

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **026193**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2017.03.31**

(21) Номер заявки  
**201301277**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.05.17**

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)  
**A61P 27/00** (2006.01)

### (54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕТЧАТКИ

(31) **61/487,419**

(32) **2011.05.18**

(33) **US**

(43) **2014.04.30**

(86) **PCT/US2012/038342**

(87) **WO 2012/158910 2012.11.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ТЕ РИДЖЕНТС ОФ ТЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ  
(US)**

(72) Изобретатель:  
**Классен Генри, Ян Цзин (US)**

(74) Представитель:  
**Саломатина И.С. (RU)**

(56) HENRY KLASSEN et al. 'Progenitor cells from the porcine neural retina express photoreceptor markers after transplantation to the subretinal space of allorecipients' Stem Cells, 2007, Vol. 25, No. 5, pp. 1222-1230, ISSN 1066-5099(p), 1549-4918(e). See abstract; figure 2; p. 1223, left-column; p. 1224; p. 1226, left-column; p. 1228, left-column

STEPHEN REDENTI et al. 'Retinal tissue engineering using mouse retinal progenitor cells and a novel biodegradable, thin-film poly(e-caprolactone) nanowire scaffold' J. Ocul. Biol. Dis. Inform., 2008, Vol. 1, No. 1, pp. 19-29, ISSN 1936-8437. See abstract; results

HENRY KLASSEN et al. 'Stem cells and retinal repair' Progress in Retinal and Eye Research, 2004, Vol. 23, No. 2, pp. 149-181, ISSN 1350-9462. See p. 162 - p. 164, left-column

HENRY KLASSEN et al. 'Isolation of retinal progenitor cells from postmortem human tissue and comparison with autologous brain progenitors' Journal of Neuroscience Research, 2004, Vol. 77, No. 3, pp. 334-343, ISSN 0360-4012. See abstract; p. 335 - p. 336, left-column; results

(57) В настоящем документе описываются композиции и способы лечения, ослабления или предотвращения заболеваний или состояний сетчатки; улучшения фотопического (дневного) зрения; коррекции остроты зрения, улучшения функции макулы, улучшения показателей поля зрения, улучшения скотопического (ночного) зрения путем введения клеток-предшественников сетчатки. Описанный здесь объект изобретения также предоставляет клеточные популяции, содержащие клетки-предшественники сетчатки, и способы их выделения.

**B1****026193****026193****B1**

### **Область техники, к которой относится данное изобретение**

Описанный в настоящем документе объект изобретения относится в основном к области биологии стволовых клеток и регенеративной медицины. В частности, здесь предлагаются композиции и способы лечения, облегчения или предотвращения заболеваний или состояний сетчатки; улучшения фотопического (дневного) зрения; улучшения или коррекции остроты зрения, улучшения функционирования желтого пятна; улучшения показателей поля зрения или улучшения скотопического (ночного) зрения путем введения предшественников клеток сетчатки. Также предлагаются популяции клеток, включающие предшественников клеток сетчатки и способы их выделения. В различных вариантах осуществления данного изобретения предлагаются композиции и способы лечения, облегчения или предотвращения заболеваний или состояний сетчатки, например синдрома Ушера, пигментного ретинита, дегенеративных заболеваний сетчатки, старческой макулярной дегенерации, сухой и влажной форм старческой макулярной дегенерации, географической атрофии сетчатки, поражений фоторецепторов, диабетической ретинопатии, кистозного отека макулы, увеита, отслоения сетчатки, повреждений сетчатки, перфорации макулы, макулярных телеангиэктазий, травматических или ятрогенных повреждений сетчатки, поражений ганглиозных клеток или зрительного нерва, глаукомы или нейропатии зрительного нерва, ишемических поражений сетчатки (например, синдрома Терри, закупорки сосудов сетчатки или ишемической нейропатии зрительного нерва); или улучшения фотопического (дневного) зрения; улучшения или коррекции остроты зрения, улучшения функционирования желтого пятна, улучшение показателей поля зрения или улучшения скотопического (ночного) зрения. В других воплощениях данного изобретения предлагаются гетерогенные смеси эмбриональных нервных клеток сетчатки, способы и композиции (например, наборы, препараты и проч.) для их изготовления и применения.

### **Уровень техники**

Дегенеративные поражения сетчатки - это группа разнородных заболеваний глаз, приводящих к непрерывной потере зрения; от этих заболеваний страдают миллионы людей во всем мире. Молекулярные механизмы дегенеративных расстройств зрения различны, но все они имеют своим результатом необратимую гибель фоторецепторных клеток. В настоящее время нет эффективного лечения, которое бы восстанавливало утраченные фоторецепторы и зрительные функции; известные на сегодняшний день терапевтические вмешательства могут в лучшем случае лишь замедлить развитие заболевания.

До сих пор в клинических исследованиях у пациентов с дегенеративной патологией сетчатки использовались для трансплантации лоскуты эмбриональной сетчатки. Этот подход базируется на том, что пересаженная незрелая ткань сетчатки образует клеточные отростки и синаптические контакты с дегенерировавшей сетчаткой реципиента при условии, что нейроны ее внутренних слоев остались неизменными, так что для восстановления зрения требуются лишь синаптические связи с фоторецепторами. Показано, что в результате трансплантации лоскутов эмбриональной сетчатки действительно достигается некоторое субъективное улучшение зрения, однако широкому применению этого метода в клинической практике препятствуют проблемы отторжения трансплантата, доступности ткани для пересадки и непредсказуемой эффективности.

Стволовые клетки и другие плюрипотентные клетки также использовались для лечения больных с дегенерацией сетчатки. Такие клетки можно выделить из ряда источников, включая эмбриональную ткань, мозговую ткань взрослых, генетически модифицированные фибробласты кожи и даже саму сетчатку. Однако до сих пор эмбриональные или стволовые клетки, будучи пересаженными в сетчатку взрослого человека, не проявляли способности дифференцироваться в клетки сетчатки, без предварительной дифференцировки в подобные эмбриональным предшественники сетчатки. Результативность и эффективность такой пересадки низкие, к тому же оставшиеся плюрипотентные клетки могут давать начало опухолям. На сегодняшний день проблема замены фоторецепторных клеток включает понимание процессов развития, ведущих к дифференцировке клеток в фоторецепторы, которое открыло бы возможность пересадки достаточного количества клеток на оптимальной для трансплантации стадии развития с минимальным риском возникновения иммунных реакций или онкогенной трансформации пересаженных клеток.

### **Раскрытие изобретения**

В различных воплощениях данного изобретения предлагаются композиции и способы лечения, облегчения или предотвращения заболеваний или состояний сетчатки, например синдрома Ушера, пигментного ретинита, дегенеративных заболеваний сетчатки, старческой макулярной дегенерации, сухой и влажной форм старческой макулярной дегенерации, географической атрофии сетчатки, поражений фоторецепторов, диабетической ретинопатии, кистозного отека макулы, увеита, отслоения сетчатки, повреждений сетчатки, перфорации макулы, макулярных телеангиэктазий, травматических или ятрогенных повреждений сетчатки, поражений ганглиозных клеток или зрительного нерва, глаукомы или нейропатии зрительного нерва, ишемических поражений сетчатки (например, синдрома Терри, закупорки сосудов сетчатки или ишемической нейропатии зрительного нерва); или улучшения фотопического (дневного) зрения; улучшения или коррекции остроты зрения, улучшения функционирования желтого пятна, улучшение показателей поля зрения или улучшения скотопического (ночного) зрения. В других воплощениях данного изобретения предлагаются гетерогенные смеси эмбриональных нервных клеток сетчатки, спосо-

бы и композиции (например, наборы, препараты и проч.) для их изготовления и применения.

В других воплощениях данного изобретения предлагаются препараты, продукты производства или композиции, содержащие гетерогенную смесь эмбриональных нервных клеток сетчатки млекопитающих, полученные способом, включающим:

(a) забор образца клеток, включающего множество эмбриональных нервных клеток сетчатки млекопитающих, из плода млекопитающего

(i) внутриутробного возраста около 17-18 недель, или около 16-19 недель, или 15-20 недель, или 14-26 недель, или около 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 недель в случае человека или около 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 недель в случае других млекопитающих, при необходимости использования кошачьих, собачьих или свиных клеток, или 6-7 недель в случае кошачьих клеток, или 6-9 недель в случае свиных клеток, или

(ii) в возрасте, по достижении которого сетчатка у млекопитающих отчетливо сформирована, но прежде чем полностью сформируются наружные сегменты фоторецепторов и завершится или завершится в основном васкуляризация сетчатки, или на аналогичной стадии развития плода млекопитающих,

причем при необходимости забираемые клетки включают человеческие или кошачьи или собачьи клетки;

(b) ферментативная обработка взятого образца клеток для получения суспензии отдельных клеток и/или мелких и средних конгломератов клеток,

причем при необходимости для ферментативной обработки собранных клеток и/или мелких клеточных конгломератов используется трипсин или равноценный агент или препарат TrypLE™ Express, Invitrogen-Life Technologies, Карлсбад, шт. Калифорния, США) или равноценный агент; и

(c) культивирование клеток и/или мелких конгломератов клеток в стерильных условиях, включающих бессывороточную среду с антибиотиками и фунгицидными агентами либо без антибиотиков и фунгицидных агентов в течение не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более пассажей,

причем при необходимости клетки и/или мелкие клеточные конгломераты культивируют в среде, содержащей среду Игла, модифицированную по Дульбекко: питательную смесь F-12™ (среду DMEM/F12)™ или ADVANCED DMEM/F12™ (Gibco-Invitrogen-Life Technologies, Карлсбад, шт. Калифорния, США) ) или среду ULTRACULTURE™ (BioWhittaker-Lonza Walkersville, Inc., Уокерсвилль, шт. Мэриленд, США), при необходимости с добавкой N2 (Invitrogen) или B27, или B27 Xeno Free (Invitrogen), L-глутамин или препарата GlutaMax (Invitrogen) и человеческих рекомбинантных факторов роста, состоящих из эпидермального фактора роста (EGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF, Invitrogen), или других факторов роста,

и при необходимости среда DMEM/F12™ используется для человеческих клеток, а среда ULTRACULTURE™ - для кошачьих или собачьих клеток,

и при необходимости клетки культивируют или выращивают в условиях низкой концентрации кислорода, или при такой концентрации кислорода, которая приближается к содержанию кислорода (или имитирует его) в развивающейся сетчатке в процессе внутриутробного развития или при концентрации кислорода около 2%, 2,5%, 3%, 3,5%,

и при необходимости в среду добавляют витамин С, при необходимости витамин С добавляют раз в день или раз в два дня, при необходимости витамин С добавляют в таком количестве, чтобы начальная его концентрация составляла около 0,1 мг/мл, или 0,05 мг/мл, или от около 0,01 до около 0,5 мг/мл,

и при необходимости в среду добавляют альбумин, или человеческий, или кошачий, или собачий альбумин, или рекомбинантный альбумин, или альбумин добавляют в таком количестве, чтобы начальная концентрация составляла около 1,0 мг/мл,

и при необходимости взятые клетки проверяют на наличие патогенных агентов, бактерий, эндотоксинов, грибов, микоплазм, вирусов, вируса гепатита или вируса иммунодефицита человека,

и при необходимости взятые клетки проверяют на наличие нормального кариотипа,

и при необходимости взятые клетки не проявляют повышенной теломеразной активности,

и при необходимости взятые клетки проверяют на жизнеспособность,

и при необходимости взятые клетки проверяют на онкогенность.

В других вариантах предлагаемых препаратов, продуктов производства или композиций способ получения гетерогенной смеси эмбриональных нервных клеток сетчатки включает:

(a) отбор эмбриональных нервных клеток сетчатки по маркерам клеточной поверхности или по генетическим маркерам, при необходимости отбор клеток до культивирования (предположительный) или после культивирования, или и до, и после культивирования,

причем маркеры клеточной поверхности или генетические маркеры включают CD15/LeX/SSEA1 и/или ганглиозид GD2; при необходимости CD9, CD81, CD133 или AQP4, CXCR4; или

(b) отбор эмбриональных нервных клеток сетчатки по составу транскриптома, протеома и/или по геному.

В других воплощениях данного изобретения способ получения гетерогенной смеси эмбриональных нервных клеток сетчатки также включает

культивирование клеток в условиях, способствующих их пролиферации с оптимальной скоростью (или со скоростью, близкой к оптимальной) и/или проявлению фенотипа или транскриптома эмбриональных нервных клеток сетчатки,

причем при необходимости фенотип эмбриональных нервных клеток сетчатки включает экспрессию при необходимости на умеренных уровнях Ki67, p21 и/или теломеразы и/или на высоких уровнях одного или более маркеров стволовых клеток, ассоциированных с мультипотентными клетками (но не с плюрипотентными),

или при необходимости фенотип эмбриональных нервных клеток сетчатки включает экспрессию (гена или мРНК) нестина, виментина, Ki-67, маркера дифференцировки,  $\beta$ -3-тубулина, глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и/или родопсина или любой их комбинации;

и при необходимости определяют мРНК Dach1, Lhx2 и/или Pax6.

В других воплощениях данного изобретения препараты, продукты производства или композиции имеют состав, пригодный для инъекций, или для инъекций в полость стекловидного тела, или в пространство под сетчаткой.

В других воплощениях настоящего изобретения предлагаются способы лечения заболеваний или состояний сетчатки, включающие:

(a) получение препарата, продукта производства или композиции по данному изобретению и

(b) введение путем инъекции препарата, продукта производства или композиции по данному изобретению в полость стекловидного тела или в пространство под сетчаткой,

причем при необходимости полость стекловидного тела или пространство под сетчаткой принадлежат человеку, или кошке, или собаке,

причем при необходимости применяется стандартная процедура интраокулярной инъекции,

причем при необходимости указанный способ также включает прокол (парацентез) передней камеры глаза, что повышает безопасность процедуры,

и таким образом лечится заболевание или состояние сетчатки.

В других воплощениях способов по данному изобретению заболевания или состояния сетчатки включают синдром Ушера, пигментный ретинит, дегенеративные заболевания сетчатки, старческую макулярную дегенерацию, сухую и влажную формы старческой макулярной дегенерации, поражения фоторецепторов, диабетическую ретинопатию, отслоение сетчатки, повреждения сетчатки, травматические или ятрогенные повреждения сетчатки, поражения ганглиозных клеток или зрительного нерва, глаукому или нейропатию зрительного нерва.

В других воплощениях данного изобретения предлагаются способы улучшения фотопического (дневного) зрения, включающие:

(a) получение препарата, продукта производства или композиции по данному изобретению и

(b) введение путем инъекции препарата, продукта производства или композиции по данному изобретению в полость стекловидного тела или в пространство под сетчаткой,

причем при необходимости полость стекловидного тела или пространство под сетчаткой принадлежат человеку, или кошке, или собаке,

причем при необходимости применяется стандартная процедура интраокулярной инъекции,

причем при необходимости указанный способ также включает прокол (парацентез) передней камеры глаза,

и таким образом улучшается фотопическое (дневное) зрение.

В других воплощениях данного изобретения предлагаются способы улучшения или коррекции остроты зрения, улучшения функционирования желтого пятна, улучшения показателей поля зрения или улучшения скотопического (ночного) зрения, включающие:

(a) получение препарата, продукта производства или композиции по данному изобретению и

(b) введение путем инъекции препарата, продукта производства или композиции по данному изобретению в полость стекловидного тела или в пространство под сетчаткой,

причем при необходимости полость стекловидного тела или пространство под сетчаткой принадлежат человеку, или кошке, или собаке,

причем при необходимости применяется стандартная процедура интраокулярной инъекции,

причем при необходимости указанный способ также включает прокол (парацентез) передней камеры глаза,

и таким образом улучшается или корректируется острота зрения, улучшается функционирование желтого пятна, увеличивается поле зрения или улучшается скотопическое(ночное)зрение.

В других воплощениях данного изобретения предлагаются способы получения гетерогенной смеси эмбриональных нервных клеток сетчатки, полученных способом, включающим:

(a) во внутриутробном возрасте около 17-18 недель, или около 16-19 недель, или 15-20 недель, или 14-26 недель, или около 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 недель в случае человека или около 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 недель в случае других млекопитающих, при необходимости кошачьих, собачьих или свиных клеток, или 6-7 недель в случае кошачьих клеток, или 6-9 недель в случае свиных клеток,

причем при необходимости образцы клеток включают человеческие, или кошачьи, или собачьи клетки;

(b) ферментативная обработка образца клеток для получения суспензии отдельных клеток и/или мелких и средних конгломератов клеток,

причем при необходимости для ферментативной обработки образца клеток используется трипсин или равноценный агент или препарат TrypLE™ Express, Invitrogen-Life Technologies, Карлсбад, шт. Калифорния, США) или равноценный агент; и

(c) культивирование клеток в стерильных условиях, включающих среду, содержащую сыворотку или не содержащую сыворотки, без антибиотиков и фунгицидных агентов в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более пассажей,

причем при необходимости клетки культивируют в среде, содержащей среду Игла, модифицированную по Дульбекко: питательную смесь F-12™ (среду DMEM/F12™ (Gibco-Invitrogen-Life Technologies, Карлсбад, шт. Калифорния, США) или среду ULTRACULTURE™ (BioWhittaker-Lonza Walkersville, Inc., Уокерсвилль, шт. Мэриленд, США),

и при необходимости среда DMEM/F12™ используется для человеческих клеток, а среда ULTRACULTURE™ - для кошачьих или собачьих клеток,

и при необходимости в среду добавляют витамин С, при необходимости витамин С добавляют раз в день или раз в два дня, при необходимости витамин С добавляют в таком количестве, чтобы начальная его концентрация составляла около 0,1 мг/мл или 0,05 мг/мл или от около 0,01 до около 0,5 мг/мл,

и при необходимости в среду добавляют альбумин или человеческий, или кошачий, или собачий альбумин, или рекомбинантный альбумин, или альбумин добавляют в таком количестве, чтобы его начальная концентрация составляла около 1,0 мг/мл,

и при необходимости образец клеток проверяют на наличие патогенных агентов, бактерий, эндотоксинов, грибов, микоплазм, вирусов, вируса гепатита или вируса иммунодефицита человека,

и при необходимости образец клеток проверяют на наличие нормального кариотипа,

и при необходимости в образце клеток не выявляется повышенной теломеразной активности,

и при необходимости клетки образца проверяют на жизнеспособность,

и при необходимости клетки образца проверяют на онкогенность.

В других воплощениях данного изобретения предлагаются наборы для лечения заболеваний или состояний сетчатки или для практического применения способа по данному изобретению, включающие:

(a) препарат, продукт производства или композицию по данному изобретению и/или

(b) гетерогенную смесь эмбриональных нервных клеток сетчатки, полученную способом по данному изобретению.

В других воплощениях данного изобретения предлагается популяция клеток, включающая клетки-предшественники сетчатки млекопитающих, в которых экспрессируются один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из нестина, Sox2, Ki67, МНС класса I и Fas/CD95, причем нестин экспрессируется в более чем 90% или в около 95-99% клеток этой популяции, Sox2 экспрессируется в более чем 80% или в около 90-99% клеток этой популяции, Ki-67 экспрессируется в более чем 30% или в около 40-60% клеток этой популяции, МНС Class I экспрессируется в более чем 70% или в около 90% клеток этой популяции, Fas/CD95 экспрессируется в более чем 30% или в около 40-70% клеток этой популяции. В некоторых воплощениях данного изобретения указанные клетки имеют человеческое происхождение или происходят от других млекопитающих.

В некоторых воплощениях данного изобретения в клетках-предшественниках сетчатки млекопитающих указанной популяции также экспрессируются один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из виментина, CD9, CD81, AQP4, CXCR4, CD15/LeX/SSEA1, ганглиозида GD2, CD133, β3-тубулина, MAP2, GFAP, OPN/SPP1, PTN, KDR и TEK.

В другом аспекте данного изобретения предлагается способ выделения популяции клеток-предшественников сетчатки млекопитающих, включающий забор эмбриональной ткани сетчатки млекопитающего на стадии после формирования сетчатки, но прежде чем по всей сетчатке полностью сформируются наружные сегменты фоторецепторов и до завершения или до завершения в основном васкуляризации сетчатки; диссоциацию извлеченной ткани с образованием суспензии отдельных клеток и клеточных конгломератов; и культивирование этой суспензии в течение 10-30 пассажей, причем в клетках-предшественниках сетчатки млекопитающих экспрессируются один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из нестина, Sox2, Ki67, β3-тубулина, MAP2, МНС класса I и Fas/CD95, причем нестин экспрессируется в более чем 90% или в около 95-99% клеток этой популяции, Sox2 экспрессируется в более чем 80% или в около 90-99% клеток этой популяции, Ki-67 экспрессируется в более чем 30% или в около 40-60% клеток этой популяции, МНС Class I экспрессируется в более чем 70% или в около 90% клеток этой популяции, Fas/CD95 экспрессируется в более чем 30% или в около 40-70% клеток этой популяции. В некоторых воплощениях данного изобретения указанные ткани берут у людей или у других млекопитающих. В некоторых воплощениях данного изобретения указанные ткани берут из сетчатки плода человека во внутриутробном возрасте от около 12 недель до около 28 недель или из ткани сетчатки

в постнатальный или неонатальный период. В других воплощениях данного изобретения указанные ткани берут из сетчатки плода других млекопитающих во внутриутробном возрасте от около 3 недель до около 11 недель. В других воплощениях данного изобретения указанные ткани берут из сетчатки плода других млекопитающих во внутриутробном возрасте от около 3 недель до около 11 недель или из ткани сетчатки в постнатальный или неонатальный период. Клетки можно культивировать при концентрации кислорода, как в атмосфере, или при низкой концентрации кислорода, которая приближается к содержанию кислорода в развивающейся сетчатке в процессе внутриутробного развития, например от около 0,5 до около 7%; клетки также можно культивировать в среде без сыворотки или с низким содержанием сыворотки, причем эта среда при необходимости может содержать дополнительные компоненты, например N2, B27, витамин C и альбумин.

В других аспектах данного изобретения предлагается способ лечения заболеваний или состояний сетчатки у нуждающихся в том индивидов, включающий введение такому индивиду эффективного количества композиции, содержащей клетки-предшественники сетчатки млекопитающего, в которых экспрессируются один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из нестина, Sox2, Ki-67,  $\beta$ 3-тубулина, MAP2, MHC класса I и Fas/CD95, причем нестин экспрессируется в более чем 90% или в около 95-99% клеток взятой популяции, Sox2 экспрессируется в более чем 80% или в около 90-99% клеток этой популяции, Ki-67 экспрессируется в более чем 30% или в около 40-60% клеток этой популяции, MHC Class I экспрессируется в более чем 70% или в около 90% клеток этой популяции, Fas/CD95 экспрессируется в более чем 30% или в около 40-70% клеток этой популяции, и при необходимости количественную оценку изменений зрения у указанного индивида, в результате чего лечится его заболевание или состояние сетчатки.

В других воплощениях данного изобретения указанный индивид является человеком или другим млекопитающим. В некоторых воплощениях данного изобретения состав указанной композиции подходит для введения путем инъекции в полость стекловидного тела или в пространство под сетчаткой. Заболевания или состояния сетчатки, подлежащие лечению по данному изобретению, могут включать пигментный ретинит, врожденный амавроз Лебера, болезнь Штаргардта, синдром Ушера, дистрофию фоторецепторов, цилиопатию, митохондриальные расстройства, прогрессирующая атрофию сетчатки, дегенеративные заболевания сетчатки, старческую макулярную дегенерацию, сухую и влажную формы макулярной дегенерации, географическую атрофию, семейную и приобретенную макулопатию, поражения фоторецепторов, заболевания, обусловленные патологией пигментного эпителия сетчатки, диабетическую ретинопатию, кистозный отек макулы, увеит, отслоение сетчатки, травматические повреждения сетчатки, ятрогенные повреждения сетчатки, перфорацию макулы, телеангиэктазии макулы, поражения ганглиозных клеток, поражения зрительного нерва, глаукому, оптическую нейропатию, ишемические поражения сетчатки, ретинопатию недоношенных, закупорку сосудов сетчатки, семейную макроаневризму сетчатки, поражения сосудов сетчатки, поражения сосудов глаза, заболевания сосудов, ишемическую нейропатию зрительного нерва.

Некоторые подробности одного или более воплощений данного изобретения представлены на прилагающихся иллюстрациях и в нижеследующем описании. Другие признаки, цели и преимущества данного изобретения явствуют из описания и иллюстраций, а также из формулы изобретения.

Все цитируемые в настоящем документе публикации, патенты, патентные заявки явным образом полностью включены в него путем отсылки.

#### **Краткое описание чертежей**

Для лучшего понимания приведенного ниже описания осуществления изобретения, представленного в качестве примера и не ограничивающего описанный в настоящем документе объект изобретения изложенными здесь конкретными воплощениями, прилагаются фигуры, включаемые в настоящий документ путем отсылки, в которых

фиг. 1 иллюстрирует морфологию кошачьих клеток-предшественников сетчатки (RPC). Морфологически эти клетки не изменялись в ходе длительного культивирования, различные моменты времени которого показаны;

фиг. 2 представляет кривые роста кошачьих RPC в двух средах - SM и UL;

фиг. 3 иллюстрирует морфологию человеческих клеток-предшественников сетчатки в ходе культивирования (день 0 → день 56);

фиг. 4 и 5 представляют графики, иллюстрирующие кинетику роста человеческих клеток-предшественников сетчатки во времени;

фиг. 6А показывает сравнение условий роста в культуральных средах Advanced DMEM/F12 и основной DMEM/F12 с добавкой N2;

фиг. 6В иллюстрирует эксперимент, в котором сравнивали рост человеческих клеток-предшественников сетчатки в культуральных средах с добавкой N2 либо B27;

фиг. 7А представляет результаты эксперимента, в котором проверяли эффект добавления витамина C в культуральные среды для человеческих клеток-предшественников сетчатки. Дополнительное количество витамина C приводило к повышению жизнеспособности человеческих клеток-предшественников

сетчатки;

фиг. 7B и 7C иллюстрируют эксперимент по проверке эффекта добавления альбумина в культуральные среды для человеческих клеток-предшественников сетчатки;

фиг. 8 представляет результаты сравнительного эксперимента, в котором проверялось влияние осмотической концентрации культуральной среды на рост и жизнеспособность человеческих клеток-предшественников сетчатки;

фиг 9-11 представляет результаты экспериментов, в которых сравнивали показатели клеточного роста человеческих клеток-предшественников сетчатки культивируемых в условиях атмосферной концентрации кислорода и при низком содержании кислорода. Определяли динамику клеточного роста, морфологию клеток и экспрессию генов. Фиг. 11 демонстрирует воспроизводимость показателей клеточного роста для трех различных образцов клеток, которые использовались для создания рабочего банка клеток;

фиг. 12 демонстрирует результаты теста на токсичность стероидов для человеческих клеток-предшественников сетчатки;

фиг. 13A-13D графически показывают жизнеспособность и стабильность замораживавшихся человеческих клеток-предшественников сетчатки;

фиг. 14 показывает кошачьи клетки-предшественники сетчатки, окрашенные иммуноцитохимически на ряд маркеров - нестин,  $\beta$ 3-тубулин, виментин, родопсин, Ki-67, и GFAP;

фиг. 15 - графическое представление генного профиля кошачьих клеток-предшественников сетчатки в разные моменты времени по данным количественной ПЦР для маркерных транскриптов нестина, виментина, GFAP и PKC- $\alpha$ ;

фиг. 16A графически иллюстрирует разницу в генной экспрессии по данным количественной ПЦР между клетками-предшественниками сетчатки, культивируемыми в разных средах - UL и SM;

фиг. 16B - сравнение кошачьих клеток-предшественников сетчатки и мозга;

фиг. 17 показывает окрашивание клеток на RFP, виментин, или опсин, эзрин, или протеинкиназу C после трансплантации *in vivo* кошачьих клеток-предшественников сетчатки в подсетчаточное пространство кошкам абиссинской породы с дистрофией сетчатки;

фиг. 18 иллюстрирует морфологические признаки человеческих клеток, демонстрируемые иммуноцитохимическим окрашиванием, выявляющим экспрессию маркеров, включая: (A) нестин; (B) виментин; (C) Sox2; (D) SSEA-1 (обозначаемый также CD 15, LeX); (E) ганглиозид GD2; (F) Ki-67;

фиг. 19 иллюстрирует морфологические признаки человеческих клеток, демонстрируемые иммуноцитохимическим окрашиванием, выявляющим экспрессию маркеров, включая: (A)  $\beta$ 3-тубулин; (B) GFAP; (C) GDNF;

фиг. 20 изображает экспрессию маркеров на уровне РНК: теплокарта по данным количественной ПЦР;

фиг. 21A показывает результаты, полученные методом количественной ПЦР, сравнения уровней экспрессии генов в человеческих клетках-предшественниках сетчатки и в человеческих фибробластах;

фиг. 21B и 21C представляют данные по генной экспрессии, полученные путем количественной ПЦР, в дополнительных экспериментах;

фиг. 22 - итоговая таблица, в которой приведен перечень 11 генов (из профиля примерно 26 изученных генов), для которых разница в уровнях экспрессии при сравнении клеток-предшественников сетчатки и фибробластов человека одинакова для материала от разных доноров;

фиг. 23 демонстрирует экспрессию маркеров на уровне РНК по данным количественной ПЦР в реальном времени в различные моменты времени культивирования;

фиг. 24 показывает изменения уровней экспрессии различных маркеров (например, GDNF, аннексина V,  $\beta$ 3-тубулина, Notch1, Six6, Ki-67 и CD 133) на ранних пассажах в сравнении с поздними пассажами;

фиг. 25 суммарно представляет данные микрочипов, отличающие человеческие клетки-предшественники сетчатки от нейральных стволовых клеток (клеток-предшественников мозга);

фиг. 26 показывает экспрессию маркеров после дифференцировки под влиянием ретиноевой кислоты;

фиг. 27 - суммарная таблица условий культивирования человеческих клеток-предшественников сетчатки от разных доноров;

фиг. 28A иллюстрирует генную экспрессию по данным количественной ПЦР в клетках, растущих в условиях SM в разные моменты времени культивирования;

фиг. 28B иллюстрирует генную экспрессию по данным количественной ПЦР в клетках, растущих в условиях SM-UL (сначала UL, затем SM) в два разных момента времени культивирования;

фиг. 29A иллюстрирует генную экспрессию по данным количественной ПЦР в клетках, растущих в условиях SM-FBS (вначале SM + 5% FBS, затем только SM) в разные моменты времени культивирования;

фиг. 29B иллюстрирует генную экспрессию по данным количественной ПЦР в клетках, растущих в условиях только SM в два разных момента времени культивирования;

фиг. 29С иллюстрирует генную экспрессию по данным количественной ПЦР в клетках, растущих в условиях SM-hS (SM, после начальной SM +человеческая сыворотка) в два разных момента времени культивирования. Как и ранее, повышен уровень экспрессии только GDNF;

фиг. 30 - суммарная таблица результатов сравнительных экспериментов, отраженных на фиг. 28 и 29. Гены, для которых наблюдалось постоянство картины экспрессии, выделены желтым цветом;

фиг. 31 - теплокарта по данным количественной ПЦР для человеческих клеток-предшественников сетчатки;

фиг. 32 - гистограмма по данным количественной ПЦР для человеческих клеток-предшественников сетчатки;

фиг. 33А представляет уровни экспрессии генов, имеющих отношение к сигнальному пути ангиогенеза, в человеческих клетках-предшественниках сетчатки;

фиг. 33В представляет уровни экспрессии генов, имеющих отношение к сигнальному пути WNT, в человеческих клетках-предшественниках сетчатки;

фиг. 34А - график, представляющий результаты анализа методом главных компонент, демонстрирующий различия в генной экспрессии между человеческими клетками-предшественниками сетчатки и тканью, из которой они происходят, и между указанными клетками и фибробластами;

фиг. 34В - аналогичный график, демонстрирующий различия в генной экспрессии между человеческими клетками-предшественниками сетчатки и тканями, полученными из эмбриональной сетчатки в день 0;

фиг. 34С - аналогичный график, демонстрирующий в целом сходство и различия между образцами клеточных популяций;

фиг. 35 представляет результаты кластерного анализа трех популяций человеческих клеток-предшественников сетчатки (исходный банк клеток, гипоксические условия; исходный банк клеток, нормальная концентрация кислорода; рабочий банк клеток, гипоксические условия) по сравнению с тканью эмбриональной сетчатки;

фиг. 36 - точечная диаграмма типа "вулкан", демонстрирующая сравнение генной экспрессии в клетках исходного банка, растущих в гипоксических условиях, и в ткани;

фиг. 37А - диаграмма Венна, показывающая число генов, по-разному экспрессирующихся в различных группах человеческих клеток-предшественников сетчатки в зависимости от условий обработки;

фиг. 37В диаграмма Венна, показывающая число генов, по-разному экспрессирующихся в различных группах человеческих клеток-предшественников сетчатки, приближенных к исходной ткани, в зависимости от числа пассажей и условий обработки;

фиг. 38А и 38В - точечные диаграммы типа "вулкан", демонстрирующие сравнение человеческих клеток-предшественников сетчатки и исходной ткани;

фиг. 39А и 39В - точечные диаграммы типа "вулкан", демонстрирующие сравнение человеческих клеток-предшественников сетчатки, растущих при пониженном и при нормальном содержании кислорода;

фиг. 40 - таблица экспериментов с кошачьими клетками-предшественниками сетчатки. Указаны донорский материал, условия обработки (среда) и время культивирования. Красный цвет (UL-d76) соответствует изгибу кривой клеточного роста вверх, т.е. возможно, спонтанной иммортализации;

фиг. 41А иллюстрирует генную экспрессию по данным количественной ПЦР в кошачьих клетках-предшественниках сетчатки, растущих в среде UL, в указанные моменты времени культивирования;

фиг. 41В включает дополнительные маркеры, не показанные на фиг. 41А;

фиг. 42-44 вместе представляют дополнительные данные того же эксперимента, который иллюстрирован фиг. 41;

фиг. 45 - круговая диаграмма, показывающая изменения генной экспрессии в кошачьих клетках-предшественниках сетчатки в зависимости от времени и условий культивирования;

фиг. 46 - таблица, суммирующая результаты количественной ПЦР для кошачьих клеток-предшественников сетчатки из разного донорского материала и в разных условиях культивирования;

фиг. 47 представляет результаты изучения человеческих клеток-предшественников сетчатки, культивируемых при нормальной и при пониженной концентрации кислорода, методом твердофазного иммуноферментного анализа. Определяли следующие маркеры: OPN, VEGF, SDF-1, BDNF и GDNF;

фиг. 48 представляет результаты изучения человеческих клеток-предшественников сетчатки, культивируемых при нормальной и при пониженной концентрации кислорода, методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Определяли следующие маркеры: нестин, Sox2, Ki-67, GFAP, белки МНС класса I и II, Fas/CD95, CXCR4, CD 15 и ганглиозид GD2;

фиг. 49 иллюстрирует доказательства действенности способов по данному изобретению при трансплантации in vivo: крысам линии RCS с дистрофией сетчатки (модель наследственной дегенерации фоторецепторов) вводили в глаз человеческие клетки-предшественники сетчатки;

фиг. 50 и 51 - фотографии, демонстрирующие окрашивание сетчатки у крыс после инъекции человеческих клеток-предшественников сетчатки в подсчетчаточное пространство;

фиг. 52 и 53 - фотографии, демонстрирующие окрашивание сетчатки у крыс после инъекции чело-

веческих клеток-предшественников сетчатки в стекловидное тело;

фиг. 54 - фотографии, демонстрирующие иммуноцитохимическое окрашивание тотальных препаратов крыс RCS после инъекции человеческих клеток-предшественников сетчатки в сетчатку этих особей. А и В - контроль (животным вводили раствор без клеток); С и D - опыт (животным вводили клетки-предшественники);

фиг. 55 - график, демонстрирующий улучшение остроты зрения у пациентов, получавших лечение человеческими клетками-предшественниками сетчатки.

### **Осуществление изобретения**

Приведенные в данном описании признаки, структуры и свойства можно комбинировать любым подходящим образом в одном или более воплощениях. Например, словосочетания "примерные воплощения", "примеры воплощений", "некоторые воплощения" или другие подобные выражения в настоящем описании употребляются применительно к ситуации, когда конкретные признак, структура или свойство, описанные в связи с каким-либо воплощением, могут быть включены по меньшей мере в одно описанное здесь воплощение. Поэтому словосочетания "примерные воплощения", "примеры воплощений", "некоторые воплощения" или другие подобные выражения в настоящем описании не обязательно относятся все к одной и той же группе воплощений, и описываемые свойства, структуры или признаки могут комбинироваться любым подходящим образом в одном или более воплощений.

