



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК

A61K 35/28 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005137569/15, 28.04.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.04.2004(30) Конвенционный приоритет:
25.07.2003 US 10/628,783

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2006

(45) Опубликовано: 10.02.2009 Бюл. № 4

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: OTANI A., et al. Bone marrow-derived
stem cell target retinal astrocytes and can
promote or inhibit retinal angiogenesis, Nat.
med., 2002 Sep; 8 (9), 1004-10 YIN AH. et
al., AC 133, a novel marker for human
hematopoietic stem and progenitor cells.
Blood, 1997 Dec; 90 (12), 5002-12. BURGER PE
et al., Fibroblast growth factor receptor-1
is expressed by endothelial progenitor cells,
Blood, 2002, Nov 15; 100 (10), 3527-35.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
02.12.2005(86) Заявка РСТ:
US 2004/012989 (28.04.2004)(87) Публикация РСТ:
WO 2004/098499 (18.11.2004)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ФРИДЛЭНДЕР Мартин (US),
ОТАНИ Ацуси (US),
ДАСИЛВА Карен (US),
ХЕЙНЕКЭМП Стейси (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЗЕ СКРИППС РИСЕРЧ ИНСТИТУТ (US)

(54) ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИЕ СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕОВАСКУЛЯРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ С ИХ ПОМОЩЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается гематопоэтических стволовых клеток и способов лечения неоваскулярных заболеваний глаз с их помощью. Сущность изобретения включает выделенную популяцию гематопоэтических стволовых клеток негативной линии дифференцировки (Lin⁻ HSC), содержащую эндотелиальные клетки-предшественники (EPC), способные защищать кровеносные сосуды сетчатки

и нейрональные сети глаза, способ выделения из костного мозга взрослой особи млекопитающего популяции гематопоэтических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, при этом приблизительно 20% клеток в выделенных Lin⁻ HSC экспрессируют антиген клеточной поверхности CD31. Преимущество изобретения заключается в том, что выделенные популяции Lin⁻ HSC могут использоваться для лечения сосудистых заболеваний глаз. 8 н. и 14 з.п. ф-лы, 24 ил., 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 35/28 (2006.01)*A61K 48/00* (2006.01)*A61P 27/02* (2006.01)*C12N 5/08* (2006.01)*C12N 5/06* (2006.01)*C12N 5/10* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005137569/15, 28.04.2004**(24) Effective date for property rights: **28.04.2004**(30) Priority:
25.07.2003 US 10/628,783(43) Application published: **10.06.2006**(45) Date of publication: **10.02.2009 Bull. 4**(85) Commencement of national phase: **02.12.2005**(86) PCT application:
US 2004/012989 (28.04.2004)(87) PCT publication:
WO 2004/098499 (18.11.2004)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**FRIDLEhNDER Martin (US),
OTANI Atsusi (US),
DASILVA Karen (US),
KhEJNEKEhMP Stejsi (US)**

(73) Proprietor(s):

DZE SKRIPPS RISERCh INSTIT'JuT (US)**(54) HEMATOPOETIC STEM CELLS AND METHODS OF TREATMENT OF NEOVASCULAR EYE DISEASES USING THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: substance of invention includes separated population of hematopoietic stem cells of negative lineage, (Lin⁻ HSC), containing progenitor endotheliocytes (EPC), protecting retina blood vessels and neuronal eye networks,method of separation of hematopoietic stem cell population of negative lineage from bone marrow of mammal adult, herewith approximately 20% of cells in separated Lin⁻ HSC express cell surface CD31.

EFFECT: possibility to apply for treatment of eye vascular diseases.

22 cl, 10 ex, 24 dwg

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Данная заявка является частичным продолжением заявки США на патент с серийным No. 10/628783, поданной 25 июля 2003 г., приоритетом для формулы изобретения которой является предварительная заявка на патент с серийным No. 60/398522, поданная 25 июля 2002 г., и предварительная заявка на патент с серийным No. 60/467051, поданная 2 мая 2003 г., полное описание которых приведено здесь в качестве ссылки.

Заявление о правительственных интересах

Часть описанной здесь работы была осуществлена при поддержке грантом номер CA92577 Национального института рака и грантами номер EY11254, EY12598 и EY125998 Национальных институтов здоровья. Правительство Соединенных штатов имеет определенные права на настоящее изобретение.

Область техники, к которой относится изобретение

Это изобретение относится к выделенным популяциям гематопозитических стволовых клеток млекопитающих негативной линии дифференцировки ($\text{Lin}^- \text{HSC}$), полученным из костного мозга, и к их применению. Более конкретно, изобретение относится к выделенным популяциям гематопозитических стволовых клеток млекопитающих негативной линии дифференцировки ($\text{Lin}^- \text{HSC}$), содержащим клетки-предшественники эндотелия (EPC). Изобретение также относится к лечению сосудистых заболеваний глаза путем введения популяций $\text{Lin}^- \text{HSC}$ и трансфецированных $\text{Lin}^- \text{HSC}$ в глаз.

Известный уровень техники

Наследуемая дегенерация сетчатки поражает 1 из 3500 индивидуумов и характеризуется прогрессирующей ночной слепотой, потерей полей зрения, атрофией зрительного нерва, артериолярным истощением, измененной сосудистой проницаемостью и центральной потерей зрения, часто прогрессирующей до полной слепоты (Heckenlively, J. R., editor, 1988; Retinitis Pigmentosa, Philadelphia: JB Lippincott Co.). Молекулярно-генетический анализ таких заболеваний выявил мутации в более 110 различных генах, ответственных только за относительно небольшой процент известных поражений у индивидуумов (Humphries et al., 1992, Science 256:804-808; Farrar et al. 2002, EMBO J. 21:857-864.). Многие из этих мутаций связаны с ферментативными и структурными компонентами механизма передачи фотосигнала, включая родопсин, фосфодиэстеразу цГМФ, периферин rds и RPE65. Несмотря на такие наблюдения, все еще нет эффективного лечения для замедления или обращения прогрессии дегенеративных заболеваний сетчатки. Последние достижения в генной терапии привели к успешной трансформации фенотипов rds (Ali et al. 2000, Nat. Genet. 25:306-310) и rd (Takahashi et al. 1999, J. Virol. 73:7812-7816) у мышей и фенотипа RPE65 у собак (Acland et al. 2001, Nat. Genet. 28:92-95) при доставке трансгена дикого типа к фоторецепторам или пигментированному эпителию сетчатки (RPE) у животных с конкретной мутацией.

Связанная с возрастом дегенерация желтого пятна (ARMD) и диабетическая ретинопатия (DR) являются основными причинами потери зрения у индустриально развитых народов, и их возникновение связано с аномальной неоваскуляризацией сетчатки. Так как сетчатка состоит из хорошо определяемых слоев нервных, глиальных и сосудистых элементов, относительно небольшие изменения, такие как наблюдаемые при пролиферации сосудов или отеке, могут привести к существенной потере зрительной функции. Наследуемая дегенерация сетчатки, такая как пигментозный ретинит (RP), также связана с аномалиями сосудов, такими как сужение артериол и атрофия сосудов. Несмотря на то, что был достигнут существенный прогресс в идентификации факторов, которые стимулируют или ингибируют ангиогенез, в настоящее время в распоряжении не имеется способа специфического лечения сосудистого заболевания глаза.

