



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104136601 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 05

(21) 申请号 201380007641. 3

(22) 申请日 2013. 02. 15

(30) 优先权数据

61/600, 288 2012. 02. 17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/026286 2013. 02. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/123292 EN 2013. 08. 22

(71) 申请人 斯格本斯眼科研究所

地址 美国马塞诸塞州

(72) 发明人 迈克尔·J·杨 彼得·Y·巴拉诺夫

(74) 专利代理机构 广东德而赛律师事务所

44322

代理人 费锦生

(51) Int. Cl.

C12N 5/00 (2006. 01)

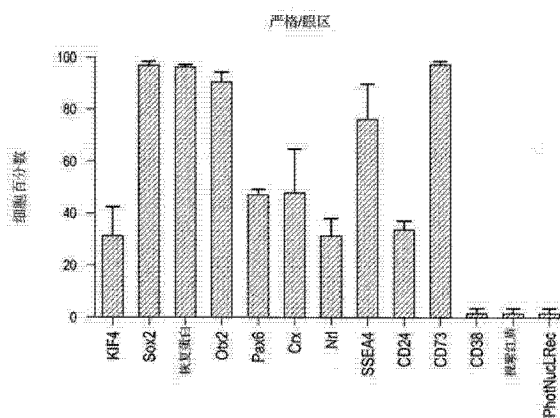
权利要求书2页 说明书13页 附图6页

(54) 发明名称

人视网膜祖细胞的表型谱

(57) 摘要

本发明涉及具有以下阳性表面标记物的人视网膜祖细胞的实质上同质的细胞群 :SSEA4、CD73、PTK7 和 PSA-NCAM。本发明还涉及利用细胞分选技术从人组织中制备这种实质上同质的细胞群的方法。



1. 一种人视网膜祖细胞的纯化的实质上同质的细胞群,所述人视网膜祖细胞具有以下阳性的可识别的表面标记物:SSEA4、CD73、PTK7 和 PSA-NCAM、CD24。

2. 根据权利要求 1 所述的纯化的细胞群,其中所述视网膜祖细胞包括作为阳性可识别标记物的恢复蛋白、Sox2 和 Pax6。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的纯化的细胞群,其中所述视网膜祖细胞缺乏以下阴性的神经干细胞表面标记物:CD15 和 CD133。

4. 根据权利要求 1 至 3 的任一项所述的纯化的细胞群,其中所述视网膜祖细胞缺乏以下阴性的神经胶质祖细胞表面标记物:A2B5 和 CD38。

5. 根据前述任一项权利要求所述的纯化的细胞群,所述细胞群包含至少约 50% 的视网膜祖细胞。

6. 根据权利要求 1 至 4 的任一项所述的纯化的细胞群,所述细胞群包含至少约 80% 的视网膜祖细胞。

7. 一种组合物,其包含前述任一项权利要求所述的细胞群,以及载体。

8. 根据权利要求 7 所述的组合物,所述载体是药学上可接受的载体。

9. 一种在混合的细胞群中识别人视网膜祖细胞的方法,所述方法包括将具有以下阳性表面标记物的细胞筛选出所述混合的细胞群:SSEA4、CD73、PTK7 和 PSA-NCAM。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,所述方法进一步包括从所述混合的细胞群中分离或纯化出人视网膜祖细胞从而提供分离的或纯化的人视网膜祖细胞。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的方法,所述方法进一步包括筛选所述细胞群中缺乏以下阴性神经干细胞表面标记物的细胞:CD15 和 CD133。

12. 根据权利要求 9 至 11 中的任一项所述的方法,所述方法进一步包括筛选所述细胞群中缺乏以下阴性神经胶质祖细胞表面标记物的细胞:A2B5 和 CD38。

13. 根据权利要求 9 至 12 中的任一项所述的方法,其中所述混合的细胞群分离自至少一个人组织来源。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,所述组织来源是人视网膜组织。

15. 根据权利要求 9 至 14 的任一项所述的方法,其中所述组织来源是人骨髓、或胚胎多能细胞、或诱导多能干细胞、或脐血细胞。

16. 根据权利要求 9 至 15 的任一项所述的细胞,其中所述筛选包括利用流式细胞术进行的细胞分选。

17. 根据权利要求 9 至 15 的任一项所述的方法,其中所述筛选包括利用荧光活化的细胞分选以及识别和结合至所述阳性细胞表面标记物的抗体进行的细胞分选。

18. 通过权利要求 10 至 17 的任一项权利要求的方法制备或获得的纯化或的细胞。

19. 通过权利要求 10 至 17 的任一项权利要求的方法制备的人视网膜祖细胞的实质上纯化的细胞群。

20. 一种组合物,包含权利要求 18 所述的纯化或分离的细胞或权利要求 19 所述的细胞群,以及载体。

21. 根据权利要求 20 所述的组合物,其中所述载体是药学上可接受的载体。

22. 一种制备纯化的人视网膜祖细胞的细胞群的方法,所述方法包括以下步骤:

使用以下阳性可识别的表面标记物分选来自于含有人视网膜祖细胞的人组织来源的

分离的细胞样品的细胞 :SSEA4、CD73、PTK7 和 PSA-NCAM,以及

收集所述分离的人视网膜祖细胞以制备纯化的人视网膜祖细胞的细胞群。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,所述方法进一步包括在分选细胞之前从所述分离的细胞样品中除去杂质和污染物。

24. 一种替换或修复需要此种治疗的患者的感光细胞的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的一种或多种权利要求 1 至 6 的任一项所述的细胞群或权利要求 7、8、20 或 21 所述的组合物,从而替换或修复所述患者的感光细胞。

25. 一种治疗或减轻需要所述治疗的患者的色素性视网膜炎的症状的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的一种或多种权利要求 1 至 6 的任一项所述的细胞群或权利要求 7、8、20 或 21 所述的组合物,从而治疗或减轻所述患者的色素性视网膜炎的症状。

26. 一种治疗或减轻需要所述治疗的患者的年龄相关性黄斑变性的症状的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的一种或多种权利要求 1 至 6 的任一项所述的细胞群或权利要求 7、8、20 或 21 所述的组合物,从而治疗或减轻所述患者的年龄相关性黄斑变性的症状。

27. 一种试剂盒,其用于权利要求 24 至 26 的任一项所述的方法中,包括一种或多种权利要求 1 至 6 的任一项所述的细胞群或权利要求 7、8、20 或 21 所述的组合物,以及使用说明。

28. 一种试剂盒,其用于权利要求 24 至 26 的任一项所述的方法中,包括分离权利要求 1 至 5 的任一项所述的细胞群的说明或权利要求 7、8、20 或 21 所述的组合物以及使用说明,并且任选地包括用于从合适的组织来源分离或纯化细胞或细胞群的试剂。

人视网膜祖细胞的表型谱

[0001] 发明背景

人视网膜的退化(无论是由创伤、年龄或疾病导致的)可导致永久性的视力丧失并影响全世界数百万人。退化病症包括,例如,视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性和糖尿病视网膜病变。这些病症的特点在于视网膜的感光细胞的逐渐死亡,并且它们是导致西方世界中不可治愈的失明的主要原因。因为人视网膜的内在再生能力极其有限,因此感光细胞丧失的患者的唯一可行治疗方法就是细胞更换。

[0002] 几种类型的细胞已被建议作为视网膜退化疾病的细胞疗法手段。这些细胞类型包括人视网膜祖细胞(hRPC)、视网膜色素上皮细胞、神经胶质祖细胞、神经干细胞、来源于骨髓和脐带血的细胞。多能干细胞(也称为祖细胞、未成熟细胞、前体细胞、未分化细胞或增殖性细胞)是移植和分化的研究热点。

[0003] 人视网膜祖细胞具有用于临床应用的很大潜力,例如用于移植到退化的或患病的视网膜宿主中。这种细胞通常分离于产前和产后组织中的胎儿视网膜,通过去除睫状边缘带和视神经以消除污染而获得。参见例如 U. S. 专利号 7,514,259,通过引用将其公开内容合并至本文。这些细胞可在体外扩增,并且能够迁移进入视网膜并使得视网膜细胞种群恢复,以形成新的有功能的感光细胞。

[0004] 在临床应用中,例如对于移植来说,活细胞作为药物产品的使用要求在宿主细胞群扩增期间并在将这些细胞注入受移植人体之前进行全面的细胞表征。这种表征通常通过识别在细胞表面表达的特异性标记物来实现。特异性标记物(即,特定细胞系独特的标记物)的识别对于宿主细胞群的富集或去除也是有用的。