Для лучшего понимания данного описания ниже даются определения ряду терминов. Термины, которым дано определения в настоящем документе, употребляются в нем в значениях, привычных для рядовых специалистов в областях техники, имеющих отношение к объекту данного изобретения. В настоящем документе эта терминология используется для изложения конкретных воплощений описанного в нем объекта данного изобретения, однако их использование не ограничивает объект данного изобретения за исключением указанного в формуле изобретения.

Данным изобретением предлагаются композиции и способы, включающие или использующие гетерогенные смеси эмбриональных нервных клеток сетчатки для лечения, облегчения или предотвращения заболеваний или состояний сетчатки, например синдрома Ушера, пигментного ретинита, дегенеративных заболеваний сетчатки, старческой макулярной дегенерации, сухой и влажной форм старческой макулярной дегенерации, поражений фоторецепторов, диабетической ретинопатии, отслоения сетчатки, повреждений сетчатки, травматических или ятрогенных повреждений сетчатки, поражений ганглиозных клеток или зрительного нерва; или улучшения фотопического (дневного) зрения; улучшения или коррекции остроты зрения, улучшения функционирования желтого пятна, улучшения показателей поля зрения или улучшения скотопического (ночного) зрения. В других воплощениях данного изобретения предлагаются гетерогенные смеси эмбриональных нервных клеток сетчатки, способы и композиции (например, наборы, препараты и проч.) для их изготовления и применения.

В других воплощениях данного изобретения предлагаются способы и применения культивируемых клеток-предшественников сетчатки, полученных в виде суспензии клеток и используемых в качестве аллогенных трансплантатов, вводимых пациенту с поражением сетчатки путем инъекции в полость стекловидного тела. В других воплощениях данного изобретения предлагаются основанные на использовании этих клеток терапевтические методы, включающие использование культивируемых гетерогенных популяций клеток из незрелой сетчатки млекопитающего, например человека, или заключающиеся в их использовании.

В других воплощениях данного изобретения пролиферирующие клетки млекопитающих, например человеческие клетки сетчатки, берутся из донорской ткани, устанавливаются их свойства и клетки вводятся (под местной анестезией) путем инъекции непосредственно в полость стекловидного тела, так что нет необходимости в иммуносупрессии организма-реципиента, например пациента.

В других воплощениях данного изобретения предлагаемые композиции и способы применяются для лечения, предотвращения или облегчения поражений сетчатки, например дегенерации сетчатки, например пигментного ретинита.

Хотя данное изобретение не ограничено каким-либо конкретным механизмом действия, в одном из его воплощений донорские эмбриональные клетки сетчатки обеспечивают трофическую функцию для сетчатки организма-хозяина, а именно включая хозяйские клетки-колбочки. Этот трофический эффект играет не только защитную для нервных клеток роль, но также вызывает быстрое восстановление жизнеспособности сохранившихся клеток хозяйской сетчатки, что определяется по улучшению зрительных функций. В одном из воплощений данного изобретения донорские клетки способны интегрироваться в хозяйскую сетчатку и, пройдя клеточную дифференцировку, заменять фоторецепторы (количество которых может быть ограничено). Общий эффект этого состоит в быстром и стойком восстановлении и сохранении клинически значимого уровня зрительных функций сетчатки, которая без такого влияния обречена на полную деградацию, что сулит больному полную слепоту. Соответственно, в одном из воплощений данного изобретения предлагаемые способы и композиции могут быстро и стойко восстанавливать и сохранять клинически значимый уровень зрительных функций сетчатки у млекопитающих, например, у человека.

В других воплощениях данного изобретения предлагаемые способы включают получение и исполь-

зование суспензий диссоциированных клеток эмбриональной сетчатки, например клеток-предшественников сетчатки человека, и при необходимости не включающие ткань или каркасные структуры. В других воплощениях данного изобретения эти клетки вводят путем инъекции в полость стекловидного тела, причем при необходимости не требуется витрэктомия или хирургические манипуляции в подсетчаточной области. В одном из воплощений данного изобретения указанные клетки можно эффективно имплантировать (например, ввести путем инъекции) в подсетчаточное пространство или их можно эффективно имплантировать (например, ввести путем инъекции) в глаз, применяя стандартную процедуру интраокулярной инъекции, например введение подкожно или под углом. В других воплощениях данного изобретения не требуется ретиномии или интраокулярное введение газа либо силиконового масла.

В других воплощениях данного изобретения может также осуществляться парацентез передней камеры глаза или же в зависимости от ситуации он не осуществляется, что определяет специалист в данной области техники. В других воплощениях данного изобретения не требуется зашивания глазного яблока в ходе и/или после процедуры. В других воплощениях данного изобретения нужна только местная анестезия, например, не делается локальная, регионарная, общая анестезия.

В других воплощениях данного изобретения не применяется супрессия воспалительной реакции и/или иммунного ответа; но при необходимости может быть включена противовоспалительная и/или иммуносупрессивная терапия в послеоперационном периоде (капли). В других воплощениях данного изобретения не требуется тканевое типирование трансплантата и пробы на гистосовместимость для пациента.

В других воплощениях данного изобретения пациенту после процедуры не требуется обязательный постельный режим и/или длительное пребывание в положении лицом вниз. В других воплощениях данного изобретения предлагаемый способ осуществляется без госпитализации пациента, при необходимости не требуется ночное пребывание в стационаре.

В других воплощениях данного изобретения предлагаемые композиции и способы применяются для предотвращения облегчения и/или лечения пигментного ретинита, синдрома Ушера или любого дегенеративного заболевания сетчатки, например старческой макулярной дегенерации или поражений фоторецепторов, например отслоения сетчатки, или такого поражения сетчатки, как диабетическая ретинопатия, или поражений ганглиозных клеток/зрительного нерва, например глаукомы или нейропатии зрительного нерва.

В других воплощениях данного изобретения применение или осуществление на практике предлагаемых композиции и способов имеет следующие результаты: улучшается фотопическое (дневное) зрение, причем при необходимости обеспечивается быстрый эффект; корректируется и увеличивается острота зрения; улучшается функционирование желтого тела, создается возможность сохранения или обретения центральной фиксации; увеличивается поле зрения; со временем улучшается скотопическое (ночное) зрение; в случае сопутствующей потери слуха при синдроме Ушера возрастает (улучшается) чувствительность к звукам (по сообщениям); и/или у больных с восприятием только света, когда улучшение зрения леченым глазом лишь ограниченное, заметно улучшается острота зрения другим глазом.

В других воплощениях данного изобретения применение или осуществление на практике предлагаемых композиции и способов приводит к различным системным положительным эффектам, например, у леченых индивидов изменяется внешность, возможно вследствие положительных соматических явлений; что может быть связано с влиянием света на циркадианные ритмы, функцию гипофиза, секрецию гормонов, тонус сосудов и др.; улучшается ощущение зрительных возможностей; возрастает независимость от амбулаторного медицинского обслуживания; улучшается ощущение качества жизни; и/или возрастает активность в повседневной жизни.

В других воплощениях данного изобретения применение или осуществление на практике предлагаемых композиции и способов не приводит к: развитию нежелательного клеточного роста, например, опухолей; инфекциям, например, эндофтальмиту, риск которого связан с любой интраокулярной процедурой; передаче заболеваний (однако трудно исключить прионную инфекцию или коровье бешенство; увеит и/или острое отторжение трансплантата; повышению глазного давления; блокаде угла; гипотонии; отслоению сетчатки и/или образованию новых сосудов.

В других воплощениях данного изобретения в предлагаемых композициях и способах используются культуры клеток-предшественников сетчатки, состоящие из (или включающие) гетерогенные культуры незрелых клеток сетчатки, полученные из эмбриональной сетчатки млекопитающих, которые при необходимости не являются результатом клонального отбора, а смешанные. В других воплощениях данного изобретения в этих клетках экспрессируются маркеры предшественников и маркеры сетчатки. В других воплощениях данного изобретения эти клетки выращивают в условиях без ксеногенных факторов для клинического применения, поскольку ксеногенная контаминация может снижать безопасность процедуры. В других воплощениях данного изобретения эти клетки выращивают в условиях полностью без сыворотки или, по желанию, эти клетки можно выращивать в среде, содержащей сыворотку.

В других воплощениях данного изобретения эти клетки не являются бессмертными, также их не вынуждают к иммортализации и не допускают ее. В других воплощениях данного изобретения эти клетки не пролиферируют неограниченно. Приведенные в качестве примера способы культивирования кле-

ток по данному изобретению могут увеличить скорость и продолжительность клеточного роста и значительно повысить выход донорских клеток для данной порции донорской ткани.

В других воплощениях данного изобретения эти клетки не являются собственно стволовыми клетками - скорее, они незрелые и/или пластичные, и при необходимости не удовлетворяют критериям истинных стволовых клеток.

В других воплощениях данного изобретения клетки, используемые для его осуществления на практике, получают из эмбриональной ткани млекопитающего и при необходимости они не живут в течение всей жизни данного организма. В других воплощениях данного изобретения клетки, используемые для его осуществления на практике, не способны (в отсутствие дополнительных манипуляций) дать начало зародышевому пласту или не способны (в отсутствие дополнительных манипуляций) дать начало всем трем зародышевым листкам; при необходимости эти клетки предетерминированы к образованию ткани или клеток сетчатки.

В других воплощениях данного изобретения клетки, используемые для его осуществления на практике, представляют собой популяцию близко родственных клеток, а не выделенный единичный клеточный тип. В других воплощениях данного изобретения клетки, используемые для его осуществления на практике, не являются плюрипотентными, при необходимости они могут быть, по-видимому, мультипотентными. В других воплощениях данного изобретения клетки, используемые для его осуществления на практике, не культивируют в состоянии плюрипотентности, таким образом, они безопаснее. В других воплощениях данного изобретения клетки, используемые для его осуществления на практике, не являются генетически модифицированными или же они генетически модифицированные (например, стабильно или временно трансформированные, или трансформация индуцируется).

В других воплощениях данного изобретения предлагаемые композиции и способы обеспечивают клинически значимое трофическое влияние на пораженную сетчатку или обеспечивают регенеративное влияние на желтое пятно и/или скотопическое зрение.

В других воплощениях данного изобретения клетки, используемые для его осуществления на практике, обладают низкой иммуногенностью, например, как аллотрансплантаты при пересадке в глаз, или в полость стекловидного тела глаза, или в подсетчаточное пространство.

В других воплощениях данного изобретения клетки, используемые для его осуществления на практике, являются клетками-предшественниками сетчатки, в отличие от нейральных предшественников и/или нейральных стволовых клеток (NSC).

В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, являются мультипотентными, но они не равнозначны нейральным стволовым клеткам. В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, происходят не из мозга, а из сетчатки. В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, дают начало фоторецепторам (клетки-предшественники, происходящие из мозга, в этом неэффективны). В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, являются мультипотентными, но без дополнительных манипуляций они, в отличие от нейральных стволовых клеток, не дают начало олигодендроцитам.

В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, характеризуются количественно различными профилями генной экспрессии наборы генов, например, как описано в настоящем документе; или они имеют количественно различные профили экспрессии растворимых факторов; или они имеют количественно различные профили экспрессии маркеров клеточной поверхности.

В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, происходят из эмбриональной нейральной сетчатки млекопитающего, а не из ресничного края радужки, ресничного эпителия глаза или пигментного эпителия сетчатки. В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, не происходят из дифференцированной мюллеровой глии, они не являются *per se* постмитотическими предшественниками или стволовыми клетками и/или не принадлежат к какому-то одному изолированному типу клеток.

В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, характеризуются генным профилем который не является фиксированным, постоянным или не подверженным мутациям; или они характеризуются динамическим генным профилем, который количественно изменяется по мере культивирования.

В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, не присутствуют в

эмбрионе на ранних стадиях развития, например в бластоцисте. В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, не присутствуют в сколько-нибудь значительном количестве в нормальном зрелом организме млекопитающего, например человека. В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, присутствуют в естественном для них количестве в развивающейся (эмбриональной) сетчатке млекопитающих, например человека. В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, в норме не находятся в костном мозге и не происходят из него.

В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, при культивировании в условиях, способствующих пролиферации, в большинстве своем находятся в состоянии митотического деления, причем при необходимости одновременно наличествует некоторое количество (меньшинство) клеток в постмитотическом периоде.

В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, происходят искусственным путем от линий плюрипотентных клеток, хотя при необходимости не содержат оставшихся плюрипотентных клеток.

В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, дают начало клеткам сетчатки (дифференцируются в них), включая фоторецепторы, но исключая олигодендроциты.

В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, в качестве аллотрансплантатов глаза иммунологически хорошо переносятся неродственным реципиентом-млекопитающим, например, человеком. В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, пересаживаются в полость стекловидного тела для лечения или профилактики расстройств зрения или поражений сетчатки у человека или других млекопитающих.

В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, не вызывают какого-либо или существенного риска образования опухолей или иного нежелательного клеточного роста.

В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, культивируют в виде сферических колоний или монослоев в адгезивной системе, или в виде сферических колоний и затем монослоев, или в виде комбинации сфер и монослоев. В других воплощениях данного изобретения не требуются сферические колонии или же клетки трансплантируют диссоциированными, или в виде смеси сфер и отдельных клеток. В других воплощениях данного изобретения клетки эмбриональной сетчатки млекопитающего или клетки-предшественники сетчатки, используемые для его осуществления на практике, включают пересаженные клетки, которые в стекловидном теле объединяются и при необходимости могут образовывать сферические колонии.

Хотя данное изобретение не ограничивается каким-либо определенным механизмом действия, примером механизма действия являются диффузия и/или трофический эффект; имеющиеся данные согласуются с идеей трофического перепрограммирования отмирающих колбочек организма-хозяина, что приводит к переключению с изменений в направлении апоптоза на восстановление способности к переработке световых раздражителей, то может происходить прямо или опосредованно. Не исключается участие других тканей зрительной системы. Этот механизм допускает расположение трансплантата, представляющего собой смесь эмбриональных нейральных клеток сетчатки по данному изобретению в стекловидном теле или в подсетчаточном пространстве. В одном из вариантов/аспектов/ данного изобретения расположение в стекловидном теле усиливает основанный на диффузии эффект процедуры. Указанный механизм допускает расположение трансплантата (гетерогенной смеси эмбриональных нейральных клеток сетчатки по данному изобретению не по зрительной оси глаза, но тем не менее достигается эффект в желтом теле пациента.

В других воплощениях данного изобретения размещение трансплантата в стекловидном теле применяется для существенного упрощения процедуры. Этот пример лечения может увеличить его доступность для нуждающихся в том больных; размещение трансплантата в стекловидном теле благодаря удаленности от сосудов может улучшить иммунологическую переносимость. Хотя данное изобретение не ограничено каким-либо конкретным механизмом действия, иллюстративное размещение трансплантата в стекловидном теле, т.е. в относительном отсутствии клеток и в присутствии малого числа нативных клеток, представляющих антигены, дает следующие преимущества: позволяет избежать возможных осложнений хирургического вмешательства в пространстве под сетчаткой, позволяет избежать риска, связанного с общим наркозом, не требует прокола (ретиномии) сетчатки (что увеличивает риск ее отслоения

и кровотечения) и/или не требуется подвергать сетчатку больного локальному отслоению (которое может обуславливать слезотечение, кровотечение, тотальное отслоение сетчатки, а при пигментном ретините отслоение пораженной сетчатки может оказаться затруднительным и рискованным).

В других воплощениях данного изобретения полезные для зрения эффекты развиваются быстро и могут проявиться в первую неделю после лечения. В других воплощениях данного изобретения постепенно развивающиеся положительные эффекты проявляются за более продолжительное время.

В других воплощениях данного изобретения замена клеток сетчатки возможна, но не требуется для клинической эффективности; миграция донорских клеток в сетчатку реципиента возможна, но не требуется для клинической эффективности. В других воплощениях данного изобретения интеграция донорских клеток в структуру сетчатки реципиента возможна, но не требуется для клинической эффективности; интеграция донорских клеток в наружный ядерный (внешний зернистый) слой/желтое пятно реципиента возможно, но не требуется для клинической эффективности. В других воплощениях данного изобретения интеграция донорских клеток в сетчатку реципиента возможна, но не требуется для длительно-го выживания трансплантата.

В других воплощениях данного изобретения интеграция донорские клетки культивируют без антибиотиков; это позволяет избежать нежелательного воздействия на клетки; в отсутствие антибиотиков можно применять очень кратковременное пассирование, поскольку скрытое загрязнение микроорганизмами может быть исключен. В других воплощениях данного изобретения кратковременное пассирование клеток связано с низким риском трансформации клеток и/или образования опухолей; также применение кратковременного пассирования клеток наиболее близко клеткам, от природы присутствующим в развивающейся сетчатке.

В других воплощениях данного изобретения клеток для выращивания клеток-предшественников сетчатки наиболее предпочтительна среда на основе DMEM/F12 или эквивалентные ей среды; для выращивания кошачьих клеток-предшественников сетчатки предпочтительна среда на основе Ultraculture или эквивалентные ей среды.

Объект данного изобретения, описанный в настоящем документе, относится к популяциям клеток, включающим клетки-предшественники сетчатки млекопитающих, которые выделены определенным методом культивирования клеток и в которых экспрессируются характерные маркеры. Эта популяция клеток может быть культурой клеток, взятых у млекопитающего и выращиваемых *in vitro*. Например, такая культура может содержать клеточную суспензию или адгезивные клетки, выращиваемые на культуральном планшете, матрасе, в чашке или биореакторе. Образец может быть гомогенным или гетерогенным, что можно определить по экспрессии маркеров, как описано в настоящем документе. В некоторых воплощениях данного изобретения описанная в настоящем документе популяция клеток является смешанной и может содержать смесь недифференцированных и дифференцированных клеток. Относительные уровни экспрессии маркеров, характерных для описанных в настоящем документе клеток-предшественников сетчатки, для разных клеток в пределах данной популяции могут варьировать.

В других воплощениях данного изобретения термины "очищенный" или "обогащенный" указывают, что данные клетки или клеточные популяции извлечены из их нормального тканевого окружения и что они присутствуют в более высокой концентрации, чем в нормальном тканевом окружении. Соответственно, очищенная или обогащенная популяция клеток может также содержать клетки других типов помимо предшественников сетчатки и может включать дополнительные тканевые компоненты; термины "очищенный" или "обогащенный" не обязательно означают, что присутствуют только клетки-предшественники или не исключает присутствия клеток других типов.

В других воплощениях данного изобретения описанные в настоящем документе популяции клеток-предшественников сетчатки могут быть по меньшей мере 5%-ной чистоты, по меньшей мере 10%-ной чистоты, по меньшей мере 15%-ной чистоты, по меньшей мере 20%-ной чистоты, по меньшей мере 25%-ной чистоты, по меньшей мере 30%-ной чистоты, по меньшей мере 35%-ной чистоты, по меньшей мере 40%-ной чистоты, по меньшей мере 45%-ной чистоты, по меньшей мере 50%-ной чистоты, по меньшей мере 55%-ной чистоты, по меньшей мере 60%-ной чистоты, по меньшей мере 65%-ной чистоты, по меньшей мере 70%-ной чистоты, по меньшей мере 75%-ной чистоты, по меньшей мере 80%-ной чистоты, по меньшей мере 85%-ной чистоты, по меньшей мере 90%-ной чистоты, по меньшей мере 95%-ной чистоты, по меньшей мере 96%-ной чистоты, по меньшей мере 97%-ной чистоты, по меньшей мере 98%-ной чистоты, по меньшей мере 99%-ной чистоты или и иметь любую другую степень чистоты в пределах от 5 до 99%.

В других воплощениях данного изобретения термин "маркер" относится к любому веществу (молекуле), которую можно наблюдать или выявить. Например, маркер может быть (не ограничиваясь перечисленным здесь) нуклеиновой кислотой, например, транскриптом определенного гена, полипептидом - продуктом какого-либо гена, полипептидом, не являющийся генным продуктом, гликопротеином, углеводом, гликолипидом, липидом, липопротеином или низкомолекулярным соединением (например, веществом с молекулярной массой менее 10000 Да). В других воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки могут характеризоваться присутствием одного или более маркеров, которые могут экспрессироваться на поверхности клеток данной клеточной популяции (маркер клеточной по-

верхности), внутри клеток данной популяции (например, в ядре или цитоплазме клетки) и/или могут экспрессироваться на уровне РНК или белка как генетический маркер.

В других воплощениях данного изобретения термины "экспрессироваться" и "экспрессия" употребляются в настоящем документе применительно к транскрипции и/или трансляции нуклеотидных последовательностей в клетке-хозяине. Уровень экспрессии желаемого продукта или белка, представляющего интерес, в клетке-хозяине можно определить или провести его скрининг по количеству соответствующей мРНК в клетке либо по количеству желаемого полипептида/белка, представляющего интерес, кодируемых выбранной нуклеотидной последовательностью, как это представлено в приведенных в настоящем документе примерах. Например, мРНК, транскрибированную с выбранной нуклеотидной последовательности можно выявить или количественно определить путем нозерн-блот-гибридизации, защиты РНК от рибонуклеазы, гибридизации с клеточной РНК *in situ*, микроматричного анализа или путем полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-PCR). Белки, кодируемые выбранной нуклеотидной последовательностью можно выявить или количественно определить различными методами с использованием антител, например, путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), вестерн-блоттинга, радиоиммуноанализа, иммунопреципитации, по биологической активности данного белка, путем иммунологического окрашивания данного белка (включая, например, иммуногистохимический и иммуноцитохимический анализ), проточной цитометрии или сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) или гомогенным методом иммунофлуоресценции с временным разрешением (HTRF).

Клетки-предшественники сетчатки можно охарактеризовать по экспрессии молекулярных маркеров, включая маркеры клеточной поверхности и неповерхностные ("генетические") маркеры. В данной области техник общепринято говорить о клетках как о положительных/отрицательных по какому-либо маркеру, однако можно количественно определять действительные уровни экспрессии. Число молекул на поверхности клеток (или в другой локализации) может различаться на несколько порядков и тем не менее клетки будут характеризоваться одинаково как "положительные". Специалистам в данной области техники понятно, что в клетке, "отрицательной" при данном методе окрашивания, т.е. при данном методе определения связывание маркера со специфическим реагентом в образце не отличается от контроля (например, изотипического), этот маркер может экспрессироваться в очень малом количестве. Если же характеризовать уровень мечения ("окрашивания"), то можно отразить тонкие различия между популяциями клеток. Интенсивность окрашивания клеток можно определять методом проточной цитометрии, когда при помощи лазера количественно определяется уровень флуорохрома (который пропорционален количеству маркера клеточной поверхности, связанному со специфическим реагентом, например с антителами). Метод проточной цитометрии или FACS можно использовать также для разделения клеточных популяций по силе связывания со специфическим реагентом, равно как и по другим показателям, например размерам клетки и рассеянию света. Абсолютное значение уровня окрашивания зависит от конкретных флуорохрома и реагентов, но данные можно нормализовать относительно контроля.

Для того чтобы нормализовать распределение относительно контроля, каждую клетку регистрируют как экспериментальную точку с определенной интенсивностью окрашивания. Эти экспериментальные точки могут быть представлены в логарифмической шкале, взяв за единицу измерения условную интенсивность окрашивания. К примеру, у самой ярко окрашенной клетки в образце интенсивность окрашивания может быть на 4 порядка больше, чем у неокрашенных клеток. При таком представлении клетки, попадающие в наивысший порядок по интенсивности окрашивания, считаются положительными по данному маркеру, а клетки с самой низшей интенсивностью окрашивания - отрицательными. У положительных клеток с низкой интенсивностью окрашивания его уровень превышает интенсивность окрашивания изотипического контроля, но меньше, чем у самых интенсивно окрашивающихся клеток, в норме присутствующих в данной клеточной популяции. Мало окрашенные "положительные" клетки могут обладать специфическими свойствами, отличающими их от "отрицательных" клеток и от ярко окрашивающихся "положительных" клеток в данном образце. Для другого контроля можно использовать субстрат с определенной плотностью маркера на его поверхности, например, искусственные гранулы или определенные клеточные линии; это дает положительный контроль на интенсивность окрашивания.

В ходе культивирования ткани сетчатки, из которой происходят клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции, экспрессия маркеров может изменяться. Например, на различия в экспрессии маркеров могут влиять условия культивирования, например содержание кислорода (как в атмосфере, или "нормальное" его содержание, или низкое). Специалистам в данной области техники известно, что экспрессия маркеров клеток-предшественников сетчатки и клеточных популяций не является неизменной, а может зависеть от одного или более условий культивирования, т.е. от культуральной среды, содержания кислорода, числа пассажей, времени пребывания в культуре и проч.

В клетках-предшественниках сетчатки и клеточных популяциях могут экспрессироваться один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более, одиннадцать или более, двенадцать или более, тринадцать или более, пятнадцать или более, шестнадцать или более, семнадцать или более, восемнадцать или более, девятнадцать или более, двадцать или более, двадцать пять или более, тридцать или более маркеров, упомянутых в настоящем документе или любое другое число маркеров между указан-

ными числами и до пятидесяти или более.

В других воплощениях настоящего изобретения клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции, включающие клетки-предшественники сетчатки, характеризуются или выявляются по экспрессии одного или более таких маркеров, как, например, нестин, виментин, Sox2, Ki67, MHC класса I, Fas/CD95, MAP2, CD9, CD81, AQP4, CXCR4, CD15/Lex/SSEA1, ганглиозид GD2, CD133,  $\beta$ 3-тубулин, GFAP, OPN/SPP1, PTN, KDR и TEK. В определенных воплощениях данного изобретения в клетках-предшественниках сетчатки и клеточных популяциях экспрессируются один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из нестина, Sox2, Ki-67, MHC класса I и Fas/CD95, причем нестин экспрессируется в более чем 90 или в 95-99% клеток данной популяции, Sox2 экспрессируется в более чем 80 или в 90-99% клеток данной популяции, Ki-67 экспрессируется в более чем 30 или в 40-60% клеток данной популяции (т.е. в 60-85% клеток, растущих в условиях нормального/атмосферного содержания кислорода, в 80-90% клеток, растущих в условиях пониженного содержания кислорода), MHC класса I экспрессируется в более чем 70 или в 90% клеток данной популяции, Fas/CD95 экспрессируется в более чем 30 или в 40-70% клеток данной популяции. В некоторых воплощениях данного изобретения в клетках-предшественниках сетчатки и клеточных популяциях экспрессируются также один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из виментина, CD9, CD81, AQP4, CXCR4, CD15/LexA/SSEA1, ганглиозида GD2, CD133,  $\beta$ 3-тубулина, MAP2, GFAP, OPN/SPP1, PTN, KDR и TEK. GFAP может экспрессироваться в 5-10% клеток данной популяции. MHC Class II может экспрессироваться в 1-3% клеток данной популяции. CXCR4 может экспрессироваться в 5-30% клеток, растущих при содержании кислорода, как в атмосфере, и в 90% клеток, растущих в гипоксических условиях. CD 15 может экспрессироваться в 4-35% клеток данной популяции, а именно в 4-8% клеток, растущих при содержании кислорода, как в атмосфере условиях, и в 15-35% клеток, растущих в гипоксических условиях. GD2 может экспрессироваться в 2-15% клеток данной популяции, т.е. в 2-4% клеток, растущих при содержании кислорода, как в атмосфере, и в 15% клеток, растущих в гипоксических условиях.

В других воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции характеризуются или выявляются по низкой, пониженной, следовой или отсутствующей экспрессии одного или более из следующих веществ: ABCA4, AIPL1, AKT3, APC2, BSN, CCNG2CDHR1, CRX, CD24, клаудин 11, CNTF, CNTFR, DACH1, DAPL1, DCX, DLG2 и 4, DLL4, EPHA7, EYS,FLT1, FSTL5, FZD5, FGF9, 10 и 14, GADD45G, GRIA2, HES5 и 6, HEY2, HEYL, HGF, HIF3A, IMPG1 и 2, JAK2 и 3, KLF4, MAP6, основной белок миелина (MBP), MYCN, NANOG, NBL1, NEFL, NEFM, NEUROD1, NEUROD4, NEUROG1, NEUROG2, NOTCH 1, 2 и 3, NRL, NRCAM, NRSN, NRXN1, 2 и 3, OCT4, OLIG2, OPN1MW1 и 2, OPN1SW, OTX2, PAR4, PAX6, PRPH2, RAX1 и 2, RBP3, RCVRN, RELN, RGR, родопсин, RICTOR, RP1, RRH, RXRG, SIX3 и 6, SOX 8, SLC25A27, STAT1, STAT3, SYP, SYT4, WIF1, VSX2 и VSX1 и 2. Профили экспрессии этих маркеров можно использовать для того, чтобы отличать клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции от тканей, из которых они происходят, например, свежее выделенных тканей сетчатки.

В других воплощениях данного изобретения другие маркеры, экспрессия которых может быть увеличена по сравнению с тканями, из которых происходят рассматриваемые клетки, включают (перечисленное здесь не ограничивает объем изобретения) ADM, ANGPT1, ANGPTL2 и 4, ATP5D, BHLHE40, CCL2, CCNB1, CCND2 и CCNDE1, CD44, CDKN2A, клаудины 1, 4 и 6, CPA4, CTGF, CXCL12, DKK2, EMP1, FOXC2, FZD6, GADD45B, HES1, HIF1A, HOXB4, IGF1, IGFBP3, 5 и 7, IL1A, IL1R, IL1RAP, IL4R, IL7R, IL11, IL18, JAG1, LIF, LOX, BDNF, EGF, EGFR, FGF1, 2, 5 и 9, KLF4, 5 и 12, MITF, MMP1, MYC, NCAN, NEFH, NOG, NTF3, NTRK2, NRP1 и 2, OSMR (IL31RA), OTX1, PAX8, PDGFA, B и C, PLAUI, PRRX1, RPE65, SDF-1, SFRP1 и 4, SIX1 и 4, SLC25A1, 19 и 20, TEK/TIE1, THBS1 и 2, TLR4, VEGFA, VEGFC WNT5A и WNT7B.

В других воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции отличаются от других клеток-предшественников центральной нервной системы, например мозговых клеток-предшественников и нейтральных стволовых клеток, а также от клеток иных типов, которые могут происходить из эмбриональных тканей центральной нервной системы, например головного и спинного мозга. Маркеры, экспрессия которых может быть увеличена по сравнению с другими клетками-предшественниками центральной нервной системы, включают (перечисленное здесь не ограничивает объем изобретения) ARR3 (аррестин C), CDF10, CDKN2A, CTGF, CXCL12/SDF1, BHLHE41, BMP2, DKK1, EGFR, EPHB2, FN1, FOSL1 и 2, FOXD1, GABBR1, GAS1 и 6, GBX2, HHX, HOXB2, IGFBP5 и 7, INHBA, JAG1, KDR, KLF10LHX9, LHX2, LIF, MET, NEUROD1, NTF3, NTRK2, OPTN (оптиневрин), RCVRN, SAG (S-аррестин), SERPINF1 (PEDF), SFRP1, SOX3, TBX3, TGFB, WIF, WNT5A и WNT5B. Маркеры, экспрессия которых может быть понижена по сравнению с другими клетками-предшественниками центральной нервной системы, включают (перечисленное здесь не ограничивает объем изобретения) AQP4, ASLL1, CLDN11, CDKN1B, CCL2, CCNG2, CXCR4 (рецептор SDF1), DCX, DLX2 и 5, EMX2, EPHA3, 4 и 7, FABP7, FOXG1, GRIA 1, 2 и 3, HGF, IL2, KLF4, LIFR, MNX1, NGF, NKX2-2, NOTCH1, NPY, NPY2R, OLIG2, OMG, PBX1, PDGFRA, RTN1, SCGN, SOX11, TFAP2B, TNFRSF21 и WNT7A.

В других воплощениях данного изобретения клеточные популяции можно брать у здоровых индивидов (т.е. у индивидов, не имеющих никаких заболеваний сетчатки) или же у больных индивидов; эти популяции могут включать не только свежие клеточные популяции, но и замороженные. Источники указанных клеточных популяций включают (перечисленное здесь не ограничивает объем изобретения) цельные глаза, или ткани сетчатки, или иные источники, полученные из тканей эмбрионов, плодов, детей или взрослых. Способы по данному изобретению могут включать дальнейшие процедуры обогащения или очистки или стадии выделения клеток путем положительного отбора по другим специфическим маркерам клеток-предшественников сетчатки. Клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции можно получать или брать у любых млекопитающих, например у человека, приматов, лошадей, крупного рогатого скота, свиней, собак, кошек, хорьков, кроликов, грызунов (например, мышей, крыс, хомяков) и проч.

У позвоночных животных в ходе эмбрионального развития сетчатка и зрительный нерв образуются как выросты развивающегося головного мозга, так что сетчатка считается частью центральной нервной системы и представляет собой в сущности мозговую ткань. Сетчатка имеет слоистую структуру: организованные в несколько слоев нервные клетки соединены друг с другом синаптическими связями. В направлении от стекловидного тела, т.е. в направлении снаружи внутрь головы, слои сетчатки включают внутреннюю пограничную мембрану, образованную базальными мембранами мюллеровских клеток, а также окончаний их отростков; слой волокон зрительного нерва, содержащий аксоны ганглиозных клеток; слой ганглиозных клеток, который содержит тела ганглиозных клеток, аксоны которых образуют зрительный нерв; внутренний сплетениевидный слой, содержащий синапсы между аксонами биполярных клеток и дендритами ганглиозных и амакриновых клеток; внутренний зернистый слой, содержащий ядра и тела биполярных клеток; наружный сплетениевидный слой, содержащий отростки палочек и колбочек, заканчивающиеся соответственно сферами палочек и ножками колбочек; наружную пограничную мембрану, отделяющую внутренние сегменты фоторецепторов от их клеточных ядер; слой фоторецепторов и пигментный эпителий, представленный кубическими клетками. Нейроны, непосредственно воспринимающие свет - это фоторецепторные клетки двух типов - палочки и колбочки. Палочки функционируют преимущественно при низкой освещенности и обеспечивают черно-белое зрение, а колбочки обеспечивают восприятие цвета и дневное зрение. Третий тип фоторецепторов - светочувствительные ганглиозные клетки, обеспечивающие, помимо прочего, подавление "засветок" от внезапного слишком сильного освещения.

В других воплощениях данного изобретения клетки берут из эмбриональной сетчатки млекопитающего на стадии, после которой происходит формирование сетчатки, но прежде чем полностью сформируются наружные сегменты фоторецепторов по всей сетчатке и до завершения (или завершения в основном) образования сосудистой сети сетчатки. У человека эти стадии обычно имеют место в период между около 12-й и около 28-й неделями внутриутробного возраста плода. В случае клеток-предшественников сетчатки других немелких млекопитающих, например кошек или свиней, эти стадии обычно имеют место в период между около 3-й и около 11-й неделями внутриутробного возраста плода. (См., например, Anand-Apte, B. and Hollyfield, J.G. "Developmental Anatomy of the Retinal and Choroidal Vasculature." In *The Retina and Its Disorders*, Besharse, J. and Bok, D., Academic Press, (2001). Однако раскрываемый в настоящем документе объект изобретения включает также забор клеток из тканей млекопитающих в постнатальный или неонатальный период.

В других воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки очищают от других тканевых компонентов после обработки образца ткани или одновременно с ней. В одном из воплощений данного изобретения клетки-предшественники сетчатки очищают от других тканевых компонентов после того, как образец ткани культивировали в условиях, подходящих для клеточного роста и в течение времени, достаточного для прикрепления клеток к стенкам культуральной чашки. В некоторых воплощениях данного изобретения очистка клеток включает получение клеток, которые в ходе культивирования мигрируют из образца ткани и находятся в культуральной среде или слабо связаны с фибронектином или иным субстратом или со слоем фидерных клеток. Эти клетки можно получить обычными методами, например путем центрифугирования среды с клетками для осаждения клеток и промывания клеток, остающихся в культуральной чашке соответствующим раствором, например фосфатным буферным раствором (PBS) или сбалансированным солевым раствором Хэнкса для удаления слабо прикрепленных клеток адгезивного слоя. Эти промывные растворы затем тоже можно центрифугировать для получения клеток. В некоторых воплощениях данного изобретения очистка клеток-предшественников сетчатки и клеточных популяций может также включать отделение клеток от определенных нерастворимых тканевых компонентов, включая остаточный тканевой материал, например липиды. Клетки можно отделить от других тканевых компонентов любыми средствами, известными и доступными в данной области техники, включая, например, использование градиента плотности, центрифугирования, сортировку путем проточной цитометрии или магнитное разделение клеток (MACS) и фильтрацию или комбинации указанных методов. Примеры специфической очистки клеток известны и описаны в данной области техники, например, в патенте США № 6777231. В некоторых воплощениях данного изобретения для удаления одного или более определенных типов клеток применяются методы разделения по принципу негативной селекции.