В течение многих лет было известно, что популяция стволовых клеток существует в системной циркуляции и в костном мозге нормального взрослого индивидуума. Различные субпопуляции данных клеток могут дифференцироваться в сторону гематопозитической линии по направлениям позитивной линии (Lin^+) или негативной линии (Lin^-) дифференцировки. Более того, популяция гематопозитических стволовых клеток (HSC)

негативной линии, как было показано недавно, содержит эндотелиальные клетки-предшественники, способные образовывать кровеносные сосуды *in vitro* и *in vivo* (Смотри, Asahara et al. 1997, Science 275: 964-7). Данные клетки могут участвовать в нормальном и патологическом постнатальном ангиогенезе (Смотри, Lyden et al. 2001 Nat. Med. 7, 1194-201; Kalka et al. 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:3422-7 и Kocher et al. 2001, Nat. Med. 7: 430-6), а также дифференцироваться в различные не эндотелиальные типы клеток, включая гепатоциты (Смотри, Lagasse et al. 2000, Nat. Med. 6:1229-34), микроглию (Смотри, Priller et al. 2002 Nat. Med. 7:1356-61), кардиомиоциты (Смотри, Orlic et al. 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:10344-9) и эпителий (Смотри, Lyden et al. 2001, Nat. Med. 7:1194-1201). Хотя данные клетки применяли в различных экспериментальных моделях ангиогенеза, механизм направленной доставки ЕРС к месту неоваскуляризации не известен и не разработана стратегия, которая будет эффективно увеличивать количество клеток, которые вносят вклад в индивидуальное образование сосудистой сети.

Гематopoэтические стволовые клетки костного мозга являются в настоящее время единственным типом стволовых клеток, обычно применяемым для терапевтического использования. HSC костного мозга применяли в трансплантатах в течение более 40 лет. В настоящее время исследуются усовершенствованные способы сбора очищенных стволовых клеток для разработки способов лечения лейкоза, лимфомы и наследуемых заболеваний крови. Исследуется клиническое применение стволовых клеток у человека для лечения диабета и прогрессирующего рака почки у ограниченного числа больных людей.

Краткое изложение существа изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенной популяции гематopoэтических стволовых клеток млекопитающих (HSC), которые не экспрессируют на своей поверхности поверхностные антигены линий дифференцировки (Lin), т.е. к гематopoэтическим стволовым клеткам негативной линии дифференцировки (Lin⁻ HSC). Популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению включают клетки-предшественники эндотелия (ЕРС), также известные как эндотелиальные клетки-предшественники, которые избирательно направляются к активированным астроцитам сетчатки при введении в стекловидное тело глаза. Lin⁻ HSC по настоящему изобретению, предпочтительно, происходят из костного мозга взрослых млекопитающих, более предпочтительно, из костного мозга взрослых людей.

В предпочтительном варианте осуществления популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению выделяют путем экстрагирования костного мозга из взрослой особи млекопитающего; отделения множества моноцитов из костного мозга; мечения моноцитов набором конъюгированных с биотином антител для линий дифференцировки против одного или более поверхностных антигенов линий дифференцировки; удаления моноцитов, которые являются позитивными в отношении поверхностных антигенов линий дифференцировки; и затем получения популяции Lin⁻ HSC, содержащей ЕРС. Предпочтительно, моноциты метят набором конъюгированных с биотином антител линий дифференцировки против одного или более поверхностных антигенов, выбранных из группы, состоящей из CD2, CD3, CD4, CD11, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD24, CD33, CD36, CD38, CD45, Ly-6G, TER-119, CD45RA, CD56, CD64, CD68, CD86, CD66b, HLA-DR и CD235a (гликофорин А) линий дифференцировки. Предпочтительно, по меньшей мере приблизительно, 20% клеток выделенной популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению экспрессирует поверхностный антиген CD31.

ЕРС в популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению экстенсивно включаются в развивающиеся сосуды сетчатки и остаются стабильно включенными во вновь образованную сосудистую сеть глаза. После выделения, популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению могут быть использованы для защиты и стабилизации дегенерирующей сосудистой сети сетчатки у млекопитающих, защиты нейрональных сетей и способствования восстановления ишемической ткани.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления клетки выделенных популяций Lin⁻ HSC трансфецируют терапевтически эффективным геном. Например, клетки могут быть трансфецированы полинуклеотидами, которые операбельно кодируют нейротрофические агенты или антиангиогенные агенты, которые селективно направлены на неоваскуляризацию и ингибируют образование новых сосудов, не влияя на уже образованные сосуды, при генной терапии на основе клеток. В одном варианте осуществления популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению после выделения включают ген, кодирующий пептид, ингибирующий ангиогенез. Ингибирующие ангиогенез Lin⁻ HSC могут использоваться для модуляции аномального роста кровеносных сосудов при таких заболеваниях как ARMD, DR и определенные типы дегенерации сетчатки, связанные с аномальной васкуляризацией. В другом предпочтительном варианте осуществления Lin⁻ HSC по настоящему изобретению после выделения включают ген, кодирующий нейротрофический пептид. Нейротрофические Lin⁻ HSC пригодны для содействия защиты нейронов при заболеваниях глаз, при которых происходит дегенерация нейронов сетчатки, таких как глаукома, пигментозный ретинит и тому подобное.

Особым преимуществом лечения глазных заболеваний выделенными популяциями Lin⁻ HSC по настоящему изобретению является васкулотрофический и нейротрофический эффекты для глаз при введении Lin⁻ HSC в стекловидное тело. При лечении выделенными Lin⁻ HSC по изобретению обеспечивается защита нейронов сетчатки и фоторецепторов и поддерживается функция зрения в глазах. В настоящем изобретении предлагается способ лечения дегенерации сетчатки, предусматривающий введение выделенных клеток Lin⁻ HSC, полученных из костного мозга, которые содержат эндотелиальные клетки-предшественники, избирательно направленные на активированные астроциты сетчатки, где, по меньшей мере, 50% выделенных Lin⁻ HSC экспрессирует поверхностный антиген CD31 и по меньшей мере 50% выделенных Lin⁻ HSC экспрессирует поверхностный антиген CD117 (c-kit).

Настоящее изобретение также относится к способу выделения популяций гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, содержащих эндотелиальные клетки-предшественники, из костного мозга взрослых млекопитающих, предпочтительно, из костного мозга взрослых людей. Кроме того, из Lin⁻ HSC может быть создана линия генетически идентичных клеток (т.е. клонов), которая пригодна для регенеративной и репаративной терапии сосудов сетчатки, а также для лечения дегенерации нервной ткани сетчатки или улучшения ее состояния.