[0005] 以往已作出许多努力来识别不同细胞类型独特的特异性标记物。已通过这种方式成功表征和识别的细胞群包括造血干细胞、胚胎干细胞、神经干细胞和神经胶质祖细胞。

[0006] Carter 等在 BMC Ophthalmology, 9: 1, 2009 中描述了使用 CD133 标记物来纯化成人视网膜细胞。视网膜细胞悬液来源于人尸体组织,并利用磁性自动化细胞分选来富集。该文献证实了约 95% 的细胞纯化率。

[0007] U. S. 专利号 6,468,794 描述了利用结合至细胞表面标记物的单克隆抗体来富集神经干细胞和祖细胞的细胞群。U. S. 专利号 7,015,037 描述了对标记物 CD44、CD45、HLA I 类和 HLA II 类呈表面阴性的分离的多能干细胞。还可参见 U. S. 专利号 6,908,763、U. S. 专利号 7,749,754、和 U. S. 专利号 7,781,179,通过引用将这些专利的各自公开内容都合并到本文中。

[0008] Yuan 等人在 Plos One, 6(3), e17540, March 2011 中描述了改良的分化和富集程序,其产生来源于多能干细胞的神经干细胞、神经胶质和神经细胞的高度纯化的细胞群。识别了这些细胞上的细胞表面标志或标记物,从而使得能够通过荧光活化的细胞分选而从异质分化的细胞群中分离这些细胞。特别地,该文献提到,神经干细胞的细胞群已通过利用荧光活化的细胞分选(FACS)和以下标记物被成功地分离:CD184+、CD271-、CD44- 和 CD24+。该公开文献的内容通过引用全部合并至本文中。

[0009] 虽然有各种利用细胞特异性标记物来表征不同类型干细胞的努力,但人视网膜祖

细胞的特异性表面标记物尚未被识别。该标记物的成功识别将促进技术的发展,其可允许细胞群的富集,消除培养物中较不期望的细胞(例如胶质细胞、神经细胞和视网膜色素上皮细胞),以及最终选出高度表达感兴趣的标记物的视网膜祖细胞。该高度纯化的细胞群随后可利用例如 2011 年 6 月 14 日申请的美国专利申请号 13/160,002 中描述的技术来培养,并可被制成细胞库,以衍生出可用于人体移植从而治疗视网膜退化疾病的细胞。这些细胞表面标记物可代表允许表征要被递送至患者的细胞产品的标记物,部分地满足了政府监管机构对于确定细胞产品质量的要求。

[0010] 鉴于以上所述以及人视网膜祖细胞对于临床评价和使用的重要性,容易意识到,需要改善人视网膜祖细胞的表征、识别和纯化,以实现移植和疾病治疗。本发明的这些以及其他目标将通过以下描述变得明显。

发明内容

[0011] 本发明涉及纯化的人视网膜祖细胞和 / 或实质上同质的人视网膜祖细胞的细胞群,以及获得所述细胞和 / 或实质上同质的细胞群的方法。本发明的人视网膜祖细胞的独特特征在于存在以下细胞表面标记物中的每一个 :SSEA4、CD73、PTK7 和 PSA-NCAM。在另一个方面,这些细胞的特征在于表达恢复蛋白、Sox2 和 Pax6。本发明还公开了含有这些细胞和 / 或细胞群的组合物。

[0012] 在一个方面,本发明的人视网膜祖细胞的特征还在于缺乏以下表面标记物 :CD15、CD133、A2B5 和 CD38 (在本领域也表示为 CD15-、CD133-、A2B5- 和 CD38-)。CD15 和 CD133 是神经干细胞表面标记物。A2B5 和 CD38 是神经胶质祖细胞表面标记物。在另一个方面,本发明的纯化的细胞群包含至少约 50%、优选至少约 60%、最优选至少约 80% 的以所述细胞表面标记物特异性识别的人视网膜祖细胞。本发明还公开了含有所述细胞和 / 或细胞群的组合物。

[0013] 本发明的方法包括从人体组织中获得分离的细胞样品,以及利用上述标记物识别并随后利用本领域已知的方法分离或纯化所述祖细胞。在一个方面,所述方法包括以下步骤、或实质上由以下步骤组成、或由以下步骤组成 :去除通常存在于细胞样品中的杂质和污染物、分选细胞以分离和纯化具有上述表面标记物的人祖细胞、以及收集纯化的细胞以用于临床或实验用途。这些细胞随后可被放置到组织培养物中并生长以允许产生大量细胞以用于治疗,这可参见 2011 年 6 月 14 日提交的美国专利申请号 13/160,002 号的公开内容,通过引用将其合并至本文中。可用于本发明的实际操作中的细胞分选技术是普遍已知的,包括例如流式细胞术和利用抗体和其片段的特异性荧光活化的细胞分析,该抗体和片段识别并结合至细胞表面标记物。

[0014] 本发明的方法允许从多种人组织来源选择视网膜祖细胞,例如骨髓、脐带血、人胚胎干细胞或其分化的子代、人诱导性多能干细胞或其分化的子代,但优选的组织来源是成人或胎儿视网膜组织。

[0015] 本发明的人视网膜祖细胞具有各种治疗用途,例如在移植到患病的眼睛中后治疗视网膜疾病,并且这些细胞对于宿主患者或受移植者是自体的或同种异体的。本发明的细胞也可通过将细胞以合适的实验形式与药剂接触从而用于体外药物发现和毒性测试。因为视网膜祖细胞能够分化成感光细胞,所以它们可用于替换或修复患者的感光组织,以及例

如用于治疗眼睛的退化疾病,例如视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性和糖尿病视网膜病变。因此,本发明还提供了通过在合适条件下培养以上识别的细胞或细胞群来诱导或支持这些细胞分化成感光细胞从而制备感光细胞的纯化的培养物的方法。各种试剂随后可与这些细胞接触(在细胞或细胞群的分化期间一次或多次接触)以确定对细胞生存率、特性或分化是否有影响。

[0016] 本发明的前述实施方式和方面仅是示例性的,并不意在限制本发明的精神和范围。

附图说明

[0017] 本发明的前述以及其他优点和特征将在阅读以下参考附图进行的详细描述后变得显而易见。

[0018] 图1显示了基于人视网膜祖细胞的流式细胞分析的所示严格(sternnes)/眼区标记物的表达柱状图。

[0019] 图2显示了基于人视网膜祖细胞的流式细胞分析的所示增殖性/细胞周期标记物的表达柱状图。

[0020] 图3显示了基于人视网膜祖细胞的流式细胞分析的所示神经/胶质标记物的表达柱状图。

[0021] 图4显示了基于人视网膜祖细胞的免疫细胞化学分析的所示严格(sternnes)/眼区标记物的表达柱状图。

[0022] 图5显示了基于人视网膜祖细胞的免疫细胞化学分析的所示增殖性/细胞周期标记物的表达柱状图。

[0023] 图6显示了基于人视网膜祖细胞的免疫细胞化学分析的所示神经/胶质标记物的表达柱状图。

具体实施方式

[0024] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科技术语的涵义与本领域技术人员通常理解的涵义相同。虽然在本发明的实践和测试中可使用类似于或等同于本文所述的方法和材料,但本文现仅描述优选的方法、装置和材料。本文所引用的所有技术文献和专利文献都通过引用将它们整体合并至本文中。本文中的任何部分都不能被解释为承认本发明不是在这些公开内容之前完成的。

[0025] 除非另有说明,否则本发明的实践将使用本领域内的常规技术,包括组织培养、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA、流式细胞术和细胞分选。参见,例如, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; the series Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th edition; Gaited.

(1984) Oligonucleotide Synthesis; U.S. 专利号 4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins eds. (1984) Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); 以及 Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology. 还可参见 Yuan et al., Plos One, 6(3), e17540, March 2011.

