合蛋白 6	视网膜母细胞瘤结合蛋白 5	-
视网膜母细胞瘤结合蛋白 7	视网膜母细胞瘤结合蛋白 7	视网膜母细胞瘤结合蛋白 7	视网膜母细胞瘤结合蛋白 6	视网膜母细胞瘤结合蛋白 6
视网膜母细胞瘤结合蛋白 8	视网膜母细胞瘤结合蛋白 8	视网膜母细胞瘤结合蛋白 8	视网膜母细胞瘤结合蛋白 7	视网膜母细胞瘤结合蛋白 7
-	视网膜母细胞瘤结合蛋白 9	-	视网膜母细胞瘤结合蛋白 8	视网膜母细胞瘤结合蛋白 8
视网膜母细胞瘤相关因子 600	视网膜母细胞瘤相关因子 600	视网膜母细胞瘤相关因子 600	-	视网膜母细胞瘤结合蛋白 9
视网膜母细胞瘤相关蛋白 140	视网膜母细胞瘤相关蛋白 140	视网膜母细胞瘤相关蛋白 140	视网膜母细胞瘤相关因子 600	视网膜母细胞瘤相关因子 600
类视网膜母细胞瘤 2 (p130)	类视网膜母细胞瘤 2 (p130)	类视网膜母细胞瘤 2 (p130)	视网膜母细胞瘤相关蛋白 140	视网膜母细胞瘤相关蛋白 140
-	-	视黄酸和干扰素可诱导蛋白 (58kD)	类视网膜母细胞瘤 2 (p130)	类视网膜母细胞瘤 2 (p130)
-	视黄酸诱导 1	-	视黄酸和干扰素可诱导蛋白 (58kD)	-
-	-	视黄酸诱导 3	-	视黄酸诱导 1
视黄酸诱导 14	视黄酸诱导 14	视黄酸诱导 14	视黄酸诱导 3	视黄酸诱导 3
视黄酸诱导 16	视黄酸诱导 16	视黄酸诱导 16	视黄酸诱导 14	视黄酸诱导 14
视黄酸诱导 17	视黄酸诱导 17	视黄酸诱导 17	视黄酸诱导 16	视黄酸诱导 16

图 6E

胚胎 RPE	hES-RPE	ARPE-19	D407	hES-TD
-	视黄酸诱导 2	-	视黄酸诱导 17	视黄酸诱导 17
视黄酸受体反应器 (他佐罗汀诱导) 2			-	-
-	视黄酸受体反应器 (他佐罗汀诱导) 3	视黄酸受体反应器 (他佐罗汀诱导) 3	视黄酸受体反应器 (他佐罗汀诱导) 3	
视黄酸受体, β	视黄酸受体, β	-	视黄酸受体, α	视黄酸受体, α
-	视黄酸受体, α	-	视黄酸受体, β	视黄酸受体, β
视黄酸阻遏蛋白	视黄酸阻遏蛋白	视黄酸阻遏蛋白	视黄酸阻遏蛋白	视黄酸阻遏蛋白
视黄醛衍生物 X 受体, α	视黄醛衍生物 X 受体, α	视黄醛衍生物 X 受体, α	视黄醛衍生物 X 受体, α	视黄醛衍生物 X 受体, α
视黄醛衍生物 X 受体, β	视黄醛衍生物 X 受体, β	视黄醛衍生物 X 受体, β	视黄醛衍生物 X 受体, β	视黄醛衍生物 X 受体, β
视黄醇结合蛋白 1, 细胞的	视黄醇结合蛋白 1, 细胞的	-	-	视黄醇结合蛋白 1, 细胞的
视黄醇脱氢酶 11 (全部反式和 9-顺式)	视黄醇脱氢酶 11 (全部反式和 9-顺式)	视黄醇脱氢酶 11 (全部反式和 9-顺式)	视黄醇脱氢酶 11 (全部反式和 9-顺式)	视黄醇脱氢酶 11 (全部反式和 9-顺式)
视黄醇脱氢酶 14 (全部反式和 9-顺式)	视黄醇脱氢酶 14 (全部反式和 9-顺式)	视黄醇脱氢酶 14 (全部反式和 9-顺式)	视黄醇脱氢酶 14 (全部反式和 9-顺式)	视黄醇脱氢酶 14 (全部反式和 9-顺式)
			-	视网膜劈裂症 (X-连锁, 青少年) 1

图 6F

黑色素生物合成	色素性视网膜炎	视觉	视黄醇结合
多巴色素变构酶 (多巴色素 δ - 异构酶, 酪氨酸相 关蛋白 2)	视网膜外部膜蛋 白 1	视网膜外部膜蛋 白 1	视网膜外部膜蛋 白 1
多巴色素变构酶 (多巴色素 δ - 异构酶, 酪氨酸相 关蛋白 2)	c-met 原癌基因 酪氨酸激酶	c-met 原癌基因 酪氨酸激酶	甲状腺转运蛋白 (前清蛋白, I 型 淀粉样变)
酪氨酸酶 (IA 型 眼皮白化病)	视黄醛结合蛋白 1	视黄醛结合蛋白 1	
银同系物 (小鼠)	视网膜 G 蛋白偶 联受体	视网膜 G 蛋白偶 联受体	
膜相关传送器	视网膜色素上皮 特异蛋白 65kDa	视网膜色素上皮 特异蛋白 65kDa	
膜相关传送器		卵黄性黄斑变性 (贝斯特症, 促贝 斯特素)	
		视黄醇脱氢酶 5 (11-顺式和 9 -顺式)	
		膜相关传送器	

图 6G