Краткое описание фигур

На фигуре 1 (а и b) изображены схематические диаграммы развивающейся сетчатки мыши. (а) Развитие первичного сплетения. (b) Вторая фаза образования сосудов сетчатки. GGL, слой клеток ганглиев; IPL, внутренний слой сплетения; INL, внутренний ядерный слой; OPL, внешний слой сплетения; ONL, внешний ядерный слой; RPE, пигментированный эпителий сетчатки; ON, зрительный нерв; P, периферия.

На фигуре 1с изображена характеристика разделенных с помощью проточной цитометрии клеток Lin⁺ HSC и Lin⁻ HSC, происходящих из костного мозга. Верхний ряд: точечная диаграмма распределения клеток, не меченных антителами, в которых R1 определяет поддающуюся количественному определению зону PE-позитивного окрашивания; R2 указывает на GFP-позитивное окрашивание; средний ряд: Lin⁻ HSC (C57B/6), и нижний ряд: клетки Lin⁺ HSC (C57B/6), каждая клеточная линия помечена конъюгированными с PE антителами против Sca-1, c-kit, Flk-1/KDR, CD31. Данные по Tie-2 были получены от мышей Tie-2-GFP. Проценты указывают на процент позитивно меченых клеток вне суммарной популяции Lin⁻ HSC или Lin⁺ HSC.

На фигуре 2 изображено приживление трансплантата Lin⁻ HSC в развивающейся сетчатке мыши. (а) Через 4 дня после введения (P6) в стекловидное тело eGFP⁺ Lin⁻ HSC клетки прикрепляются и дифференцируются на сетчатке. (b) Lin⁻ HSC (мыши B6.129S7-

Gtrosa26, окраска антителами против β -gal) фиксируются впереди сосудов, окрашенных антителами на коллаген IV (звездочка указывает верхушку сосудистой сети). (с)

Большинство клеток $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ (eGFP⁺) через 4 дня после введения (P6) были не способны дифференцироваться. Брыжеечные EC eGFP⁺ мыши через 4 дня после введения (P6).

(е) $\text{Lin}^- \text{HSC}$ (eGFP⁺) вводили в глаза взрослой мыши. (f) Слабое увеличение, eGFP⁺ $\text{Lin}^- \text{HSC}$ (стрелки) усаживаются и дифференцируются вдоль предсуществующей астроцитной матрицы у трансгенной мыши GFAP-GFP. (g) Более высокое увеличение, связь между клетками Lin^- (eGFP) и подлежащим астроцитом (стрелки). (h) Трансгенный контроль без введения GFAP-GFP. (i) Через 4 дня после введения (P6) eGFP⁺ $\text{Lin}^- \text{HSC}$ клетки мигрируют и подвергаются дифференцировке в зоне будущего глубокого сплетения. На левой фигуре представлена активность $\text{Lin}^- \text{HSC}$ на монтированной сетчатке целиком; на правой фигуре показана локализация клеток Lin^- (стрелки) в сетчатке (верх представляет собой сторону к стекловидному телу, низ - сторону к склере). (j) Двойное мечение антителами α -CD31-PE и α -GFP-alexa 488. Через семь дней после введения введенные $\text{Lin}^- \text{HSC}$ (eGFP), (красные) включались в сосудистую сеть (CD31). Стрелки указывают на зоны включения. (k) Клетки eGFP⁺ $\text{Lin}^- \text{HSC}$ образуют сосуды через четырнадцать дней после введения (P17). (l и m) Внутрисердечное введение родамин-декстрана указывает на то, что сосуды являются интактными и функционируют как в первичном (l), так и в глубоком (m) сплетении.

На фигуре 3 (а и б) показано, что клетки eGFP⁺ $\text{Lin}^- \text{HSC}$ фиксируются на глиоз (обозначенный астроцитами, экспрессирующими GFAP, дальнее левое изображение), индуцируемый как лазером (а), так и механическим повреждением (б) в сетчатке взрослой особи (звездочка указывает на место повреждения). Дальние правые изображения представляют собой более сильное увеличение, что говорит о тесной связи $\text{Lin}^- \text{HSC}$ и астроцитов. Отрезок калибровки = 20 мкм.

На фигуре 4 показано, что клетки $\text{Lin}^- \text{HSC}$ защищают сосудистую сеть мыши с дегенерацией сетчатки. (а-d) Сетчатка через 27 дней после введения (P33) с окраской на коллаген IV; (а) и (б) сетчатка с введенными клетками $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ (Balb/c) не демонстрируют различий в сосудистой сети по сравнению с нормальными мышами FVB; (с) и (d) сетчатка с введенными $\text{Lin}^- \text{HSC}$ (Balb/c) демонстрируют богатую сосудистую сеть, аналогичную таковой у мышей дикого типа; (а) и (с) криосрезы цельной сетчатки (верх представляет собой сторону к стекловидному телу, низ - сторону к склере) с окрашиванием DAPI; (б) и (d) глубокое сплетение целиком смонтированной сетчатки; (е) гистограмма, иллюстрирующая увеличение сосудистой сети глубокого сосудистого сплетения, образованной в сетчатках с введенными клетками $\text{Lin}^- \text{HSC}$ (n = 6). Протяженность глубокой васкуляризации сетчатки была оценена с помощью расчета суммарной длины сосудов в каждом изображении. Сравнивали среднюю суммарную длину сосудов/на поле с высоким увеличением (в микронах) для $\text{Lin}^- \text{HSC}$, $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ или контрольных сетчаток. (f) Сравнение длины глубокого сосудистого сплетения после введения клеток $\text{Lin}^- \text{HSC}$ (R, правый глаз) или $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ (L, левый глаз) от мыши rd/rd. Представлены результаты шести независимых мышей (каждый цвет представляет каждую мышь). (g) и (h) клетки $\text{Lin}^- \text{HSC}$ (Balb/c) также защищают сосудистую сеть rd/rd при введении в глаз на P15. Показано промежуточное и глубокое сосудистое сплетение сетчаток с введенными клетками $\text{Lin}^- \text{HSC}$ (G) или $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ (H) (через один месяц после введения).

На фигуре 5 показаны микрофотографии ткани сетчатки мышей: (а) глубокий слой целиком смонтированной сетчатки (мышь rd/rd), через пять дней после введения (P11) видны eGFP⁺ $\text{Lin}^- \text{HSC}$ (серые). (б) и (с) сосудистая сеть сетчатки мышей Tie-2-GFP (rd/rd) на P60, которые получали клетки $\text{Lin}^- \text{Balb/c}$ (б) или $\text{Lin}^+ \text{HSC}$ клетки (с), введение на P6. Только эндогенные эндотелиальные клетки (окрашенные GFP) визуализируются на левых панелях (б) и (с). Средние панели (б) и (с) окрашены антителом против CD31; стрелки указывают на сосуды, окрашенные на CD31, но не на GFP, правые панели (б) и

(с) демонстрируют окрашивание как на GFP, так и на CD31. (d) окрашивание на α -SMA введенных Lin⁻ HSC (левая панель) и контрольной сетчатки (правая панель).