[0026] 所有数字表示(包括范围值),例如 pH、温度、时间、浓度和分子量,都是近似值,可上(+)下(-)改变 0.1。要理解的是,虽然不总是明确表述,但所有数字表示前都有术语“约”。术语“约”也包括精确值“X”和“X”的些微改变,如“X+0.1”或“X-0.1”。还要理解的是,虽然不总是明确表述,但本文所述的试剂仅是示例性的,其等价物在本领域是已知的。

[0027] 如本领域技术人员所理解的,为任何和所有目的,特别是在提供书面说明方面,本文所公开的所有范围值也包括任何和所有可能的子范围值或子范围值的组合。任何所列举的范围可被容易地意识到是充分描述的并且使该范围能够被分解为至少两等份、三等份、四等份、五等份、十等份等。作为一个非限制性的例子,本文所讨论的每个范围值可被容易地分解为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域技术人员所理解的,像“达”、“至少”、“大于”、“小于”这样的语言包括所引用的数并且是指范围值,该范围值随后可被分解为如上所述的子范围。

[0028] 如说明书和权利要求中所使用的,单数形式的“一个”和“该”,除非另有明确说明,都包括单个和多数引用。例如,术语“药学上可接受的载体”包括多种药学上可接受的载体,包括它们的混合物。

[0029] 如本文所使用的,术语“包括”是指该组合物和方法包括所引述的内容,但不排除其他内容。当用来定义组合物和方法时,“实质上由...组成”意味着排除对于该组合物或方法具有任何实质性意义的其他内容。因此,如文本所定义的,实质上由成分组成的组合物不排除由于分离和纯化方法带来的污染物以及药学上可接受的载体,例如磷酸盐缓冲液、防腐剂等。“由...组成”对意味着排除高于痕量的其他组分以及施用本发明的组合物的实质性方法步骤。由每个这些过渡术语定义的实施方式都在本发明的范围内。

[0030] 本发明的“宿主”或“患者”是动物(例如哺乳动物)或人。可诊断或治疗的非人动物例如是需要治疗的猴、鼠科(例如大鼠、小鼠)、犬科(例如狗)、兔科(例如兔子)、家畜、竞技动物和宠物。

[0031] 术语“纯化的”或“分离的”是指与组分、细胞或其他物质分离,其中细胞、组织、多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段在自然条件下通常是连在一起的。例如,分离的多核苷酸是与 3' 和 5' 相邻核苷酸相分离,通常在其天然或自然环境中(例如在染色体上)它们是连在一起的。纯化的或分离的细胞是与组织相分离,在自然状态下,通常其是与组织连在一起的。分离的或纯化的细胞是指与不相似的表型或基因型的组织或细胞分开的细胞。如本领域技术人员明显知道的,非天然的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段是不需

要“分离”从而与其天然副本相区别的。

[0032] 如本文所使用的,“干细胞”定义为具有在培养物中无限期分化并生成专门细胞的能力的细胞。在本文中,为方便起见,干细胞被分为成体(成人)干细胞或胚胎干细胞。成体干细胞是在分化的组织中发现的未分化细胞,其能够进行自我更新(克隆)并且在特定条件下能够分化以产生其所在组织的所有的专门细胞类型。胚胎干细胞是来自胚胎的原始(未分化)细胞,其具有变成各种专门细胞类型的能力(多能的)。近期,体细胞(包括完全分化的成人细胞,如成纤维细胞),通过引入以下一些或所有因子:Oct-3/4、SOX2、c-Myc、Nanog 和 Klf4 可变的像胚胎干细胞一样呈多能性的。这些细胞也被称作诱导多能干细胞(IPSC)。胚胎干细胞或诱导多能干细胞已可在体外条件下培养数月至数年,以让其增殖而不分化。通过使用合适的标记物可将多能干细胞与其他类型的细胞区别开来,这些标记物包括,但不限于,Oct-4、碱性磷酸酶、CD30、TDGF-1、GCTM-2、Genesis、生殖细胞核因子、SSEA1、SSEA3、和 SSEA4。

[0033] 术语“干细胞”也包括“去分化的”干细胞,其一个例子是直接转化成干细胞的体细胞,即重编程为干细胞。克隆是指与初始细胞(本发明中为干细胞)遗传上等同的细胞系。

[0034] 术语“繁殖”或“增殖”是指使细胞或细胞群生长或改变其表型。术语“生长”或“扩增”是指细胞在存在支持培养基、营养、生长因子、支持细胞或获得期望数量的细胞或细胞类型所需的任何化学或生物学化合物的情况下的增殖。在一个实施方式中,细胞的生长导致组织的再生。在另一个实施方式中,所述组织包含心肌细胞。

[0035] 术语“培养”是指在各种类型的培养基上或中的细胞或微生物的体外繁殖。可以理解的是,培养物中生长的细胞的子代可能不与亲本细胞完全相同(例如,形态学上、遗传学上或表型上)。“扩增”是指细胞的任何增殖或分裂。

[0036] “克隆增殖”或“克隆扩增”是指通过将单个细胞连续分裂成两个相同的子细胞和/或相同的细胞群而实现的细胞群的生长。

[0037] 如本文所使用的,细胞“谱系”是指细胞的遗传性,即,其祖先和后代。细胞谱系将该细胞置于发育和分化的遗传体制中。

[0038] “分化”描述了非专门细胞获得专门细胞(例如心细胞、肝细胞或肌肉细胞)的特征的过程。“定向分化”是指对干细胞培养条件进行控制以诱导分化成特定的细胞类型或细胞表型。“去分化的”是指细胞回复到细胞谱系中较不定型的(committed)位置。如本文所使用的,术语“分化或分化的”是指细胞在细胞谱系中占据更加定型的(“分化的”)位置。

[0039] 如文本所使用的,“抗体”是指整个抗体及其抗原结合片段或单链。因此,术语“抗体”包括包含免疫球蛋白分子的至少一部分的任何蛋白质或含肽分子。例子包括,但不限于,重链或轻链的互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架(FR)区或其任何部分、或结合蛋白的至少一个部分,它们的任何一个都可被整合到本发明的抗体中。

[0040] 所述抗体可为多克隆的或单克隆的,并且可分离自任何合适的生物来源,例如鼠、兔、羊和狗。

[0041] 术语“抗体”进一步包括单克隆抗体、其消化片段、指定部分、衍生物和变体,包括抗体模拟物或模拟抗体或其指定片段或部分的结构和/或功能的抗体的组成性部分,包括单链抗体及其片段。术语抗体的“抗原结合部分”所包含的结合片段的例子包括 Fab 片段,

它是由 VL、VH、CL 和 CH 结构域构成的单价片段 ;F(ab')₂ 片段,它是包含在铰链区通过二硫桥相连的两个 Fab 片段的二价片段 ;Fd 片段,其由 VH 和 CH 结构域构成 ;Fv 片段,其由抗体的单个臂的 VL 和 VH 结构域构成 ;dAb 片段 (Ward et al. (1989) Nature 341:544-546), 其由 VH 结构域构成 ;和分离的互补决定区(CDR)。而且,虽然 Fv 片段的两个结构域(VL 和 VH) 由不同基因来编码,但可利用重组方法经由合成连接物使它们形成单个蛋白链从而被连接在一起,在该单个蛋白链中,VL 和 VH 区域配对以形成单价分子(称为单链 Fv (scFv))。Bird et al. (1988) Science 242:423-426 and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad Sci. USA 85:5879-5883。单链抗体也被包括在术语“抗体的片段”之内。任何上述抗体片段可利用本领域技术人员的常规技术来获得,并且这些片段的结合特异性和中和活性的筛选与完整抗体所进行的方式相同。

[0042] 术语“表位”是指能够特异性结合至抗体的蛋白决部位。表位通常由化学上有活性的分子(例如氨基酸或糖侧链) 表面群组构成,并且通常具有特异的三维结构特征以及特异的电荷特征。构象表位和非构象表位的区别在于在存在变形溶剂的情况下,对构象表位的结合丧失,而对非构象表位的结构不丧失。

[0043] 本文使用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体成分”是指单个分子成分的抗体分子的制剂。单克隆抗体成分表现出对特定表位的单种结合特异性和亲中性。

[0044] 本文使用的术语“视网膜祖细胞”、或“神经视网膜来源的视网膜干细胞”、或“视网膜干细胞”是 synonym 并且是指可来源于神经视网膜组织的分离的活干细胞。这些细胞的起始点(point of origin)是可将它们与非神经视网膜细胞区别开来的一个因素,例如视网膜色素上皮细胞的色素细胞、睫状体或虹膜。本发明的细胞可进一步通过不能在缺乏生长因子的情况下增殖的表现而辨别。这些细胞在正常生长培养物中不表达大量的感光标记物,但在缺乏生长因子并且特别是当种植在特定基质物质(PCL 专利申请)时,这些细胞快速地分化成感光标记物呈阳性的细胞。

[0045] 本发明的细胞的进一步的特征在于如下进一步描述的独特群组的细胞表面标记物。本发明的细胞可来源于产前或产后来源物,并且是多能的,意思是它们能够自我更新并且能够视网膜特异性地分化成感光细胞。这些细胞在 U. S. 专利号 7, 514, 259 中有描述,其公开内容通过引用整体合并至本文中。

[0046] 如本文关于本发明的视网膜祖细胞所使用的,术语“多能性”是指视网膜祖细胞增殖并形成多种成熟视网膜细胞类型(特别是感光细胞) 的能力。

[0047] “实质上同质的”细胞群是指超过约 50%、或超过约 60%、或超过约 70%、或超过约 75%、或超过约 80%、或超过约 85%、或超过约 90%、或超过约 95% 的细胞具有相同或类似表型的细胞群。表型是由下文更详细描述 of 的细胞表面标记物决定的。