В некоторых воплощениях данного изобретения ткань подвергают определенной обработке – "диссоциируют". Эта "диссоциация" может осуществляться физически и/или путем воздействия ферментных препаратов, которые ускоряют и облегчают отделение клеток от других тканевых компонентов с образованием "диссоциированной" суспензии клеток и/или клеточных конгломератов. Примеры таких ферментов включают матриксные металлопротеиназы, кlostрипаин, папаин, трипсин и подобные ему ферменты, пепсин и подобные ему ферменты, нейтральные протеиназы и коллагеназы. Пригодные для указанной обработки ферменты описаны в патентах США № 5079160; 6589728; 5422261; 5424208 и 5322790. В некоторых воплощениях данного изобретения указанные ферментные препараты включают трипсин сам по себе или в комбинации с одним или более дополнительными ферментами. Ферментативная "диссоциация" ткани может осуществляться в сочетании с физической диссоциацией путем, например, измельчения тем или иным способом, гомогенизирования, пипетирования, замораживания-оттаивания, осмотического шока, для удаления нежелательных клеток или соединительной ткани и получения в итоге культур из отдельных клеток или культур из отдельных клеток и конгломератов клеток, которые можно подразделить по размерам на мелкие, средние и крупные. Размеры клеточного конгломерата субъективны и варьируют на практике осуществления объекта изобретения, описанного в настоящем документе.

Культура клеток предполагает процесс выращивания клеток в контролируемых условиях, как правило, вне их естественного окружения. В других воплощениях данного изобретения популяции клеток выращивают, или культивируют в любой культуральной среде, известной в данной области техники. В других воплощениях данного изобретения термин "минимальная среда" употребляется в настоящем документе применительно к любой среде, которая может поддерживать клеточный рост. Минимальная среда обеспечивает клетки стандартным набором неорганических солей, например солей цинка, железа, магния, кальция и калия, витаминами, глюкозой, буферными системами и основными аминокислотами. Минимальная среда, используемая по данному изобретению, включает (перечисленное ниже не ограничивает объема изобретения) минимальную основную среду Игла, ADC-1, LPM (безальбуминовая коровья сыворотка), F10 (Ham), F12 (Ham), DCCM1, DCCM2, RPMI 1640, среду BGJ (немодифицированную или модифицированную по Фиттону-Джексону), основную среду Игла (BME) с добавлением солей Эрла, среду Игла, модифицированную по Дульбекко (бессывороточная DMEM), Yamahe, IMEM-20, среду Игла, модифицированную по Глазго (GMEM), среду Лейбовица L-15, среду Мак-Коя 5A, среду M199 (M199E-C солями Эрла), среду M199 (M199H-C солями Хэнка), минимальную основную среду Игла с солями Эрла (MEM-E), минимальную основную среду Игла с солями Хэнка (MEM-H) и минимальную основную среду Игла без незаменимых аминокислот (MEM-NAA), в том числе среды 199, CMRL 1415, CMRL 1969, CMRL 1066, NCTC 135, MB 75261, MAB 8713, DM 145, среду Уильямса G, среду Ньюмена-Тителла, Хигучи, MCDB 301, MCDB 202, MCDB 501, MCDB 401, MCDB 411, MDBC 153 и Ultraculture. Для культивирования клеток-предшественников сетчатки, описанных в настоящем документе, предпочтительны среды Advanced DMEM/F12 и Ultraculture. Ряд этих сред приводится в работе "Methods in Enzymology", т. LVIII, "Cell Culture," стр. 62-72.

В других воплощениях данного изобретения термин "кондиционированная среда" относится к средам, измененным по сравнению с основной или минимальной средой.

Например, кондиционирование среды может означать, что такие ингредиенты, как питательные вещества и/или факторы роста, добавлены в нее или исключены из ее состава, или их содержание увеличено либо уменьшено по сравнению с изначальным составом основной среды. В некоторых воплощениях данного изобретения среда кондиционируется тем, что в ней дают жить или расти определенным клеткам в определенных условиях в течение определенного промежутка времени. Например, среда может быть кондиционирована тем, что клетки-предшественники сетчатки живут, размножаются или дифференцируются в среде определенного состава при определенной температуре в течение определенного времени. Специалистам в данной области техники понятно, что, используя множество различных комбинаций клеток, типов сред, периодов времени и условий окружения, можно получить почти неограниченный набор кондиционированных сред.

Примеры дополнительных компонентов и добавок для культуральных сред включают (перечисленное здесь не ограничивает объем изобретения) ингредиенты для замены - частичной или полной - функции сыворотки для поддержания жизнеспособности или роста клеток. В других воплощениях данного изобретения они включают инсулин, трансметаллопротеины, микроэлементы, витамины и другие факторы. Эти факторы обычно не входят в состав минимальных сред, но обеспечиваются за счет сыворотки, обычно используемой при культивировании клеток. Дополнительные компоненты или добавки могут включать по меньшей мере один или более из следующих ингредиентов, поддерживающих клеточный рост: один или более инсулинов или их заменителей; один или более трансметаллопротеинов или их заменителей; один или более микроэлементов (например, селен, железо, цинк, медь, кобальт, хром, иод, фтор, марганец, молибден, ванадий, никель, олово), один или более витаминов (например, витамины А, С, Е, группа В), одну или более солей (например, соли натрия, магния, кальция или фосфаты), один или более забуферивающих агентов (например, PBS - фосфатный буферный раствор, HEPES - N-(2-гидроксипиперазин-N-(2-этансульфонная кислота), одну или более аминокислот (например, L-глутамин), один или более гормонов, гормоноподобных веществ или факторов роста (например, транс-

феррин, эпидермальный фактор роста - EGF, фактор роста нервов - NGF, фактор роста эндотелиальных клеток - ECGF, фактор роста тромбоцитов - PDGF, фактор роста фибробластов - FGF, инсулиноподобный фактор роста - IGF, фактор ингибирования лейкозных клеток - LIF, интерлейкины, интерфероны, трансформирующий фактор роста -TGF и/или фактор роста эндотелия сосудов - VEGF, глюкагон, кортикостероиды, вазопрессин, простагландины), сывороточный альбумин или его заменители, один или более углеводов glucagon (глюкозу, галактозу, фруктозу, маннозу, рибозу, промежуточные продукты гликолиза), один или более антибиотиков и/или фунгицидных агентов (например, пенициллин, стрептомицин, фунгизон) и один или более липидов (например, свободные и связанные с белками жирные кислоты, триглицериды, фосфолипиды, холестерин, этаноламин). Специалистам в данной области техники хорошо известны и доступны многие имеющиеся в продаже добавки, заменяющие сыворотку, например Knock-Out Serum Replacement (KOSR), N2, B27, StemPro, Insulin-Transferrin-Selenium Supplement (ITS), G5. Эти добавки имеют определенный состав, так что концентрации их компонентов можно определить по содержанию добавки в среде.

В других воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки млекопитающих можно культивировать в среде с низким содержанием сыворотки или не содержащей сыворотки. Примеры сыворотки включают сыворотку плода коровы, телячью сыворотку, сыворотку новорожденного теленка, козью сыворотку, лошадиную сыворотку, человеческую сыворотку, кроличью сыворотку и проч. При определенных условиях культивирования концентрация сыворотки может варьировать от менее чем около 0,05 до около 20% (об./об.). Например, при некоторых процессах дифференцировки концентрация сыворотки в среде может быть менее чем около 0,05% (об./об.), менее чем около 0,1% (об./об.), менее чем около 0,2% (об./об.), менее чем около 0,3% (об./об.), менее чем около 0,4% (об./об.), менее чем около 0,5% (об./об.), менее чем около 0,6% (об./об.), менее чем около 0,7% (об./об.), менее чем около 0,8% (об./об.), менее чем около 0,9% (об./об.), менее чем около 1% (об./об.), менее чем около 2% (об./об.), менее чем около 3% (об./об.), менее чем около 4% (об./об.), менее чем около 5% (об./об.), менее чем около 6% (об./об.), менее чем около 7% (об./об.), менее чем около 8% (об./об.), менее чем около 9% (об./об.), менее чем около 10% (об./об.), менее чем около 15% (об./об.) или менее чем около 20% (об./об.). В некоторых воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции, содержащие клетки-предшественники сетчатки, выращивают в среде без сыворотки ("бессывороточной"), без заменителей сыворотки и/или без каких-либо дополнительных ингредиентов.

В некоторых воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции, содержащие клетки-предшественники сетчатки, культивируют в нексеногенных условиях. Термин "нексеногенные" означает, что клетки данного вида живых организмов (например, клетки человека) выращивают или культивируют в присутствии продуктов и дополнительных компонентов только от этого же вида (например, человеческого происхождения - человеческого сывороточного альбумина, человеческой сыворотки), но не других видов. Это особенно важно в случае клеток, которые используются для трансплантации у человека. Клетки, контактировавшие с различными неустановленными продуктами животного происхождения нежелательно применять в клинической практике из-за повышенного риска отторжения трансплантата, иммунных реакций, вирусных, прионных или бактериальных инфекций и не идентифицированных зоонозов. Во всех случаях применения у млекопитающих, включая человека и объекты ветеринарии, предназначенные для этого клетки проверяют на нормальность кариотипа и присутствие инфекционных агентов или иных загрязнений, например микоплазм, грамотрицательных бактерий (например, тест на эндотоксины), грибы и проч. Клетки также проверяют на онкогенность или трансформированность к злокачественному фенотипу путем анализа на теломеразную активность, экспрессию гена hTERT и клеточный рост в мягком агаре или образование опухолей у голых мышей. Такие тесты хорошо известны специалистам в данной области техники.

В других воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции, содержащие клетки-предшественники сетчатки, культивируют на пластах фидерных (питающих) клеток (например, эмбриональных или "взрослых" фибробластов) или в присутствии опорных структур межклеточного матрикса или таких субстратов, как коллаген, энтактин, протеогликаны, содержащие гепаринсульфат, фибронектин, ламинин, желатин или матригель. Например, используется коллаген PURECOL®, отличающийся высокой чистотой (содержание коллагена >99,9%) и функциональной эффективностью; этот продукт наиболее близок природному коллагену. PURECOL® состоит на 97% из коллагена типа I, остальное приходится на коллаген типа III. Этот продукт превосходно покрывает поверхности тонким слоем для культивирования клеток; он также используется как твердый гель. Другой пример известного в данной области техники субстрата или опорной структуры - продукт CELLstart (In-vitrogen).

В других воплощениях данного изобретения условия культивирования клеток включают рост клеток в инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки-предшественники сетчатки или клеточные популяции, содержащие клетки-предшественники сетчатки, можно культивировать при нормальном, или атмосферном, содержании кислорода (20%); также их можно выращивать в условиях, по содержанию кислорода близких к условиям в развивающейся сетчатке эмбриона в период внутриутроб-

ного развития, т.е. в гипоксических условиях, например, при содержании кислорода 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 или 7% или при любом значении содержания кислорода в промежутке между указанными.

Термин "плотность посева" относится к числу клеток в единице объема культуральной среды или к числу клеток на единицу площади ( $\text{см}^2$ ) в случае адгезивной культуры. Сходный термин в данном контексте - конфлюэнтность (степень смыкания слоя клеток), используемый как мера числа клеток в культуральной чашке, флаконе или матрасе и относящийся к покрытости чашки или флакона культивируемыми клетками. Например, конфлюэнтность 100% означает, что чашка полностью покрыта клетками, и, следовательно, места для клеточного роста не осталось; 50%-ная конфлюэнтность означает, что половина чашки покрыта клетками и место для их роста еще есть.

"Пассирование (или пересев, или разделение, или субкультивирование) клеток" подразумевает перенос небольшого числа клеток в новый культуральный сосуд. В других воплощениях данного изобретения клетки растут в культуре дольше, если их пересевают регулярно, так как тем самым удается избежать старения клеток, связанного с продолжительным существованием в условиях высокой плотности клеток. Суспензионные культуры легко пересевают, разводя небольшое количество культуральной среды с содержащимися в ней многочисленными клетками в большем объеме свежей культуральной среды. В случае адгезионных культур для посева клетки нужно вначале отделить от субстрата; это обычно делается с помощью смеси, содержащей фермент, например трипсин-EDTA, или неферментных растворов наподобие буферного раствора для диссоциации клеток Cell Dissociation Buffer; для снятия клеток с подложки существуют различные ферментные и неферментные смеси или препараты. Небольшое количество отделившихся от субстрата клеток можно затем использовать для посева новой культуры.

Большинство первичных культур клеток живут ограниченное время и не пролиферируют бесконечно. После некоторого числа удвоений популяции (называемого пределом Хейфлика) клетки претерпевают процесс старения и прекращают делиться, сохраняя в то же время жизнеспособность.

В других воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции можно культивировать на протяжении не более 10 пассажей, например, культуру пересевают один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь девять или десять раз. В других воплощениях данного изобретения клетки можно пассировать более десяти раз, например делать одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать или более пассажей. В некоторых воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции культивируют на протяжении 10-30 пассажей. В других воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки и содержащие их клеточные популяции предпочтительно не являются бессмертными, их не иммортализируют и не вынуждают к иммортализации. Описанные в настоящем документе клетки считаются незрелыми предшественниками, однако клеточные популяции, содержащие клетки-предшественники сетчатки, могут включать и клетки, которые можно считать полипотентными стволовыми клетками *per se*, поскольку такие клетки, как правило, способны при определенных условиях культивирования дифференцироваться в ткань сетчатки или клетки сетчатки, включая клетки-предшественники сетчатки. В других воплощениях данного изобретения термин "полипотентные" относится к незрелым недифференцированным и/или неспециализированным клеткам, которые обладают способностью к самообновлению, но ограничены в своей способности к дифференцировке и, по существу, детерминированы для образования клеток определенных типов. В определенных воплощениях данного изобретения описанные в настоящем документе клетки и клеточные популяции содержат близкородственные клетки, но необязательно одного типа.

В других воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки генетически модифицированы таким образом, что в них экспрессируются одна или более гетерологичных или экзогенных нуклеотидных последовательностей, представляющих интерес в контексте данного изобретения. Нуклеотидная последовательность может быть экзогенной - это значит, что она чужеродна для клетки, в которую внедрен вектор, или что эта последовательность гомологична имеющейся в клетке последовательности, но находится в таком положении в нуклеиновой кислоте клетки-хозяина, в котором она обычно не бывает. Нуклеотидные последовательности включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) плазмиды, ампликоны, комплементарные ДНК (кДНК), матричные РНК (мРНК), антисмысловые РНК, малые интерферирующие РНК. Термин "ген" относится к функциональному белку, полипептиду или нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид. Специалистам в данной области техники понятно, что этот функциональный термин включает геномные последовательности, последовательности кДНК и относительно небольшие искусственно сконструированные последовательности, которые экспрессируются (или могут быть приспособлены для экспрессии) с образованием белков, полипептидов, доменов, пептидов, гибридных и мутантных белков. Для генетического изменения тканей могут быть применены любые методические подходы, известные в данной области техники. Например, один из них состоит в том, что ген внедряется в клетки ткани с помощью рекомбинантного вирусного вектора, для введения экзогенной нуклеотидной последовательности, кодирующей терапевтический агент, в клетки-мишени и/или ткани можно использовать любой из ряда различных векторов, например вирусные векторы, плазмиды, линейные ДНК и проч. Эти векторы можно вводить в клетки путем, например, заражения, трансдукции,

трансфекции, трансфекции с фосфатом кальция, трансфекции с DEAE-декстраном, электропорации, трансфекции с помощью липосом (в том числе катионных, анионных, фузогенных), баллистической трансфекции, непосредственной инъекции, трансфекции, опосредованной рецепторами, магнитофекции, ультразвуковой обработки и других известных методов.

В других воплощениях данного изобретения термин "вектор" употребляется применительно к молекуле нуклеиновой кислоты, которая служит носителем и в которую встраивается нужная нуклеотидная последовательность для внедрения в клетку, где она должна реплицироваться. Векторы включают плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаги, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, дрожжевые - YAC). Специалисты в данной области техники обладают достаточными знаниями и навыками, чтобы сконструировать вектор стандартными рекомбинантными методами, описанными в работах Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences. Помимо кодирования модифицированного полипептида вектор может кодировать немодифицированные полипептидные последовательности, например метящие или направляющие молекулы. Полезные векторы, кодирующие такие гибридные белки, включают векторы pIN, векторы, кодирующие цепочку остатков гистидина, и векторы pGEX для применения с целью образования глутатион-S-трансферазы растворимых гибридных белков для последующей очистки и разделения или расщепления.

В других воплощениях данного изобретения векторы конструируются в основном для того, чтобы вводить в клетки молекулы гетерологичных нуклеиновых кислот, например, какой-либо ген, "функционально связанный" с одной или несколькими регуляторными нуклеотидными последовательностями или находящийся под их контролем. Термин "промотор" относится к одному или более элементам регуляции транскрипции, сгруппированных вблизи сайта инициации для РНК-полимеразы II и других белков - активаторов транскрипции. Для запуска экспрессии нужной молекулы нуклеиновой кислоты (т.е. конститутивной, индуцируемой, подлежащей репрессии или тканеспецифичной) может также использоваться любая комбинация промотор/энхансер (по базе данных эукариотических промоторов - EPDB). Также векторы по данному изобретению могут содержать подходящий маркер для облегчения манипулирования вектором *in vitro* или *ex vivo*. Векторы могут также содержать сигнал полиаденилирования, который можно взять из гена человеческого гормона роста (hGH), гормона роста крупного рогатого скота (BGH) или из SV40. Кроме того, векторы могут также содержать элементы внутренних сайтов связывания рибосом (IRES), используемые для создания полигенных или полицистронных матричных РНК. Элементы IRES могут обеспечивать инициацию трансляции помимо "сканирующего" механизма, т.е. без участия метилированного кэпа, привлекающего рибосому к 5'-концу мРНК, а с внутренних участков мРНК (Pelletier, J. and Sonenberg, N. (1988) *Nature* 334 (6180): 320-325). IRES-элементы могут быть связаны с гетерологичными открытыми рамками считывания. Множественные открытые рамки считывания могут транскрибироваться вместе, и каждая из них отделена IRES, так что создается полицистронная матрица. Посредством элементов IRES каждая открытая рамка считывания доступна для эффективной трансляции на рибосомах. Путем использования единого промотора/энхансера для единой матричной РНК возможна эффективная экспрессия множества генов.

В других воплощениях данного изобретения вектор является вирусным. Вирусные векторы, известные в данной области техники, включают (перечисленное здесь не ограничивает объем изобретения) аденовирусные векторы, ретровирусные векторы, векторы на основе вируса вакцинии, векторы на основе аденоассоциированных вирусов, векторы на основе вируса полиомы, альфавирусные векторы, рабдовирусные векторы, лентивирусные векторы, векторы на основе вируса Эпштейна-Барр, пикорнавирусные векторы или герпесвирусные векторы.

В других воплощениях данного изобретения нуклеотидные последовательности могут быть включены внутрь липосом или липидных композиций. Липосомы - это структуры типа пузырьков: двухслойная фосфолипидная мембрана окружает небольшое пространство, заполненное водной средой. В многослойных липосомах липидных слоев много, и они разделены водной средой. Липосомы образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендированы в избытке водного раствора: происходит самосборка липидных компонентов и формирование замкнутых структур (пузырьков), в ходе которого внутри них и между липидными двойными слоями оказывается вода с растворенными в ней веществами (Ghosh, P.C. and Bachhawat, B.K. (1991) *Targeted Diagn. Ther.* 4: 87-103). Примером имеющихся в продаже липосом или липидных композиций является липофектамин (Lipofectamine) производства компании Invitrogen. Другие примеры включают фуджин (FuGENE, производство Promega), промофектин (PromoFectin, производство PromoKine), аффектен (Affectene, производство Qiagen), полифект (Polyfect, производство Qiagen), суперфект (Superfect, производство Qiagen) и трансмессенджер (TransMessenger, производство Qiagen).

Объектом данного изобретения, описанным в настоящем документе, также являются способы лечения заболеваний или состояний сетчатки у нуждающегося в том индивида путем введение ему в полость стекловидного тела или в подсетчаточное пространство композиции, содержащей популяцию клеток, которая включает клетки-предшественники сетчатки млекопитающего, и при необходимости определение изменений или улучшения зрения у данного индивида.

В других воплощениях данного изобретения термин "лечение" в различных его грамматических формах относится (в контексте настоящего описания) к излечению, обращению, ослаблению, облегчению, минимизации, подавлению или прекращению вредных проявлений/последствий заболевания/патологического состояния, прогрессирования заболевания, причины заболевания или иных аномальных аспектов. Например, лечение может включать облегчение того или иного симптома (т.е. необязательно всех симптомов) заболевания или ослабление (замедление) прогрессирования заболевания. В других воплощениях данного изобретения термин "предотвращение" подразумевает, что благодаря введению какого-либо агента (например, описанного в настоящем документе) устранены проявления/последствия патологического состояния или причины заболевания. В том же смысле в контексте данного изобретения употребляется термин "профилактика".

Термины "индивид" и "пациент" относятся к объекту воздействия и в настоящем документе употребляются как синонимы, включая млекопитающих и не млекопитающих. В некоторых воплощениях данного изобретения индивид является млекопитающим, например человеком, другим приматом, собакой, мышью, кошкой, коровой, овцой, свиньей, козой. В некоторых воплощениях данного изобретения индивид является человеком.

Описанные в настоящем документе популяции клеток и имеющие к ним отношение композиции могут быть предоставлены индивиду/пациенту различными путями. В некоторых воплощениях данного изобретения они применяются местно, например, в участке произошедшего или возможного поражения. В некоторых воплощениях данного изобретения их вводят в участок произошедшего или возможного поражения с помощью иглы или шприца. В других воплощениях данного изобретения их применяют системно, т.е. вводят в кровоток внутривенно или интраартериально. Конкретный путь введения зависит в основном от локализации и природы поражения, подлежащего лечению или предотвращению. Соответственно, описанный в настоящем документе объект изобретения включает обеспечение индивида клеточными популяциями или композициями по данному изобретению любым известным и доступным методом или путем, включая (перечисленное здесь не ограничивает объем изобретения) пероральное, парентеральное, внутривенное, интраартериальное, интраназальное и внутримышечное введение. Определить нужную дозировку и схему введения можно на основании общеизвестных сведений в данной области техники, находящихся в распоряжении врача. Лечение может включать монотерапию или комплексную терапию. В частности в некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые очищенные клеточные популяции вводят индивиду в целях профилактики после стресса, которые может спровоцировать поражение сетчатки. В других воплощениях данного изобретения предлагаемые клеточные популяции и композиции вводят индивиду местно однократно путем инъекции в полость стекловидного тела или в подсетчаточное пространство. Или же композиции или клеточные популяции по данному изобретению вводят два, три, четыре раза или любое число раз, следуя способам, описанным в настоящем документе.

В других воплощениях данного изобретения предлагаемые способы включают выделение и определение свойств клеток-предшественников сетчатки млекопитающего и композиций, содержащих такие клетки, которые берут из донорской ткани, выращивают в культуре и формируют композицию для введения индивиду или пациенту. В некоторых воплощениях данного изобретения предлагаемые способы включают введение указанных композиций под местной анестезией непосредственно в полость стекловидного тела, при этом нет необходимости с системной иммуносупрессии. В других воплощениях данного изобретения не требуется тканевого типирования трансплантата и определения совместимости с реципиентом (индивидом или пациентом), но при желании их можно осуществить. Методы тканевого типирования и определения совместимости тканей донора и реципиента хорошо известны специалистам в данной области техники.

Клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции, используемые для практического осуществления данного изобретения, могут быть представлены в виде композиции для введения индивиду любым из различных путей, включая пероральный, парентеральный, вдыхание спрея, назальный, интратекальный, интрацеребральный, эпидуральный, интракраниальный, ректальный или местное применение. Описанные в настоящем документе композиции и препараты могут содержать фармацевтически или ветеринарно приемлемые жидкости, носители, вспомогательные компоненты и основы и могут быть в жидкой форм, в виде таблеток, капсул, имплантатов, аэрозолей, имплантатов, гелей, липосом, наночастиц и проч.

В некоторых воплощениях данного изобретения клетки-предшественники сетчатки и клеточные популяции можно вводить индивиду в составе фармацевтических или ветеринарных композиций. Словосочетание "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным структурам и композициям, которые, будучи введены животному или человеку, не вызывают у него вредных, аллергических или иных нежелательных реакций. В настоящем документе выражение "фармацевтически приемлемый носитель" подразумевает любой (и все) водные и неводные носители, включая воду, этиловый спирт, многоатомные спирты (например, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и проч.) и их смеси, подходящие для целей данного изобретения, растительные масла (например, оливковое масло) и пригодные для инъекций органические эфиры (например, этилолеат). Нужная текучесть обеспечивается использованием,

например, кроющих агентов (например, лецитина), поверхностно-активных веществ, а также в случае дисперсий - должным размером частиц. Эти композиции могут также содержать вспомогательные компоненты, например консерванты, увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвратить присутствие микроорганизмов можно путем стерилизации тем или иным способом и включением в состав композиции различных антибактериальных и противогрибковых агентов (например, парабенов, хлорбутанола, сорбиновой кислоты и проч.). Также может оказаться желательным включить в композицию агенты, обеспечивающие нужное осмотическое давление, например сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, можно добиться увеличения времени абсорбции введенной инъекционной фармацевтической формы путем включения в состав композиции агентов, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина. Композиция должна быть стабильной в условиях ее изготовления и хранения и защищена от загрязнения микроорганизмами, например бактериями и грибами. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники.

В некоторых воплощениях данного изобретения индивиду требуется вводить эффективное количество клеток-предшественников сетчатки и клеточных популяций. Выражение "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" означает такое количество композиции, которое оказывает желаемый эффект. Эффективное количество композиции зависит, например, отчасти от природы вводимых индивиду веществ или агентов (здесь - клеток-предшественников сетчатки и клеточных популяций), показаний, по которым данный терапевтический агент используется применительно к данному индивиду, пути введения композиции, физических параметров (массы тела, поверхности тела или размера органа) и состояния (возраста, общего состояния здоровья) индивида или пациента. Соответственно этим факторам врач или исследователь может подобрать дозировку и, если нужно, изменить путь введения для достижения оптимального терапевтического эффекта. Эффективное количество того или иного агента для какой-либо конкретной цели может быть определено хорошо известными в данной области техники методами. Для любой описанной в настоящем документе композиции эффективное количество можно первоначально оценить по данным, полученным в клеточной культуре или на животной модели, например, у мышей, крыс, кроликов, собак, свиней или обезьян. Животная модель может также послужить для определения подходящего диапазона концентраций и пути введения композиции. Затем эту информацию можно использовать для определения полезных доз и подходящих путей введения для человека. Примеры эффективных количеств описанных в настоящем документе композиций включают клеточные суспензии в объеме 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 мкл или любое промежуточное значение вплоть до 5000 мкл (5 мл). Верхний и нижний пределы вводимого объема зависят от системы и/или метода введения. (См., например, Kayıkcıoglu, O.R. et al, (2006) *Retina* 26(9): 1089-90). Например, в случаях без витрэктомии верхнее предельное значение вводимого объема составляет приблизительно 200 мкл из-за увеличенного внутриглазного давления. В случаях с витрэктомией верхнее предельное значение вводимого в полость стекловидного тела объема определяется объемом этой полости и может составлять до 5 мл или более. Верхнее предельное значение вводимого объема в случае инъекции в подсчетчаточное пространство может быть до 200 мкл из-за отслоения сетчатки. В других воплощениях данного изобретения указанные объемы включают любое количество клеток от 1000 до 10 млн на одну дозу или 1000-2000 клеток на одну дозу, 2000-3000 клеток на одну дозу, 3000-4000 клеток на одну дозу, 4000-5000 клеток на одну дозу, 5000-6000 клеток на одну дозу, 6000-7000 клеток на одну дозу, 7000-8000 клеток на одну дозу, 8000-9000 клеток на одну дозу, 9000-10000 клеток на одну дозу, 10000-15000 клеток на одну дозу, 15000-20000 клеток на одну дозу, 20000-25000 клеток на одну дозу, 25000-30000 клеток на одну дозу, 30000-35000 клеток на одну дозу, 35000-40000 клеток на одну дозу, 40000-45000 клеток на одну дозу, 45000-50000 клеток на одну дозу, 50000-55000 клеток на одну дозу, 55000-60000 клеток на одну дозу, 60000-65000 клеток на одну дозу, 65000-70000 клеток на одну дозу, 70000-75000 клеток на одну дозу, 75000-80000 клеток на одну дозу, 80000-85000 клеток на одну дозу, 85000-90000 клеток на одну дозу, 90000-95000 клеток на одну дозу, 95000-100000 клеток на одну дозу, 100000-125000 клеток на одну дозу, 125000-150000 клеток на одну дозу, 150000-200000 клеток на одну дозу, 200000-250000 клеток на одну дозу, 250000-300000 клеток на одну дозу, 300000-350000 клеток на одну дозу, 350000-400000 клеток на одну дозу, 400000-450000 клеток на одну дозу, 450000-500000 клеток на одну дозу, 500000-550000 клеток на одну дозу, 550000-600000 клеток на одну дозу, 600000-650000 клеток на одну дозу, 650000-700000 клеток на одну дозу, 700000-750000 клеток на одну дозу, 750000-800000 клеток на одну дозу, 800000-850000 клеток на одну дозу, 850000-900000 клеток на одну дозу, 900000-950000 клеток на одну дозу, 950000-1 000000 клеток на одну дозу или любое значение от 1000 до 10 млн клеток на одну дозу. Разумеется, дозировка может варьировать в зависимости от частоты и продолжительности введения. В других воплощениях данного изобретения дозировка клеток в описанных в настоящем документе композициях предполагает большое количество клеток в малом объеме, например 0,5 млн клеток на 100 мкл. Количество клеток можно подсчитать любым известным в данной области техники методом, например путем гемоцитометрии, спектрофотометрии, проточной цитометрии, при помощи счетчика Колтера и проч. Введение композиции индивиду может быть однократным или же проводиться несколько раз в ходе курса лечения.

В других воплощениях данного изобретения состав композиции может быть предназначен для парентерального введения в глаз (в частности, в полость стекловидного тела или в подсетчаточное пространство), в полость стекловидного тела или в подсетчаточное пространство, в сетчатку, мозг, нерв или центральную нервную систему трансклерально или любым методом или способом, известным в данной области техники, например, в составе трансклеральной системы введения, как описано в патенте США № 7585517; в составе системы с пролонгированным высвобождением внутрь глаза пациента, как описано в патенте США № 7883717; с помощью устройства для введения в область стекловидного тела глаза, как описано в патентах США № 5378475 или 5466233; или с помощью подкожного шприца с изогнутой иглой, например, как описано в заявках на патент США № 20110112470 или 20100256597 (описываются микроиглы для прицельного введения в глаз); или с помощью гидрогеля гидрофильного полимера, параметры которого позволяют проходить через *puncta lacrimali*, например, как описано в заявке на патент США № 20100209478; или с помощью устройства, обеспечивающего доступ в подсетчаточное пространство человеческого глаза, как описано в заявке на патент США № 20100191176. Можно также делать парацентез передней камеры глаза, если специалист сочтет это необходимым. В других воплощениях данного изобретения предлагаемые способы не включают наложения швов на глазное яблоко в процессе и/или после процедуры введения композиции, в частности, в случае размещения вводимого препарата в стекловидном теле. Однако при осуществлении способов, предполагающих витректомию, это может оказаться необходимым, например, при размещении клеток в подсетчаточном пространстве.

Состав композиций, описанных в настоящем документе, может быть также предназначен для интрастекального, интрацеребрального, эпидурального, подкожного, внутривенного, внутримышечного и/или интраартериального введения (см., например, заявку на патент США № 200500480021) путем инъекции, но также включая различные инфузионные процедуры. Введение композиций по данному изобретению может осуществляться посредством катетеров или интрастекальной насосной системы, или с помощью имплантируемого устройства. В других воплощениях данного изобретения предлагаемые способы могут предполагать введение или пересадку имплантатов или искусственных органов, использование биореакторных систем, систем для культивирования клеток, планшетов, чашек, пробирок, колб, флаконов и проч., содержащих клетки-предшественники сетчатки, клеточные популяции или описанные в настоящем документе композиции, например, такие, как описаны в патентах США №№ 7388042; 7381418; 7379765; 7361332; 7351423; 6886568; 5270192; и заявках на патент США №№ 20040127987; 20080119909; 20080118549; 20080020015; 20070254005; 20070059335; 20060128015.

В других воплощениях данного изобретения предлагаемые способы могут применяться для лечения, облегчения или предотвращения заболеваний или состояний сетчатки, например (перечисленное здесь не ограничивает объем изобретения), пигментного ретинита, врожденного амавроза Лебера, болезни Штаргардта, синдрома Ушера, хориодермии, дистрофического поражения палочек или колбочек, цилиопатии, митохондриальных расстройств, прогрессирующей атрофии сетчатки, дегенеративных заболеваний сетчатки, старческой макулярной дегенерации, сухой и влажной форм старческой макулярной дегенерации, географической атрофии сетчатки, наследственной или приобретенной макулопатии, заболеваний сетчатки, обусловленных поражением пигментного эпителия, поражений фоторецепторов, диабетической ретинопатии, кистозного отека макулы, увеита, отслоения сетчатки, травматических повреждений сетчатки, ятрогенных повреждений сетчатки, перфорации макулы, макулярной телеангиэктазии, поражений ганглиозных клеток, поражений зрительного нерва; глаукомы, нейропатии зрительного нерва, ишемического поражения сетчатки, ретинопатии недоношенных, закупорки сосудов сетчатки, семейной макроаневризмы сетчатки, поражения сосудов сетчатки, поражения сосудов глаза, заболевания сосудов, ишемической нейропатии зрительного нерва, для улучшения фотопического (дневного) зрения; улучшения или коррекции остроты зрения, улучшения функционирования желтого пятна, улучшения показателей поля зрения или улучшения скотопического (ночного) зрения.

В других воплощениях данного изобретения предлагаемые способы включают местную анестезию, но в ходе введения можно применять любую локальную, регионарную или общую анестезию. Примеры местных обезболивающих агентов, пригодных для использования в способах по данному изобретению, включают (перечисленное здесь не ограничивает объем изобретения) меприкаин, пропаракаин, прилокаин, ропивакаин, бензокаин, бупивакаин, бутамбена пикрат, хлорпрокаин, кокаин, дибукаин, диметизохин, диклонин, этидокаин, гексилкаин, кетамин, лидокаин, мепивакаин, прамоксин, прокаин, тетракаин, салицилаты и их производные, эфиры, соли и смеси указанных веществ.

Композиции по данному изобретению, содержащие клетки-предшественники сетчатки или клеточные популяции, при необходимости можно вводить вместе с одним или более лекарственных препаратов. Примеры этих лекарственных препаратов включают агенты, подавляющие ангиогенез, например, ангиостатин, анекортава ацетат, тромбоспондин, ингибиторы тирозинкиназного рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), и агенты, подавляющие активность VEGF (например, ранибизумаб и бевацизумаб), пегаптаниб, сунитиниб, сорафениб и любой из разнообразных низкомолекулярных агентов и ингибиторов транскрипции, подавляющих ангиогенез; известные офтальмологические лекарства, включая применяемые при глаукоме, например адренергические антагонисты (например,  $\beta$ -блокаторы - ацетбутолол, атенолол, бисопролол, карведилол, асмолол, лабеталол, надолол, пенбутолол, пиндолол, пропранолол,

лол, метипранолол, бетаксолол, картеолол, левобетаксолол, левобутанолол и тимолол); адренергические агонисты или симпатомиметические агенты, например эпинефрин, дипивефрин, клонидин, апарклонидин и бримонидин; парасимпатомиметические или холинергические агонисты, например пилокарпин, карбахол, фосфолин-йодид и физостигмин, салицилат, ацетилхолина хлорид, эзерин, диизопропилфторфосфат, демекарий бромид; мускариновые агонисты; ингибиторы карбоангидразы, включая местно и/или системно действующие агенты, например ацетозоламид, бринзоламид, дорзоламид и метазоламид, этосазоламид, диамокс и дихлорфенамид; мидриатические и циклоплегические средства, например атропин, циклопентолат, сукцинилхолин, гоматропин, фенилэфрин, скополамин и тропикамид; простагландины, например простагландин F2 $\alpha$ , антипростагландины, предшественники простагландинов или аналоги простагландинов, например биматопрол, латанопрол, травопрол и унопрол.