На фигуре 6 показано, что Lin⁻ HSC, трансфецированные T2-TrpRS, ингибируют развитие сосудистой сети сетчатки мыши. (a) Схематическое представление TrpRS, T2-TrpRS и T2-TrpRS с сигнальной последовательностью Igk на аминоконце. (b) Сетчатка с введенными Lin⁻ HSC, трансфецированными T2-TrpRS, экспрессируют белок T2-TrpRS *in vivo*. (1) Рекombинантный T2-TrpRS, продуцируемый в *E. coli*; (2) Рекombинантный T2-TrpRS, продуцируемый в *E. coli*; (3) Рекombинантный T2-TrpRS, продуцируемый *E. coli*; (4) контрольная сетчатка; (5) сетчатка с введенными Lin⁻ HSC + pSecTag2A (только вектор); (6) сетчатка с введенными Lin⁻ HSC + pKLe135 (Igk-T2-TrpRS в pSecTag). (a) Эндогенный TrpRS. (b) Рекombинантный T2-TrpRS. (c) Сетчатка с введенным T2-TrpRS в Lin⁻ HSC. (с- f) Примеры первичного (поверхностного) и вторичного (глубокого) сплетений в сетчатках после введения, семь дней после введения. (с) и (d) Глаза с введенными Lin⁻ HSC, трансфецированными пустой плазмидой, развиваются нормально; (е) и (f) в большинстве случаев глаз с введенными Lin⁻ HSC, трансфецированными T2-TrpRS, характеризуется ингибированием глубокого сплетения; (с) и (е) первичное (поверхностное) сплетение; (d) и (f) вторичное (глубокое) сплетение. Нечеткое очертание сосудов, наблюдаемое в (f), представляет собой «проступание» изображений первичной сосудистой сети, представленной в (е).

На фигуре 7 представлена последовательность ДНК, кодирующая His₆-меченный T2-TrpRS, SEQ ID NO: 1.

На фигуре 8 представлена аминокислотная последовательность His₆-меченного T2-TrpRS, SEQ ID NO: 2.

На фигуре 9 представлены микрофотографии и электроретинограммы (ERG) сетчаток мышей, в глаза которых вводили Lin⁻ HSC по настоящему изобретению и Lin⁺ HSC (контроли).

На фигуре 10 изображены статистические графики, представляющие корреляцию между нейрональной защитой (ось Y) и васкулярной защитой (ось X) как для промежуточного (Int.), так и для глубокого слоя глаз мышей rd/rd, которым вводили Lin⁻ HSC.

На фигуре 11 изображены статистические графики, демонстрирующие отсутствие корреляции между нейрональной защитой (ось Y) и васкулярной защитой (ось X) для глаз мышей rd/rd, которым вводили Lin⁺ HSC.

На фигуре 12 представлена гистограмма длины сосудов (ось Y) в относительных условных единицах для глаз мышей rd/rd, которым вводили Lin⁻ HSC (темные столбики) и для глаз мышей rd/rd, которым не вводили Lin⁻ HSC (светлые столбики) во временные точки 1 месяц (1M), 2 месяца (2M) и 6 месяцев (6M) после введения.

На фигуре 13 представлены три гистограммы количества ядер во внешнем нервном слое (ONR) мышей rd/rd через 1 месяц (1M), 2 месяца (2M) и 6 месяцев (6M) после введения, и они демонстрируют значительное увеличение числа ядер для глаз, которым вводили Lin⁻ HSC (темные столбики) по отношению к контрольным глазам, которым вводили Lin⁺ HSC (светлые столбики).

На фигуре 14 изображены графики числа ядер во внешнем нейрональном слое для индивидуальных мышей rd/rd, сравнение правого глаза (R, вводили Lin⁻ HSC) с левым глазом (L, вводили Lin⁺ HSC) во временные точки (после введения) 1 месяц (1M), 2 месяца (2M) и 6 месяцев (6M); каждая линия на графике - сравнение глаз индивидуальной мыши.

На фигуре 15 изображены изменения сосудистой сети и нервных клеток сетчатки у мышей rd1/rd1 (C3H/HeJ, левые панели) и мышей дикого типа (C57BL/6, правые панели). Сосудистая сеть промежуточного (верхние панели) или глубокого (средние панели) сосудистых сплетений в целиком собранной сетчатке (красный: коллаген IV, зеленый: CD31) и представлены срезы (красный: DAPI, зеленый: CD31, нижние панели) тех же самых сетчаток (P: постнатальный день). (GCL: слой клеточных ганглиев, INL: внутренний

ядерный слой, ONL: внешний ядерный слой).

На фигуре 16 показано, что введение Lin⁻ HSC защищает нервные клетки мышей rd1/rd1 от дегенерации. А, В и С сосудистая сеть сетчатки промежуточного (int.) или глубокого сплетения и срезы глаза с введением Lin⁻ HSC (правые панели) и второго глаза с введением контрольных клеток (CD31⁻) (левые панели) на P30 (А), P60 (В) и P180 (С). D, средняя суммарная длина сосудистой сети (+ или - стандартная ошибка среднего) в сетчатках с введением Lin⁻ HSC и с введением контрольных клеток (CD31⁻) на P30 (левый, n = 10), P60 (средний, n = 10) и P180 (правый, n = 6). Данные по промежуточному (Int.) и глубокому сосудистому сплетению показаны отдельно (ось Y: относительная длина сосудистой сети). Е, среднее число клеточных ядер в ONL на P30 (левый, n = 10), P60 (средний, n = 10) и P180 (правый, n = 6) в сетчатках с введением контрольных клеток (CD31⁻) или Lin⁻ HSC (ось Y: относительное число клеточных ядер в ONL). F, Линейные корреляции между длиной сосудистой сети (ось X) и числом клеточных ядер в ONL (ось Y) на P30 (левый), P60 (средний) и P180 (правый) в сетчатках с введением Lin⁻ HSC или контрольных клеток.

На фигуре 17 показано, что защитная функция сетчатки достигается путем введения Lin⁻ HSC. Для оценки функции сетчаток с введением Lin⁻ HSC или контрольных клеток (CD31⁻) применяли электроретинографические (ERG) записи. А и В, примеры случаев защищенной и не защищенной сетчаток через 2 месяца после введения. Показаны срезы сетчатки правого глаза с введением Lin⁻ HSC (А) и левого глаза с введением контрольных клеток CD31⁻ (В) (зеленый: сосудистая сеть, окрашенная на CD31, красный: ядра, окрашенные DAPI). С, результаты ERG от того же животного, что и представленный в А и В.

На фигуре 18 показано, что популяция клеток костного мозга человека может защищать дегенерирующие сетчатки у мыши rd1 (А-С). Защита наблюдалась также на другой модели дегенерации сетчатки, rd10 (D-K). А, Lin⁻ HSC человека (hLin⁻ HSC), меченные зеленым красителем, могут дифференцироваться в клетки сосудов сетчатки после введения в стекловидное тело мышам C3SnSmn.CB17-Prkdc SCID. В и С, сосудистая сеть сетчатки (левые панели; верх: промежуточное сплетение, низ: глубокое сплетение) и нервные клетки (правая панель) в глазу с введением hLin⁻ HSC (В) или во втором, контрольном глазу (С) через 1,5 месяца после введения. D-K, защита мышей rd10 с помощью Lin⁻ HSC (введенных на P6). Показаны примеры сетчаток на P21 (D: Lin⁻ HSC, H: контрольные клетки), P30 (E: Lin⁻ HSC, I: контрольные клетки), P60 (F: Lin⁻ HSC, J: контрольные клетки) и P105 (G: Lin⁻ HSC, K: контрольные клетки) (глаза, подвергавшиеся лечению, и контрольные глаза в каждой временной точке были от того же животного). Сосудистую сеть сетчатки (верхнее изображение в каждой панели представляет собой промежуточное сплетение; среднее изображение в каждой панели представляет собой глубокое сплетение) окрашивали на CD31 (зеленый) и коллаген IV (красный). В изображении внизу каждой панели представлен поперечный срез, сделанный из той же сетчатки (красный: DAPI, зеленый: CD31).