[0048] 如本文所使用的,术语“治疗”等是指获得期望的药理学和 / 或生理学效果。该效果可为预防性的(完全或部分地预防疾病或疾病的征兆或症状),和 / 或治疗性的(部分地或完全地治愈疾病和 / 或由该疾病引起的负面效果)。“治疗”的例子包括但不限于:阻止在可能易患某种疾病但尚未被诊断为患有该病的对象中出现该病;抑制疾病,即阻止疾病发展;和 / 或减轻或缓解疾病症状,例如黄斑变性。如本领域技术人员所理解的,“治疗”可包括与病理学相关的症状的全身性减轻和 / 或延迟症状(例如胸痛) 的发作。“治疗”的临床和亚临床表现会因病理学、个体和治疗方式而变化。

[0049] “组合物”是指活性试剂、细胞或细胞群、以及另一种惰性(例如可检测试剂或标志物)或活性化合物或组合物的结合。

[0050] “药物组合物”包括活性试剂与惰性或活性载体(例如生物相容性支架或基质)的结合,使该组合物适于体外、体内或间接体内的诊断或治疗用途。

[0051] 术语“药学上可接受的载体”(或介质),可与术语生物学相容性载体或介质互换使用,是指试剂、细胞、化合物、材料、组合物和 / 或剂量形式,其不仅能与细胞及其他要被治疗性地施用的试剂相容,而且,在合理的医学判断的范围内,适合用于与人体和动物体的组织接触,而不会产生过度的毒性、刺激、过敏反应或其他具有合理受益 / 风险比率的并发症。适合用于本发明的药学上可接受的载体包括液体、半固体(例如凝胶)和固体材料(例如,细胞支架和基质、管材、片材及其他本领域已知并在本文详细描述的材料)。这些半固体和固体材料可被设计成在体内耐降解(非生物可降解的),或者它们可被设计成可在体内降解(生物可降解的、生物可侵蚀的)。生物可降解材料可进一步为生物可再吸收的或生物可吸收的,即,它可被溶解并被吸收到体液中(水溶性植入物即是一个例子),或被降解并最终被从体内清除(通过转化成其他材料或分解并经由自然途径消除)。

[0052] “有效量”是足以实现有益的或期望的结果的量。有效量可在一次或多次施用、应用或剂量中施用。

[0053] 如本文所使用的,用于体内和间接体内的术语“施用”是指向对象提供有效量的组合物、细胞或细胞群,以有效地实现方法的期望目的。施用组合物的方法(如本文所描述的那些方法)是本领域技术人员熟知的,包括但不限于,肠胃外、局部、口腔、或局部施用以及静脉内、皮下或肌肉内给药。在整个治疗过程中,施用可连续进行或间断进行。确定最有效的使用手段和剂量的方法对于本领域技术人员是熟知的并且根据用于治疗的细胞、用于治疗的组合物、治疗目的和被治疗的对象而变化。可进行单次或多次施用,并由治疗医师选择剂量水平和模式。例如,组合物可在对象患有治疗所针对的疾病或病症之前或已患有该疾病或病症时施用。

[0054] 视网膜祖细胞表面标记物

本发明涉及纯化的或分离的细胞和 / 或实质上同质的视网膜祖细胞群,特点在于存在以下细胞表面分子的每一个 :SSEA4+、CD73+、PTK7+ 和 PSA-NCAM+。

[0055] 这些是阳性表面标记物,意思是指每个标记物都存在于细胞的表面上并且其存在可被抗体或其他结合至该表面标记物的相关配体检测到。本发明的视网膜细胞的特点还在于阴性细胞标记物,意思是指无法通过抗这些标记物的抗体检测到这些标记物的存在(或观察到缺少这些标记物)。以下是本发明的视网膜祖细胞的阴性细胞标记物 :CD15-(神经干细胞)、CD 133-(神经干细胞)、A2B5-(神经胶质祖细胞)和 CD38-(神经胶质祖细胞)。

[0056] 本发明的细胞群通常具有至少约 50%、优选至少约 60%、最优选至少约 80% 的人视网膜祖细胞。视网膜祖细胞的人体来源包括各种器官或组织的组织,例如产前视网膜组织、胎儿组织、成人器官和骨髓、以及视网膜神经球。人视网膜组织是这些细胞的优选来源物。这些细胞可来自活宿主或尸体。

[0057] 简言之,人视网膜祖细胞分离自 16 周胎龄的人神经视网膜的不同捐献体,它们获得自符合伦理和 GTP 的组织库,例如位于加州 Alameda 的 ABR Inc 公司。这些被分离的细胞在 Ultraculture™培养基的涂布有纤连蛋白的表面上扩增,该培养基补充剂(20 ng/

ml rhEGF、10 ng/ml bFGF),增殖至不同的传代(例如 P8 和 P13),随后冷冻以提供药物物质(DS)份(lot)的备用品。这些药物物质份可按 GMP 制造以用于临床应用。为进行细胞增殖,DS 份被解冻并以 20000 个细胞/平方厘米的密度被接种。两天后,收获细胞并根据标准程序制备以产生药物产品(DP)。记录人视网膜祖细胞的每个制备批次的细胞浓度(每 mL 的实际细胞数)和细胞存活率(稳定性)。

[0058] 为表征这些细胞,将人视网膜祖细胞制备成在无毒赋形剂(如 HBSS-NAC)中的视网膜细胞新鲜悬浮液的形式,浓度为每 mL 5 千万个细胞。增殖这些细胞并按标准程序制备以用于移植。参见,2011 年 6 月 14 日提交的美国专利申请 13/160,002 号中所述的方法,其全部公开内容通过引用合并至本文中。

[0059] 这些细胞可利用以下实施例中描述的流式细胞分析和免疫细胞化学分析来表征。

[0060] 治疗用途

本发明还提供替换或保护需要此种治疗的患者中感光细胞的方法,包括将上述人视网膜祖细胞移植到患病的或退化的人视网膜的视网膜下空间中。一方面,这些细胞可治疗或减轻需要此种治疗的患者色素性视网膜炎的症状。另一方面,这些细胞可被种植到合适的生物相容性支架上,例如 2012 年 1 月 23 日提交的美国专利申请 13/356,073 号中描述的内容,这些内容通过引用被合并至本文中,并且该细胞-支架组合产品可被移植从而治疗或减轻需要此种治疗的患者中年龄相关性黄斑变性的症状。对于所有这些治疗,视网膜祖细胞对于患者来说是同种异体的。在另一个方面,本发明的细胞可与其他治疗结合施用。

[0061] 筛选试验

本发明提供筛选调节视网膜祖细胞的分化的各种试剂的方法。它也可被用来发现支持和/或拯救在培养物中由视网膜祖细胞产生的成熟感光细胞的治疗剂。为本发明的目的,“试剂”包括但不限于生物学或化学化合物(例如简单或复杂的有机或无机分子)、肽、蛋白质(例如抗体)、多核苷酸(例如反义多核苷酸)或核酶。各种化合物可被合成,例如聚合物(如多肽和多核苷酸)以及基于各种母核结构的合成的有机化合物,这些都被包括在术语“试剂”中。此外,各种天然来源物可提供用于筛选的化合物,例如植物或动物提取物等。应当理解的是,虽然不总是明确表述,但所述试剂可单独使用或与具有相同或不同生物学活性的另一种试剂(例如通过发明的筛选方法识别的试剂)结合使用。

[0062] 为在体外进行所述筛选方法,可如以上所述获得分离的细胞群。当试剂是非 DNA 或 RNA 的组合物时,例如是以上所述的小分子,那么该试剂可直接被添加至细胞或添加至要被添加的培养基中。本领域技术人员明显知道,必须加入“有效”量,这可通过经验确定。当试剂是多核苷酸时,其可利用基因枪或电穿孔而被直接加入。

[0063] 作为选择,它可利用基因递送载体或其他以上所述方法被插入到细胞中。可进行阳性对照和阴性对照试验以确认药物或其他试剂的所声称的活性。

[0064] 试剂盒

本发明还提供了用于本文所描述的方法的试剂盒,所述试剂盒含有本发明的细胞群、细胞或组合物中的一个或多个,并含有使用说明。任选地,该试剂盒可包括用于所述方法的试剂。

[0065] 在另一个方面,本发明提供用于所述方法的试剂盒,包括用于分离或纯化细胞或细胞群的说明以及使用说明,并且任选地包括用来从合适的组织来源(如本文所述的来源)