Другие примеры лекарственных средств включают также противовоспалительные агенты, в том числе, например, глюкокортикоиды и кортикостероиды, например бетаметазон, кортизон, дексаметазон, дексаметазон-21-фосфат, метилпреднизолон, преднизолон-21-фосфат, преднизолона ацетат, преднизолон, фторметолон, лотепреднол, медризон, фторцинолона ацетонид, триамцинолона ацетонид, триамцинолон, триамцинолона ацетонид, беклометазон, будезонид, флунизолид, фторметолон, флутиказон, флуорокортизон, гидрокортизон, гидрокортизона ацетат, лотепреднол, римексолол и нестероидные противовоспалительные средства, включая, например, аспирин, диклофенак, флурбипрофен, ибупрофен, бромфенак, непафенак и кеторолак, салицилат, индометацин, наксопрен, пироксикам и набуметон, дифлунизал, этодолак, фенпрофен, флурбипрофен, индометацин, кетопрофен, меклофенамат, мефенамовая кислота, мелоксикам, набуметон, оксапрозин, пироксикам, сальсалат, сулиндак и тодлметин; ингибиторы циклооксигеназы-2, например цекоксиб, рофекоксиб и вальдекоксиб; антиинфекционные и противомикробные агенты, например антибиотики, включая, например, тетрациклин, хлортетрациклин, бацитрацин, неомицин, полимиксин, грамицидин, цефалексин, окситетрациклин, хлорамфеникол, рифампицин, ципрофлоксацин, тобрамицин, гентамицин, эритромицин, пенициллин, сульфонамиды, сульфадиазин, сульфацетамид, сульфаметизол, сульфизоксазол, нитрофуразон, пропионат натрия, аминогликозиды, например, гентамицин, тобрамицин, амикацин и стрептомицин; фторхинолоны, например, ципрофлоксацин, гатифлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин; бацитрацин, эритромицин, фузидовая кислота, неомицин, полимиксин В, грамицидин, триметоприм и сульфацетамид; противогрибковые агенты, например, амфотерицин В, каспофунгин, клотримазол, флуконазол, итраконазол, кетоконазол, вориконазол, тербинафин, нистатин и миконазол; противомаларийные средства, например хлорохин, атоваквон, мефлохин, примахин, хинидин и хинин; средства против микобактерий, например этамбутол, изониазид, пипразинамид, рифампин и рифабутин; антипаразитарные агенты, например албендазол, мебендазол, тиобендазол, метронидазол, пирантел, атоваквон, йодохинол, ивермектин, паромоцилин, празиквантел и триматрексат.

Другие примеры лекарственных средств включают также противовирусные агенты, например идоксуридин, трифтортимидин, ацикловир, цидофовир, фамцикловир, ганцикловир, валацикловир, валганцикловир, видарабин, трифлуридин и фоскарнет; ингибиторы протеаз, например ритонавир, саквинавир, лопинавир, индинавир, атазанапир, ампренавир и нефлинавир; нуклеотидные/нуклеозидные/нунуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, например абакавир, диденезин (ddl), ламивудин (ЗТС), ставудин (d4T), зальцитобин (ddC), тенофовир и эмтрицитабин, делавирдин, эфавиренз и невирапин; другие противовирусные агенты, например интерфероны, рибавирин и трифлуридин; антибактериальные агенты, включая капапенемы, например этрапенем, имипенем и меропенем; цефалоспорины, например цефадроксил, цефазолин, цефдинир, цефдиторен, цефалексин, цефаклор, цефепим, цефоперазон, цефотаксим, цефотетан, цефокситин, цефпродоксим, цефпрозил, цефтаксидим, цефбутен, цефтизоксим, цефтриаксон, цефуроксим и лоракарбеф; другие макролиды и кетолиды, например азитромицин, кларитромицин, диритромицин и телитромицин; пенициллины (с клавуланатом и без него), включая амоксициллин, ампициллин, пивампициллин, диклоксациллин, нафциллин, оксациллин, пиперациллин и тикарциллин; тетрациклины, например доксициклин, миноциклин и тетрациклин; другие антибактериальные агенты, например азтреонам, хлорамфеникол, клиндамицин, линезолид, нитрофурантоин и ванкомицин.

Другие примеры лекарственных средств включают также иммуномодулирующие агенты, например противоаллергические средства, в том числе, например, хромогликат натрия, антазолин, метапирилин, хлорфенирамин, цетризин, пириламид, профенпиридамин; альдеслейкин, адалимумаб, азатиоприн, базиликсимаб, даклизумаб, этанерцепт, гидроксихлорохин, инфликсимаб, лефлуномид, метотрексат, микофенолата мофетил и сульфасалазин; антигистаминные агенты, например азеластин, эмедастин, лоратадин, дезлоратадин, цетиризин, дифенгидрамин, хлорфенирамин, дексхлорфенирамин, клемастин, ципрогептадин, фексофенадин, гидроксизин, прометазин и левокабастин; иммунологические препараты (например, вакцины и иммуностимуляторы); средства, стабилизирующие мембраны тучных клеток, например кромолин натрия, кетотифен, лодоксамид, недокримил, олопатадин и пемироласт; агенты, разрушающие ресничное тело, например гентимицин и цидофовир; и другие офтальмологические средства, например вертепорфин, пропаракатаин, тетракаин, циклоспорин и пилокарпин; ингибиторы рецепторов гликопротеинов клеточной поверхности; противозастойные средства, например фенилэфрин, нафазолин,

тетрагидразолин; липиды или гипотензивные липиды; дофаминергические агонисты и/или антагонисты, например квинпирол, фенолдопам и ибопамин; средства, подавляющие спазм сосудов; сосудорасширяющие средства; средства против повышения кровяного давления; ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента; антагонисты рецепторов ангиотензина-1, например олмесартан; ингибиторы динамики микротрубочек; ингибиторы моторных белков (динеина и/или кинезина); агенты, регулирующие актиновый цитоскелет, например цитохалазин, латрункулин, свинхолид А, этакриновая кислота, Н-7 и ингибиторы Rho-киназы; ингибиторы перестройки; агенты, влияющие на межклеточный матрикс, например трет-бутилгидрохинолон и AL-3037A; агонисты и/или антагонисты рецепторов аденозина, например N-6-циклофексиладенозин и (R)-фенилизопропиладенозин; агонисты серотонина; гормональные средства, например эстрогены, эстрадиол, гестагенные гормоны прогестерон, инсулин, кальцитонин, паратгормон, либерины (пептидные гормоны гипоталамуса), вазопрессин; антагонисты факторов роста или факторы роста, в том числе, например, фактор роста эпидермиса, фактор роста фибробластов, фактор роста, происходящий из тромбоцитов, трансформирующий фактор роста ( $\beta$ ), соматотропин, фибронектин, фактор роста соединительной ткани, морфогенетические белки костной ткани (BMP); цитокины, например интерлейкины, CD44, кохлин и сывороточный амилоид, например сывороточный амилоид А.

Другие терапевтические агенты могут включать нейропротекторы, например лубезол, нимодипин и родственные соединения, и в том числе агенты, способствующие кровотоку, блокаторы натриевых каналов, агенты, ослабляющие действие глутамата (например, антагонист глутаматных рецепторов мексантин), нейротрофические факторы, ингибиторы синтазы оксида азота; поглотители свободных радикалов или антиоксиданты; хелирующие соединения; ингибиторы протеаз, связанных с апоптозом; соединения, ослабляющие образование белков *de novo*; агенты для лучевой терапии; агенты для фотодинамической терапии; агенты для генной терапии; модуляторы генной экспрессии; средства, облегчающие сухость глаз, например циклоспорин А, смягчительные агенты и гиалуронат натрия;  $\alpha$ -блокаторы, например доксазозин, празозин и теразозин; блокаторы кальциевых каналов, например амлодипин, безпридил, дилтиазем, фелодипин, израдипин, никардипин, нифедипин, низолдипин и верапамил; другие средства против повышенного давления, например клонидин, диазоксид, фенолдопам, гидралазин, миноксидил, нитропруссид, феноксibenзамин, эпопростенол, толазолин, трептостинил и агенты на основе нитратов; противосвертывающие агенты, включая гепарины и гепариноиды, например гепарин, далтепарин, эноксапарин, тинзапарин и фондапаринукс; другие противосвертывающие средства, например гирудин, апротинин, аргатробан, бивалирудин, дезирудин, лепирудин, варфарин и ксимелагатран; агенты, противодействующие функции тромбоцитов, например абциксимаб, клопидогрель, дипиридамола, оптифибатида, тиклопидина и тирофибана.

Другие терапевтические агенты могут включать ингибиторы фосфодиэстеразы типа 5 и другие агенты из группы простагландинов, например алпростадил, карбопрост, силденафил, тадалафил и варденафил; ингибиторы тромбина; агенты, противодействующие образованию тромбина; агенты, противодействующие агрегации тромбоцитов; тромболитические агенты и/или фибринолитические агенты, например алтеплаза, анистреплаза, ретеплаза, стрептокиназа, тенектеплаза и урокинназа; агенты, подавляющие пролиферацию клеток, например сиролimus, такролимус, эверолимус, зотаролимус, паклитаксел и микофеноловая кислота; гормональные и родственные гормонам агенты, в том числе левотироксин, флуоксиместерон, метилтестостерон, нандролон, оксандролон, тестостерон, эстрадиол, эстрон, эстропиат, кломифен, гонадотропины, гидроксипрогестерон, левоноргестрел, медроксипрогестерон, мегестрол, мифепристон, норэтиндрон, окситоцин, прогестерон, ралоксифен и тамоксифен; антинеопластические агенты, в том числе алкилирующие агенты, например кармустин, ломустин, мелфалан, цисплатин, фторурацил-3 и прокарбазин; агенты типа антибиотиков, например блеомицин, даунорубин, доксорубин, идарубин, митомицин и пликамицин; агенты, противодействующие пролиферации клеток (например, 1,3-цис-ретиноевая кислота, 5-фторурацил, таксол, рапамицин, митомицин С и цисплатин); антиметаболиты, например цитарабин, флударабин, гидроксимочевина, меркаптопурин и 5-фторурацил; иммуномодуляторы, например альдеслейкин, иматиниб, ритуксимаб и тозитумомаб; агенты, подавляющие митоз, например доцетаксел, этопозид, винбластин и винкристин; радиоактивные агенты, например стронций-89; и другие антинеопластические агенты, например иринотекан, топотекан и митотан.

Применения и способы, описанные в настоящем документе, могут быстро и надолго восстановить и/или сохранить клинически значимую степень зрительной функции сетчатки у млекопитающих, включая (но не ограничиваясь) улучшение фотопического (дневного) зрения, увеличение максимально скорректированной остроты зрения, улучшение функционирования желтого пятна, сохранение или восстановление центральной фиксации, улучшение показателей поля зрения, улучшение скотопического (ночного) зрения, увеличение или улучшение чувствительности к звукам и увеличение остроты зрения другим глазом. Возможны и иные изменения, в том числе различные системные положительные эффекты, например, изменения внешности вследствие соматических проявлений воздействия света на циркадианные ритмы, функцию гипофиза, высвобождение гормонов, тонус сосудов; улучшение ощущения зрительных способностей; сокращение зависимости от медицинского обслуживания; усиление чувства благополучия; и/или увеличение активности в бытовом отношении. Такие изменения зрения можно опреде-

лить известными в данной области техники методами. Позитивные изменения могут проявиться в первую неделю после лечения, но могут также постепенно нарастать на протяжении более продолжительного времени. Возможна замена клеток сетчатки и/или миграция донорских клеток в сетчатку, нервные цепочки, наружный зернистый слой или макулу, но для клинической эффективности этого не требуется; миграция донорских клеток в сетчатку возможна, но не требуется, для клинической эффективности. Оценка изменений зрения, включая улучшение зрения в результате лечения описанными в настоящем документе композициями, содержащими клетки-предшественники сетчатки, достигается с использованием стандартных офтальмологических процедур, включая (но не ограничиваясь) исследование глазного дна, определение максимально скорректированной остроты зрения (BCVA), определение внутриглазного давления (IOP), осмотр глаза с помощью щелевой лампы, флуоресцеиновую ангиографию (FA), оптическую когерентную томографию (OCT), стереофотосъемку глазного дна, электроретинографию (ERG), ритмическую электроретинографию колбочек, периметрию (поле зрения) микропериметрию, темновую адаптацию, навык прохождения лабиринта, оптокинетический/оптомоторный рефлекс, зрачковый рефлекс, индуцированный зрительный потенциал (VEP) и сканирующей лазерной офтальмоскопии с использованием адаптивной оптики (AOSLO).

#### Наборы и инструкции.

Данным изобретением предлагаются наборы, включающие композиции (например, гетерогенные смеси эмбриональных нервных клеток сетчатки) и способы (например, лечение заболевания или состояния сетчатки или приготовление гетерогенной смеси эмбриональных нервных клеток сетчатки), включая инструкции по их применению. В других воплощениях данного изобретения предлагаются наборы, содержащие композицию, продукт производства или смесь или культуру клеток (например, гетерогенную смесь эмбриональных нервных клеток сетчатки), причем при необходимости такой набор также содержит инструкции по практическому применению способа по данному изобретению.

По данному изобретению предлагаются наборы, содержащие клеточные популяции, включающие описанные в настоящем документе клетки-предшественники сетчатки млекопитающих, представленные в виде культуры клеток, свежей или замороженной, или включенной в состав композиции для введения индивиду. Такой набор может также содержать инструкции по практическому применению способа по данному изобретению. Такие наборы могут также содержать агенты, связывающие один или более маркеров клеток-предшественников сетчатки, описанных в настоящем документе (например, антитела или олигонуклеотиды-праймеры), и основную или кондиционированную среду. Например, набор по данному изобретению может содержать первую емкость с антителами, специфичными к одному или более маркерам, причем указанные антитела приспособлены для выделения или выявления, например, путем конъюгирования с флуоресцентным маркером или магнитными частицами; вторую емкость с основной или кондиционированной средой. В различных близких воплощениях эти наборы могут также содержать один или более дополнительных реагентов, используемых при получении клеточной популяции по данному изобретению, например среду для культивирования клеток, чашки для культивирования клеток, покрытые межклеточным матриксом, и ферменты, нужные для обработки ткани. Такой набор может также включать инструкции по его использованию для очистки и размножения клеток-предшественников сетчатки или клеточных популяций, полученных из образца ткани. В других воплощениях данного изобретения такие наборы могут также содержать средства для взятия образца ткани у пациента или донора и/или емкость для помещения этого образца ткани.

#### Применение в ветеринарии.

В других воплощениях данного изобретения предлагаемые композиции и способы можно применять в ветеринарии; например, данное изобретение демонстрирует впервые успешно осуществленное выращивание кошачьих клеток-предшественников сетчатки и первое терапевтическое применение при дистрофии сетчатки у кошек и других животных, например млекопитающих, содержащихся в качестве домашних питомцев, обычных одомашненных и некоторых диких млекопитающих, животных, содержащихся в зоопарках, сельскохозяйственных и спортивных (например, беговых лошадей или собак) животных и проч.

У ряда домашних животных в результате многократного близкородственного скрещивания имеются гены, обуславливающие слепоту. Это касается кошек, собак и лошадей, а также, вероятно, других видов. У домашних и диких животных бывают заболевания и повреждения сетчатки, при которых может оказаться эффективным лечение с использованием композиций и способов по данному изобретению.

#### Продукты производства, имплантаты и искусственные органы.

Данным изобретением также предлагаются имплантаты и искусственные органы, биореакторные системы, системы культивирования клеток, планшеты, чашки, пробирки, флаконы и колбы и т.п., содержащие одну или более композиций или фармацевтических препаратов по данному изобретению, включающих гетерогенные смеси эмбриональных нервных клеток сетчатки.

В других воплощениях данного изобретения предлагаются биореакторы, имплантаты, стенты, искусственные органы и другие устройства, содержащие гетерогенную смесь эмбриональных нервных клеток сетчатки; например, такие имплантаты, как описаны в патентах США №№ 7388042; 7381418; 7379765; 7361332; 7351423; 6886568; 5270,92; и заявках на патент США №№ 20040127987; 20080119909

(ушные имплантаты); 20080118549 (глазные имплантаты); 20080020015 (биологически активный перевязочный материал); 20070254005 (биопротезы клапанов сердца, трансплантаты сосудов, имплантаты мениска); 20070059335; 20060128015 (имплантаты печени) или аналогичные им.

Данное изобретение далее описывается на приведенных ниже примерах; однако следует учесть, что такими примерами данное изобретение не ограничивается.

#### Примеры

Пример 1. Выделение и культивирование клеток-предшественников сетчатки.

У доноров брали эмбрионы внутриутробного возраста приблизительно 16-19 недель, извлекали цельные глаза и помещали их в 15-миллилитровые пробирки, содержащие среду RPMI-1640 с L-глутамином (производство BioWhittaker). Глаза транспортировали на льду в течение около 4,5-21,5 ч. Одновременно у доноров брали образцы крови и отправляли их для проверки на присутствие каких-либо занесенных агентов. По прибытии в лабораторию каждое глазное яблоко осматривали, чтобы убедиться в прозрачности роговицы и нормальности формы, после чего помещали в укрытие с ламинарным потоком воздуха в стерильных условиях. Цельные глаза эмбрионов промывали в отдельных 50-миллилитровых пробирках три раза в 40 мл холодного физиологического раствора, забуференного фосфатом (PBS) и содержащего антибиотики. Затем иссекали зрительный нерв и оставшуюся мезенхимную ткань. Это делалось, чтобы избежать возможного загрязнения изолятов сетчатки нежелательными клетками не сетчаточного происхождения. После иссечения глаза промывали еще раз холодным PBS, содержащим антибиотики.

Под бинокулярной препаровальной лупой в каждом глазу делали отверстие по хирургическому лимбу роговицы, используя шприц типа "ТВ" объемом 1 мл с иглой калибра 25-5/8. Затем делали круговой разрез вдоль лимба при помощи тонких ножниц. Удаляли передние структуры (роговицу, хрусталик) и оставшееся стекловидное тело. Сетчатку осторожно отделяли при помощи препаровальной иглы от пигментного эпителия и переносили в небольшую чашку Петри, содержащую 2 мл холодной среды DMEM/F12. Ткань сетчатки измельчали вручную в чашке Петри при помощи кончика 1-миллилитровой пипетки. Фрагменты ткани переносили в виде суспензии в холодную коническую 15-миллилитровую пробирку; оставшуюся в чашке Петри ткань собирали, ополаскивая чашку 2-3 раза 1 мл холодной среды DMEM/F12, и добавляли в эту же пробирку. Образец центрифугировали при скорости 1000 об/мин (179 g) в течение 5 мин, супернатант отбрасывали.

Затем ткань подвергали ферментативной обработке, инкубируя в 0,8 мл неразбавленного препарата TrypLE Express (Invitrogen) в течение 40 с при комнатной температуре. "Переваренную" трипсином ткань пропускали туда-сюда через кончик 1-миллилитровой пипетки. Действие трипсина прекращали, добавляя 10 мл холодной свежеприготовленной бессывороточной культуральной среды и собирали смесь путем центрифугирования при скорости 1000 об/мин (179 g) в течение 4 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в холодной свежей культуральной среде и определяли количество клеток и их жизнеспособность при помощи селективного красителя трипанового синего (Invitrogen); клетки считали при помощи автоматического счетчика Countess (Invitrogen) или вручную. Были получены конгломераты из приблизительно  $10 \times 10^6$  клеток, причем из них примерно 80% составляли мелкие и средние конгломераты, приблизительно 9-18% - отдельные клетки и примерно 1-2% - крупные конгломераты. Описанная методика обеспечивала 92%-ную жизнеспособность клеток.

Затем клетки высевали в два культуральных флакона T75, предварительно покрытых человеческим фибронектином (без ксеногенной контаминации). В некоторых экспериментах использовали человеческий фибронектин плазмы крови (Invitrogen). В других экспериментах использовали орнитин, полилизин, ламинин или матригель. Затем клетки инкубировали при температуре 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> и обычного атмосферного количества кислорода или же при концентрации кислорода 3%, используя инкубатор LowOx. В ходе культивирования диссоциировали конгломераты клеток путем обработки трипсином и/или измельчения, чтобы предотвратить преждевременную дифференцировку по мере последовательных пассажей. Каждые один-два дня сменяли культуральную среду на 90% и клетки пассировали при конфлюэнтности 60-80%, при необходимости 40-90%, используя TrypLE Express в течение 5-6 мин при температуре 37°C. Действие трипсина прекращали, добавляя 10 мл холодной культуральной среды или холодного PBS. Определяли жизнеспособность клеток при помощи селективного красителя трипанового синего и подсчитывали их количество. Затем диссоциированные клетки высевали в новые флаконы с фибронектиновым покрытием или на планшеты при плотности  $1-6,7 \times 10^4$  клеток на 1 см<sup>2</sup>. Клетки подготавливали для замораживания следующим образом. Вначале их собирали с помощью TrypLE Express. Собранные клетки центрифугировали при скорости 1000 об/мин (179 g) в течение 5 мин. Супернатант удаляли, клеточный осадок ресуспендировали в свежей культуральной среде или холодном PBS. Определяли количество клеток и их жизнеспособность. Затем клеточную суспензию вновь центрифугировали при скорости 1000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в среде для хранения клеток в замороженном состоянии (90% свежей полной среды, 10% диметилсульфоксид) и помещали в каждую криопробирку аликвоту  $(0,5-5) \times 10^6$  клеток. Криопробирки размещали в контейнере-холодильнике при температуре 1°C, а затем переносили в морозильную камеру с температурой -80°C, или держали в жид-

ком азоте, или использовали иной способ хранения при низкой температуре.

Для оттаивания клеток криопробирки вынимали из жидкого азота или иного замораживающего хранилища и помещали в водяную баню с температурой 37°C на 2-3 мин до тех пор, пока не исчезали кристаллы льда. Оттаявшие клетки тотчас переносили в холодную коническую 15-миллилитровую пробирку с помощью кончика 1-миллилитровой пипетки и пробирку, в которой они оттаивали, дважды ополаскивали холодной свежей культуральной средой. В эту 15-миллилитровую пробирку прибавляли 10 мл холодной свежей культуральной среды по каплям, осторожно встряхивая. Затем центрифугировали при скорости 800 об/мин (115 g) в течение 3 мин, супернатант отбрасывали, полученный клеточный осадок ресуспендировали в свежей культуральной среде. Определяли количество клеток и их жизнеспособность, как описано выше, и высевали клетки в новые флаконы с фибронектиновым покрытием; инкубировали в условиях, описанных выше.

На фиг. 1 можно видеть морфологические особенности кошачьих клеток-предшественников сетчатки. Видно, что в ходе длительного культивирования в различные моменты времени морфология сохраняется неизменной. На фиг. 2 изображена кривая роста кошачьих клеток-предшественников сетчатки в двух разных культуральных средах. В среде SM эти клетки старели на 10-й день пассирования (P10), тогда как такие же клетки в среде UL продолжали расти. После P14 имело место усиление роста - кривая загибается вверх.

При культивировании человеческих клеток вначале были видны мелкие конгломераты клеток (см. фиг. 3), а к концу первой недели они постепенно превращались в отдельные адгезивные клетки. Это достигалось путем диссоциации в процессе пассирования, как описано выше. В целом первоначальное использование мелких и средних конгломератов способствовало жизнеспособности клеток, что является преимуществом при полном отсутствии сыворотки. Последующая полная диссоциация при сохранении относительно высокой плотности клеток может способствовать пролиферации, в то же время дифференцировки клеток не происходит.

Кинетика роста человеческих клеток-предшественников сетчатки иллюстрируется фиг. 4 и 5. Клетки, происходящие из донорской ткани, использовали клинически на стадии P4. При содержании кислорода, равном атмосферному, клеточный рост был значительным и сохранялся на протяжении по меньшей мере десяти пассажей (P10), однако клеточный рост не был бесконечным. Свойство неограниченного клеточного роста не допустимо в контексте данного изобретения, поскольку может указывать на плюрипотентность, иммортализацию и повышенный риск онкогенеза.

Чтобы определить оптимальные условия для размножения клеток-предшественников сетчатки, были опробованы различные бессывороточные и нексеногенные культуральные среды, включая DMEM/F12 (стандартную, Advanced и KnockOut; Invitrogen), Neurobasal (Invitrogen), Ultraculture (Lonza) и ReNcell (Chemicon). Питательные среды, используемые для клеток-предшественников сетчатки, в первые две недели культивирования иногда дополнялись добавками N2 (Invitrogen), B27 (Invitrogen или другая фирма), Stempro (Invitrogen), витамина С, альбумина, рекомбинантного человеческого фактора роста эпидермиса (EGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF), GlutaMAX I, L-глутамина и/или пенициллина/стрептомицина, (Invitrogen). В настоящем документе обозначение "SM" относится к стандартной питательной среде на основе DMEM/F12; "UL" относится к питательной среде, в которой основой является среда Ultraculture. Бессывороточные среды использовались без антибиотиков или с антибиотиками в первые две недели культивирования, после чего в течение 6 недель использовали среду без антибиотиков. Противогрибковые агенты не использовались. На фиг. 5 представлены результаты экспериментов, проведенных с целью определить, какая среда оптимальна для культивирования клеток-предшественников сетчатки. Основную среду - стандартную DMEM/F12 с добавками N2, факторов роста, глутамина или GLUTAMAX™ (GlutaMax™) - сравнивали со средой "Advanced DMEM/F12", с такими же добавками. Как видно на фиг. 6А, вариант "Advanced", который содержит также витамин С и альбумин, оказался эффективнее и увеличивал выход человеческих клеток-предшественников сетчатки на 18-29%.

Мы исследовали также эффект добавок в культуральную среду. На этот счет сравнивали добавку N2 и нексеногенную добавку B27. Фиг. 6В показывает, что добавление в культуральную среду нексеногенной B27 увеличивает выход клеток-предшественников сетчатки. Добавка N2 умеренно увеличивает выход, и этого достаточно для терапевтической эффективности. Проверяли также влияние добавления витамина С. Витамин С добавляли в культуральную среду раз в два дня. Фиг. 7А показывает, что витамин С увеличивает выход человеческих клеток-предшественников сетчатки на приблизительно 30%. Хотя среда Advanced DMEM/F12 содержит добавленный витамин С, очевидно, что более высокие его концентрации (0,05-0,1 мг/мл), достигаемые при дополнительном добавлении витамина С, полезны для роста человеческих клеток-предшественников сетчатки. Достаточно добавлять свежий витамин С раз в два дня; установлено, что ежедневное добавление не требуется. Наконец, проверили эффект добавления альбумина. Когда нексеногенный рекомбинантный человеческий альбумин добавляли в среду на основе стандартной DMEM/F12 в концентрации 1,0 мг/мл, наблюдалось усиление пролиферации (прирост до 27%). Но увеличения клеточного роста не выявлялось, когда дополнительный альбумин добавляли к среде на основе Advanced DMEM/F12, которую обычно предпочитают в качестве основной среды (она уже

содержит добавку альбумина). См. фиг. 7B и 7C.

Изучали также влияние осмотической концентрации культуральной среды, используя среды с различной осмолярностью (Осм) в сочетании с различными имеющимися в продаже добавками. См. фиг. 8. Среда с низкой осмолярностью (KnockOut DMEM/F12; 276 мОсм/кг) не обладала положительным эффектом в сочетании с обычно используемыми для нервных клеток добавками N2 или B27, и в некоторых случаях приводила к значительно более низкому выходу по сравнению со средой нормальной осмолярности (DMEM/F12; 300-318 мОсм/кг). Были получены данные, указывающие на то, что низкая осмотическая концентрация среды имеет положительный эффект, если сочетается с реже используемой добавкой (набор STEMPro™, Invitrogen, данные не приводятся).

В дополнение к жизнеспособности (%) и скорости пролиферации был разработан еще один количественный показатель, позволявший предсказывать оптимальный (например, *in vitro*) выход первоначально собранных клеток; в настоящем документе он называется «время оседания». Этот показатель относится к промежутку времени, за которое диссоциированные клетки располагаются на дне культурального сосуда в инкубируемой питательной среде. Задержка в суспензии (клетки не оседают на дно) может быть связана с повреждением клеток или нежизнеспособностью вследствие травмирования клеток в процессе выделения; успешный "саморемонт" клеток связан с наблюдаемой способностью восстанавливать мембранный гомеостаз, нормальную осмолярность и проч., тем самым обретать отрицательную плавучесть и, таким образом, осесть. Если "саморемонт" задерживается, это стрессовая ситуация для клетки, приводящая к снижению активности и ухудшению состояния культуры. Взяв за критерий примерно 90%-ное оседание(% - доля в популяции), мы обнаружили, что клетки, полученные из тканей, транспортировка которых занимала 21,5 ч, характеризовались временем оседания около 6 ч; у клеток, полученных из ткани, транспортировавшейся 4,5 ч, время оседания сокращалось до приблизительно 1,5 ч. Кошачьи клетки-предшественники сетчатки и клетки-предшественники мозга, которые сразу помещали в культуральную посуду, характеризовались временем оседания 1 ч. С человеческими клетками достижимы времена оседания приблизительно 1 ч и менее.

Для демонстрации улучшения зрения у людей с пигментным ретинитом клетки культивировали в условиях атмосферной концентрации кислорода. Изучали развитие клеток-предшественников сетчатки, культивируемых при низком содержании кислорода, что имитирует кислородные условия в развивающейся сетчатке эмбриона во внутриутробном периоде; в данном случае концентрация кислорода составляла 3% (обозначено "lowOx"). Как видно на фиг. 9, в условиях "lowOx" (3% кислорода) пролиферация человеческих клеток-предшественников сетчатки заметно усиливается и длится дольше (день 56, P10), также значительно увеличивается выход клеток, полученных из данного донорского образца ткани. Для сравнения приведены показатели клеточного роста в условиях атмосферного содержания кислорода (20%); видно, что в таких условиях скорость пролиферации явно ниже, старение культуры наступает раньше (день 47, P7) и общий выход клеток ниже. Фиг. 9 также демонстрирует изгиб кривой роста вверх, отвечающий ускорению пролиферации человеческих клеток-предшественников сетчатки в условиях низкой концентрации кислорода; эта точка приходится на конfluence около 40%, что указывает на важность высокой плотности культуры для оптимального роста человеческих клеток-предшественников сетчатки. Сходные результаты получены для клеток, растущих в гипоксических условиях (фиг. 10). Показатели клеточного роста для культивируемых в гипоксических условиях клеток из рабочего банка клеток были воспроизводимыми (фиг. 11).

С клетками по данному изобретению также проделывали тест на токсичность стероидов, поскольку стероидные препараты часто применяются у больных при трансплантации. Фиг. 12 демонстрирует токсичность стероидного агента триамцинолона ацетонида, который обычно используется в офтальмологии, но брали его в концентрациях за пределами области ожидаемого клинического применения. Дозы триамцинолона ацетонида, используемые в клинической практике, не влияют, по-видимому, на пролиферацию клеток, но высокие дозы (примерно в 10 раз превышающие ожидаемые клинические дозы) могут снижать жизнеспособность донорских клеток.

Клетки, предварительно замороженные в жидком азоте, оттаивали и определяли их жизнеспособность. На фиг. 13 показаны результаты эксперимента с замораживанием-оттаиванием. Предварительно замороженные клетки были жизнеспособны как в гипоксических условиях, так и при нормальной (атмосферной) концентрации кислорода. И в тех, и в других условиях жизнеспособность указанных клеток составляла приблизительно 94%. У оттаявших клеток наблюдалась такая же кинетика клеточного роста, как у человеческих клеток-предшественников сетчатки в условиях непрерывной культуры.

Пример 2. Определение свойств клеток-предшественников сетчатки.

Иммуноцитохимический анализ.

Клетки диссоциировали и выращивали на предметных стеклах с 8 лунками в течение 1-3 суток, после чего фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 15 мин и промывали три раза PBS. Препараты блокировали в растворе, содержащем 5% ослиной сыворотки и/или 0,3% Triton X-100, в течение 1 ч, затем еще раз промывали PBS. Для выявления антигенов, экспрессирующихся в клетках-предшественниках, инкубировали панель антител в течение ночи при температуре 4°C. Использовали антитела против нестина (Chemicon 1:200), виментина (Sigma 1:200), Sox2 (Santa Cruz 1:400), SSEA-1

(BD 1:200), GD2 (Chemicon 1:100), Ki-67 (BD 1:200),  $\beta$ 3-тубулина (Chemicon 1:400), GFAP (Chemicon 1:400) и GDNF (Santa Cruz 1:200). Затем проводили инкубацию с вторыми антителами - антимышиными иммуноглобулинами, конъюгированными с флуорохромом Alexa 546 (Invitrogen 1:400), антикозьими иммуноглобулинами, конъюгированными с флуорохромом Alexa 488 (Invitrogen 1:400) или с антикроличьими FITC (Chemicon 1:800). Флуоресценцию наблюдали с помощью микроскопа Leica; для визуализации использовали программное обеспечение MetaMorph. Долю положительных профилей (%) рассчитывали, определяя специфичную иммунореактивность в шести случайно выбранных полях; для определения общего числа клеток использовали краситель DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол).

#### Выделение РНК.

Тотальную РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini kit (Qiagen, шт. Калифорния, США), действуя по инструкции производителя, и обрабатывали ДНКазой I. Количественно РНК определяли при помощи спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Уилмингтон, шт. Делавэр, США), измеряя оптическую плотность (OD) при 260 нм/280 нм 1,90-2,10 и 260 нм/230 нм 1,90-2,20.

#### Микроматричный анализ.

Все исходные образцы РНК проверяли перед тем, как начать приготовление мишени и процедуру обработки: небольшое количество каждого образца (обычно 25-250 нг на одну лунку) анализировали на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent Technologies, Пало-Альто, шт. Калифорния, США) с набором реагентов 6000 Nano LabChip. Синтезировали двухцепочечную кДНК по поли(А)+мРНК, присутствующей в выделенной тотальной РНК, используя набор GeneChip WT cDNA Synthesis Kit (Affymetrix, Inc., Саанта-Клара, шт. Калифорния, США) и случайные гексамеры с промотором T7. Обычно для каждого образца брали 100 нг исходного материала тотальной РНК. Двухцепочечную кДНК использовали в качестве матрицы для создания множества копий антисмысловой кРНК в реакции транскрипции *in vitro* в течение 16 ч в присутствии T7-РНК-полимеразы; при этом использовали набор Affymetrix Genechip WT cDNA Amplification Kit. Для второго цикла брали 10 мкг кРНК со случайными гексамерами и в результате обратной транскрипции получали одноцепочечную ДНК в смысловой ориентации.

Образец одноцепочечной ДНК разделяли на фрагменты (использовали набор WT Terminal Labeling Kit, Affymetrix) со средней длиной 60 оснований (разброс 40-70 оснований), действуя согласно предписанным протоколам (Affymetrix GeneChip WT Sense Target Labeling Assay Manual). Фрагментированную одноцепочечную ДНК метили с помощью рекомбинантной концевой дезоксиинуклеотидил-трансферазы и реагента Affymetrix proprietary DNA Labeling Reagent, ковалентно связанного с биотином. Следуя рекомендациям по проведению этой процедуры, 0,54 мкг взятой фрагментированной одноцепочечной кДНК-мишени гибридизовали при температуре 45°C с вращением в течение 17 ч (Affymetrix GeneChip Hybridization Oven 640) для проверки наборов на микрочипе Affymetrix human-gene 1.0 ST array. Чипы промывали и затем окрашивали стрептавидином/фикоэритрином, используя Affymetrix Fluidics Station 450 (протоколы FS450\_007). Чипы сканировали с помощью GeneChip Scanner 3000 7G, используя программное обеспечение GeneChip Operating Software v1.4 и получали CEL-файлы данных свечения проб.

Нормализацию данных осуществляли методом PLIER (ошибка логарифма интенсивности флуоресценции проб), который включает протокол квантильной нормализации, реализованный в соответствующем программном обеспечении. Вкратце, созданные файлы интенсивности флуоресценции проб (\*.CEL) анализировали, используя консольную программу Affymetrix Expression Console software v1.1 и алгоритм PLIER для создания файлов суммаризации проба-уровень (\*.CHP). Использовали алгоритм из PLIER v2.0 (шкала квантификации: линейная; тип квантификации: сигнал и р-значение обнаружения; фон: PM-GCBG; метод нормализации: скетч-квантиль). Данные микрочипа оценивали с использованием программы JMP Genomics 4.1 (SAS Americas). Данные анализировали путем однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным t-критерием и полученными р-значениями, скорректированными с использованием FDR  $\alpha < 0,05$ . Итоговая таблица данных снабжена комментариями. Программное обеспечение JMP также использовали для анализа главных компонент, построения диаграммы Венна, а также для иерархических кластерных карт и теплокарт, используя модифицированный метод Уорда в дополнение к точечным диаграммам типа «вулкан» по результатам дисперсионного анализа.

#### Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Выбор маркеров-кандидатов основывался на результатах ранее проведенных исследований с клетками этого типа в свете потенциальной связи с настоящим исследованием. Особенное внимание было уделено маркерам, связанным с незрелыми клетками нейральной линии, а также выбранным маркерам для нейральной и глиальной дифференцировки. Проводили обратную транскрипцию тотальной РНК из образца (2 мкг), используя набор Omniscriptase Reverse Transcriptase kit (Qiagen, шт. Калифорния, США) и случайные праймеры (10 мкМ) (Sigma, шт. Миссури, США) согласно инструкциям производителя. Количественную ПЦР осуществляли, используя амплификатор 7500 fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Ирвин, США) с красителем Power SYBR green (Applied Biosystems, Ирвин, США) или набором для анализа геной экспрессии TaqMan (Applied Biosystems).

Нужный продукт ПЦР отличали от неспецифического продукта амплификации путем анализа кривой плавления, когда применяли метод с красителем SYBR green. В качестве эндогенного контроля для

нормализации данных по генной экспрессии использовали  $\beta$ -актин или GDNPH. ПЦР в реальном времени проводили по следующему общему протоколу: программа денатурации (95°C в течение 10 мин), программа квантификации (95°C в течение 15 с и 60°C 1-30 мин) - 40 циклов, программа кривой плавления (95°C 15 с и 60°C 1 мин с непрерывным измерением флуоресценции), завершая программой охлаждения при 40°C. Каждую реакцию повторяли трижды. Обработку результатов (построение графиков и анализ) проводили методом  $\Delta\Delta C_t$  (программное обеспечение 7500 Fast system 1.4 и DataAssist 2.0, Applied Biosystems, Ирвин, США) и с использованием программ JMP 4.1 (SAS Americas). Все данные выражали как среднее  $\pm$  стандартная ошибка (SE). Статистическую разницу определяли с использованием t-критерия. Данные считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Исследование цитотоксичности.

Для определения цитотоксичности клеток-предшественников сетчатки использовали набор ССК-8 (Dojindo Molecular Technologies Inc., Гейтерсберг, шт. Мэриленд, США). В этот набор входит соединение тетразолия WST-8, которое в результате биологического восстановления в присутствии переносчика электронов 1-метоксифеназинметасульфата (PMS), образует водорастворимое окрашенное соединение формазан. В лунки 96-луночных планшетов с клеточной суспензией (90 мкл на лунку) вводили по 10 мкл раствора ССК-8. Планшеты инкубировали в течение 2 ч и определяли оптическую плотность при 450 нм ( $OD_{450}$ ). Каждый опыт повторяли четыре раза в по меньшей мере трех отдельных экспериментах.

В кошачьих клетках-предшественниках сетчатки, окрашенных иммуноцитохимически (ИСС) на определенные маркеры, обнаруживался высокий уровень экспрессии виментина (см. фиг. 14). То же наблюдалось и в случае человеческих клеток-предшественников сетчатки. Маркеры направления дифференцировки, включая нестин, виментин, Ki-67,  $\beta$ 3-тубулин, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) и родопсин выявляли присутствие нейронов, фоторецепторов, глиальных клеток и демонстрировали сохранение полипотентности и гетерогенности в культурах клеток-предшественников сетчатки. Генетический профиль кошачьих клеток-предшественников сетчатки наблюдали во времени, используя количественную ПЦР маркерных транскриптов. Динамика профиля генной экспрессии (общая тенденция к нисходящим количественным изменениям в экспрессии маркеров по мере культивирования) наблюдалась также в случае человеческих клеток-предшественников сетчатки (см. фиг. 15). Также путем количественной ПЦР сравнивали генную экспрессию в условиях культуральных сред UL и SM (фиг. 16A). Поскольку в среде SM пролиферация кошачьих клеток-предшественников (сетчатки и мозга) ослабевала, было проведено сравнительное исследование генной экспрессии. В случае культуральной среды SM в качестве базового уровня для сравнения был взят день 13 ("1.0"); сравнивали кошачьи клетки-предшественники сетчатки, растущие в средах SM и UL, в день 31. По мере культивирования экспрессия большинства изученных маркеров уменьшалась, но в среде SM наблюдалось значительное увеличение экспрессии GFAP, что согласовалось с прогрессирующей утратой полипотентности и тенденцией к ограничению соответственно развитию по глиальной линии. В среде UL такого не наблюдалось.

Также проводили сравнение между мозговыми и сетчаточными клетками-предшественниками кошек (см. фиг. 16B). В случае клеток сетчатки наблюдалась относительно повышенная по сравнению с клетками-предшественниками мозга экспрессия некоторых маркеров: в том числе Dach1, Lhx2 и Pax6, которые являются факторами транскрипции, участвующими в развитии и формировании тканевой спецификации сетчатки; то же относится к факторам транскрипции Hes1 и Hes5, также участвующим в развитии сетчатки. Нестин, CD 133, виментин и Sox2 являются общими маркерами предшественников центральной нервной системы, а  $\beta$ 3-тубулин, Map2, и PKC $\alpha$  являются маркерами направления дифференцировки.

Кошачьи клетки-предшественники сетчатки пересаживали в подсетчаточное пространство кошкам абиссинской породы с дистрофией сетчатки, после трансплантации эти клетки выделяли и окрашивали (см. фиг. 17). Пересаженные клетки сохраняли жизнеспособность и, кроме того, проявляли способность мигрировать в сетчатку реципиента. Пересаженные клетки проявляли способность дифференцироваться, по-видимому, в мюллеровские глиальные клетки, с которыми оказывались сходны как морфологически, так и по мечению виментином. Мюллеровские клетки - это специфичные для сетчатки глиальные клетки, которые располагаются по всей толще сетчатки, обеспечивая структурную стабилизацию. Они важны для ряда функций сетчатки, включая жизнеспособность нейронов.

Морфологические признаки человеческих клеток-предшественников сетчатки определяли, используя экспрессию маркеров для ИСС. На фиг. 18 и 19 показана экспрессия (в процентах) определенных важных маркеров в популяции культивируемых клеток. Наблюдалась экспрессия нестина, которая, как считается, связана с нейральными стволовыми клетками/клетками-предшественниками и клетками-предшественниками сетчатки. Во взятой клеточной популяции отмечалась выраженная экспрессия виментина, хотя она не считается специфичной для клеток-предшественников сетчатки. В человеческих клетках-предшественниках сетчатки присутствовал Sox2, который тоже является фактором транскрипции, связанным с нейральным развитием. Маркер SSEA-1 (известный также под названием CD15, LeX) связывали с плюрипотентностью эмбриональных стволовых (ES) клеток; в исследованиях наблюдалась экспрессия этого маркера в подгруппах полипотентных клеток-предшественников мозга и сетчатки, не

являющихся плюрипотентными. В человеческих клетках-предшественниках сетчатки наблюдалась также экспрессия ганглиозиды GD2. Ki-67 является маркером активной пролиферации; его использовали для подтверждения того, что в данном воплощении настоящего изобретения взятые клетки обладают пролиферативной и митотической активностью во время клинического применения. Присутствие этих маркеров отличает человеческие клетки-предшественники сетчатки от популяций постмитотических предшественников (Surani, M.A. and McLaren A. (2006) *Nature* 443(7109): 284-285). При относительном отсутствии экспрессии OCT4 экспрессия Ki-67 отличает клетки-предшественники сетчатки от митотически активных плюрипотентных стволовых клеток - эмбриональных стволовых (ES) и индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток, которые небезопасно использовать для трансплантации, если только не подвергнуть их дальнейшей дифференцировке. Уровень активности Ki-67 также позволял следить за качеством (общим состоянием и пригодностью) культур выделенных человеческих клеток-предшественников сетчатки. Тубулин  $\beta 3$  является маркером развития в нейроны; обнаружено, что он умеренно экспрессируется в культурах, предположительно нейрального направления дифференцировки и потенциально способных дифференцироваться в нейроны. Поскольку образование нейронов исчезает после большого числа пассажей, экспрессия этого маркера может служить подтверждением сохранения полипотентности культур. GFAP - это маркер, обычно связанный с глиальной дифференцировкой, в особенности астроцитов, хотя он также экспрессируется мюллеровскими клетками сетчатки после ряда изменений или в культуре. Низкий относительный уровень экспрессии GFAP отражает скорость спонтанной дифференцировки в глиальные клетки и помогает подтвердить сохранение полипотентности культур. Однако известно, что GFAP также экспрессируется в незрелых предшественниках. GDNF - нейротрофический фактор, связанный с восстановлением нейронов, включая фоторецепторы, в некоторых моделях на животных; в популяциях человеческих клеток-предшественников сетчатки, выделенных, как описано в настоящем документе, этот фактор может экспрессироваться по иммуноцитохимическим данным, однако отрицательные результаты твердофазного иммуноферментного анализа указывают на то, что этот фактор не обязательно секретируется. Для опосредованного клетками-предшественниками сетчатки восстановления фоторецепторов важнее, вероятно, еще какие-то факторы.

Человеческие клетки-предшественники сетчатки можно отличить от фибробластов по экспрессии маркеров на уровне РНК. На фиг. 20 показана теплокарта по данным количественной ПЦР, демонстрирующая, что маркер виментин интенсивно экспрессируется в человеческих клетках-предшественниках сетчатки, но не в фибробластах; кроме того, выявляются динамические изменения относительного профиля экспрессии с течением времени культивирования. Фиг. 21А-21С показывает результаты количественной ПЦР в эксперименте, в котором сравнивались человеческие клетки-предшественники сетчатки и фибробласты и расширялось выявление маркеров. Идентифицировано множество генов, экспрессия которых сильнее в клетках-предшественниках сетчатки (AQP4, CD133, GFAP, MAP2, MASH1, нестин, Notch1, рековерин, SIX6, SOX2), и один (KLF4), экспрессия которого слабее (соответственно сильнее в фибробластах). Уровни экспрессии варьируют с течением времени культивирования, но относительное превалирование в клетках разных типов, по-видимому, довольно постоянное. На фиг. 22 представлен список из 11 генов (из профиля по приблизительно 26 генам), которым свойственно постоянное соотношение уровней экспрессии в человеческих клетках-предшественниках сетчатки и в фибробластах в материале от разных доноров. Гены, "ведущие себя" одинаково в клетках всех трех доноров, выделены желтым цветом - это KLF4 (уровень экспрессии в клетках сетчатки меньше, чем в фибробластах) и GFAP, MAP2, нестин, рековерин, SIX6 и SOX2 (уровень экспрессии в клетках сетчатки больше, чем в фибробластах).

Уровни экспрессии выбранных маркеров отслеживали как функцию времени культивирования путем количественной ПЦР в реальном времени. Как показано на фиг. 23, у маркеров с высоким уровнем экспрессии этот уровень со временем становится ниже пикового. Например, уровень экспрессии Ki-67 со временем падает, что согласуется со статусом клеток, являющихся предшественниками, и отсутствием иммортализации. Экспрессия MHC и GDNF несколько возрастает с течением времени культивирования. Определяли изменения уровней экспрессии маркеров на ранних пассажах клеток по сравнению с поздними пассажами; результаты представлены на фиг. 24. На поздних пассажах наиболее существенно снижается экспрессия генов клеточного цикла и фактора транскрипции Six6, важного для развития сетчатки. Напротив, уровень экспрессии нейропротективного фактора GDNF на поздних пассажах возрастет, возможно, в результате клеточного стресса.

На фиг. 25 суммированы данные микрочипов, отличающие клетки-предшественники сетчатки (человеческие) от нейральных стволовых клеток (клеток-предшественников мозга). Результаты анализа методом главных компонент демонстрируют четкое разделение групп данных по сетчаточным (3) и мозговым (3) клеткам-предшественникам; таким образом, по транскриптому клетки-предшественники сетчатки как тип клеточной популяции можно отличить от клеток аналогичных типов, происходящих из мозга. Точечная диаграмма типа "вулкан" показывает основу этой разницы: в клетках-предшественниках сетчатки по сравнению с клетками-предшественниками мозга значительно выше уровень почти 1000 транскриптов и значительно ниже уровень примерно 600 транскриптов. Это сравнение далее проводили, построив дендрограммы для транскриптов согласно генным категориям, и идентифицированы специфич-

ные гены. Например, уровень экспрессии BHLHE41 (члена e41 основного семейства факторов транскрипции с доменом "спираль-петля-спираль") в клетках-предшественниках сетчатки высокий, а в клетках-предшественниках мозга - низкий. Этот ген кодирует фактор транскрипции подсемейства HES (Hairy Enhancer of Split) основного семейства факторов транскрипции с доменом «спираль-петля-спираль», кодируемый им белок действует как репрессор транскрипции. К числу других факторов транскрипции, уровень экспрессии которых в клетках-предшественниках сетчатки выше, чем в клетках-предшественниках мозга, относятся HHEX, SOX3 и SOX13, HOXB2, LHX2, KLF10, TLE4, MYCBP, TFAP2A, FOSL1 и 2, FOXD1, NHLH1, GBX2, NEUROD, MET и др. Что касается сигнальных молекул, то, как показано, в клетках-предшественниках сетчатки множество транскриптов экспрессируется на значительно более высоких уровнях, чем в клетках-предшественниках мозга/нейральных стволовых клетках, включая WNT5A и B, KDR, LIF, CALB1, RGS4, CAV2, IL11, IL1R1, IL1RAP, IL4R, IL21R, CXCL6 и 12, CXCR7, DKK1, HBEGF, SMAD7, BMP2 и др. Сходным образом уровни экспрессии генов межклеточного матрикса (фибронектина, LUM, ALCAM, TGFBI, ECM1, PARVA, а также коллагенов 4A1, 4A2, 5A1, 5A2, 7A1, 9A2, 13A1, 18A1 и ряда других) выше в клетках-предшественниках сетчатки.

Были проведены эксперименты по изучению экспрессии маркеров в человеческих клетках-предшественниках сетчатки после дифференцировки с ретиновой кислотой; их результаты представлены на фиг. 26. Сравнивали генетический профиль человеческих клеток-предшественников сетчатки, растущих в стандартной культуральной среде для пролиферации (SM) и в условиях дифференцировки под влиянием ретиновой кислоты (SM без факторов роста + ретиновая кислота). Уровни экспрессии маркера пролиферации Ki-67 и виментина снижались, а гена-супрессора опухолей возрастал, наряду с такими маркерами направления дифференцировки, как APL-1, MAP2, NRL, CRALBP, GFAP и реверин. возрастание уровней экспрессии как глиальных, так и нейронных маркеров согласуется с полипотентностью культивируемых популяций клеток-предшественников сетчатки. Другие маркеры, которые можно использовать, осуществляя данное изобретение для идентификации человеческих клеток-предшественников сетчатки, описаны в патенте США № 7419825.

Сравнивали также генную экспрессию в человеческих клетках-предшественниках сетчатки, культивируемых в гипоксических условиях и при атмосферном содержании кислорода (фиг. 27). Полученные данные свидетельствуют, что имеют место заметные изменения генной экспрессии; при этом усиливается экспрессия маркеров клеточной поверхности CD9 и CD73, но в целом уровни экспрессии генов по большей части снижаются, включая ген-супрессор опухолей p21, а также маркеры направления дифференцировки CRALBP, GFAP, MAP2, NRL и реверин. Эти изменения вполне согласуются с тем, что экспрессия генов, не являющихся жизненно важными, ослабевает по мере пролиферации в длительной культуре в таких перmissive условиях. Отметим, что уровень экспрессии GDNF тоже снижается, вероятно, в связи со снижением потребности в аутокринном механизме нейропротекции.

Изучали различия в генной экспрессии в человеческих клетках-предшественниках сетчатки от разных доноров и растущих в различных культуральных средах и в разные моменты времени культивирования; результаты этих экспериментов показаны на фиг. 28-30. В эксперименте, представленном на фиг. 28A, методом количественной ПЦР определяли экспрессию генов в условиях среды SM в различные моменты времени; фиг. 28B изображает генную экспрессию (определяемую путем количественной ПЦР) в клетках, которые росли в условиях смены среды (сначала UL, затем SM), в различные моменты времени; фиг. 29A изображает генную экспрессию (определяемую путем количественной ПЦР) в клетках, которые росли в условиях другой смены среды (сначала SM+FBS, затем SM) в различные моменты времени. Фиг. 29B изображает генную экспрессию (определяемую путем количественной ПЦР) в клетках, которые росли в условиях среды только SM в два разных момента времени. У большинства изученных маркеров экспрессия ослабевала с течением времени культивирования, но у некоторых оставалась на более или менее одном уровне. Отметим, что из этих маркеров только у DNF экспрессия усиливалась с течением времени культивирования. Фиг. 29C изображает генную экспрессию (определяемую путем количественной ПЦР) в клетках, которые росли сначала в среде SV +FBS, а затем в только SM, в те же два момента времени. Как видно на фиг. 29B, только у GDNF уровень экспрессии повышался. На фиг. 30 эти сравнения суммированы.

Количественную ПЦР применяли для дальнейшего изучения признаков человеческих клеток-предшественников сетчатки в связи с сигнальными путями факторов роста и относительной экспрессии секретируемых факторов. Специфичные панели включали сигнальные пути ангиогенеза и WNT. Клетки, которые использовались в этих экспериментах, происходили из кратковременно пассируемых человеческих клеток-предшественников сетчатки, растущих при "нормальном" (атмосферном - 20%) содержании кислорода и в гипоксических (3% кислорода) условиях; из рабочего банка клеток, включавшего длительно пассируемые человеческие клетки-предшественники сетчатки, растущие в гипоксических условиях; или из ткани эмбриональной сетчатки человека в день 0 (день взятия образца ткани у донора), что представляет исходное происхождение человеческих клеток-предшественников сетчатки. Для сравнения брали клетки пигментного эпителия эмбриональной сетчатки человека (RPE) и человеческие эмбриональные фибробласты.

На фиг. 31 представлена теплокарта по данным количественной ПЦР для сигнальных путей факто-

ров роста. Каждая вертикальная колонка отвечает определенному типу клеток или условиям обработки. Для сравнения служили человеческие эмбриональные клетки пигментного эпителия сетчатки и фибробласты (первые две колонки), три правых колонки представляют человеческие клетки-предшественники сетчатки. Цитокин с заметно высокой экспрессией в двух из трех пулов человеческих клеток-предшественников сетчатки, но не экспрессирующийся клетками пигментного эпителия сетчатки или фибробластами, - это SPP1 (остеопонин, OPN), который представляется первым кандидатом на участие в трофическом механизме действующего фактора. Еще один кандидат - плейотропин (PTN), уровень экспрессии которого также высокий, хотя этот фактор, по-видимому, менее специфичный, чем SPP1 (OPN). К числу потенциальных кандидатов по этим данным (в смысле уровня экспрессии) относятся также мидкин (MDK), TGFB1 (TGF $\beta$ 1), JAG1, VEGFA (VEGF A), фосфолипидкиназа 1 (PGK1); и можно привести доводы в той или иной степени для других, а именно GDF11, DKK1, пептидилпролилизомеразы A (PPIA), LIF, и др. в зависимости от принятого критерия. Кроме того,  $\beta$ 2-микроглобулин, относящийся к белкам МНС класса I, не является собственно цитокином, но интенсивно экспрессируется в человеческих клетках-предшественниках сетчатки.

Что касается специфичности, то полученные методом иерархического кластерного анализа дендрограммы показывают, что все перечисленные факторы - от фактора роста, связывающего гепарин и podobного эпидермальному фактору роста (HBEGF), JAG1 до SPP1 (OPN) - обладают общей специфичностью в отношении человеческих клеток-предшественников сетчатки по сравнению с клетками пигментного эпителия и фибробластами и, следовательно, могут давать вклад в эффект гетерогенного "коктейля". Сюда входит плейотропин (PTN), а также низкие уровни интерлейкина 1 $\beta$  (IL1B). Возможно также, что 20% MCB (исходного банка клеток) обладают максимальной трофической эффективностью и в таком случае интерес представляют факторы, перечисленные от MDK до LEFTY2. Определяли также убиквитин C (UBC). Известно, что в развитии сетчатки играют роль некоторые из этих генов, включая GDF11, lefty, nodal, DKK1, LIF и др. Известно, что многие из этих факторов имеют нейротрофическое значение, в том числе SPP1, NTF3, HB-EGF или связаны с нейральным направлением развития, например мидкин, нейрегулины (NRG1, 3), JAG и др.

Иной взгляд на результаты количественной ПЦР по сигнальным путям факторов роста дает гистограмма, изображенная на фиг. 32. Для сравнения использовали человеческие эмбриональные клетки пигментного эпителия сетчатки. В количественном отношении с точки зрения уровня экспрессии секретируемые продукты генов, характеризовавшихся особенно высокими уровнями экспрессии в человеческих клетках-предшественниках сетчатки, включали FGF9, GDF10, интерлейкин 1 $\alpha$  (IL-1A), PTN и SPP1 (остеопонин - OPN). Все эти гены, как оказалось, группируются в относительно специфичном для человеческих клеток-предшественников сетчатки кластере теплокарты и поэтому считаются кандидатами на участие в трофических механизмах. Другие гены - с более низкими, но все же достаточно высокими уровнями экспрессии - включают BMP2, FGF7,13,14, Lefty1,2, nodal, NTF3, тромбопоэтин и, возможно, VEGF A, C. К числу генов, уровни экспрессии которых в человеческих клетках-предшественниках сетчатки ниже, чем в клетках пигментного эпителия, относятся гены JAG2, NGF, ингибина  $\beta$  B (INHBB) и интерлейкина-10 (IL-10).

Клетки-предшественники сетчатки активны до и в течение периода формирования сосудов сетчатки, соответственно, можно ожидать, что они играют роль в ангиогенезе, особенно по мере того, как начинают дифференцироваться. Факторы и рецепторы, участвующие в молекулярных сигнальных путях, регулирующих ангиогенез, могут также играть нейротрофическую роль в дегенерирующей сетчатке. Кроме того, активация или подавление этих сигнальных путей, возможно, важны при различных состояниях сетчатки, включая возрастную атрофию, что может приносить пользу либо оказываться нежелательным побочным эффектом.

У всех генов, показанных на фиг. 33A, уровни экспрессии были выше по сравнению с клетками пигментного эпителия по крайней мере с кратностью 10. Гены, уровни экспрессии которых были выше с кратностью более 100, включали ген рецептора с инсерцией киназного домена (KDR) фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), хондромодулина/LECT1 (только в гипоксических условиях), ген фактора транскрипции PROX1 и рецептора тирозинкиназы TEK (TIE2). Наивысший (по сравнению с клетками пигментного эпителия) уровень экспрессии был у гена плейотропина (PTN) - кратность более 10000 для человеческих клеток-предшественников сетчатки в гипоксических условиях и почти такой же в условиях нормального (атмосферного) содержания кислорода.

Были обнаружены четкие свидетельства усиленной экспрессии генов, связанных с ангиогенезом, и дополнительное подтверждение высоких уровней экспрессии плейотропина (PTN) - одного из первых кандидатов на роль трофического фактора. Подтвердилось также повышение уровней экспрессии маркеров клеточной поверхности KDR и TEK, идентифицированных ранее. Оказалось, что уровень экспрессии KDR-рецептора VEGF неизменно повышен в клетках-предшественниках сетчатки по сравнению с клетками других типов. Результаты микроматричного анализа также продемонстрировали 80-кратное превышение уровня экспрессии KDR в клетках-предшественниках сетчатки по сравнению с клетками-предшественниками мозга у человека, а у свиньи - 106-кратное. Следовательно, такой маркер клеточной

поверхности, как KDR может быть полезным для идентификации и обогащения клеток-предшественников сетчатки, он позволяет отличить эти клетки от мозговых предшественников (нейральных стволовых клеток) и представляется весьма важным для функции сетчаточных клеток-предшественников.

Считается, что сигнальный путь WNT важен для нейрального направления клеточного развития, включая дифференцировку нейронов и глиальных клеток во всей центральной нервной системе, в том числе в сетчатке. Ранее в геномных исследованиях были получены существенные свидетельства активности сигнального пути WNT в человеческих клетках-предшественниках сетчатки, на которую указывают уровни экспрессии генов, связанных с этим путем, включая гены *wnt*, гены *fz* ("fizzled" рецепторов) и фактора, подавляющего WNT (WIF). Как видно на фиг. 33B, уровни экспрессии всех показанных здесь генов превышают соответствующие показатели для клеток пигментного эпителия по меньшей мере в 10 раз. Гены, уровни экспрессии которых выше более чем в 100 раз, включают FRZB, SFRP4 (в условиях нормальной концентрации кислорода), TLE2 (только в гипоксических условиях) и WNT7B (в условиях нормальной концентрации кислорода). Уровни экспрессии генов SFRP4 (в гипоксических условиях) и WNT7B (в гипоксических условиях) выше более чем в 1000 раз. Ген WIF1 (только в гипоксических условиях) характеризовался кратностью изменения уровня экспрессии ~10,000.

Итак, путем микроматричного анализа получены четкие данные об экспрессии генов сигнального пути WNT, включая гены, имеющие отношение к его подавлению. Ранее результаты микроматричного анализа продемонстрировали, что WIF1 предпочтительно экспрессируется в человеческих клетках-предшественниках сетчатки, где его уровень экспрессии превышает таковой в клетках-предшественниках мозга в 45 раз. Выраженное превышение уровней экспрессии SFRP4 и в особенности WIF1 (вероятно, оба в результате активации FRZB), по-видимому, характерно для клеток-предшественников сетчатки человека, растущих в гипоксических условиях. Это связано со способностью таких клеток лучше сохранять жизнеспособность в незрелом состоянии и дольше пролиферировать при низкой концентрации кислорода; тем самым значительно увеличивается выход этих обычно с трудом культивируемых клеток. Представленные выше данные, полученные путем количественной ПЦР, важным образом согласуются с результатами микроматричного анализа. Они показали, что ген фактора ингибирования лейкозных клеток (LIF) предпочтительно экспрессируется в человеческих клетках-предшественниках сетчатки, где его уровень экспрессии превышает таковой в клетках-предшественниках мозга в 65 раз, ген HB-EGF в 30 раз, гена Dickkopf-1 (DKK1) - в 23 раза, остеопонина (SPP1, OPN) - в 6 раз, TGF- $\beta$ 1 и BMP2- в 5 раз и JAG1 - в 3 раза. Каждый из этих генов дает вклад в состав/специфику человеческих клеток-предшественников сетчатки в сравнении с аналогичными клетками (стволовыми/предшественниками) мозга (нейральными стволовыми клетками); то же относится в еще большей степени к гену KDF (кратность 80) и WIF (кратность 45).

Рассмотрение данных микроматричного анализа методом главных компонент показывает, что возможно различать клеточные популяции (обладающие терапевтическим эффектом, не обладающие им/контрольные) на основе тотальной картины генной экспрессии. Это также касается характеристики человеческих клеток-предшественников сетчатки, позволяя определить, насколько близки сравниваемые образцы и в какой мере возраст (время культивирования) и условия культивирования (нормальная или пониженная концентрация кислорода) влияют на картину экспрессии.

У эмбрионов брали в один и тот же день три пары глаз (биологические копии) и выделяли РНК (в день 0) из сетчатки; этот же материал использовали для культивирования клеток-предшественников сетчатки (в условиях нормальной и пониженной концентрации кислорода), а также фибробласты склеры. Из культивируемых клеточных популяций затем выделяли РНК и со всеми образцами РНК одновременно проделывали микроматричный анализ.

На фиг. 34 представлены результаты анализа методом главных компонент, которые ясно показывают, что клетки-предшественники сетчатки отличаются по генной экспрессии от эмбриональной ткани сетчатки, из которой они происходят, а также от фибробластов склеры, причем к сетчаточным эмбриональным клеткам они ближе, чем к фибробластам. Кроме того, различаются картины экспрессии в условиях нормальной концентрации кислорода и в гипоксических условиях, но здесь наблюдается некая непрерывность перехода от более молодых клеток на одном "полюсе" к более старым клеткам на другом. На фиг. 35 видно, что человеческие клетки-предшественники сетчатки четко отличаются от ткани сетчатки (P0), из которой они происходят.

Влияние продолжительности культивирования явствует из того факта, что самые старые клетки (рабочий банк клеток, гипоксические условия) отличаются от других, более молодых образцов. Разница между условиями нормальной концентрации кислорода и гипоксическими условиями не дает четкого разделения.

Был проведен полногеномный микроматричный анализ с целью охарактеризовать состав человеческих клеток-предшественников сетчатки относительно клеток других типов, включая отличия от той ткани, из которой эти клетки происходят (эмбриональная сетчатка) и от аналогичных клеток, но макроскопически дезорганизованных и опасно онкогенных, а именно клеток ретинобластомы. Также было предпринято исследование с целью определить сходство и различия между культурами человеческих

клеток-предшественников сетчатки, растущих при нормальной и при пониженной концентрации кислорода. Тотальную генную экспрессию в клеточных популяциях сравнивали, используя чипы Affymetrix Human Gene Array.

Метод главных компонент позволяет получить трехмерную визуализацию общего сходства и различий между клеточными популяциями (см. фиг. 34С). Сходные образцы группируются вместе (все одного цвета, все в трех повторях), что демонстрирует надежность данных. При сравнении эмбриональной сетчатки (на чертеже - "сетчатка") с четырьмя образцами человеческих клеток-предшественников сетчатки очевидны четкие отличия. Образцы клеток-предшественников сетчатки несколько различались в связи с разными условиями обработки, но они заметно отличались от зрительных клеток других изученных типов, а именно клеток эмбрионального пигментного эпителия (RPE), эмбриональных фибробластов (FB) и ретинобластомных клеток (RB). На чертеже можно провести линию, отделяющую нейральную сетчатку и клетки, происходящие из нее (слева) от ненейральных сетчаточных клеток (вверху справа). Наконец, на этом чертеже человеческие клетки-предшественники сетчатки, культивируемые при нормальной и при пониженной концентрации кислорода, находятся относительно недалеко друг от друга, так что, хотя их и можно различить, они, по-видимому, очень близки. Эти данные согласуются с ранее полученными данными касательно относительного сходства/различий между клетками указанных типов. На фиг. 35 представлены результаты кластерного анализа трех популяций человеческих клеток-предшественников сетчатки (в порядке представления: исходный банк клеток, гипоксические условия; исходный банк клеток, нормальная концентрация кислорода; рабочий банк клеток, гипоксические условия) в сравнении с клетками эмбриональной сетчатки (три повтора для каждой популяции). На фиг. 36 представлена точечная диаграмма типа "вулкан", показывающая результаты экспериментов по сравнению ткани и клеток исходного банка в гипоксических условиях. Эти данные демонстрируют, что популяции человеческих клеток-предшественников сетчатки отличимы от популяций исходной ткани. За немногочисленными исключениями те гены, которые показаны красным цветом для ткани (справа), для клеток-предшественников сетчатки зеленые и наоборот.

На фиг. 37А показано число генов, по-разному экспрессирующихся в разных группах человеческих клеток-предшественников сетчатки, в связи с условиями обработки (для сравнения служила ткань эмбриональной сетчатки). Большинство различий приходится на изменения по сравнению с тканью (11706, в центре, серый цвет), которые общие для популяций клеток-предшественников сетчатки, тогда как по периферии диаграммы видны отдельные перекрытия и различия. В каждой популяции человеческих клеток-предшественников сетчатки экспрессировалось приблизительно 1300-2100 различных генов. Число генов, по-разному экспрессирующихся в разных группах человеческих клеток-предшественников сетчатки измеряли как функцию пассирования и условий обработки (см. фиг. 37В). Сравнивали также клетки, культивируемые при нормальной концентрации кислорода. Клетки исходного банка, растущие в гипоксических условиях, меньше отличались от таких же клеток, растущих в условиях нормального содержания кислорода (одинаковое число пассажей), чем от клеток рабочего банка, растущих в гипоксических условиях (более поздние пассажи). Таким образом, продолжительность культивирования заметно влияет на генную экспрессию в человеческих клетках-предшественниках сетчатки, хотя и гораздо меньше, чем влияет тип клеток; разница между этими клетками и тканью, из которой они происходят также больше.

На фиг. 38А и 38В представлены точечные диаграммы типа "вулкан", демонстрирующие отличие разных человеческих клеток-предшественников сетчатки от ткани, из которой они происходят, а аналогичные графики на фиг. 39А и 39В сравнивают человеческие клетки-предшественники сетчатки, растущие в гипоксических условиях и в условиях нормальной концентрации кислорода. На диаграммах типа "вулкан" каждый ген изображается точкой, координаты которой соответствуют кратности изменения уровня его экспрессии (по оси абсцисс, повышенные уровни справа, пониженные - слева) и статистической значимости (функция значения  $p$  по оси ординат), что позволяет сразу видеть, как много генов изменяются по уровню экспрессии, насколько и в каком направлении (повышается уровень экспрессии или понижается). Эти результаты свидетельствуют, что при сравнении ткани с клетками-предшественниками изменяется экспрессия большего числа генов, чем при сравнении клеток-предшественников, растущих в разных условиях. В первом случае генов, экспрессия которых ослабевает, больше, чем тех, у которых она возрастает предположительно потому, что в ткани присутствуют более дифференцированные клетки, которые утрачиваются в культуре или вытесняются клетками более примитивными, интенсивнее пролиферирующими. А при сравнении клеток-предшественников, растущих в условиях разной концентрации кислорода, при низком содержании кислорода экспрессия усиливается у большего числа генов, чем уменьшается.

Также методом микроматричного анализа исследовались конкретные гены и сигнальные пути. Сравнивали человеческие клетки-предшественники сетчатки, эмбриональную ткань сетчатки (день 0) и человеческие эмбриональные фибробласты (в условиях нормального содержания кислорода). Уровень экспрессии аденомедулина в клетках-предшественниках сетчатки был выше, чем в ткани. Уровень экспрессии плейотропина в клетках-предшественниках сетчатки был выше, чем в ткани и в фибробластах. Уровень экспрессии остеопонина в клетках-предшественниках сетчатки был выше, чем в фиброб-

ластах. Было также обнаружено, что в клетках-предшественниках сетчатки выше активность сигнальных путей ангиогенеза. Уровень экспрессии ангиопоэтина в клетках-предшественниках сетчатки был выше, чем в ткани и в несколько меньшей степени, чем в фибробластах. Уровень экспрессии подобного ангиопоэтина белка 4 (ANGPTL4) в клетках-предшественниках сетчатки в 30-60 раз выше, чем в ткани и примерно в 20 раз выше, чем в фибробластах. Уровень экспрессии BA13 (ингибитора) в клетках-предшественниках сетчатки примерно в 30 раз ниже, чем в ткани. Уровень экспрессии тромбоспондина 1 в клетках-предшественниках сетчатки примерно в 100 раз выше, чем в ткани; уровень экспрессии тромбоспондина 2 в клетках-предшественниках сетчатки примерно в 40 раз выше, чем в ткани. Уровень экспрессии матриксной металлопептидазы 1 в клетках-предшественниках сетчатки примерно в 200 раз выше, чем в ткани. Уровень экспрессии нейрокана (NCAN - протеогликан, участвующий в клеточной адгезии) в клетках-предшественниках сетчатки в 16-21 раз ниже, чем в ткани. Определяли также экспрессию онкогенов/генов, связанных с пролиферацией MYC, MYCN и NBL1. Уровень экспрессии MYC в клетках-предшественниках сетчатки в 8-9 раз выше, чем в ткани, что согласуется с пролиферацией этих клеток. Уровень экспрессии MYCN (связанный с v-тус, нейробластомный) в клетках-предшественниках сетчатки в 25-40 раз ниже, чем в ткани. Уровень экспрессии NBL1 ниже в 3-4 раза. В клетках-предшественниках сетчатки, как правило, в 2-4 раза выше, чем в ткани, уровень экспрессии большого набора митохондриальных/метаболических генов, включая мембранные белки-переносчики  $H^+$ -АТФ-синтазу и семейство SLC 25, однако уровень экспрессии SLC25A27 (27-го члена этого семейства) примерно в 20 раз ниже. Эти данные согласуются с представлением о том, что культивируемые клетки-предшественники сетчатки человека метаболически более активны и интенсивнее пролиферируют, чем клетки эмбриональной ткани сетчатки, из которой они происходят.