На фигуре 19 продемонстрировано, что количество кристаллин α A повышается при защите клеток внешнего ядерного слоя после введения Lin⁻ HSC, но не в контрольных глазах с введением контрольных клеток. Левая панель; контроль IgG в защищенной сетчатке, средняя панель; кристаллин α A в защищенной сетчатке, правая панель; кристаллин α A в не защищенной сетчатке.

На фигуре 20 представлены таблицы генов, которые стимулированы в сетчатках мышей, которым вводили Lin⁻ HSC по настоящему изобретению. (А) Гены, чья экспрессия повышена в 3 раза в сетчатках мышей, которым вводили мышинный Lin⁻ HSC. (В) Гены кристаллина, которые стимулируются в сетчатках мышей, которым вводили мышинные Lin⁻ HSC. (С) Гены, чья экспрессия увеличена в 2 раза в сетчатках мышей, которым вводили Lin⁻ HSC человека. (D) Гены нейротрофических факторов или ростовых факторов, чья экспрессия увеличена в сетчатках мышей, которым вводили Lin⁻ HSC человека.

На фигуре 21 показано распределение поверхностных антигенов CD31 и интегрин $\alpha 6$ на позитивных CD133 (CD133⁺) и на негативных CD133 (CD133⁻) популяциях Lin⁻ HSC по настоящему изобретению.

На фигуре 22 представлено постнатальное развитие сетчатки мышей C57/B16 дикого типа при нормальных уровнях кислорода (нормоксия) на постнатальные дни с P0 до P30.

На фигуре 23 представлена модель индуцированной кислородом ретинопатии у мышей C57/B16, содержащихся при высоких уровнях кислорода (гипероксия; 75% кислорода), между P7 и P12 с последующей нормоксией с P12-P17.

На фигуре 24 представлена защита сосудов с помощью введения популяций Lin⁻ HSC по настоящему изобретению в модели индуцированной кислородом ретинопатии.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

Стволовые клетки обычно идентифицируют по распределению антигенов на поверхности клеток (для подробного обсуждения см. Stem Cells: Scientific Progress and Future Directions, доклад, подготовленный национальными институтами здоровья, управление научной политикой, июнь 2001 г., приложение E: Stem Cell Markers, который включен здесь в качестве ссылки в полном объеме).

Гематопозитические стволовые клетки представляют собой такие стволовые клетки, которые способны развиваться в различные типы клеток крови, например, в В-клетки, Т-клетки, гранулоциты, тромбоциты и эритроциты. Поверхностные антигены линий дифференцировки представляют собой группу белков клеточной поверхности, которые являются маркерами линий дифференцировки зрелых клеток крови, включая CD2, CD3, CD11, CD11a, Mac-1 (CD11b:CD18), CD14, CD16, CD19, CD24, CD33, CD36, CD38, CD45, CD45RA, Ly-6G мыши, TER-119 мыши, CD56, CD64, CD68, CD86 (B7.2), CD66b, антиген лейкоцитов человека DR (HLA-DR) и CD235a (гликофорин A). Гематопозитические стволовые клетки, которые не экспрессируют существенные уровни данных антигенов, обычно относят к негативной линии дифференцировки (Lin⁻). Гематопозитические стволовые клетки человека обычно экспрессируют другие поверхностные антигены, такие как CD31, CD34, CD117 (c-kit) и/или CD133. Гематопозитические стволовые клетки мыши обычно экспрессируют другие поверхностные антигены, такие как CD34, CD117 (c-kit), Thy-1, и/или Sca-1.

Настоящее изобретение относится к выделенным гематопозитическим стволовым клеткам, которые не экспрессируют существенные уровни «поверхностного антигена линии дифференцировки» (Lin) на поверхности своих клеток. Такие клетки обозначают здесь как гематопозитические стволовые клетки «негативной линии дифференцировки» или «Lin⁻». В частности, изобретение относится к популяции гематопозитических стволовых клеток Lin⁻ (Lin⁻ HSC), которая включает эндотелиальные клетки-предшественники (EPC), которые способны включаться в развивающуюся сосудистую сеть и затем дифференцироваться, становясь клетками эндотелия сосудов. Предпочтительно, выделенные популяции Lin⁻ HSC присутствуют в культуральной среде, такой как забуференный физиологический раствор (ЗФР).

Используемое здесь и в прилагаемой формуле изобретения выражение «взрослый» в отношении к костному мозгу включает костный мозг, выделенный в постнатальный период, т.е. от неполовозрелых и взрослых индивидуумов в отличие от эмбрионов. Термин «взрослое млекопитающее» относится как к неполовозрелым, так и к полностью половозрелым млекопитающим.

Настоящее изобретение относится к выделенным популяциям гематопозитических стволовых клеток млекопитающих негативной линии дифференцировки (Lin⁻ HSC), содержащим эндотелиальные клетки-предшественники (EPC). Выделенные популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению, предпочтительно, включают клетки млекопитающих, в которых по меньшей мере приблизительно 20% клеток экспрессируют поверхностный антиген CD31, обычно присутствующий на эндотелиальных клетках. В другом варианте осуществления, по меньшей мере приблизительно 50% клеток экспрессируют CD31, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 65%, наиболее предпочтительно, по

меньшей мере приблизительно 75%. Предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 50% клеток популяций Lin⁻ HSC по настоящему изобретению, предпочтительно, экспрессируют антиген интегрин $\alpha\beta$.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления популяции Lin⁻ HSC мыши по меньшей мере приблизительно 50% клеток экспрессирует антиген CD31 и по меньшей мере, приблизительно, 50% клеток экспрессирует антиген CD117 (c-kit).

Предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 75% клеток Lin⁻ HSC экспрессирует антиген CD31, более предпочтительно, приблизительно 81% клеток. В другом предпочтительном варианте осуществления у мышей по меньшей мере приблизительно 65% клеток экспрессирует поверхностный антиген CD117, более предпочтительно, приблизительно 70% клеток. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения представлена популяция Lin⁻ HSC мыши, в которой от приблизительно 50% до приблизительно 85% клеток экспрессирует поверхностный антиген CD31 и от приблизительно 70% до приблизительно 75% клеток экспрессирует поверхностный антиген CD117.