分离或纯化细胞或细胞群的试剂。

[0066] 本发明在以下实施例中进一步详细描述,这些实施例不是用来限制本发明的范围。

实施例

[0067] 视网膜形态学

神经视网膜的形态学在 2011 年 6 月 14 日提交的共同受让的共同待决的美国专利申请 13/160,002 号中进一步描述,其全部内容通过引用合并至本文中。

[0068] 细胞分离

按以下参考文献中所描述的(进行小的修改)从胎儿视网膜中分离 hRPC(人视网膜祖细胞):Klassen, H.J. et al., Multipotent Retinal Progenitors Express Developmental Markers, Differentiate into Retinal Neurons, and Preserve Light-Mediated Behavior, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2004, 45 (11), pages 4167-4173; Klassen, H. et al., Isolation of Retinal Progenitor Cells from Post-Mortem Human Tissue and Comparison with Autologous Brain Progenitors, J. Neuroscience Research, 2004, 77(3), pages 334-343; Klassen, H. et al., Progenitor Cells from the Porcine Neural Retina Express Photoreceptor Markers after Transplantation to the Subretinal Space of Alloreipients; Stem Cells, 2007, 25(5); pages 1222-1230。

[0069] 简言之,从人胎儿眼睛(14-18 周胎龄)切出整个神经视网膜,在 0.1% 胶原酶 I (Sigma) 中分离 4 个循环(总共发酵 1.5 小时),并接种在改性的 Ultraculture 培养基(10 ng/ml rhEGF、20 ng/ml rhbFGF、青霉素 / 链霉素、制霉菌素和 L- 谷氨酰胺)中或冷冻。单个细胞及细胞团的量和成活率利用 Trypan 蓝和血球计来估算。

[0070] 流式细胞术分析

按照以下一般性方案处理人视网膜祖细胞:

1. 固定:对于所有抗原(细胞周期分析和 PCNA 除外),使用冷的新鲜 4% 多聚甲醛缓冲液(pH 7.4)在 4℃ 处理 30 分钟;对于细胞周期分析和 PCNA 使用 100% 乙醇在 4℃ 处理 30 分钟

2. 洗涤:添加 PBS,在 1500 rpm 离心 5 分钟

3. 透化和封闭:在封闭缓冲液(0.1% Triton-X、10% 山羊血清溶液,在 5% BSA 的 PBS 中制备)中重悬细胞团块,在室温温育 30 分钟

4. 洗涤

5. 在染色液(10% 山羊血清溶液,在 5%BSA 的 PBS 中制备)的 X(要添加的抗体数目)100f11 中重悬细胞团块;通过 100f11 在 5 ml 管中等分

6. 根据下表 1 添加一级抗体;所有抗体溶液在染色液中制备;在室温温育 45 分钟

7. 洗涤

8. 根据表 1 添加 100f11 的二级抗体(在染色液中);在室温温育 30 分钟

9. 洗涤

10. 在 500f11 的 PBS 中重悬

11. 在 4 小时内(例如使用 BD LSR II)分析门内的至少 10000 个事件。

[0071] 碘化丙啶染色(用于细胞周期分析)

1. 在含有 20f1g/mL 的 PI 和 100 fIg/mL 的无 DNA 酶的 RNA 酶 A 的 1 mL PBS 中悬浮细胞团块

2. 洗涤

3. 在 500 f. . t1 的 PBS 中重悬并分析。

[0072] DAPI 染色(用于存活率分析)

1. 在固定之前,在 200 ng/ml DAPI 的 PBS 中重悬细胞

2. 在室温下温育 5 分钟

3. 洗涤

4. 在 4% 的冷 PFA 中固定 30 分钟

5. 洗涤

6. 在 500 f. . 11 的 PBS 中重悬并分析。

[0073] 表 1

	抗原	宿主	公司	参考号	稀释, 1:
眼区	Nr1	ms	SantaCruz	sc-166087	50
	SSEA4	ms	Chemicon	MAB4304	100
	Klf4	rbt	SantaCruz	sc-20691	50
	Sox2	rbt	SantaCruz	sc-20088	50
	巢蛋白	ms	BDBio.	611658	100
	Pax6	ms	hybridomabk		100
增殖	Otx2	rbt	Chemicon	AB9566	100
	细胞周期素 D1	rbt	Neomarkers	RB010Plabx	100
	PCNA	ms	Dako	M0879	100
	Ki67	rbt	Chemicon	AB9260	100
感光细胞	Nr2e3(PNR)	rbt	Chemicon	AB9469	200
	恢复蛋白	rbt	Chemicon	AB5585	200
	视紫红质	ms	Chemicon	MABN15	100
	视蛋白蓝色	rbt	Chemicon	AB5407	100
	视蛋白红色 / 绿色	rbt	Chemicon	AB5405	100
	S- 视蛋白	rbt	Abeam	ab81017	100
神经元 / 神经胶质	NF200	rbt	Chemicon	AB1982	100
	GFAP	ms	Chemicon	MAB360	100
	B3 微管蛋白	ms	Sigma	T8669	100
表面标记物	CD15/SSEA1	ms	BDBio.	5590945	100
	CD24	PE	MACS		100
	CD73	PE	MACS		100
	CD133	PE	MACS		50
	PSA-NCAM	PE	MACS		50
	CD38	PE	MACS		50
	SSEA4	ms	Chemicon		50
同型对照	IsoIgG	rbt	Invitrogen	MAB4304	100
	IsoIgG1	ms	Invitrogen		
	IsoIgG2	ms	Invitrogen		

统计学方法

阳性细胞的比率根据抗体的同位素对照来确定。实验重复三次,计算每个标记物的阳性细胞的平均值百分数(含标准偏差)。而且,在适用的情况下,计算出高表达 / 低表达细胞

的比率。

[0074] 结果

流式细胞术

流式细胞分析的结果(3次,每次10000个事件)如表2所示。表中的数字表示药物产品内阳性(表达)细胞的比率,该数字基于与合适的同型对照比较而产生。同型表达的98%水平被作为阈值水平。

[0075] 表 2

Kf14	Sox2	恢复蛋白	Otx2	Pax6	Crx	Nr1	SSEA4	CD24	CD73
51.4	97.7	97.1	94.3	50.1	48.0	31.0	91.2	38.8	98.1
12.7	99.2	97.2	94.9	46.7	77.9	43.6	89.4	35.0	98.7
27.6	97.3	97.0	82.3	44.3	19.1	18.2	49.3	27.1	97.1
CD38	视紫红质	PhotNucLRec	Ki67	PCNA	细胞周期素 D1	细胞周期	细胞周期	细胞周期	β3 微管蛋白
2.3	1.30	0.8	82.8	96.7	34.4	70.6	3.2	25.1	92.9
5.2	4.10	3.4	80.3	86.9	28.1	70.7	17.0	12.3	99.4
0.9	2.00	1.6	75.2	91.8	22.5	70.1	5.6	23.9	99.3
NF200	巢蛋白	GFAP	PSA-	PTK7	SSEA1/CD	CD133	A2B5		
97.7	95.1	14.8	62.1	97.8	0.7	5.8	2.15		
97.9	98.9	40.9	49.4	98.6	0.8	2.8	4.20		
90.1	99.4	11.6	97.8	99.7	2.3	1.4	3.30		

图1、2、3显示了上述结果的平均值和标准偏差(M+/-SEM)的柱状图。已发现,药物产品中的细胞表达所研究的大多数严格标记物。但是,亲本细胞群的仅一半是对于Pax6、Crx和Nr1呈阳性的,表明该细胞群实际上由几个子细胞群构成。标记物在9至14代的传代中是稳定的,并且在两个独立的胎儿捐献物中是稳定的。

[0076] 免疫细胞化学分析

根据以下一般性方案处理人视网膜祖细胞:

1. 接种:细胞以4k个细胞/平方em的密度被接种在位于人视网膜祖细胞培养基中的刚涂布了纤连蛋白的16孔Nunc载片上(200 f11/孔)
2. 温育:在37℃、5% CO₂、3% O₂、100%湿度下温育6小时
3. 洗涤:吸出培养基,添加PBS
4. 固定:在室温下用冷的4% PFA缓冲液固定10分钟
5. 洗涤
6. 透化和封闭:在封闭缓冲液(0.1% Triton-X、10%山羊血清溶液,在5% BSA的PBS中制备)中于室温下温育1小时
7. 洗涤
8. 根据表3添加一级抗体(50f11/孔);所有抗体溶液在染色液(10%山羊血清溶液,在5% BSA的PBS中制备)中制备;在4℃于加湿箱中温育过夜
9. 洗涤2次,每次5分钟
10. 根据表3添加100f11的二级抗体(在染色液中);在室温下温育1小时
11. 洗涤3次,每次5中
12. 在封固介质w/DAPI中封固
13. 干燥过夜
14. 成像和分析。