Изучали также экспрессию факторов роста. Уровень экспрессии фактора роста соединительной ткани (CTGF) в клетках-предшественниках сетчатки значительно (более чем в 70 раз) выше, чем в ткани. Уровень экспрессии фактора, ингибирующего лейкозные клетки (LIF) в клетках-предшественниках сетчатки тоже в несколько десятков раз выше, чем в ткани. Уровни экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF) и эпидермального фактора роста в клетках-предшественниках сетчатки умеренно (в 2-14 раз) выше, чем в ткани. Уровень экспрессии цилиарного нейротрофического фактора (CNTF) в клетках-предшественниках сетчатки примерно в 25 раз ниже, чем в ткани. Подтвердилось, что уровень экспрессии фактора роста фибробластов (FGF9), который на основании ранее полученных данных считался кандидатом на роль трофического фактора, в клетках-предшественниках сетчатки в 4-6 раз выше, чем в фибробластах, но в 14-25 раз ниже, чем в ткани. В семействе факторов роста фибробластов белок FGF5 характеризуется наибольшим превышением (в 20-40 раз) уровня экспрессии в клетках-предшественниках сетчатки по сравнению с тканью, но по сравнению с фибробластами его экспрессии слабее. Белок FGF14 характеризуется максимально в этом семействе пониженным (в 16-38 раз) уровнем экспрессии в клетках-предшественниках сетчатки по сравнению с тканью. Уровень экспрессии фактора роста гепатоцитов (HGF) в клетках-предшественниках сетчатки в 30 раз ниже, чем в ткани. Представители семейства белков, связывающих инсулиноподобные факторы роста, а именно IGFBP3, -5 и -7, в клетках-предшественниках сетчатки, как правило, экспрессируются интенсивнее, чем в ткани. Уровни экспрессии этих трех белков значительно (в 15-110 раз) выше, причем наибольшее превышение установлено для IGFBP3 и 5, особенно в гипоксических условиях (исходный и рабочий банки клеток). Нейротрофин-3 (NTF3), считающийся кандидатом на роль фактора роста, в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировался не больше, чем в ткани, но при нормальном содержании кислорода уровень его экспрессии в этих клетках в 8 раз превышал таковой в фибробластах. Уровень экспрессии нейротрофического рецептора тирозинкиназы типа 2 (NTRK2) в клетках-предшественниках сетчатки, растущих в гипоксических условиях, был умеренно выше, чем в ткани, и значительно выше и в гипоксических и в нормальных условиях, чем в фибробластах (в 50-180 раз). Еще один кандидат на роль трофического фактора - фактор роста C, происходящий из тромбоцитов, (PDGFC) в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировался в 20 раз интенсивнее, чем в ткани. Уровень экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA) был умеренно повышен в клетках-предшественниках сетчатки, растущих в гипоксических условиях. Уровень экспрессии ядерного белка DACH1 в клетках-предшественниках сетчатки был умеренно выше, чем в фибробластах, но значительно ниже, чем в ткани. Синаптический маркер DLG2 в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировался значительно слабее, чем в ткани. Из семейства белков KLF уровень экспрессии KLF4 в клетках-предшественниках сетчатки был в 3-4 раза ниже, чем в фибробластах, а KLF5 в 4-5 раз выше, чем в ткани.

Фактор транскрипции NeuroD1, связанный с дифференцировкой, в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировался значительно (более чем в 300 раз) слабее, чем в ткани, так же как NeuroD4 и нейрогенины 1 и 2; нейронатин экспрессировался в 2-10 раз слабее. Фактор NOG, или noggin, который связан с определением направления дифференцировки, в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировался в 10-21 раз интенсивнее, чем в ткани. Глазной фактор транскрипции OTX2 в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировался значительно слабее, чем в ткани. Глазные факторы транскрипции PAX6, SIX3, SIX6, RAX, RAX2 в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировались умеренно слабее, чем в ткани. Известно, что PAX6 экспрессируется, по меньшей мере, в некоторых клетках-

предшественниках сетчатки.

Экспрессия даблкортина (DCX), являющегося постмитотическим маркером нейробластов, и рилина (RELN), характерного для нейробластов белка, необходимого для миграции клеток, в клетках-предшественниках сетчатки была существенно слабее, чем в ткани (рилины - при пониженном содержании кислорода). Фактор транскрипции SOX2, важный для нейрального развития в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировался так же, как в ткани, но гораздо интенсивнее (более чем в 100 раз), чем в фибробластах. Белок Bassoon (BSN), характерный для синапсов зрелой сетчатки, и реоверин - маркер зрелых клеток сетчатки в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировались значительно (в 20 и 50-450 раз соответственно) слабее, чем в ткани.

Гликопротеин клеточной поверхности CD44 в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировался в 6 раз интенсивнее, чем в ткани. Хемокин CCL2 (MCP-1) в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировался значительно (в 68-105 раз) интенсивнее, чем в ткани. CXCL12 (SDF-1), являющийся лигандом CXCR4 (неспецифического маркера поверхности клеток-предшественников сетчатки), в этих клетках экспрессировался слабее, чем в фибробластах, но его уровень экспрессии, хотя и низкий (по данным твердофазного иммуноферментного анализа), был в 4012 раз выше, чем в ткани. CXCR4, являющийся маркером поверхности клеток-предшественников сетчатки, в этих клетках экспрессировался явно интенсивнее, чем в фибробластах. Сравнение с тканью интересно тем, что клетки исходного банка при нормальной концентрации кислорода характеризовались более низким уровнем экспрессии CXCR4, чем ткань, а в гипоксических условиях разницы не было. Это подтверждает, что и при нормальном, и при пониженном содержании кислорода в клетках-предшественниках сетчатки экспрессируется CXCR4, причем в гипоксических условиях уровень его экспрессии выше и сходен с таковым в ткани сетчатки.

Уровень экспрессии интерлейкинов IL-11 и IL-18 в клетках-предшественниках сетчатки был выше, чем в ткани. Уровень экспрессии IL-1A (IL-1 $\alpha$ ) в клетках-предшественниках сетчатки был выше, чем в ткани, но не в случае клеток исходного банка в гипоксических условиях. Ряд рецепторов интерлейкинов в клетках-предшественниках экспрессировался интенсивнее, чем в ткани, наиболее заметно IL-7R (в 60-105 раз), IL-31RA (в 28-80 раз) и IL-4R (в 18-40 раз). Все они представляются потенциальными положительными маркерами для человеческих клеток предшественников сетчатки, отличающих их от исходной ткани.

Гены сигнального пути WNT, уровень экспрессии которых в клетках-предшественниках был выше, чем в ткани, включают некоторые из генов, ранее идентифицированных путем количественной ПЦР, в том числе WNT7B и SFRP4. Также уровень экспрессии в клетках-предшественниках был выше, чем в ткани, у DKK2, FZD6 SFRP1, WNT5A. В клетках-предшественниках WIF1 экспрессировался интенсивнее, чем в фибробластах (в гипоксических условиях), но значительно слабее, чем в ткани (при нормальном содержании кислорода). Гены сигнального пути Notch экспрессировались в клетках-предшественниках слабее, чем в ткани, или также, за исключением Jag1, который представляется кандидатом на роль трофического фактора для клеток-предшественников сетчатки, он экспрессировался в них интенсивнее, чем в ткани в 8-13 раз. Самая большая разница уровней экспрессии "в пользу" ткани наблюдалась у DLL4 и HEYL.

Гены JAK-STAT в клетках-предшественниках экспрессировались умеренно (в 2-5 раз) и одинаково слабее, чем в фибробластах, кроме STAT3, уровень экспрессии которого в клетках-предшественниках в гипоксических условиях был такой же, как в фибробластах. По сравнению с тканью уровень экспрессии этих генов не изменен. Что касается генов апоптоза, то для них картина смешанная. Наибольшее превышение уровня экспрессии в клетках-предшественниках по сравнению с тканью наблюдалось для GADD45B. Наибольшая отрицательная ("в пользу" ткани) разница (в 20-56 раз) отмечалась для GADD45G и DAPL1. BMP2 (кандидат) в клетках-предшественниках экспрессировался интенсивнее, чем в фибробластах, но так же, как в ткани. Другие гены BMP, как правило, в клетках-предшественниках экспрессировались слабее, чем в фибробластах и так же, как в ткани. Уровень экспрессии генов трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ) был везде одинаковый.

Уровень экспрессии фактора транскрипции HIF1A (HIF1 $\alpha$ ) в клетках-предшественниках был умеренно (в 4 раза) ниже, чем в ткани. Уровни экспрессии нейрофилина 1 и, особенно, 2 в клетках-предшественниках (кроме клеток исходного банка в гипоксических условиях) были выше, чем в ткани. Уровень экспрессии не чувствительного к рапамицину спутника mTOR (Rictor) в клетках-предшественниках был умеренно (в 2 раза) ниже, чем в ткани. Толл-подобные рецепторы (TLR) 3-7 и 9 в клетках-предшественниках экспрессировались так же, как в ткани. Даблкортин (DCX) в клетках-предшественниках экспрессировался значительно ниже, чем в ткани, так же, как и в меньшей степени ряд других нейральных маркеров; даблкортину "уступает" только нейрексин 1 (NRXN1) с кратностью >25. Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) в клетках-предшественниках сетчатки экспрессировался явно интенсивнее, чем в фибробластах, и не так явно интенсивнее в эмбриональной ткани сетчатки. Многие гены, ассоциированные с сетчаткой, в клетках-предшественниках экспрессируются значительно слабее, чем в исходной ткани эмбриональной сетчатки. В их числе - CRX, EYS, IMPG1, 2; NRL, ген реоверина, RGR, RP1 и VSX1, 2. Из 98 изученных малых некодирующих РНК (SNORD) почти все в

клетках-предшественниках присутствовали в меньшем, иногда значительно меньшем количестве, чем в ткани, за исключением 114-6, 49B, 75 и 78, причем количества 114-2, 44, 49A, 74, 79, 96A варьировали в различных условиях, впрочем, превышение по сравнению с тканью, если и было, то незначительное.

Итак, полученные данные свидетельствуют, что CTGF является маркером человеческих клеток-предшественников сетчатки и может быть полезен для определения трофического механизма, лежащего в основе терапевтической эффективности. Другие маркеры включают SPP1 (OPN), PTN, LIF, FGF9, JAG1, IL-1A, IL-11, IL-18 и noggin. Рецептор нейротрофина NTRK2 является маркером поверхности указанных клеток, так же как IL7R, IL-31RA и IL-4R. Отметим, что HGF, по-видимому, может служить отрицательным маркером этих клеток или же его можно использовать для выявления примесей клеток других типов. Для того чтобы отличать культивируемые человеческие клетки-предшественники сетчатки от ткани, из которой они происходят, также ценен факт сниженных по сравнению с тканью уровней экспрессии глазных факторов транскрипции DACH1, OTX2, CRX, NRL, VSX1, 2 факторов транскрипции, важных для клеточной дифференцировки NeuroD1 и 4, постмитотического маркера нейробластов даблкортина (DCX), маркера синапсов DLG2, многих генов сигнального пути Notch, нейрексина 1, а также маркеров зрелой сетчатки реверина и генов матрикса между фоторецепторами IMPG1, 2. Клетки, в которых экспрессируются эти маркеры, более специализированы и слабее пролиферируют, а значит малочисленнее, чем пролиферирующие культивируемые клетки-предшественники. В этих клетках уровень экспрессии CPA4 значительно выше, а PAR4 и многих SNORD ниже, чем в ткани.

Сходные результаты были получены для кошачьих клеток-предшественников сетчатки. На фиг. 40 представлена таблица экспериментов с различными условиями культивирования в различные моменты времени. На фиг. 41-44 показаны результаты эксперимента по определению генной экспрессии в кошачьих клетках-предшественниках сетчатки путем количественной ПЦР в среде UL в разные моменты времени. Отметим, что уровни экспрессии изученных маркеров в клетках-предшественниках, растущих в среде UL, уменьшались по сравнению с уровнем в день 0, взятым за базовый; при этом уровни экспрессии маркеров предшественников нестина и виментина возрастали. Уровень экспрессии циклина D2 в среде UL в моменты времени после дня 0 возрастал. Картина генной экспрессии по полученным профилям для кошачьих клеток-предшественников сетчатки представлена в виде круговой диаграммы на фиг. 45. Гены, присутствующие в большом числе копий, располагаются ближе к центру круга, а гены с более низкими уровнями экспрессии - на периферии. Маркеры предшественников перечислены начиная с нестина (в точке "12 часов") по часовой стрелке до виментина ("половина седьмого"). Показаны также маркеры направления клеточной дифференцировки. Обратим внимание, что экспрессия всех маркеров наибольшая в день 0 (синий цвет) и у многих маркеров (но не у всех) уменьшается со временем. Максимальное снижение уровня экспрессии происходит, по-видимому, в промежутке между днем 0 и первой взятой для определения точкой во времени культивирования (день 31). Снижение уровней экспрессии наблюдается как среди маркеров предшественников, так и среди маркеров направления дифференцировки. На фиг. 46 изображена таблица, суммирующая данные по генной экспрессии для кошачьих клеток-предшественников сетчатки; представлены результаты количественной ПЦР для материала от различных доноров и различных условий культивирования.

Для того чтобы охарактеризовать человеческие клетки-предшественники сетчатки и возможный механизм действия (то есть нейропротекцию), был проведен твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) в варианте "сэндвич" и мультиплексным методом. При мультиплексном анализе в 96-луночный фильтр-планшет помещали буферный раствор для анализа и планшет ставили в шейкер на 10 мин. Затем планшет очищали под вакуумом и в лунки наносили по 25 мкл буферного раствора для анализа или другого подходящего буферного раствора вместе с 25 мкл стандарта/образца/контроля. Затем добавляли 25 мкл смеси, содержащей нужные цитокины (разведение 1:50), конъюгированные с шариками. Планшет помещали в шейкер на ночь при температуре 4°C. После этого планшет промывали три раза. Прибавляли детекционные антитела и планшет ставили в шейкер на 1 ч при комнатной температуре. Затем в каждую лунку прибавляли по 25 мкл фикоэритрина (разведение 1:25) и одержали планшет в шейкере 30 мин. После этого планшет промывали три раза и в каждую лунку прибавляли 150 мкл проточной жидкости Sheath Fluid. Планшет анализировали с помощью ридера Luminex 100 и программного обеспечения Softmax Pro. Для расчетов использовали программное обеспечение от Millipore (BeadLyte).

При иммуноферментном твердофазном анализе (ELISA) в варианте "сэндвич" маркеры определяли с использованием двух антител и биотин-стрептавидин-пероксидазного комплекса. Полистироловые планшеты инкубировали с иммобилизуемыми антителами в течение ночи при температуре 25°C. Затем планшеты промывали 4 раза раствором Tris (50 мМ)/Tween-20 (0,2%), pH 7,0-7,5 и блокировали в течение 90 мин при температуре 25°C буферным раствором для разведения (Assay Buffer). После этого планшеты промывали 4 раза и в каждую лунку прибавляли 50 мкл буферного раствора для разведения вместе с 50 мкл образца или стандарта в буферном растворе для разведения. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Планшеты промывали 4 раза, прибавляли по 100 мкл биотинилированных детекционных антител в буферном растворе для разведения и инкубировали в течение 1 ч при температуре 25°C. Планшеты промывали 4 раза, после чего прибавляли полимер, несущий стрептавидин/пероксидазу, в буферном растворе с казеином (RDI) и инкубировали при температуре 25°C в течение 30 мин. Планшеты про-

мывали 4 раза, прибавляли 100 мкл готового имеющегося в продаже субстрата (TMB; Neogen) и инкубировали при температуре 25°C в течение 10-30 мин. Реакцию останавливали прибавлением 100 мкл HCl (2н.) и считывали A450 (минус A650) с помощью микропланшетного ридера (Molecular Dynamics). Строили калибровочную кривую, используя набор стандартов, полученные данные анализировали с помощью компьютерной программы SoftPro (Molecular Dynamics) и для каждого образца рассчитывали концентрацию цитокина, используя калибровочную кривую. Данные отражают секрецию белка по усредненным образцам. Определяли экспрессию пяти трофических факторов-кандидатов: GDNF, BDNF, VEGF, OPN и SDF-1 - при стандартных "нормальных" условиях (концентрация кислорода 20%) и при низкой (3%) концентрации кислорода.

На фиг. 47 экспрессия GDNF не показана, так как она оказалась не выявляемой при том количестве, в котором секретируется белок ( $<0,1$  пкг/мл). Экспрессия BDNF была меньше нижнего предела детектируемого диапазона, но все же выявлялась при средней концентрации 1,58 пкг/мл в нормальных условиях и при 0,55 пкг/мл при гипоксических условиях. Экспрессия VEGF была меньше нижнего предела детектируемого диапазона при нормальных (20% кислорода) условиях, но выявлялась в гипоксических (3% кислорода) условиях при средней концентрации 92 пкг/мл. Экспрессия OPN (остеопонтина, SPP1) была высокой (не в пикограммовом, а в нанограммовом диапазоне) и в нормальных, и в гипоксических условиях, причем при 20%-ной концентрации кислорода вдвое превышала уровень, наблюдавшийся при 3%-ной его концентрации (среднее значение 72,2 нг/мл по сравнению с 31,3 нг/мл соответственно). Уровень экспрессии весьма значительный в обоих вариантах условий и позволяет предполагать, что этот известный нейротрофический/антиапоптозный фактор играет какую-то роль и в данном случае. Экспрессия фактора стромальных клеток SDF-1 была меньше нижнего предела детектируемого диапазона, но выявлялась при средней концентрации приблизительно 48 пкг/мл как в нормальных, так и в гипоксических условиях.

Остеопонтин (OPN, SPP1) интенсивно экспрессируется в человеческих клетках-предшественниках сетчатки и секретируется в окружающую среду в предположительно физиологически значимых концентрациях. Другие данные по генной экспрессии показали, что экспрессия гена OPN различна в клетках разных типов. Вместе взятые, полученные данные позволяют предполагать, что OPN может играть роль в таких эффектах клеток-предшественников сетчатки, как нейротрофикация и восстановление функции колбочек. Что касается других изученных факторов, то менее вероятно, что они играют такую роль (если только после трансплантации не происходит радикального усиления экспрессии в ответ на микроокружение стекловидного тела/дегенерирующей сетчатки, что маловероятно).

Для того чтобы охарактеризовать человеческие клетки-предшественники сетчатки и определить степень экспрессии маркеров в клеточной популяции, было проведено исследование методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Культивируемые клетки или диссоциированные одиночные клетки сетчатки окрашивали конъюгатами антитело-маркер клеточной поверхности/изотипический контроль (производство BD) либо фиксировали и нарушали целостность клеточных мембран, после чего окрашивали конъюгатами антитело-внутриклеточный маркер/изотипический контроль (BD) в течение 30 мин при комнатной температуре. После трехкратного промывания в буферном растворе для окрашивания (BD) клетки пропускали через проточный цитофлуориметр-сортер BD Aria II. Данные получали по тем же трем одновременно взятым эмбриональным глазам, которые использовались для исследований методом микроматричного анализа.

На фиг. 48 показана экспрессия 10 маркеров, связанных с клеточной дифференцировкой, или вероятных поверхностных маркеров, или генетических маркеров в ткани сетчатки в день 0 в сравнении с культурой человеческих клеток предшественников сетчатки в нормальных (20% кислорода) или гипоксических (3% кислорода) условиях. Эти данные демонстрируют разницу между культивируемыми клетками-предшественниками и тканью сетчатки, из которой они происходят. В частности, в клетках-предшественниках значительно повышен уровень экспрессии белков МНС класса I, что сопровождается существенным усилением экспрессии Fas (CD95), тогда как белки МНС класса II остаются на почти том же уровне; уровень экспрессии GFAP невысокий, но выше, чем в ткани. Экспрессия других маркеров изменяется в различной степени.

Пример 3. Эффективность клеток-предшественников сетчатки *in vivo*.

Клетки-предшественники сетчатки подготавливали для трансплантации: их собирали с помощью TrypLE Express, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, промывали один раз сбалансированным солевым раствором Хэнка (HBSS), ресуспендировали в холодном HBSS и определяли количество и жизнеспособность клеток. Для трансплантации человеку брали  $0,5 \times 10^6$  клеток в 100 мкл HBSS. Для трансплантации крысам брали различные дозы от 4000 до 75000 клеток в 2 мкл HBSS.

Капюшонным крысам линии RCS с дистрофией сетчатки вводили суспензию человеческих клеток-предшественников сетчатки в стекловидное тело или в подсетчаточное пространство. Чтобы избежать отторжения трансплантата животным давали циклоспорин А и стероидные препараты. Для контроля во второй глаз делали инъекцию такого же раствора без клеток. У крыс с трансплантатом проверяли функциональные признаки в состоянии бодрствования без ограничения с помощью имеющегося в продаже аппарата для количественного определения оптомоторной реакции. В группе животных определяли по-

рог яркости в поле зрения. Для этого применяли электрофизиологический подход: осуществляли внеклеточное отведение в контрлатеральном верхнем двухолмии. В конце эксперимента у животных извлекали глаза, фиксировали их и исследовали гистологически, чтобы выявить признаки восстановления фоторецепторов реципиента и жизнеспособности донорских клеток.

Фиг. 49 иллюстрирует доказательства действенности способов по данному изобретению при трансплантации *in vivo*. Крысам линии RCS с дистрофией сетчатки (модель наследственной дегенерации фоторецепторов) вводили путем инъекции в глаз (в стекловидное тело либо в подсетчаточное пространство) человеческие клетки-предшественники сетчатки либо такой же раствор без клеток. В возрасте 60 суток животные с трансплантатами как той, так и другой локализации выполняли проверочные действия значительно лучше, чем особи, получившие "пустую" инъекцию. Гистологическое исследование в этот момент времени показало заметное восстановление, которое было сосредоточено в области подсетчаточной инъекции (фиг. 50-51) или широко охватывало сетчатку в случае введения трансплантата в стекловидное тело (фиг. 52-53). Также определяли порог яркости в поле зрения в возрасте 90 суток, используя отведение в контрлатеральном верхнем двухолмии. У животных с трансплантатами световая чувствительность значительно улучшилась по сравнению с особями, получившими "пустую" инъекцию и с интактными контрольными особями. Гистологическое исследование в возрасте 90 суток показало устойчиво высокую степень восстановления фоторецепторов реципиента. На фиг. 54-55 представлены результаты иммуноцитохимического исследования тотальных препаратов RCS.

Эти полученные *in vivo* данные подтверждают и иллюстрируют тот факт, что на животной модели (крысы) трансплантация человеческих клеток-предшественников сетчатки дает хорошие результаты как в функциональном отношении, так и с анатомической точки зрения. Эти данные также свидетельствуют, что инъекция трансплантируемых клеток в стекловидное тело в определенных обстоятельствах может иметь преимущество по сравнению с трансплантацией в подсетчаточное пространство в том смысле, что дает более обширное восстановление сетчатки реципиента. Клетки-предшественники эффективны и при подсетчаточном введении, хотя и несколько ограничено (такая ограниченность наблюдалась при подсетчаточной трансплантации для большинства, если не для всех незлокачественных клеток, использовавшихся другими исследователями).

Пример 4. Клинические исследования трансплантации человеческих клеток-предшественников сетчатки у людей.

Было проведено проспективное открытое клиническое исследование с оценкой клинико-экономической целесообразности для получения предварительных данных относительно безопасности интраокулярных инъекций клеток-предшественников сетчатки у больных с поражениями сетчатки. До начала клинического исследования клетки и ткани вначале оценивали с точки зрения безопасности. Ткани были предоставлены компанией Advanced Bioscience Resources, Inc. (ABR), которая также могла предоставлять образцы тканей на уровне международных требований (GTP - Good Tissue Practice) для формирования по этой методике исходного банка клеток, отвечающего современной надлежащей производственной практике лекарственных средств для человека (CGMP). Донорский материал проверяли гистологически и по составу крови на присутствие опасных агентов (например, вируса иммунодефицита человека, вирусов гепатита В и С, цитомегаловируса); также проводили проверку культивируемых донорских образцов на наличие эндотоксинов, микоплазм и грибов, например LAL-тест на эндотоксины (турбидиметрическое определение с лизатом амебоцитов мечехвоста), тест Fungitell для обнаружения (1-3)-b-D-глюканов грибов кинетическим хромогенным методом, тестирование на стерильность хранения в окончательной упаковке с использованием прямой инокуляции. Культуральные среды проверяли в нашей лаборатории или в специализированной службе по микоплазмам с использованием набора LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit (Sigma) или MycoAlert mycoplasma detection kit (Lonza). Культивируемые донорские образцы также проверяли в мягком агаре на онкогенность. Клеточные суспензии, содержащие  $0,2 \times 10^5$  или  $1,0 \times 10^5$  клеток, из материала от разных доноров в разные моменты времени культивирования, высевали в питательную среду, содержащую 0,35% агара и затем наслаивали на 0,7%-ный агаровый гель. Инкубировали 28 суток, после чего колонии окрашивали 0,005%-ным кристалл-виолетом и рассчитывали клеточный рост относительно положительного и отрицательного контролей. Клетки для трансплантации также подвергали тесту на теломеразную активность. Клеточный белок (в количестве 1 мкг) из разного донорского материала и в разные моменты времени культивирования проверяли с использованием набора TRAPEZE RT Telomerase Detection Kit (Chemicon) с ДНК-полимеразой TITANIUM Taq DNA Polymerase (BD Clontech) по инструкциям производителя. Кроме того, клетки кариотипировали в независимой организации для выявления каких-либо аномалий, которые могут указывать на спонтанную иммортализацию и канцерогенность культивируемых клеток-предшественников. Наконец, определяли жизнеспособность клеток и их количество путем окрашивания трипановым синим (Invitrogen) и с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen) или вручную с помощью гематоцитометра (Fisher Scientific).

Результаты клинических лабораторных исследований показали, что донорские образцы крови не содержали опасных вирусов или иных агентов. Клетки для трансплантации не содержали эндотоксинов, микоплазм и грибов. Кроме того, клетки, подготовленные для трансплантации, не образовывали колоний

в мягком агаре, т.е. не были онкогенными. Было также проведено кариотипирование, чтобы убедиться в клинической безопасности культивируемых человеческих клеток-предшественников сетчатки (для кариотипирования образцы передавали в стороннюю организацию, котирующуюся в Управлении по контролю качества пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США - в Cell Line Genetics). Кариотипирование не выявило никаких аномалий. Для определения жизнеспособности и количества клеток собранные клетки оставляли в среде для трансплантации на льду вне инкубатора на различные промежутки времени. Проверяли также влияние на жизнеспособность клеток пропускания их через подкожную иглу калибра 27g; эта манипуляция не вызывала заметного эффекта. Ожидаемая продолжительность процедуры менее 1 ч. Жизнеспособность клеток вне инкубатора начинала ощутимо уменьшаться через 2,5 ч, но оставалась больше 90% (что приемлемо) до 3,5 ч. Из этого следовало, что клиническая процедура трансплантации существенно не повлияет на жизнеспособность донорских клеток.

В клетках, подготовленных для трансплантации, уровень теломеразной активности был низкий или умеренный, но не повышенный. В клетках млекопитающих теломеразная активность обычно падает после раннего эмбрионального развития за исключением некоторых клеток, включая клетки зародышевой линии, которые должны быть фактически бессмертными и передаваться из поколения в поколение бесконечно. Нормальная утрата теломеразной активности связана с ограниченностью продолжительности жизни индивидуального организма, но также она говорит о низкой вероятности онкогенности. Повышенная теломеразная активность наблюдается в раковых клетках млекопитающих, в плюрипотентных стволовых клетках и в иммортализованных культивируемых человеческих клетках. Связь со злокачественностью означает, что потенциально опасно пересаживать клетки с повышенным уровнем теломеразной активности. Проверка безопасности показывает, что условия подготовки клеток к трансплантации не вызывают повышения теломеразной активности на протяжении культивирования до 97 суток (т.е. за пределом времени использования). Собственно теломеразная активность со временем снижается в соответствии со "старением" процесса развития. Иными словами, в конце концов клетки становятся старыми и утрачивают способность к пролиферации.

Пациентам, подходящим для участия в исследовании и давшим согласие на участие в нем, делали одну одностороннюю инъекцию клеток. Для эксперимента приглашали больных с какой-либо из следующих патологий: терминальная стадия заболевания сетчатки или зрительного нерва, низкая остаточная центральная острота зрения (20/200 или менее) при использовании корректирующих стекол и/или неблагоприятный прогноз в отношении зрения. Требовалось также, чтобы у человека было адекватное расширение зрачка и прозрачные оптические среды глаза (чтобы было возможно стереоскопическое фотографирование глазного дна), внутриглазное давление 21 мм рт.ст. или меньше и широкий (открытый) угол передней камеры глаза. Не допускались узкий угол передней камеры глаза, синехии в передней камере глаза или неоваскуляризация, закрытоугольная глаукома в анамнезе, существенная мутность оптических сред глаза, которая бы мешала видеть в ходе лечения, исследовать глазное дно, определять остроту зрения, не позволяла бы оценить токсичность; также исключались хирургическое вмешательство внутри данного глаза на протяжении трех месяцев перед началом исследования, наличие установленной аллергии на флуоресцентный краситель, используемый при ангиографии; наличие в анамнезе или наличие симптомов тяжелого сердечного заболевания (функциональный класс III или IV по NYHA), инфаркт миокарда в течение 6 месяцев перед началом исследования, желудочковые тахикардии, требующие продолжительного лечения, нестабильная стенокардия.

Были отобраны три человека - инвалиды по зрению с поражением сетчатки (диагностированным пигментным ретинитом), остротой зрения не более 20/200 и неблагоприятным прогнозом относительно возможности улучшения зрения: две женщины и один мужчина, все в возрасте 46-57 лет. У двоих из них были внутриглазные линзы, у одного пациента - катаракта.

Клетки-предшественники сетчатки человеческих эмбрионов их ранних пассажей характеризовали по профилям экспрессии белков и транскриптов и проверяли нормальность кариотипа. В этих клетках не было примеси грибов, бактерий (эндотоксинов), микоплазм. Ткани-источники также проверяли на присутствие опасных вирусов, и не было обнаружено антител против вирусов иммунодефицита человека (HIV1 и HIV2), антигенов вируса гепатита В, антител против вируса гепатита С, антител против возбудителя сифилиса, антитела (IgM) против вируса герпеса (Herpes simplex), ДНК вируса Западного Нила (определение методом амплификации, опосредованной транскрипцией), антител (IgM) к капсидному белку (VCA) вируса Эпштейна-Барр. Клетки подготавливали к разовой инъекции в стекловидное тело в дозе 100 мкл клеточной суспензии (в глаз поступало приблизительно 0,5 млн клеток).

В течение трех дней до дня 0 указанные пациенты дома пускали себе в глаза капли с антибиотиком. В день 0 проводили базовое клиническое обследование участников эксперимента, включавшее фотографирование глазного дна. Глаза промывали и вводили антибиотики местного действия, затем расширяли зрачок и капали местное анестезирующее средство. Пациентам в состоянии бодрствования без наркоза вводили подготовленные клетки путем однократной инъекции через стенку глазного яблока на уровне хирургического лимба в полость стекловидного тела, применяя стандартное косое введение с тем, чтобы прокол заживал спонтанно и не происходило рефлюкса трансплантата; процедура проводилась под прямым визуальным контролем с помощью хирургического микроскопа в условиях стерильной операцион-

ной. Во избежание ятрогенного увеличения внутриглазного давления проводили парацентез передней камеры глаза. Не применялись иммуносупрессивная терапия, наложение швов или ушивание раны. После инъекции вводили антибиотики и тщательно следили за внутриглазным давлением. Всех пациентов отпустили домой в тот же день (в сопровождении медицинского работника), госпитализации не требовалось. Участникам эксперимента было рекомендовано в течение по меньшей мере 2 ч после инъекции не наклонять голову больше, чем на 45°, чтобы введенные клетки не попали на желтое пятно. Их также проинструктировали, что 2-3 суток после процедуры следует спать с приподнятой головой.

После той процедуры пациентов наблюдали (включая клинические обследования) через 1 день, 3 дня, 1 неделю, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, полгода, 1 год и затем раз в год на протяжении 5 лет. Частоту и степень негативных явлений, затрагивающих зрение, определяли стандартными методами офтальмологического обследования, включая исследование глазного дна, определение максимально скорректированной остроты зрения (BCVA) и внутриглазного давления (IOP), исследование со щелевой лампой, ангиографию с флуоресцеином (FA), оптическую когерентную томографию (ОСТ), стереофотосъемку глазного дна и электроретинографию (колбочковый ответ на световое мелькание).

Проведенные в послеоперационный период исследования со щелевой лампой показали, что у всех пациентов трансплантированные клетки видны в стекловидном теле (некоторые образуют нитевидные структуры); тем самым подтверждается, что трансплантировавшиеся клетки попали в глаз и остались там и что в результате введения трансплантата в стекловидное тело в нем появляется скопление клеток. Отметим, что это не препятствует улучшению зрения экранированием зрительной оси (блокированием видения объектов), как могло бы теоретически быть.

Проводили также ультразвуковое В-сканирование, которое через 4 месяца после трансплантации выявляло клетки в стекловидном теле. Результаты этого исследования не показали никаких опухолевых образований ни в глазу, ни в глазнице (позади глаза). Тот факт, что трансплантированные клетки продолжали существовать в глазу (и то, что наблюдалось стойкое улучшение зрения) позволяет полагать, что пациентам, которым пересаживают клетки-предшественники сетчатки, не требуются обычные мероприятия для иммуносупрессии. Ни ультразвуковое исследование, ни фотосъемка глазного дна не обнаруживали признаков опухолей, сосудистых осложнений или отслоения сетчатки. Отметим, что ни один из пациентов не испытывал потери зрения из-за процедуры трансплантации и все пациенты сообщали о заметном улучшении зрения. Улучшение зрения зависело от тяжести поражения: чем хуже зрение изначально, тем ограниченнее улучшение, а чем зрение лучше, тем более значительно улучшение и тем скорее оно наступает. Один из пациентов (002), у которого была очень низкая острота зрения (видел движение руки у лица) через 4 месяца после трансплантации мог читать таблицу для проверки остроты зрения. У другого пациента восстановилась центральная фиксация и в некоторой степени функция желтого тела (которая необходима для остроты зрения лучше, чем 20/200). У пациента 003 улучшение остроты зрения достигло "20 букв" по таблице для проверки зрения, что является очень значительным улучшением. Улучшения зрительного восприятия не ослабевали и обретенная острота зрения сохранялась по меньшей мере 1,5 года. Пациенты сообщали об улучшении зрительной функции в целом и расширении возможностей в бытовой деятельности.

Результаты определения остроты зрения у этих пациентов для сравнения представлены на фиг. 55. Шкалы нелинейные. У всех трех пациентов уже в первую неделю после трансплантации наблюдались признаки быстрого улучшения зрения, причем они согласовались с клинически значимым трофическим эффектом в реципиентной сетчатке. Через 1 месяц наблюдалась тенденция к дальнейшему улучшению, которое могло включать приживание трансплантата и замещение клеток сетчатки. Некоторые очевидные отклонения, видные на графиках соответствуют определенным событиям в ходе лечения. Пациентка 002 (голубой цвет) не вполне соблюдала режим лечения, а именно не пускала капли в глаз после операции; в результате у нее развился увеит, который удалось быстро вылечить стандартными послеоперационными лекарственными средствами. Отметим, что в дальнейшем у нее наблюдалось длительное улучшение. У пациентки 001 (розовый цвет) была катаракта, которая ухудшилась в первые несколько месяцев после трансплантации - возможно, из-за этой процедуры; вероятно, с усугублением катаракты связано вторичное ухудшение зрения (однако зрение стало лучше, чем было до операции). Каких-либо аномалий внутриглазных линз в связи с трансплантацией клеток-предшественников сетчатки не обнаружилось (см. таблицу).