Другим предпочтительным вариантом осуществления является популяция Lin⁻ HSC человека, в которой клетки являются негативными в отношении CD133, в которой по меньшей мере приблизительно 50% клеток экспрессирует поверхностный антиген CD31 и, по меньшей мере, приблизительно 50% клеток экспрессирует антиген интегрин $\alpha\beta$. Еще одним предпочтительным вариантом осуществления является популяция Lin⁻ HSC человека, в которой клетки являются позитивными в отношении CD133, в которой настолько мало как приблизительно 30% клеток экспрессирует поверхностный антиген CD31 и настолько мало как приблизительно 30% клеток экспрессирует антиген интегрин $\alpha\beta$.

Выделенные популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению избирательно направлены на астроциты и включаются во вновь образующуюся сосудистую сеть сетчатки при введении в стекловидное тело глаза таких видов млекопитающих, как мышь или человек, из которых клетки были выделены.

Выделенные популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению включают эндотелиальные клетки-предшественники, которые дифференцируются в эндотелиальные клетки и создают сосудистые структуры в сетчатке. В частности, популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению могут использоваться для лечения заболеваний с неоваскуляризацией сетчатки и дегенеративных заболеваний сосудов сетчатки, а также для восстановления поврежденных сосудов сетчатки. Клетки Lin⁻ HSC по настоящему изобретению стимулируют защиту нервных клеток в сетчатке и усиливают позитивную регуляцию антиапоптозных генов. Неожиданно было обнаружено, что клетки Lin⁻ HSC взрослого человека по настоящему изобретению могут ингибировать дегенерацию сетчатки даже у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID), страдающих дегенерацией сетчатки. Кроме того, популяции Lin⁻ HSC могут использоваться для лечения дефектов сетчатки глаз новорожденных млекопитающих, таких, которые страдают индуцированной кислородом ретинопатией или ретинопатией недоношенных.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения глазных заболеваний у млекопитающего, предусматривающему выделение из костного мозга млекопитающего популяции гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, которая включает эндотелиальные клетки-предшественники, и введение выделенных стволовых клеток в стекловидное тело глаза млекопитающего в количестве, достаточном для купирования заболевания. Настоящий способ может быть применен для лечения глазных заболеваний, таких как дегенеративные заболевания сетчатки, дегенеративные заболевания сосудов сетчатки, ишемические ретинопатии, кровоизлияния сосудов, утечка из сосудов и хороидопатии новорожденных, неполовозрелых или полностью половозрелых млекопитающих. Примеры таких заболеваний включают связанную с возрастом дегенерацию желтого пятна (ARMD), диабетическую ретинопатию (DR), предполагаемый

глазной гистоплазмоз (POHS), ретинопатию недоношенных (ROP), серповидно-клеточную анемию и пигментозный ретинит, а также повреждения сетчатки.

Количество стволовых клеток, вводимых в глаз, достаточно для купирования патологического состояния глаза. Например, число клеток может быть эффективным для восстановления повреждения сетчатки глаза, стабилизации неоваскуляризации сетчатки, созревания новых сосудов сетчатки и предотвращения утечки из сосудов или их восстановления и кровоизлияния сосудов.

Клетки популяций Lin⁻ HSC по настоящему изобретению могут быть трансфецированы терапевтически эффективными генами, такими как гены, кодирующие антиангиогенные белки для применения при генной терапии глазных заболеваний на основе клеток, и гены, кодирующие нейротрофические агенты для увеличения эффектов защиты нервных клеток.

Трансфецированные клетки могут включать любой ген, который терапевтически эффективен для лечения нарушений сетчатки. В одном из предпочтительных вариантов осуществления трансфецированные Lin⁻ HSC по настоящему изобретению включают операбельный ген, кодирующий антиангиогенный пептид, включая белки или фрагменты белков, такие как TrpRS или его антиангиогенные фрагменты, например, фрагменты T1 и T2 TrpRS, которые подробно описаны в находящейся в процессе одновременного рассмотрения патентной заявке США, сообладателями которой являются заявители, с серийным No. 10/080839, описание которой приведено здесь в качестве ссылки в полном объеме. Трансфецированные Lin⁻ HSC, кодирующие антиангиогенный пептид по настоящему изобретению, могут использоваться для лечения заболеваний сетчатки, связанных с аномальным развитием сосудов, таких как диабетическая ретинопатия и подобные ей заболевания. Предпочтительно, Lin⁻ HSC являются клетками человека.

В другом предпочтительном варианте осуществления трансфецированные Lin⁻ HSC по настоящему изобретению включают операбельный ген, кодирующий нейротрофический агент, такой как фактор роста нервов, нейротрофин-3, нейротрофин-4, нейротрофин-5, цилиарный нейротрофический фактор, нейротрофический фактор, происходящий из пигментного эпителия сетчатки, инсулиноподобный ростовой фактор, нейротрофический фактор, происходящий из линии глиальных клеток, нейротрофический фактор, происходящий из мозга, и тому подобное. Такие нейротрофические Lin⁻ HSC могут использоваться для стимуляции защиты нервных клеток при дегенеративных заболеваниях нервных клеток сетчатки, таких как глаукома и пигментозный ретинит, при лечении повреждений нервных клеток сетчатки и тому подобное. Сообщалось, что имплантаты цилиарного нейротрофического фактора могут использоваться для лечения пигментозного ретинита (смотри, Kirby et al. 2001, Mol Ther. 3(2):241-8; Farrar et al. 2002, EMBO Journal 21:857-864). Нейротрофический фактор, полученный из мозга, как сообщают, модулирует гены, связанные с ростом, в поврежденных ганглиях сетчатки (смотри, Fournier, et al., 1997, J. Neurosci. Res. 47:561-572). Нейротрофический фактор, полученный из линии глиальных клеток, как сообщается, снижает дегенерацию фоторецепторов при пигментозном ретините (смотри, McGee et al. 2001, Mol Ther. 4(6): 622-9).

Настоящее изобретение также относится к способу выделения гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, включающих эндотелиальные клетки-предшественники, из костного мозга млекопитающего. Способ предусматривает стадии (а) экстрагирования костного мозга из взрослой особи млекопитающего; (b) отделения количества моноцитов из костного мозга; (с) мечения моноцитов набором конъюгированных с биотином антител линий дифференцировки против одного или нескольких поверхностных антигенов, предпочтительно, против антигенов линий дифференцировки, выбранных из группы, включающей CD2, CD3, CD4, CD11, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD24, CD33, CD36, CD38, CD45, Ly-6G (мышинный), TER-119 (мышинный), CD45RA, CD56, CD64, CD68, CD86 (B7.2), CD66b, антиген лейкоцитов человека DR (HLA-DR) и CD235a (гликофорин А); (d) удаления моноцитов, которые являются позитивными в отношении указанного одного или нескольких поверхностных антигенов

линий дифференцировки из множества моноцитов, и получения популяции гематопоэтических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, содержащей эндотелиальные клетки-предшественники, в которой, предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 20% клеток экспрессирует CD31.