[0077] 表 3

	抗原	宿主	公司	参考号	稀释, 1:
眼区	Nr1	ms	SantaCruz	sc-166087	50
	SSEA4	ms	Chemicon	MAB4304	200
	Klf4	rbt	SantaCruz	sc-20691	50
	Sox2	rbt	SantaCruz	sc-20088	50
	巢蛋白	ms	BDBio.	611658	200
	Pax6	ms	hybridomabk		200
	Otx2	rbt	Chemicon	AB9566	200
	Chx10	Gt	SantaCruz	sc-21692	200
	CD15/SSEA	ms	BDBio.	559045	200
增殖	细胞周期素 D1	rbt	Neomarkers	RB010P1abx	200
	PCNA	ms	Dako	M0879	200
	Ki67	rbt	Chemicon	AB9260	200
感光细胞	Nr2e3(PNR)	rbt	Chemicon	AB9469	200
	恢复蛋白	rbt	Chemicon	AB5585	200
	视紫红质	ms	Chemicon	MABN15	100
	视蛋白蓝色	rbt	Chemicon	AB5407	200
	视蛋白红色 / 绿色	rbt	Chemicon	AB5405	200
神经元 / 神经胶质	S- 视蛋白	rbt	Abeam	ab81017	200
	NF200	rbt	Chemicon	AB1982	200
	GFAP	ms	Chemicon	MAB360	200
	波形蛋白	ms	Sigma	T8669	200
	B3 微管蛋白	ms	Sigma	V22558	200
同型对照	IsoIgG	rbt	Invitrogen	MAB4304	100
	IsoIgG1	ms	Invitrogen		
	IsoIgG2	ms	Invitrogen		

结果

免疫细胞化学

免疫细胞化学分析的结果(5次,每次大于100个事件)显示于图4、5和6中。使用合适的同型对照调节显微镜/摄像头上的荧光和曝光设置。图4、5和6显示了上述结果的平均值和标准偏差(M+/-SEM)的柱状图。免疫细胞化学分析的结果支持并加强了利用流式细胞术确立的分布图。

[0078] 本发明的人视网膜祖细胞可用于研究视网膜和眼睛的发育以及影响这种发育的(无论是有益还是有害的)因子。这些hRPC也可通过移植到患有眼疾的视网膜内而用于临床试验。它们可有利地用来恢复细胞群或拯救营养不良的且退化的眼组织(特别是功能有障碍的视网膜)。视网膜功能障碍包括正常视网膜功能的缺乏或丧失,无论是由疾病、机械或化学损伤引起的,还是由涉及受试者视网膜的退化性或病理性过程引起的。hRPC可根据现有技术已知的技术被注射或以其他方式放置到视网膜位置、视网膜下空间、玻璃体、或视神经中。

[0079] 优选地,本发明的hRPC可用来补偿感光细胞功能的缺乏或降低。可利用本发明的视网膜干细胞群和方法治疗的视网膜功能障碍的例子包括,但不限于:感光细胞退化(发生在例如色素性视网膜炎、视锥细胞营养不良、视锥-视杆和/或视杆-视锥营养不良、及黄斑变性);视网膜脱落和视网膜创伤;由激光或阳光导致的光损伤;黄斑孔;黄斑水肿;夜盲和色盲;由例如糖尿病或血管闭塞导致的缺血性视网膜病变;由于早熟/早产导致的视网膜病变;感染性疾病,例如CMV视网膜炎和弓形体病;炎症性疾病,例如葡萄膜炎;肿瘤,例

如成视网膜细胞瘤和葡萄膜恶性黑色素瘤 ;并且可用于替换受眼神经病影响的视网膜内层神经细胞,所述眼神经病包括青光眼、外伤性视神经病变、脱落、以及放射性视神经病变和视网膜病变。

[0080] 本文所述的治疗可作为单独疗法使用,或与其他治疗结合进行。这些治疗可包括施用可刺激来源于神经视网膜的干细胞分化成感光细胞或其他视网膜细胞类型(例如双极细胞、神经节细胞、水平细胞、无长突细胞、Mueller 细胞)的物质。

[0081] 从以上所述可以意识到,虽然本文已为解释性目的描述了本发明的具体实施方式,但仍可在不违背所附权利要求界定的本发明的精神和范围内做出许多修改。本文所参考的所有公开文献、专利和专利申请都通过引用以其整体形式合并至本文中。