**Внутриглазное давление у пациентов, которым делали трансплантацию  
клеток-предшественников сетчатки**

| <b>Пациент<br/>(условный номер)</b> | <b>Внутриглазное давление (мм рт.ст.)</b> |                 |
|-------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------|
|                                     | <b>Начальное</b>                          | <b>Конечное</b> |
| 001                                 | Нормальное                                | Нормальное      |
| 002                                 | Нормальное                                | Нормальное      |
| 003                                 | Нормальное                                | Нормальное      |

Проверка поля зрения показала, что до лечения у всех трех пациентов отсутствовала центральная фиксация вследствие низкой остроты зрения, обусловленной утратой функции желтого тела на последней стадии пигментного ретинита. У пациента 003 на третий день после трансплантации восстановилась центральная фиксация и он смог пройти автоматизированную проверку поля зрения, которая выявила небольшую (2°) область с чувствительностью 20 дБ (норма). У этого пациента зрительная чувствительность также повысилась в другом участке - в сторону носа от фовеолярной точки фиксации. Поскольку у этого человека восстановилась центральная фиксация, стало возможным провести проверку поля зрения путем автоматизированной периметрии (HVF). Такое исследование показало, что у данного пациента появился небольшой, но высоко чувствительный "островок" зрения в центральной фовеолярной области. Полученные данные поддерживают представление о том, что лечение по данному изобретению включает быстрый трофический эффект, создаваемый пересаженными клетками, распространяющимися в сетчатку через стекловидное тело; по-видимому, таким образом восстанавливается функция оставшихся колбочек сетчатки реципиента. Сообщения об улучшении ночного зрения (у многих больных) и улучшении показателей электроретинографии (пациент 003) указывают на то, что данное лечение также улучшает функцию фоторецепторов-палочек. Эти положительные эффекты могут быть обусловлены функциональной интеграцией клеток в сетчатку реципиента. Проводили также другие исследования сетчатки, например топографическое исследование толщины слоя нервных волокон (RNFL), оптическую когерентную томографию и др. Никаких признаков образования опухолей или иммунологического отторжения ткани не наблюдалось.

Итак, в проведенном клиническом испытании у всех пациентов после лечения произошло увеличение остроты зрения. Улучшение зрения держалось по меньшей мере 20 месяцев после инъекции. По меньшей мере у одного пациента улучшилось поле зрения, а именно восстановилась центральная фиксация. Не наблюдалось никаких хирургических осложнений или признаков иммунного отторжения, несмотря на отсутствие иммуносупрессии или введения препаратов, подавляющих иммунную систему. Во всех проведенных исследованиях (со щелевой лампой, при непрямой офтальмоскопии, ультразвуковом В-сканировании глаза и глазницы, фотографировании глазного дна) не наблюдалось существенной пролиферации донорских клеток. На протяжении по меньшей мере 20 месяцев после трансплантации не наблюдалось образования опухолей.

Хотя выше подробно описано всего несколько вариантов осуществления данного изобретения, возможны и другие модификации и добавления. В частности, можно предложить другие признаки и/или варианты в дополнение к представленным в настоящем документе. Например, описанные выше воплощения данного изобретения могут быть направлены на различные комбинации и подкомбинации раскрываемых здесь признаков и/или комбинации и подкомбинации нескольких других признаков, описанных выше. Кроме того, логика выполнения, обозначенная прилагающимися иллюстрациями и/или описанная в настоящем документе, не предполагает, что для получения желаемых результатов обязательно следовать показанному здесь порядку или последовательности. Другие воплощения данного изобретения входят в объем нижеследующей формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клеточная популяция, содержащая клетки-предшественники сетчатки человека, в которых экспрессируются один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из нестина, Sox2, Ki-67, белков МНС класса I и Fas/CD95, и в которой нестин экспрессируется более чем в 90% клеток популяции, Sox2 экспрессируется более чем в 80% клеток популяции, Ki-67 экспрессируется более чем в 30% клеток популяции, белки МНС класса I экспрессируются более чем в 70% клеток популяции, Fas/CD95 экспрессируется более чем в 30% клеток популяции.

2. Клеточная популяция по п.1, в которой в клетках популяции экспрессируются также один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из виментина, CD9, CD81, AQP4, CXCR4, CD15/LeX/SSEA1, ганглиозида GD2, CD133, β3-тубулина, MAP2, GFAP, OPN/SPP1, PTN, KDR и TEK.

3. Способ получения популяции клеток-предшественников сетчатки человека, экспрессирующих один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из нестина, Sox2, Ki-67, белков МНС класса I и Fas/CD95, включающий

извлечение ткани сетчатки эмбриона человека на стадии, после которой формируется сетчатка, но прежде чем по всей сетчатке полностью сформируются наружные сегменты фоторецепторов и завершит-

ся или завершится в основном васкуляризация сетчатки, где указанные ткани берут из сетчатки человеческого эмбриона внутриутробного возраста от около 12 недель до около 28 недель;

диссоциацию взятой ткани механически или ферментативно для получения диссоциированной суспензии клеток и конгломератов клеток и

культивирование диссоциированной суспензии клеток при атмосферной концентрации кислорода, или при низкой концентрации кислорода, которая имитирует содержание кислорода в развивающейся сетчатке в процессе внутриутробного развития, или в гипоксических условиях, в бессывороточной среде в культуральных флаконах или чашках, покрытых фибронектином без ксеногенной контаминации, орнитинном, полилизинном, ламинином или их эквивалентах, на протяжении 10-30 пассажей, в которой после культивирования в клетках-предшественниках сетчатки человека экспрессируются один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из нестина, Sox2, Ki-67, белков МНС класса I и Fas/CD95, и в которой нестин экспрессируется более чем в 90% клеток популяции, Sox2 экспрессируется более чем в 80% клеток популяции, Ki-67 экспрессируется более чем в 30% клеток популяции, белки МНС класса I экспрессируются более чем в 70% клеток популяции, Fas/CD95 экспрессируется более чем в 30% клеток популяции.

4. Способ по п.3, в котором указанные клетки культивируют при атмосферной концентрации кислорода.

5. Способ по п.3, в котором указанные клетки культивируют при концентрации кислорода от около 0,5 до около 7%.

6. Способ по п.3, в котором указанные клетки культивируют в бессывороточной среде или в среде с пониженным содержанием сыворотки, при необходимости содержащей витамин С и альбумин.

7. Способ по п.3, в котором в клетках указанной популяции также экспрессируются один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из виментина, CD9, CD81, AQP4, CXCR4, CD15/LeX/SSEA1, ганглиозида GD2, CD133,  $\beta$ 3-тубулина, MAP2, GFAP, OPN/SPP1, PTN, KDR и TEK.

8. Способ по п.3, в котором фермент представляет собой трипсин.

9. Способ по п.3, в котором фибронектин без ксеногенной контаминации представляет собой человеческий фибронектин плазмы крови.

10. Способ по п.3, дополнительно включающий сбор или выделения культивируемых клеток.

11. Способ по п.3, дополнительно включающий криоконсервирование собранных или выделенных клеток.

12. Способ по п.3, в котором клетки-предшественники сетчатки человека экспрессируют на своей поверхности один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из нестина, Sox2, Ki-67, белков МНС класса I и Fas/CD95.

13. Способ по п.3, в котором низкая концентрация кислорода, которая имитирует содержание кислорода в развивающейся сетчатке в процессе внутриутробного развития, составляет около 3%.

14. Способ лечения заболевания или состояния сетчатки у нуждающегося в том индивида, включающий введение этому индивиду эффективного количества композиции, содержащей клетки-предшественники сетчатки человека, в которой в этих клетках-предшественниках сетчатки человека экспрессируются один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из нестина, Sox2, Ki-67, белков МНС класса I и Fas/CD95, и в которой нестин экспрессируется более чем в 90% клеток популяции, Sox2 экспрессируется более чем в 80% клеток популяции, Ki-67 экспрессируется более чем в 30% клеток популяции, белки МНС класса I экспрессируются более чем в 70% клеток популяции, Fas/CD95 экспрессируется более чем в 30% клеток популяции, и при необходимости количественное определение изменений зрения у указанного индивида, таким образом осуществляя лечение заболевания или состояния сетчатки.

15. Способ по п.14, в котором состав указанной композиции предназначен для инъекции в полость стекловидного тела или в подсетчаточное пространство указанному индивиду.

16. Способ по п.14, в котором заболевания или состояния сетчатки, подлежащие лечению по данному изобретению, включают пигментный ретинит, врожденный амавроз Лебера, болезнь Штаргардта, хориодермию, синдром Ушера, дистрофию фоторецепторов, цилиопатию, митохондриальные расстройства, прогрессирующую атрофию сетчатки, дегенеративные заболевания сетчатки, старческую макулярную дегенерацию, сухую и влажную формы макулярной дегенерации, географическую атрофию, семейную или приобретенную макулопатию, поражения фоторецепторов, заболевания, обусловленные патологией пигментного эпителия сетчатки, диабетическую ретинопатию, кистозный отек макулы, увеит, отслоение сетчатки, травматические повреждения сетчатки, ятрогенные повреждения сетчатки, перфорацию макулы, телеангиэктазии макулы, поражения ганглиозных клеток, поражения зрительного нерва, глаукому, оптическую нейропатию, ишемические поражения сетчатки, ретинопатию недоношенных, закупорку сосудов сетчатки, семейную макроаневризму сетчатки, поражения сосудов сетчатки, поражения сосудов глаза, заболевания сосудов, ишемическую нейропатию зрительного нерва.

17. Способ по п.14, в котором в клетках в составе композиции также экспрессируются один или более маркеров, выбираемых из группы, состоящей из виментина, CD9, CD81, AQP4, CXCR4,

CD15/LeX/SSEA1, ганглиозида GD2, CD133,  $\beta$ 3-тубулина, MAP2, GFAP, OPN/SPP1, PTN, KDR и TEK.

18. Препарат, содержащий гетерогенную смесь клеток-предшественников сетчатки человека, полученную способом по п.3.

19. Препарат по п.17, в котором способ получения гетерогенной смеси эмбриональных нервных клеток сетчатки дополнительно включает:

(а) отбор эмбриональных нервных клеток сетчатки по маркерам клеточной поверхности или по генетическим маркерам, при необходимости отбор клеток до культивирования (перспективно) или после культивирования или и до, и после культивирования,

причем маркеры клеточной поверхности или генетические маркеры включают CD15/LeX/SSEA1 и/или ганглиозид GD2; при необходимости CD9, CD81, CD133 или AQP4, CXCR4; или

(б) отбор эмбриональных нервных клеток сетчатки по составу транскриптома, протеома и/или генома.

20. Способ лечения заболевания или состояния сетчатки, включающий:

(а) предоставление препарата, продукта или композиции по любому из пп.18 или 19;

(б) введение препарата, продукта или композиции по п.(а) путем инъекции в полость стекловидного тела или в подсетчаточное пространство,

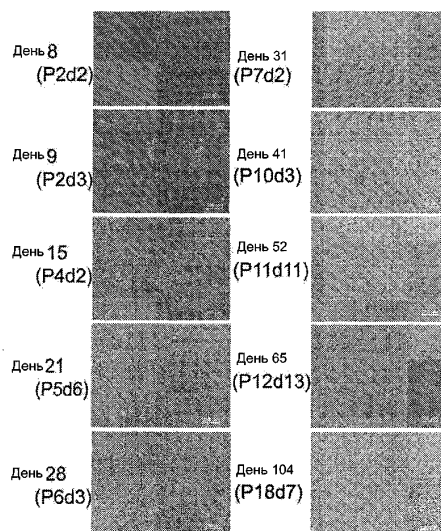
в котором при необходимости полость стекловидного тела или подсетчаточное пространство принадлежат человеку, или кошке, или собаке; в котором при необходимости применяется стандартная процедура интраокулярной инъекции; причем при необходимости указанный способ включает парацентез передней камеры глаза и таким образом лечится заболевание или состояние сетчатки, которые при необходимости включают синдром Ушера, пигментный ретинит, дегенеративные заболевания сетчатки, старческую макулярную дегенерацию, сухую и влажную формы старческой макулярной дегенерации, географическую атрофию, поражения фоторецепторов, диабетическую ретинопатию, кистозный отек макулы, увеит, отслоение сетчатки, повреждения сетчатки, перфорацию макулы, макулярные телеангиэктазии, травматические или ятрогенные повреждения сетчатки, поражения ганглиозных клеток или зрительного нерва, глаукому или нейропатию зрительного нерва, ишемические поражения сетчатки, например ретинопатию недоношенных, закупорку сосудов сетчатки или ишемическую нейропатию зрительного нерва.

21. Способ улучшения фотопического (дневного) зрения, или для коррекции остроты зрения, или для улучшения функции макулы, или для улучшения показателей поля зрения, или для улучшения скотопического (ночного) зрения, включающий:

(а) предоставление препарата, продукта или композиции по любому из пп.18 или 19;

(б) введение препарата, продукта или композиции по п.(а) путем инъекции в полость стекловидного тела или в подсетчаточное пространство,

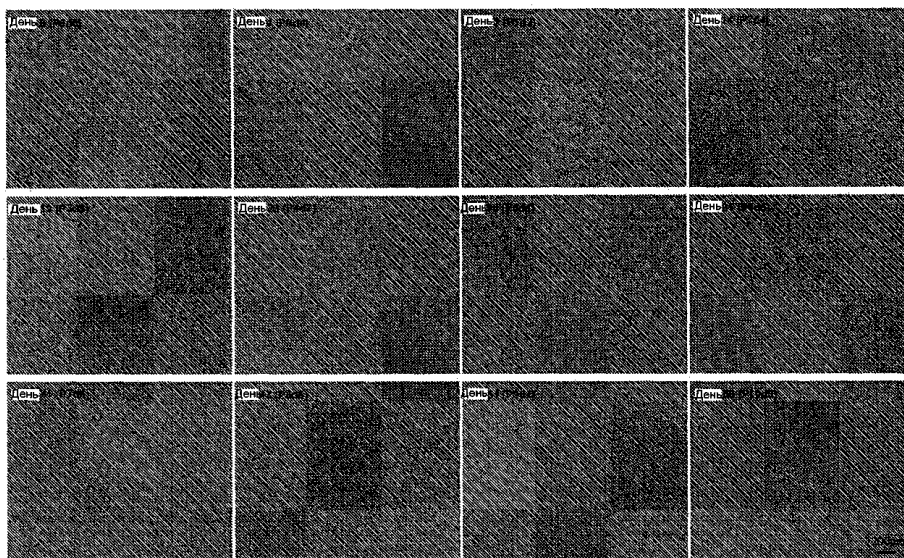
в котором при необходимости полость стекловидного тела или подсетчаточное пространство принадлежат человеку, или кошке, или собаке; в котором при необходимости применяется стандартная процедура интраокулярной инъекции; причем при необходимости указанный способ включает также парацентез передней камеры глаза, и таким образом повышается безопасность процедуры; таким образом, достигается улучшение фотопического (дневного) зрения, или коррекция остроты зрения, или улучшение функции макулы, или улучшение показателей поля зрения.



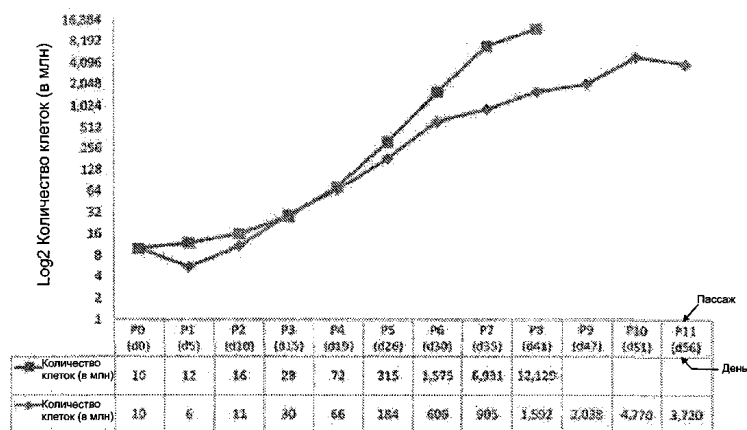
Фиг. 1



Фиг. 2

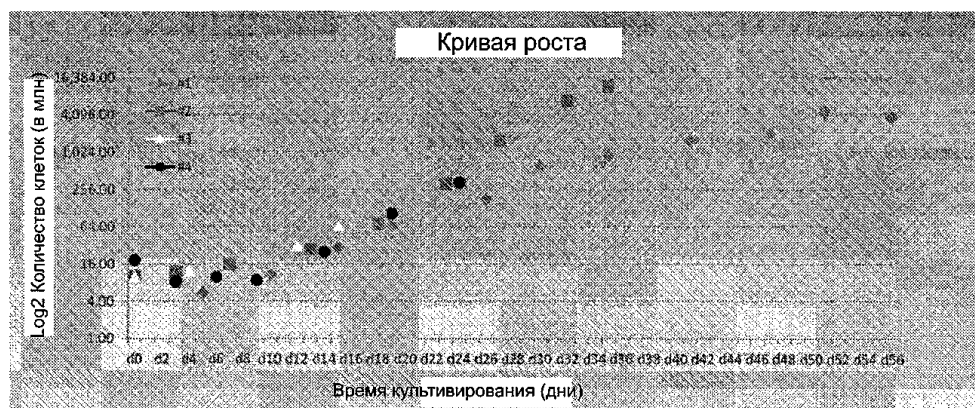


Фиг. 3



Донорский материал, показанный голубым цветом, использовался для введения пациентам на 5-м пассаже, что приводило к улучшению зрения

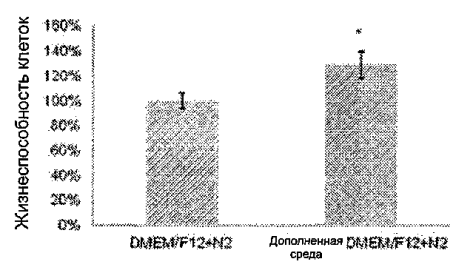
Фиг. 4



Фиг. 5

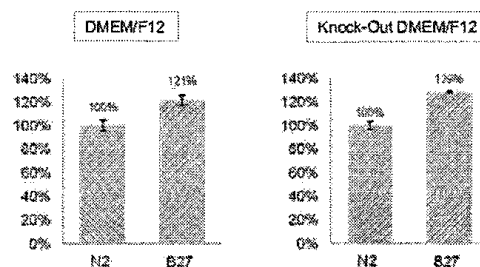
А

Дополненная среда DMEM/F12 vs. DMEM/F12



В

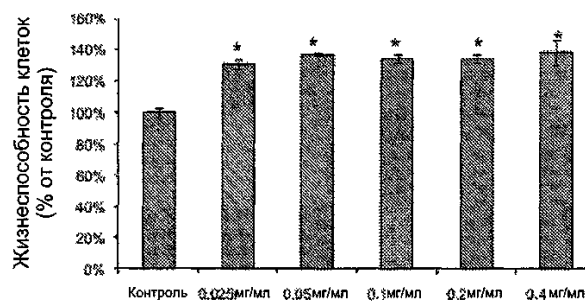
Добавки в культуральную среду:  
добавка №2 по сравнению с нексеногенной добавкой B27



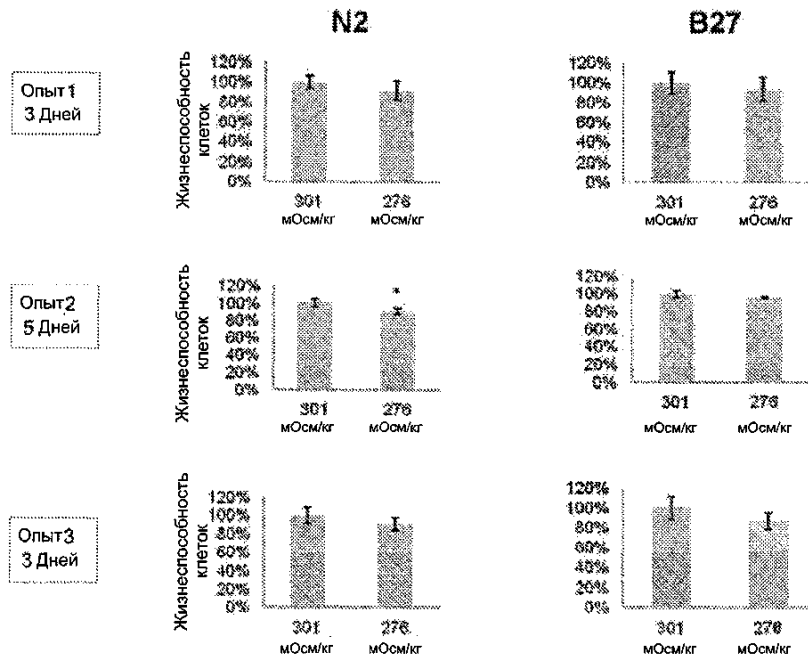
Фиг. 6

А

\* Витамин С (аскорбиновая кислота) \* \*\*



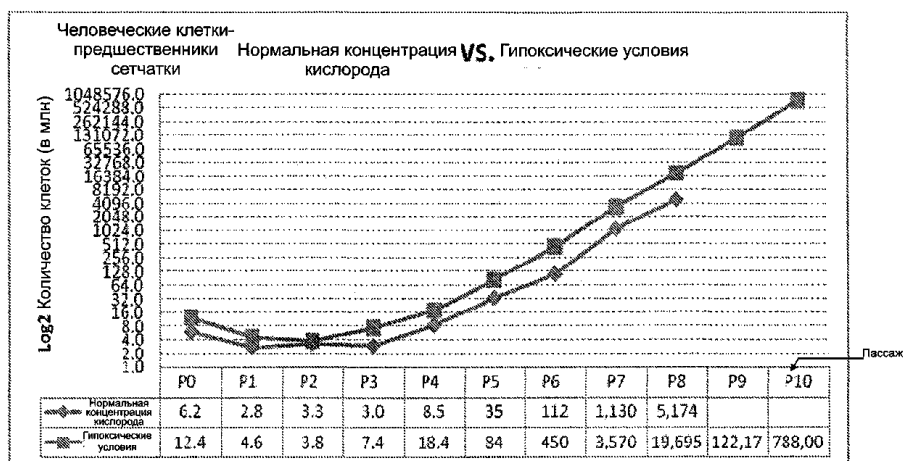
Фиг. 7



ФИГ. 8



Фиг. 9

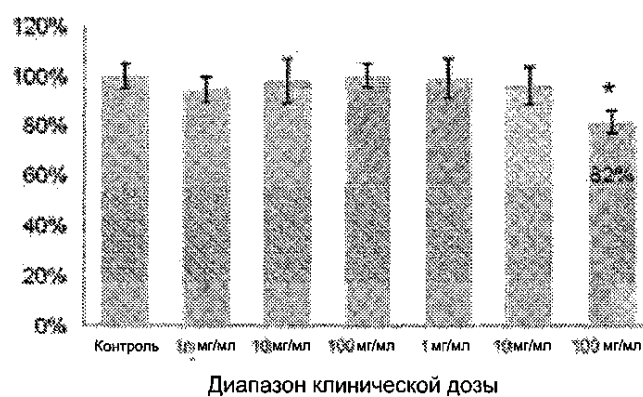


Фиг. 10

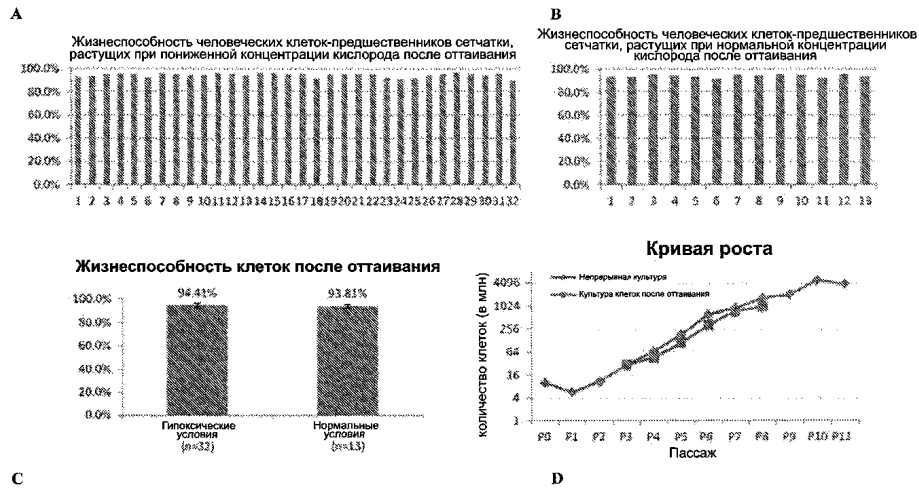


Фиг. 11

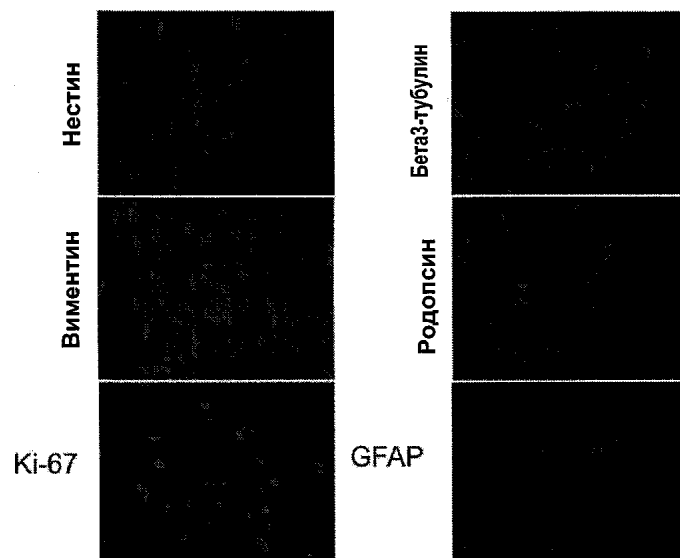
Стероидный препарат (триамцинолона ацетонид)



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

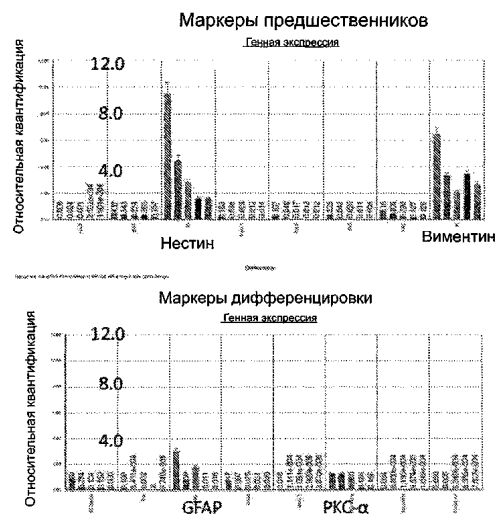
## Профиль генной экспрессии в разные моменты времени

In UL

День 10=1 (as control)  
 Эндогенный контроль: бета-актин

Момент времени:

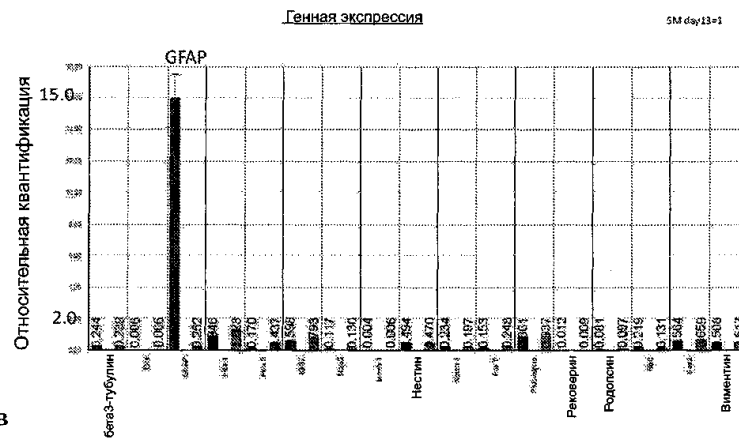
- День 13 (0.5 месяцев)
- День 31 (1 месяц)
- День 52 (2 месяца)
- День 97 (3 месяца)
- День 114 (4 месяца)



Фиг. 15

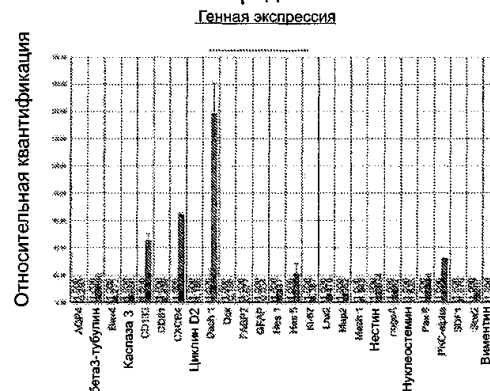
A

## Сравнение сред UL и SM



B

## Сравнение кошачьих клеток-предшественников сетчатки и клеток-предшественников мозга



Фиг. 16

## Мечение с помощью антител

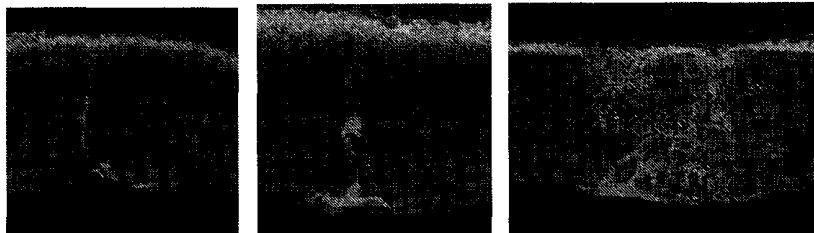
Анти-RFP инъецированные клетки

Анти-виментин мюллеровские клетки

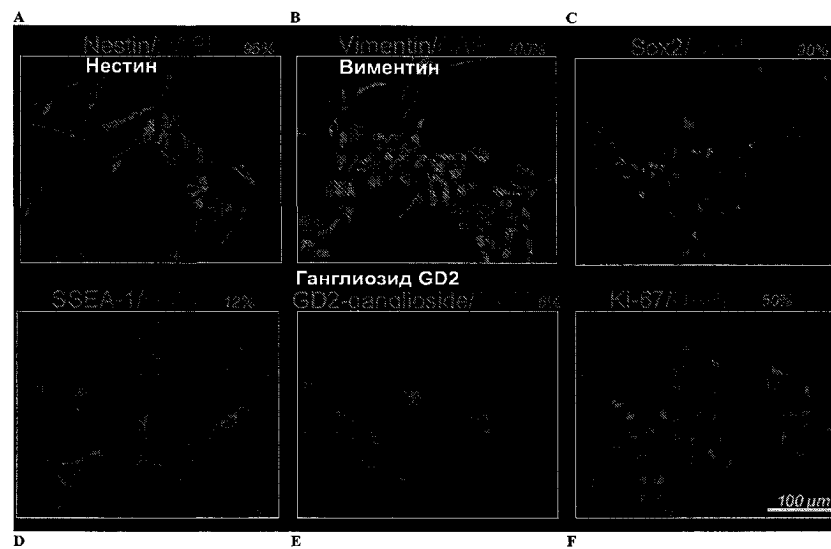
Анти-родопсин наружные сегменты палочек и тела некоторых палочек по мере распространения белка из-за дегенерации OR

Анти-зррин микроворсинки клеток пигментного эпителия и мюллеровских клеток в наружной ограничивающей мембране OR

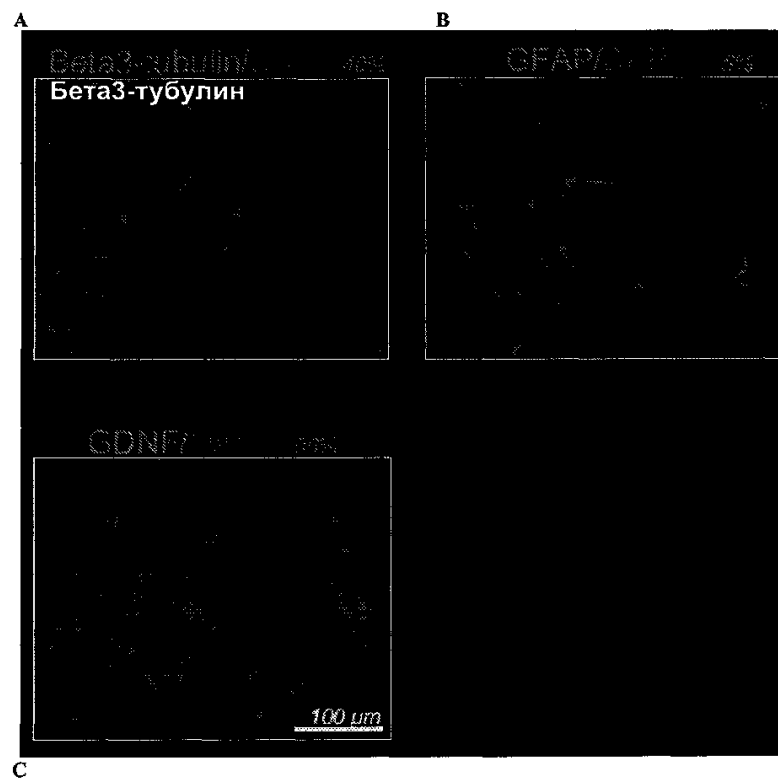
Протеинкиназа C палочки биполярные клетки



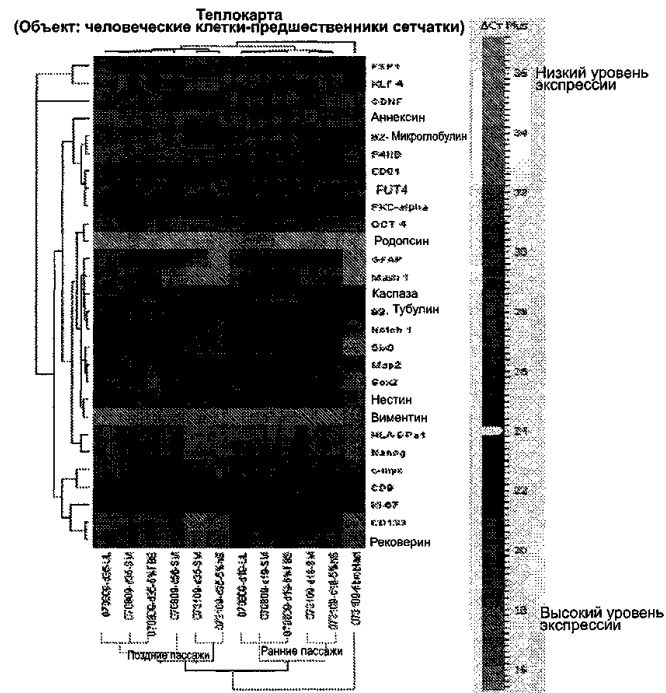
Фиг. 17



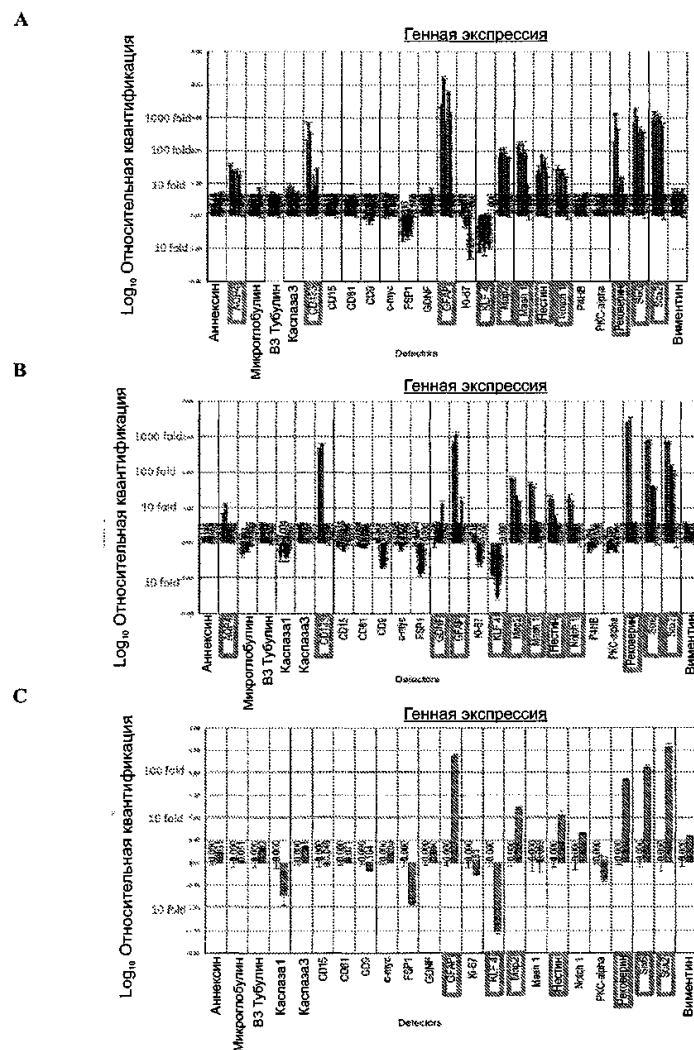
Фиг. 18



Фиг. 19



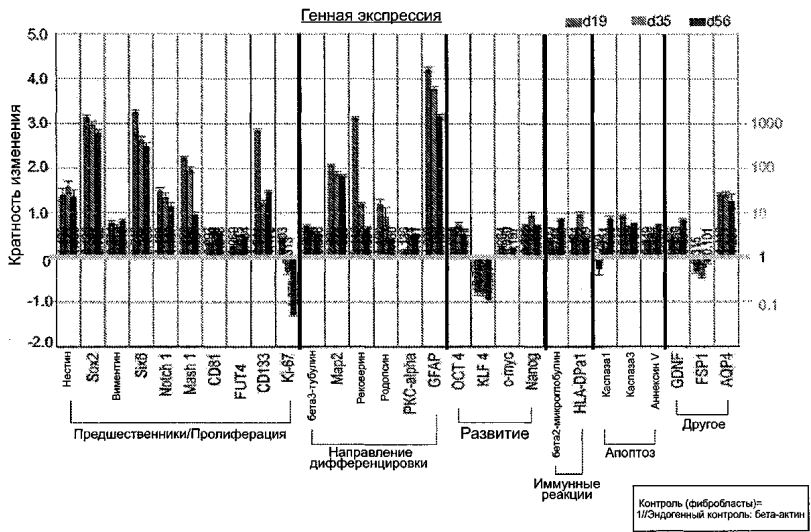
ФИГ. 20



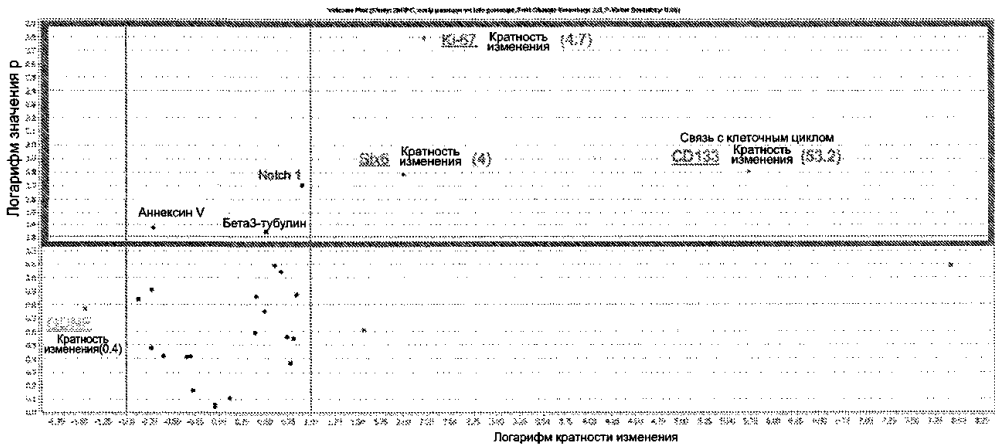
Первые десять генов, уровень экспрессии которых в человеческих клетках-предшественниках сетчатки более чем в 10 раз выше, чем в человеческих фибробластах (=1)

|      | 070809hRPC | 073109hRPC | 011310hRPC |
|------|------------|------------|------------|
| 1    | AQP4       | AQP4       |            |
| 2    | CD133      | CD133      |            |
| 3    | GFAP       | GFAP       | GFAP       |
| 4 ** | Klf4       | Klf4       | Klf4       |
| 5    | Map2       | Map2       | Map2       |
| 6    | Mash1      | Mash1      |            |
| 7    | Нестин     | Нестин     | Нестин     |
| 8    | Notch1     | Notch1     |            |
| 9    | Рековерин  | Рековерин  | Рековерин  |
| 10   | six6       | six6       | six6       |
| 11   | sox2       | sox2       | sox2       |