- 5 Когда Lin⁻ HSC выделяют из костного мозга взрослых людей, предпочтительно, моноциты метят набором конъюгированных с биотином антител для линий дифференцировки против поверхностных антигенов линий дифференцировки CD2, CD3, CD4, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD33, CD38, CD45RA, CD64, CD68, CD86 (B7.2) и CD235a. Когда Lin⁻ HSC выделяют из костного мозга взрослых мышей, предпочтительно, моноциты метят набором конъюгированных с биотином антител линий дифференцировки против поверхностных антигенов линий дифференцировки CD3, CD11, CD45, Ly-6G и TER-119.

- 15 В предпочтительном способе клетки выделяют из костного мозга взрослых людей и, дополнительно, отделяют линию дифференцировки CD133. В одном из предпочтительных способов выделения Lin⁻ HSC предусмотрена дополнительная стадия мечения моноцитов конъюгированным с биотином антителом против CD133 и получения CD133 позитивной популяции Lin⁻ HSC. Обычно менее приблизительно 30% таких клеток экспрессируют CD31 и менее приблизительно 30% таких клеток экспрессируют интегрин α 6. CD133 позитивные популяции Lin⁻ HSC человека по настоящему изобретению могут направленно доставляться к местам периферической управляемой ишемией неоваскуляризации при введении в глаза, в которых не возникает ангиогенез.

- В еще одном предпочтительном способе выделения Lin⁻ HSC человека предусмотрены дополнительные стадии мечения моноцитов конъюгированным с биотином антителом против CD133, удаления CD133 позитивных клеток и получения CD133 негативной популяции Lin⁻ HSC. Обычно, по меньшей мере приблизительно 50% таких клеток экспрессируют CD31 и по меньшей мере приблизительно 50% таких клеток экспрессируют интегрин α 6. CD133 негативные популяции Lin⁻ HSC человека по настоящему изобретению могут включаться в развивающуюся сосудистую сеть при введении в глаза, в которых происходит ангиогенез.

- Настоящее изобретение также относится к способу лечения глазных заболеваний с ангиогенезом путем введения трансфецированных клеток Lin⁻ HSC по настоящему изобретению с помощью инъекции клеток в стекловидное тело глаза. Такие трансфецированные клетки Lin⁻ HSC включают Lin⁻ HSC, трансфецированные терапевтически эффективным геном, таким как ген, кодирующий антиангиогенный или нейротрофический продукт гена. Предпочтительно, трансфецированные клетки Lin⁻ HSC представляют собой клетки человека.

- Предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 1×10^5 клеток Lin⁻ HSC или трансфецированных клеток Lin⁻ HSC вводят путем инъекции в стекловидное тело в глаз млекопитающего, страдающего дегенеративным заболеванием сетчатки. Количество клеток для введения может зависеть от степени дегенерации сетчатки, возраста млекопитающего и других факторов, которые должны быть очевидны специалисту в области лечения заболеваний сетчатки. Lin⁻ HSC могут быть введены однократной дозой или многократным введением доз в течение периода времени, определенного врачом, наблюдающим за лечением.

- Lin⁻ HSC по настоящему изобретению могут использоваться для лечения повреждений сетчатки и дефектов сетчатки, связанных с разрывами или дегенерацией сосудистой сети сетчатки или дегенерацией нервных клеток сетчатки. Lin⁻ HSC человека также могут использоваться для создания линии генетически идентичных клеток, т.е. клонов для применения в регенеративном или репаративном лечении сосудистой сети сетчатки, а также для лечения или улучшения состояния при дегенерации нервных клеток сетчатки.

Способы

Пример 1. Выделение и обогащение клеток; получение популяций A и B Lin⁻ HSC мыши

Общая процедура. Все оценки *in vivo* проводили в соответствии с Правилами по уходу и применению лабораторных животных NIH, и все процедуры по оценке были санкционированы сертификатами Комиссии по уходу и применению животных исследовательского института (TSRI, La Jolla, CA). Клетки костного мозга экстрагировали из B6.129S7-Gtrosa26, Tie-2GFP, ACTbEGFP, FVB/NJ (rd/rd мышей) или взрослых мышей Balb/cBYJ (The Jackson Laboratory, ME).

После этого отделяли моноциты путем разделения в градиенте плотности с применением полисахарозного градиента HISTOPAQUE® (Sigma, St. Louis, MO) и метили набором конъюгированных с биотином антител линий дифференцировки (CD45, CD3, Ly-6G, CD11, TER-119, Pharmingen, San Diego, CA) для селекции Lin⁻ у мыши. Клетки позитивной (Lin⁺) линии дифференцировки отделяли и удаляли из Lin⁻ HSC с помощью оборудования для магнитного разделения (сортер AUTOMACS™, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Полученную популяцию Lin⁻ HSC, содержащую эндотелиальные клетки-предшественники, дополнительно характеризовали с помощью проточного цитометра FACS™ Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) с применением следующих антител: конъюгированного с PE Sca-1, c-kit, KDR и CD31 (Pharmingen, San Diego, CA). Клетки костного мозга Tie-2-GFP применяли для характеристики Tie-2.

Для получения эндотелиальных клеток взрослой мыши ткань мезентерия хирургически удаляли из мыши ACTbEGFP и помещали в коллагеназу (Worthington, Lakewood, NJ) для переваривания ткани с последующим фильтрованием с применением фильтра 45 мкм. Прошедший материал собирали и инкубировали в среде роста эндотелия (Clonetics, San Diego, CA). Эндотелиальные свойства были подтверждены обнаружением кубической морфологии, окраской mAb против CD31 (Pharmingen) и исследованием культур на предмет образования трубчато-подобных структур в матриксе MATRIGEL™ (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

Популяция A Lin⁻ HSC мыши. Клетки костного мозга экстрагировали из мышей ACTbEGFP в соответствии с общей процедурой, описанной выше. Клетки Lin⁻ HSC характеризовали проточной цитометрией FACS по антигенным маркерам клеточной поверхности CD31, c-kit, Sca-1, Flk-1 и Tie-2. Результаты показаны на фиг. 1с. Приблизительно 81% Lin⁻ HSC экспонируют маркер CD31, приблизительно 70,5% Lin⁻ HSC экспонируют маркер c-kit, приблизительно 4% Lin⁻ HSC экспонируют маркер Sca-1, приблизительно 2,2% Lin⁻ HSC экспонируют маркер Flk-1 и приблизительно 0,91% Lin⁻ HSC экспонируют маркер Tie-2. Напротив, Lin⁺ HSC, которые были выделены из данных клеток костного мозга, обладали в значительной мере отличным профилем маркеров клетки (т.е. CD31: 37,4%; c-kit: 20%; Sca-1: 2,8%; Flk-: 0,05%).