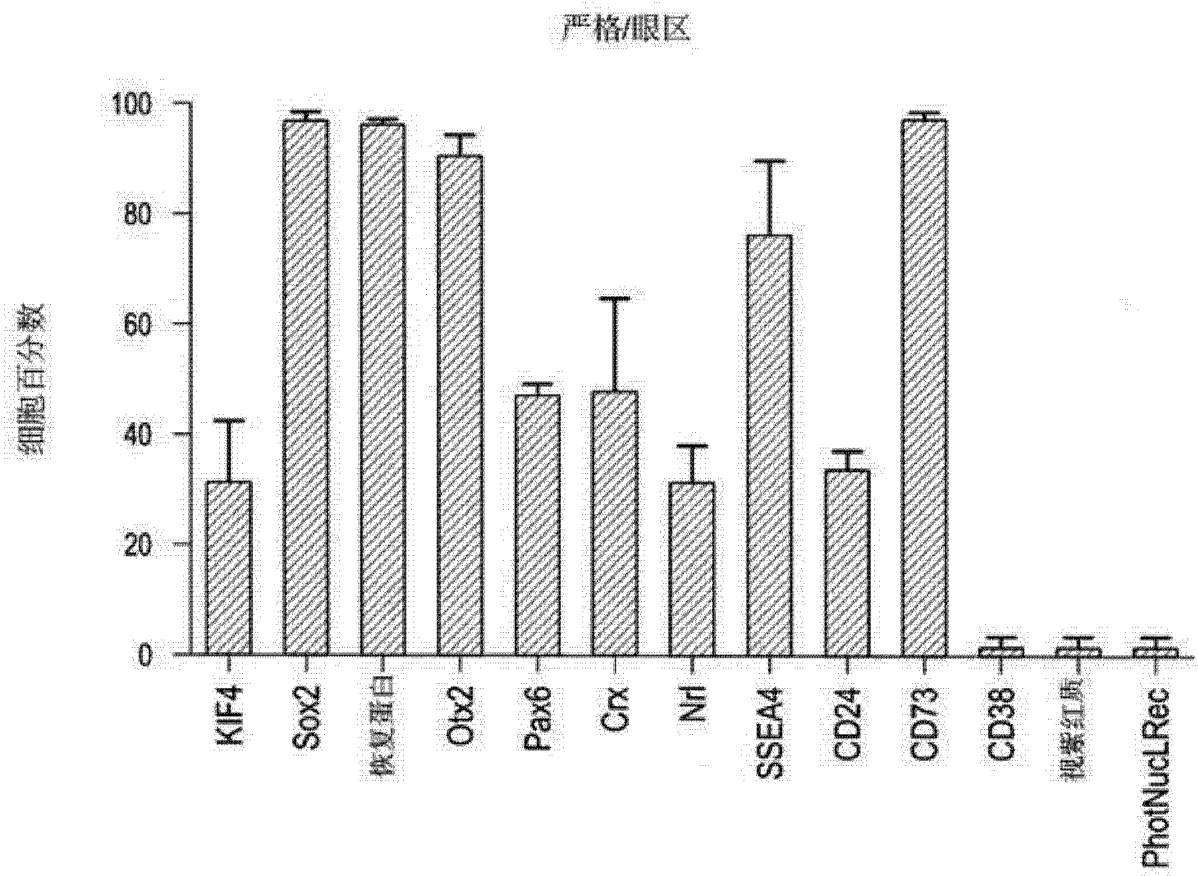


图 1

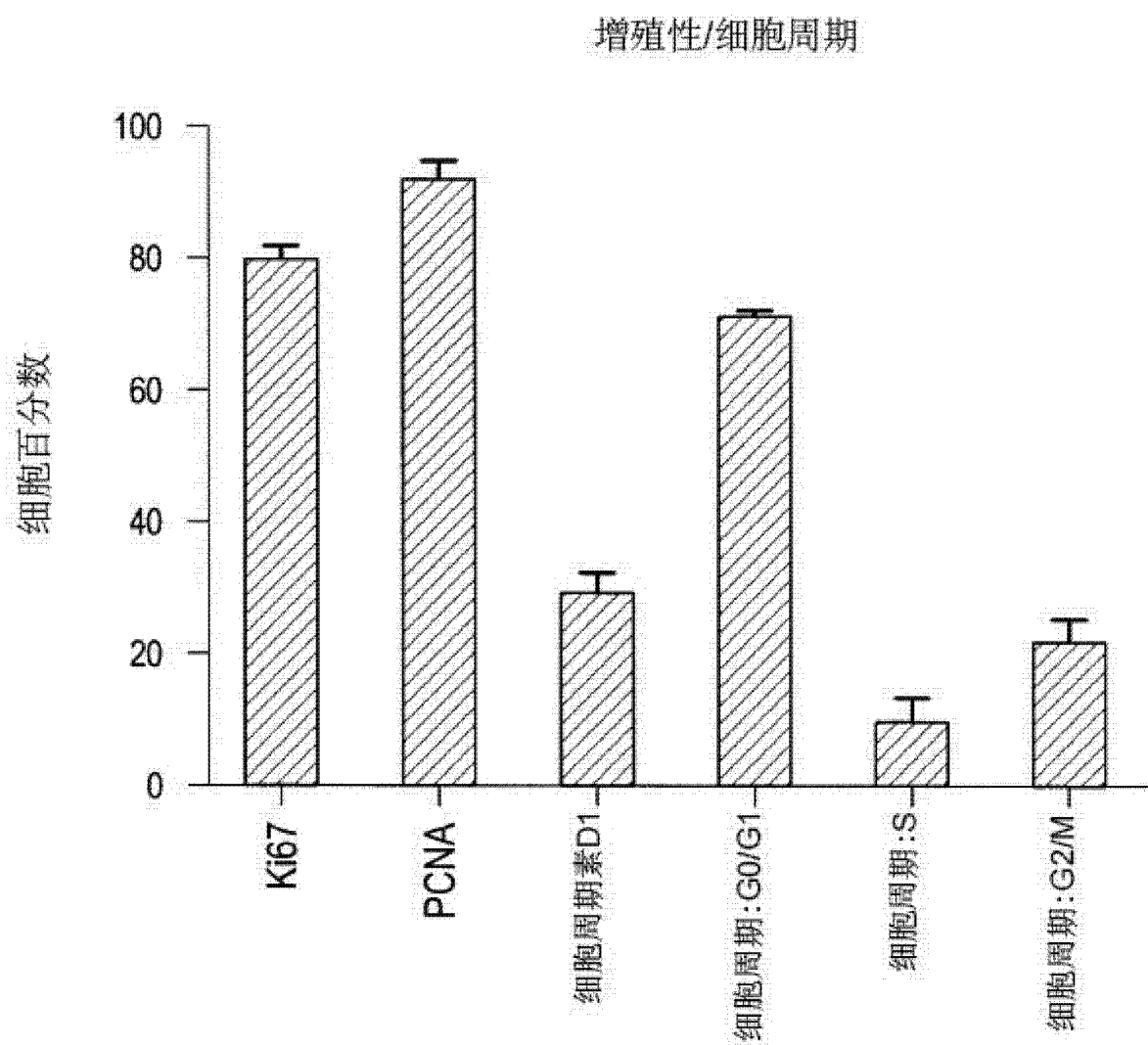


图 2

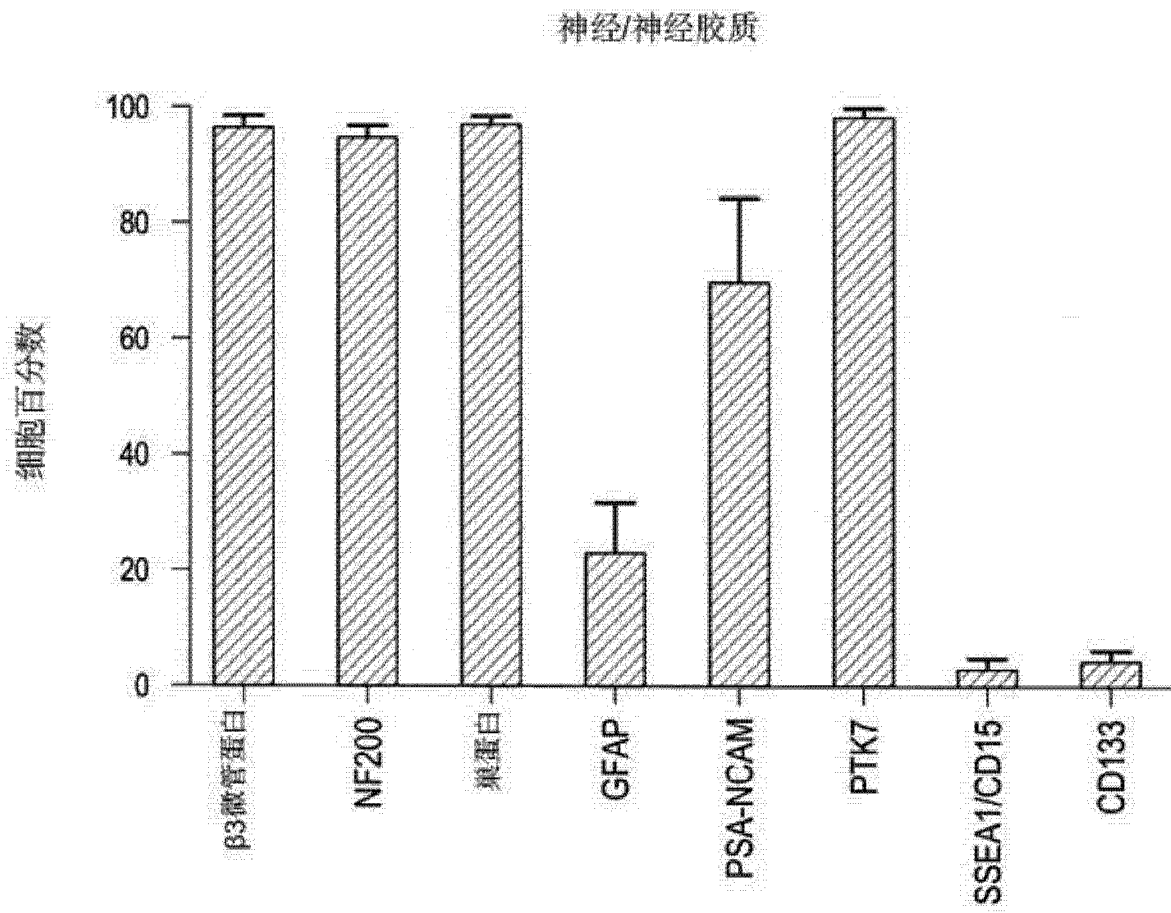


图 3