Фиг. 22

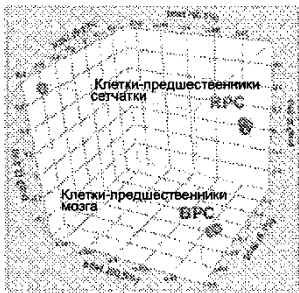


Фиг. 23

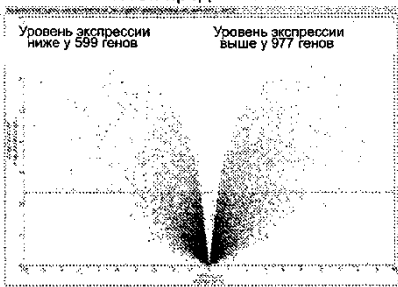


Фиг. 24

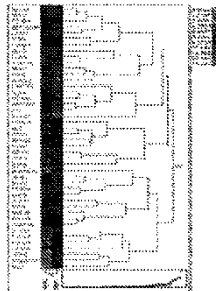
Анализ методом главных компонент



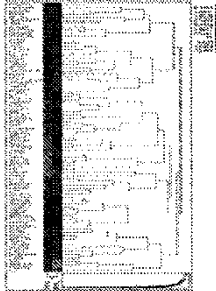
Сравнение клеток-предшественников сетчатки и клеток-предшественников мозга



Факторы транскрипции



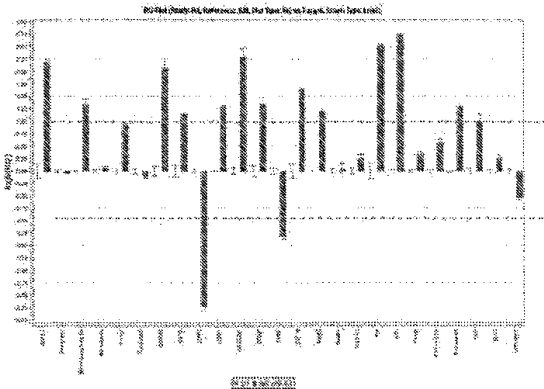
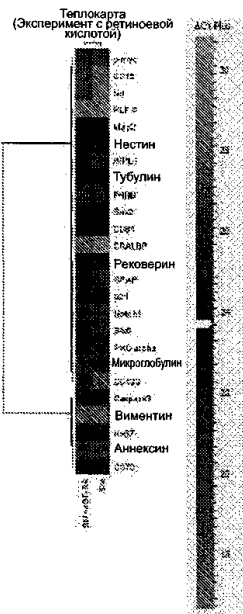
Сигнальные молекулы



Молекулы межклеточного матрикса, клеточная адгезия



Фиг. 25



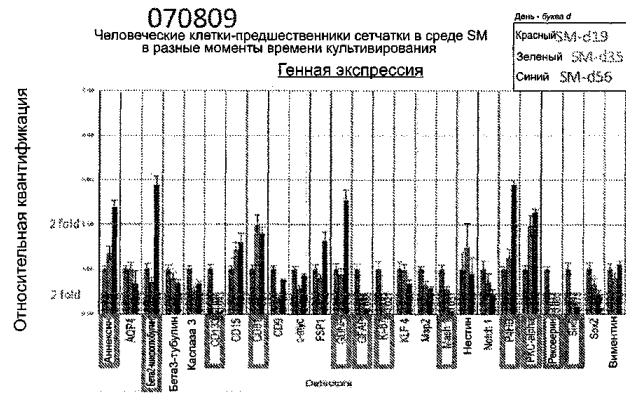
Фиг. 26

Условия в разные моменты времени культивирования человеческих клеток-предшественников сетчатки

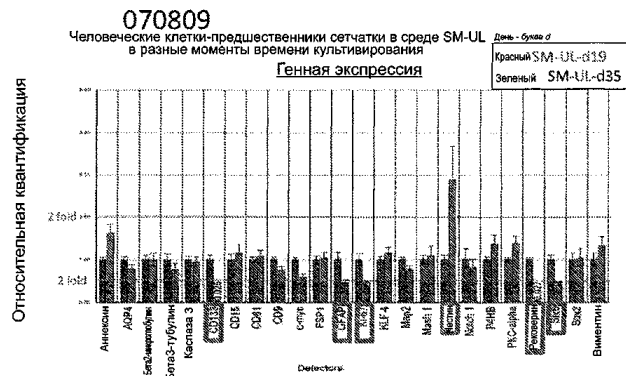
| 012209hRPC |        | 070809hRPC |              | 073109hRPC |             | 011310hRPC |
|------------|--------|------------|--------------|------------|-------------|------------|
| SM-d17     | SM-d19 | SM-UL-d19  | SM-5%FBS-d19 | SM-d18     | SM-5%hS-d18 | SM-d22     |
| SM-d22     | UL-d22 | SM-UL-d35  | SM-5%FBS-d35 | SM-d35     | SM-5%hS-d35 |            |
| SM-d27     | UL-d27 | SM-d56     |              |            |             |            |
| SM-d38     | UL-d38 |            |              |            |             |            |
| SM-d48     | UL-d48 |            |              |            |             |            |
| SM-d72     | UL-d72 |            |              |            |             |            |
| SM-d99     | UL-d99 |            |              |            |             |            |

Фиг. 27

A

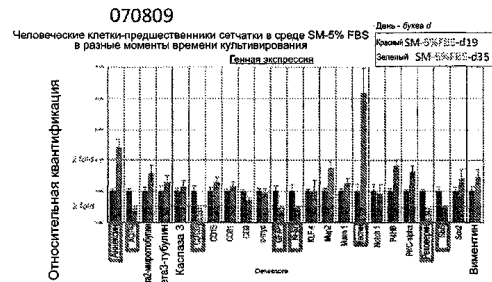


B

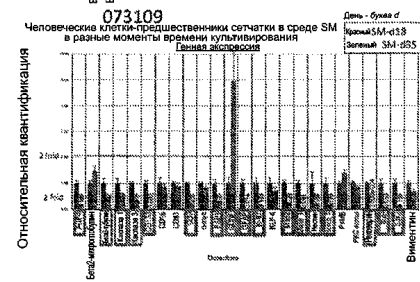


Фиг. 28

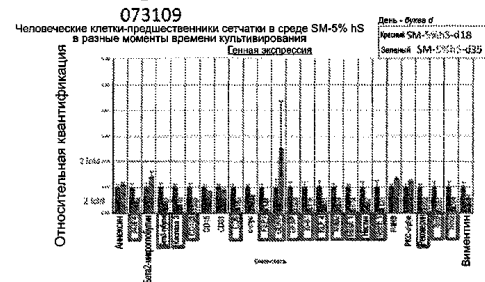
A



B



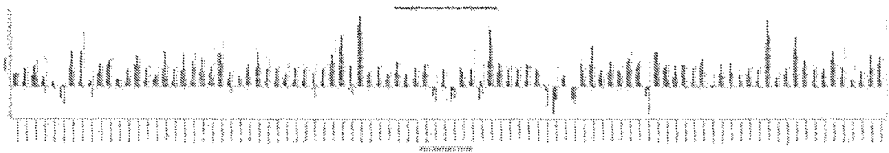
C



Фиг. 29

ФИГ. 30





Фиг. 32

A

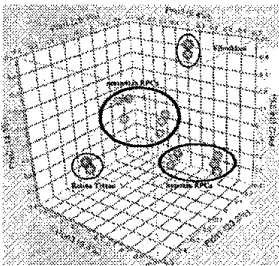


B

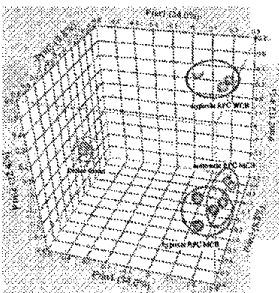


Фиг. 33

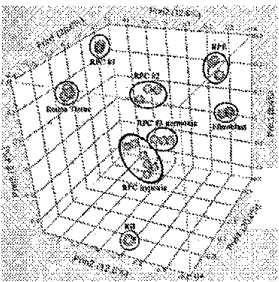
A



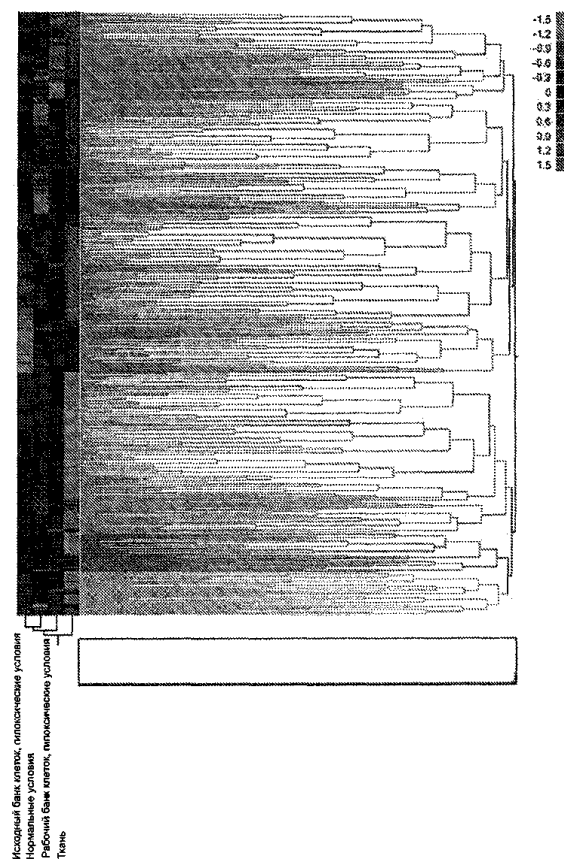
B



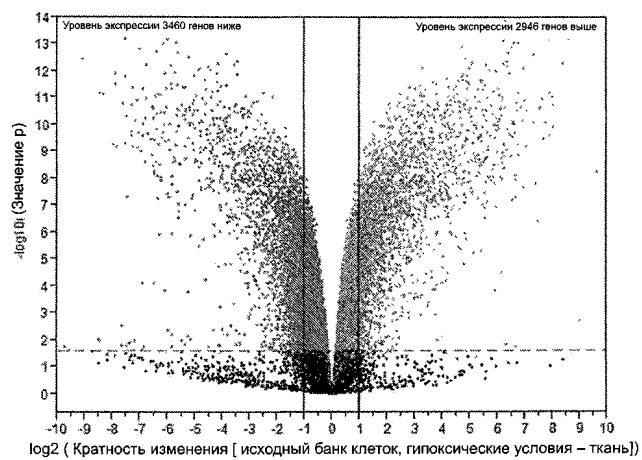
C



Фиг. 34

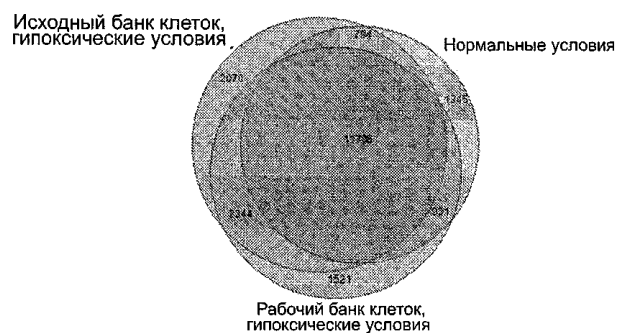


Фиг. 35

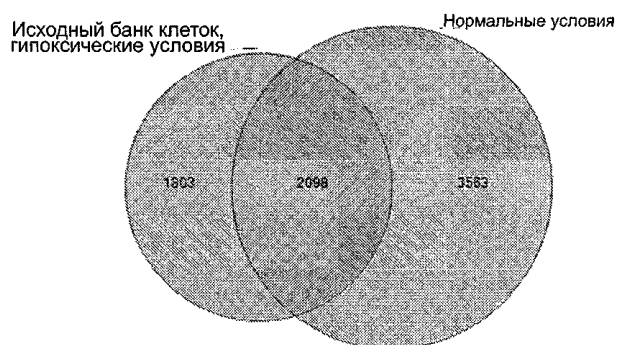


Фиг. 36

А

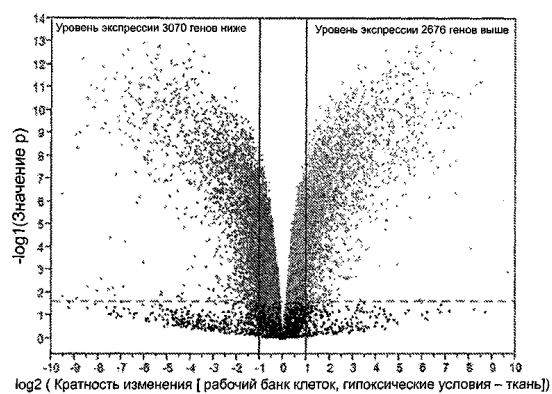


В

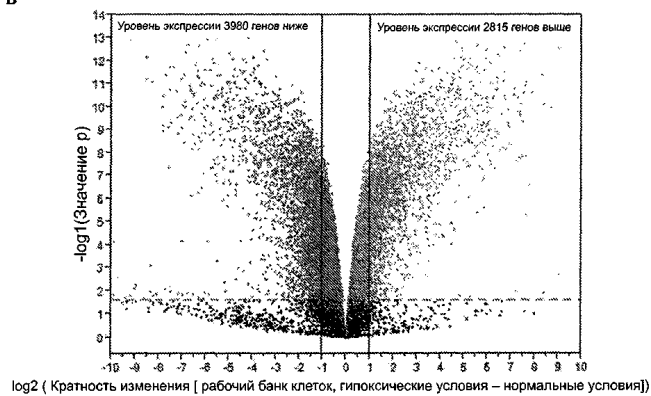


Фиг. 37

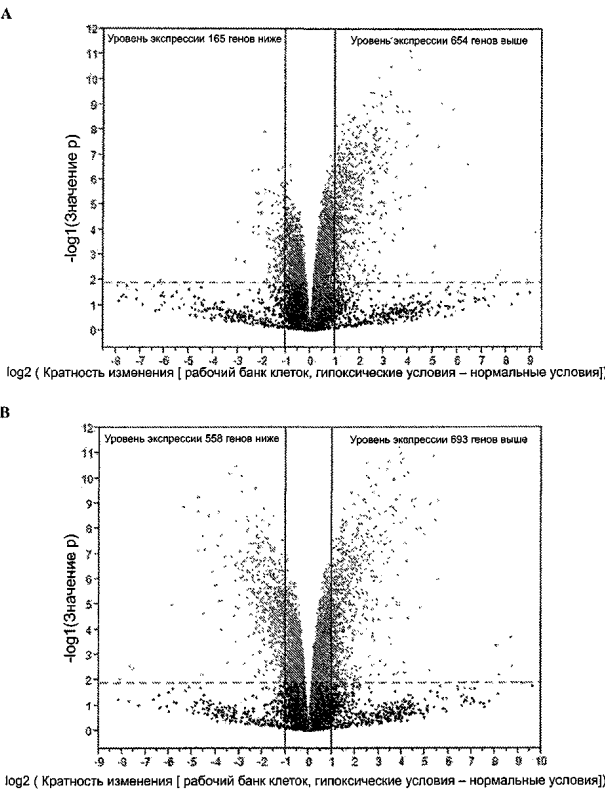
А



В



Фиг. 38



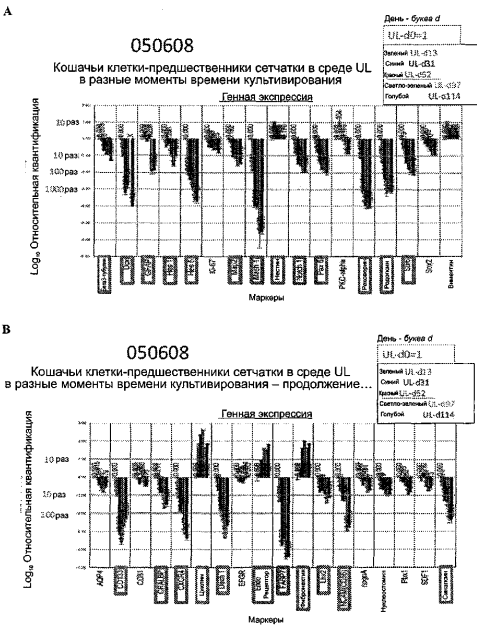
Фиг. 39

Кошачьи клетки-предшественники сетчатки – условия в разные моменты времени культивирования

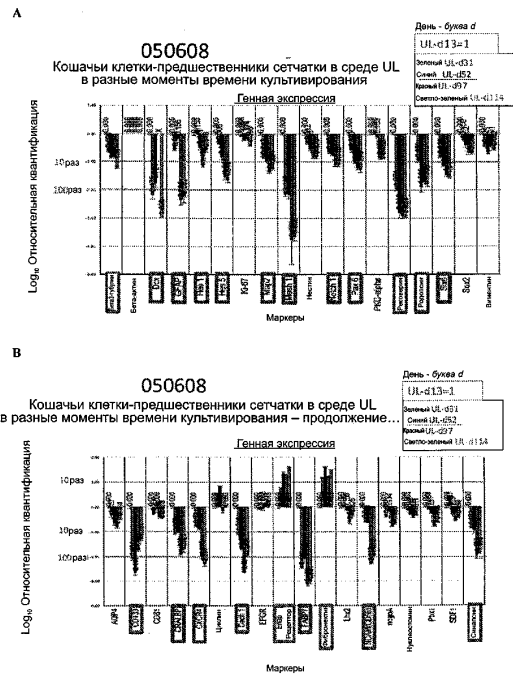
День - буква d

| T12707cRPC |        | 05D608cRPC |          | 09D808cRPC 0912D8cRPC |          |
|------------|--------|------------|----------|-----------------------|----------|
| SM-d24     | UL-d24 | SM-d0-1    | UL-d0-1  | UL-d20                | UL-d14-1 |
|            |        |            | UL-d13-1 |                       | UL-d135  |
|            |        | SM-d31     | UL-d31   |                       |          |
|            |        |            | UL-d52   |                       |          |
|            |        |            | UL-d76   |                       |          |
|            |        |            | UL-d97   |                       |          |
|            |        |            | UL-d114  |                       |          |

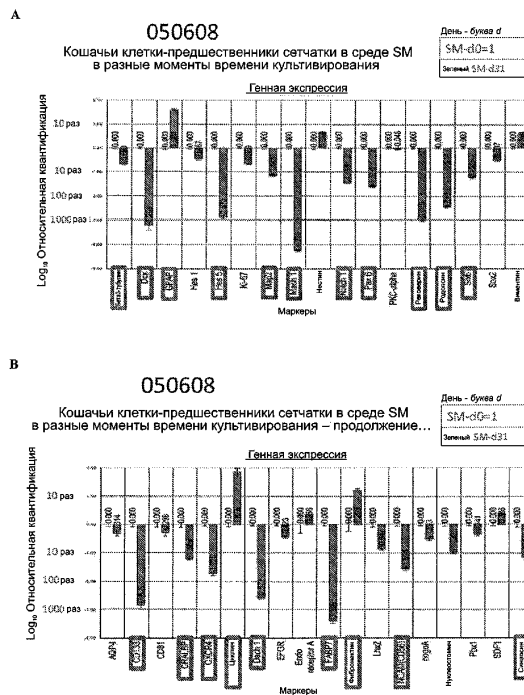
Фиг. 40



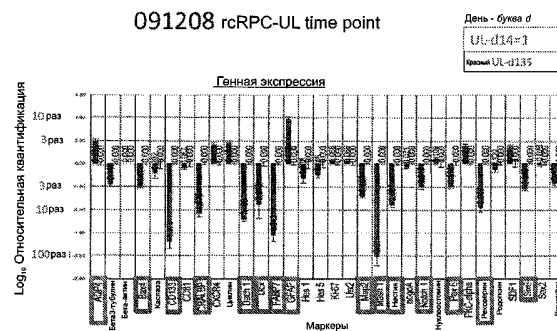
Фиг. 41



Фиг. 42

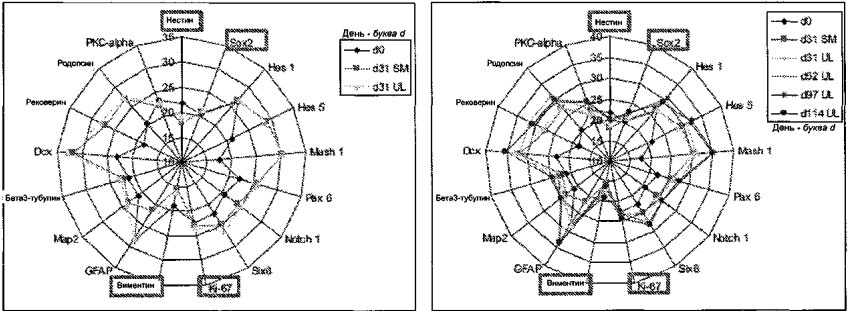


Фиг. 43



Фиг. 44

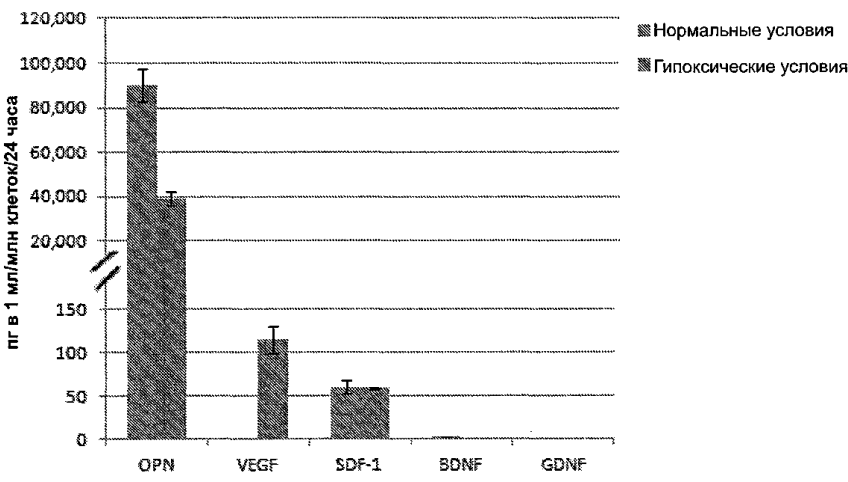
Кошачьи и клетки-предшественники сетчатки в разные моменты времени культивирования



Фиг. 45

|                 |  |                 |  | Сопоставление с человеческими клетками-предшественниками сетчатки |  |
|-----------------|--|-----------------|--|-------------------------------------------------------------------|--|
| d0-d31 UL       |  | d0-d31 SM       |  | d0-d31 UL                                                         |  |
| d0+1            |  | d13+1           |  | d0+1                                                              |  |
| Бета3-тубулин   |  | Beta3 tubulin   |  | Beta3 tubulin                                                     |  |
| PCX             |  | PCX             |  | PCX                                                               |  |
| Hes1            |  | Hes1            |  | Hes1                                                              |  |
| Hes5            |  | Hes5            |  | Hes5                                                              |  |
| Mash1           |  | Mash1           |  | Mash1                                                             |  |
| CD133           |  | CD133           |  | CD133                                                             |  |
| Pax6            |  | Pax6            |  | Pax6                                                              |  |
| Gfap            |  | Gfap            |  | Gfap                                                              |  |
| Klf6            |  | Klf6            |  | Klf6                                                              |  |
| Map2            |  | Map2            |  | Map2                                                              |  |
| Nestin          |  | Nestin          |  | Nestin                                                            |  |
| Notch1          |  | Notch1          |  | Notch1                                                            |  |
| RhoGTPase       |  | RhoGTPase       |  | RhoGTPase                                                         |  |
| PCX             |  | PCX             |  | PCX                                                               |  |
| Receptor        |  | Receptor        |  | Receptor                                                          |  |
| Sox2            |  | Sox2            |  | Sox2                                                              |  |
| Anexin V        |  | Anexin V        |  | Anexin V                                                          |  |
| CXCR4           |  | CXCR4           |  | CXCR4                                                             |  |
| Cyclin D2       |  | Cyclin D2       |  | Cyclin D2                                                         |  |
| Dach1           |  | Dach1           |  | Dach1                                                             |  |
| Endo receptor A |  | Endo receptor A |  | Endo receptor A                                                   |  |
| FABP7           |  | FABP7           |  | FABP7                                                             |  |
| Fibronectin     |  | Fibronectin     |  | Fibronectin                                                       |  |
| Uhx2            |  | Uhx2            |  | Uhx2                                                              |  |
| NCAM            |  | NCAM            |  | NCAM                                                              |  |
| Synapsin1       |  | Synapsin1       |  | Synapsin1                                                         |  |

Фиг. 46



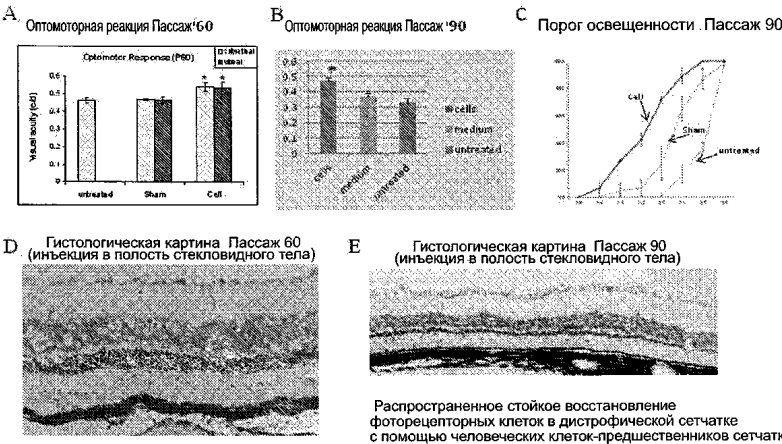
Фиг. 47

Сетчатка

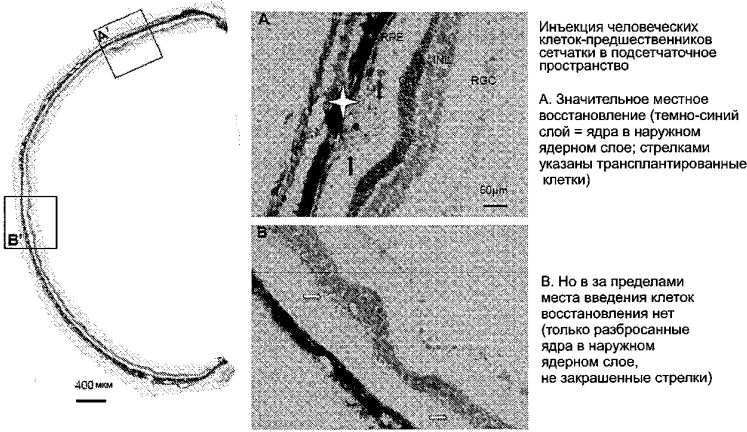
Культивируемые человеческие клетки-предшественники сетчатки

|            | Ткань сетчатки | Человеческие клетки-предшественники сетчатки в нормальных условиях | Человеческие клетки-предшественники сетчатки в гипоксических условиях | Иммуноцитохимическое подтверждение |
|------------|----------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|            | 86%            | 99%                                                                | 99%                                                                   | 95%                                |
| Sox2       | 70%            | 90-99%                                                             | 90-99%                                                                | 90%                                |
| Ki67       |                |                                                                    |                                                                       | 40-50%                             |
| GFAP       | 0.5%           | 5-10%                                                              | 5-10%                                                                 | 5%                                 |
| MHC I      | 2%             | 90%                                                                | 90%                                                                   |                                    |
| MHC II     | 0%             | 1-3%                                                               | 0-1%                                                                  |                                    |
| FAS (CD95) | 0%             | 40-60%                                                             | 40-60%                                                                |                                    |
| CXCR4      | 80%            | 5-30%                                                              | 90%                                                                   |                                    |
| CD15       | 4-8%           | 4-8%                                                               | 15-35%                                                                | 12%                                |
| GD2        | 2%             | 2-4%                                                               | 15%                                                                   | 6%                                 |

Фиг. 48

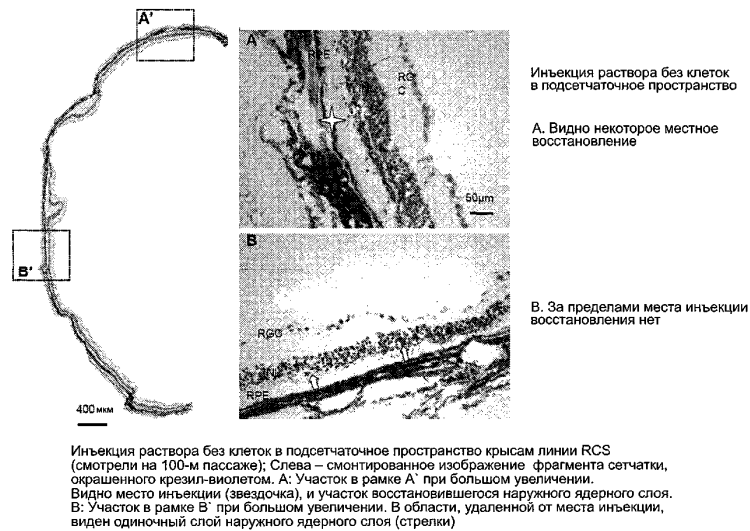


Фиг. 49

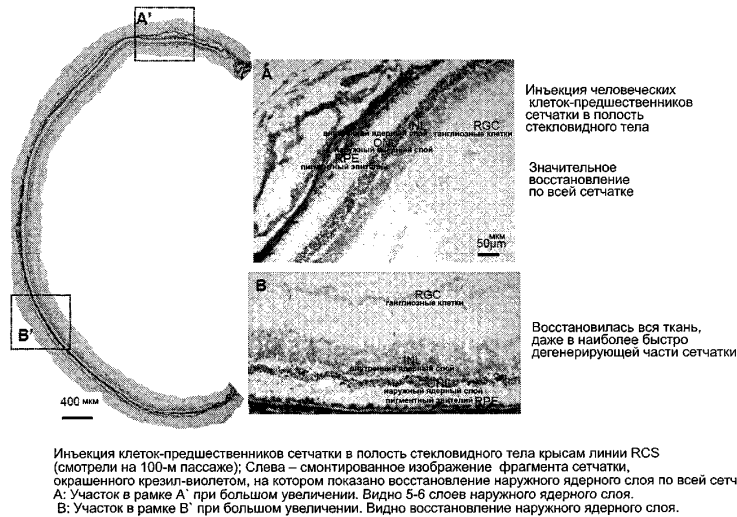


Инъекция клеток-предшественников сетчатки в подсетчаточное пространство крысам линии RCS (осуществляли на 21-м пассаже, смотрели на 100-м пассаже); Слева – смонтированное изображение фрагмента сетчатки, окрашенного кризид-виолетом. A: Участок в рамке A при большом увеличении. Видно место инъекции (звездочка), донорские клетки (стрелки) и восстановление наружного ядерного слоя. B: Участок в рамке B при большом увеличении. В области, удаленной от трансплантата, виден одиночный слой наружного ядерного слоя (стрелки)

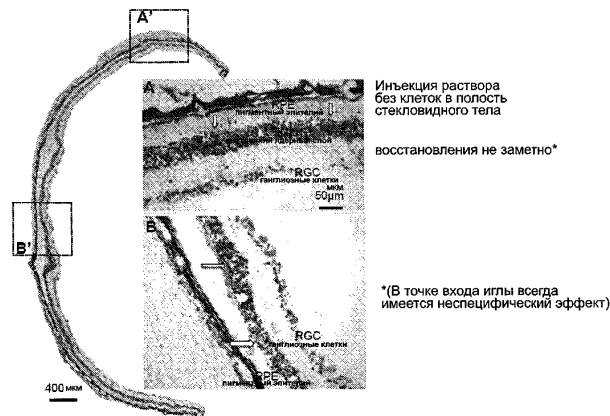
Фиг. 50



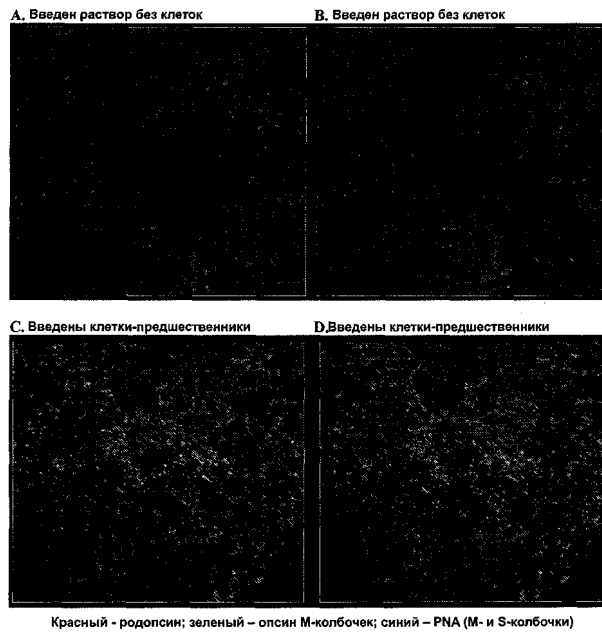
Фиг. 51



Фиг. 52



Фиг. 53



Фиг. 54



Фиг. 55