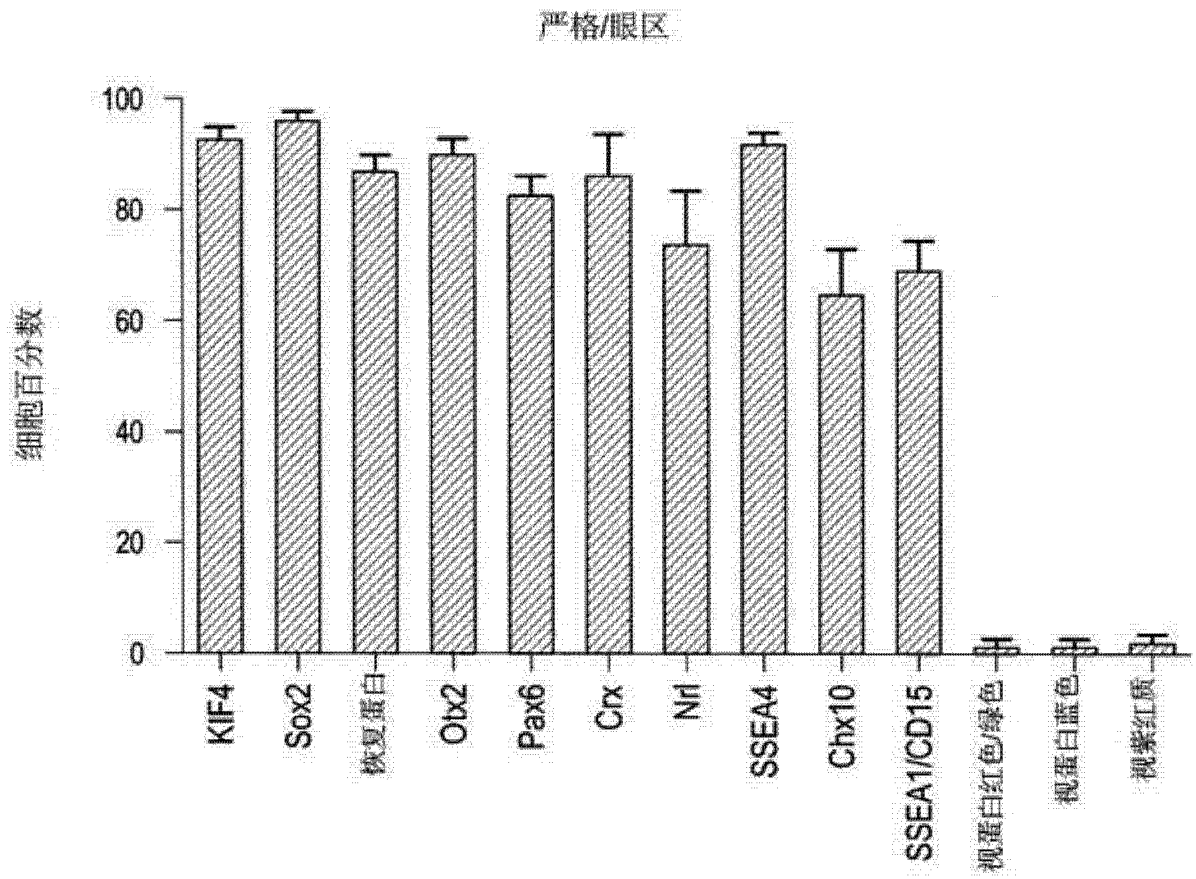


图 4

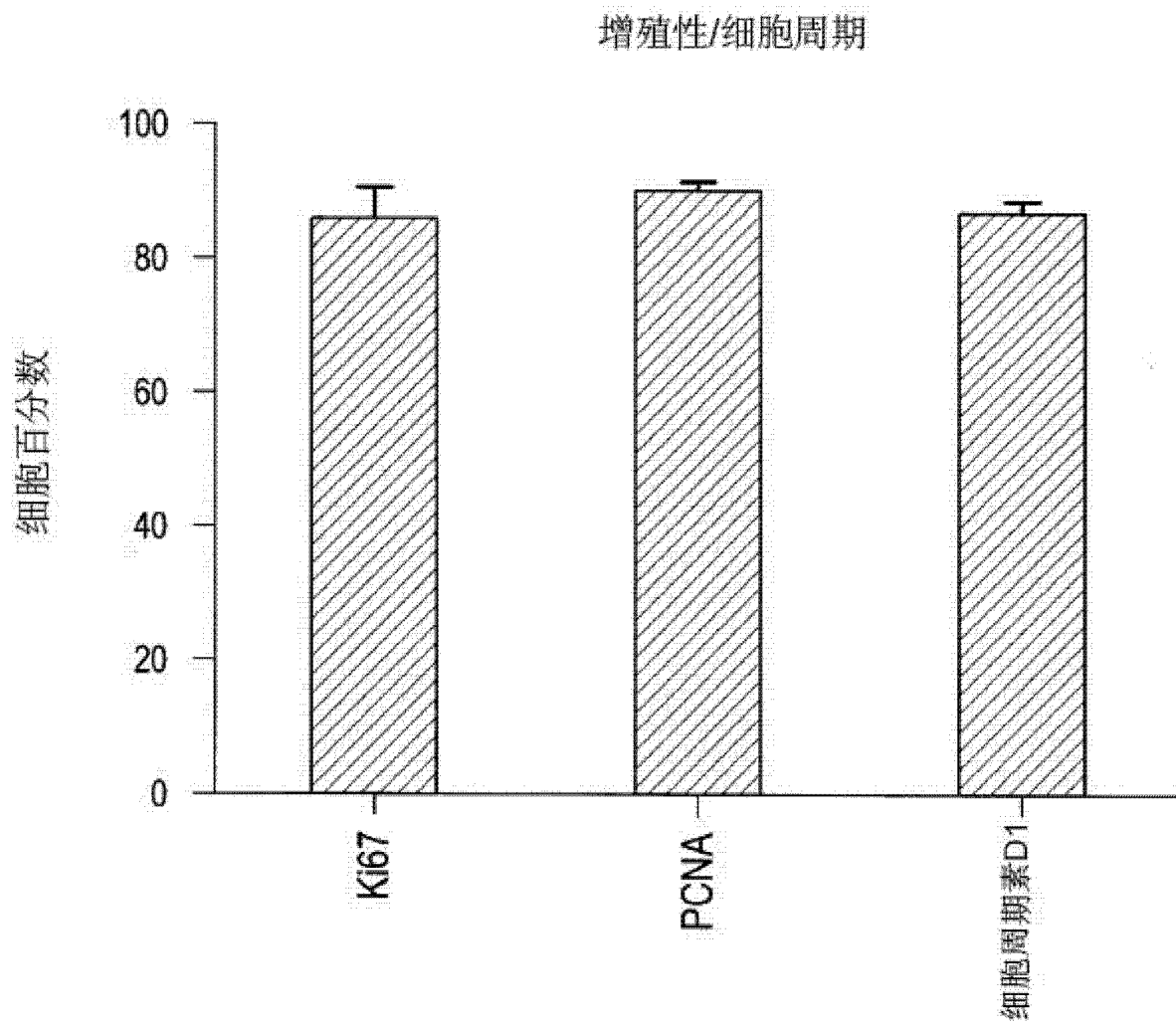


图 5

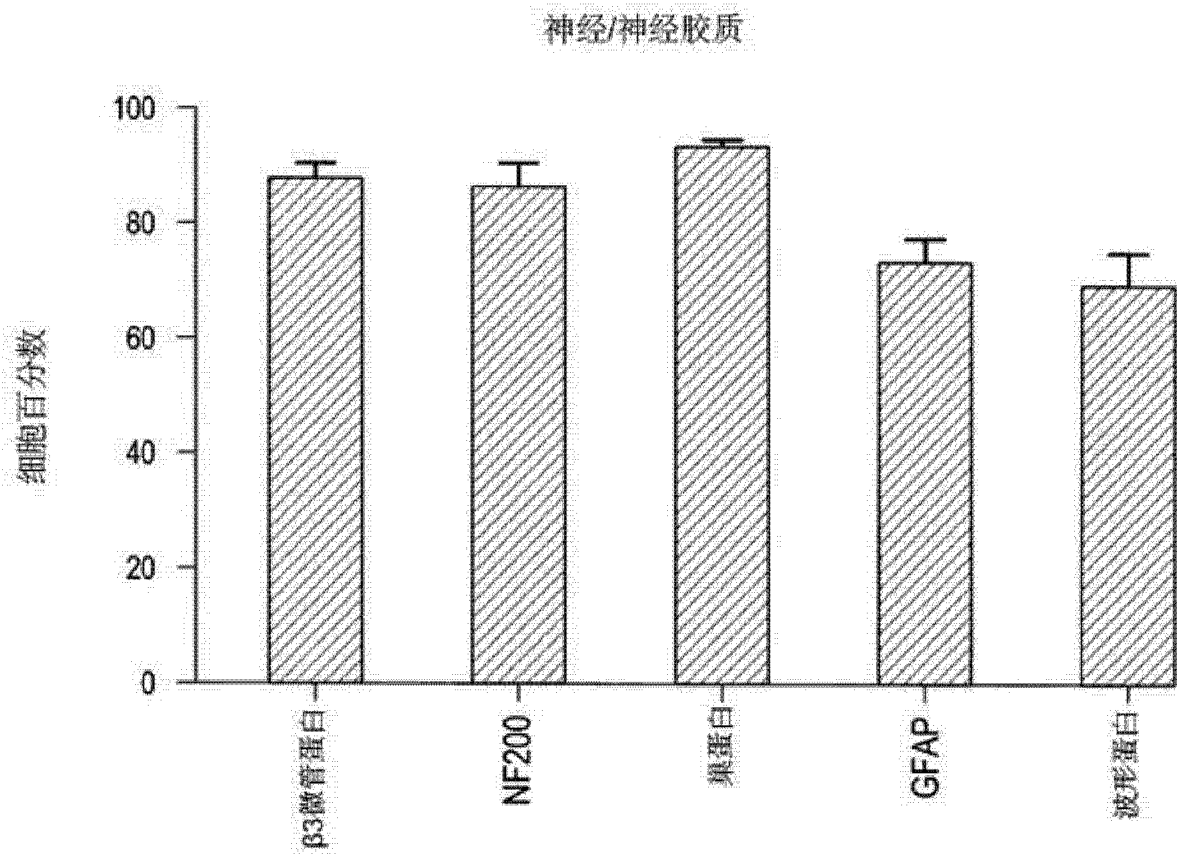


图 6