Популяция B Lin⁻ HSC мыши. Клетки костного мозга экстрагировали из мышей Balb/C, ACTbEGFP и C3H в соответствии с общей процедурой, описанной выше. Клетки Lin⁻ HSC анализировали на наличие маркеров клеточной поверхности (Sca-1, KDR, c-kit, CD34, CD31 и различных интегринов: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, α_M , α_V , α_X , α_{IV} , β_1 , β_4 , β_3 , β_4 , β_5 и β_7). Результаты показаны в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика популяции B Lin ⁻ HSC	
Маркер клеток	Lin ⁻ HSC
$\alpha 1$	0,10
$\alpha 2$	17,57
$\alpha 3$	0,22
$\alpha 4$	89,39
$\alpha 5$	82,47
$\alpha 6$	77,70
α_L	62,69
α_M	35,84

α X	3,98
α V	33,64
α IIb	0,25
β 1	86,26
β 2	49,07
β 3	45,70
β 4	0,68
β 5	9,44
β 7	11,25
CD31	51,76
CD34	55,83
Flk-1/KDR	2,95
c-kit(CD117)	74,42
Sca-1	7,54

Пример 2. Введение клеток в стекловидное тело в мышинной модели.

В веке мыши делали надрез с помощью тонкого лезвия для экспозиции глазного яблока с P2 по P6. Популяцию A негативной линии дифференцировки HSC по настоящему изобретению (приблизительно 10^5 клеток в приблизительно от 0,5 мкл до приблизительно 1 мкл среды клеточной культуры) вводили затем в стекловидное тело с помощью шприца с иглой 33 размера (Hamilton, Reno, NV).

Пример 3. Трансфекция EPC.

Lin^- HSC мыши (популяция A) трансфецировали ДНК, кодирующей фрагмент T2 TrpRS и включающей также метку His_6 (SEQ ID NO: 1, фиг. 7), с применением реагента трансфекции FuGENETM6 (Roche, Indianapolis, IN) согласно протоколу производителя.

Клетки Lin^- HSC (приблизительно 10^6 клеток на мл) суспендировали в среде opti-MEM® (Invitrogen, Carlsbad, CA), содержащей фактор стволовых клеток (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Затем добавляли смесь ДНК (приблизительно 1 мкг) и реагента FuGENE (приблизительно 3 мкл), и смеси инкубировали при приблизительно 37°C в течение приблизительно 18 часов. После инкубации клетки промывали и собирали. Степень трансфекции в данной системе составляла приблизительно 17%, что было подтверждено анализом FACS. Продукция T2 была подтверждена с помощью иммуноблоттинга. Аминокислотная последовательность меченого His_6 T2-TrpRS показана как SEQ ID NO: 2, фиг. 8.

Пример 4. Иммуногистохимия и конфокальный анализ.

Сетчатки мышей брали в различные моменты времени и подготавливали либо для монтирования целиком, либо для получения криосрезов. Для монтирования целиком сетчатки фиксировали 4% параформальдегидом и блокировали в 50% сыворотке плодов телят (FBS) и 20% нормальной сыворотке козы в течение одного часа при комнатной температуре. Сетчатки обрабатывали первичными антителами и проявляли вторичными антителами. Примененными в качестве первичных были: анти-коллаген IV (Chemicon, Temecula, CA), анти- β -gal (Promega, Madison, WI), анти-GFAP (Dako Cytomation, Carpinteria, CA), анти- α -актин гладких мышц (α -SMA, Dako Cytomation). Примененные вторичные антитела были конъюгированы либо с Alexa 488, либо 594 флуоресцентными маркерами (Molecular Probes, Eugene, OR). Изображения получали с помощью конфокального микроскопа MRC 1024 (Bio-Rad, Hercules, CA). Трехмерные изображения создавали с применением программы LASERSHARP® (Bio-Rad) для оценки трех различных слоев развития сосудов в монтированной целиком сетчатке. Для создания 3D изображений использовали разницу в пиксельной интенсивности GFP между мышами (eGFP) с увеличенным GFP и мышами GFAP/wtGFP.

Пример 5. Количественный анализ ангиогенеза сетчатки у мышей *in vivo*.

Для анализа T2-TrpRS по трехмерным изображениям сетчаток мышей реконструировали первичное и глубокое сплетения. Первичное сплетение делили на две категории: нормальное развитие или задержанная прогрессия сосудов. Категории ингибирования

развития глубоких сосудов истолковывали на основании процента ингибирования сосудов, включая следующие критерии: полное ингибирование образования глубокого сплетения обозначали как «полное», нормальное развитие сосудов (включая ингибирование менее чем на 25%) обозначали как «нормальное», а остальное обозначали как «частичное». Для

5 получения выходных данных для мышей rd/rd фиксировали с помощью объектива 10х четыре отдельные области глубокого сплетения в каждой монтированной целиком сетчатке. Общую длину сосудистого русла рассчитывали для каждого изображения, суммировали и сравнивали между группами. Для получения точной информации Lin⁻ HSC вводили в один глаз, а Lin⁺ HSC в другой глаз той же самой мыши. Контрольные сетчатки

10 без введения брали из того же вывода.

Пример 6. Мышинные модели повреждения сетчатки у взрослых особей.

Были созданы лазерная и раневая модели с применением либо диодного лазера (150 мвт, 1 секунда, 50 мм), либо механического прокалывания сетчатки мыши иглой 27

15 размера. Через пять дней после нанесения травмы вводили клетки с помощью способа введения в стекловидное тело. Через пять дней от мышей получали глаза.

Пример 7. Нейротропная защита при регенерации сетчатки.

Берущие начало из костного мозга взрослой мыши гематопозитические стволовые клетки негативной линии дифференцировки (Lin⁻ HSC) обладают васкулотропным и нейротропным

20 защитным действием в мышинной модели дегенерации сетчатки. В стекловидное тело правого глаза 10-дневных мышей вводили приблизительно 0,5 микролитров, содержащих приблизительно 10⁵ Lin⁻ HSC по настоящему изобретению, и через 2 месяца производили оценку на наличие сосудистой сети и количество ядер нейронального слоя сетчатки. В левый глаз тех же мышей вводили приблизительно такое же количество Lin⁺ HSC в

25 качестве контроля, и их оценивали сходным образом. Как показано на фиг. 9, в глазах, обработанных Lin⁻ HSC, сосудистая сеть сетчатки выглядела почти нормальной, внутренний ядерный слой был почти нормальным, а наружный ядерный слой (ONL) содержал от приблизительно 3 до приблизительно 4 слоев ядер. Напротив, в контралатеральном глазе, обработанном Lin⁺ HSC, имелся заметно атрофичный средний

30 сосудистый слой сетчатки, полностью атрофичный наружный сосудистый слой сетчатки; внутренний ядерный слой был заметно атрофичным, а наружный ядерный слой был полностью утрачен. Это было драматически иллюстрировано у мыши 3 и мыши 5. У мыши 1 не было эффекта защиты, и это было характерно для приблизительно 15% мышей с

введением.

35 При оценке функции зрения с помощью электроретинограммы (ERG) восстановление позитивной ERG наблюдалась, когда наблюдалась и сосудистая, и нейрональная защита (мыши 3 и 5). Позитивная ERG не наблюдалась, когда не происходила сосудистая или нейрональная защита (мышь 1). Данная корреляция между сосудистой и нейротропной защитой глаз мышей rd/rd под действием Lin⁻ HSC по настоящему изобретению

40 иллюстрируется графиком регрессионного анализа, показанным на фиг. 10. Корреляция между нейрональным (ось y) и сосудистым (ось x) восстановлением наблюдалась для сосудистой сети промежуточного типа ($r=0,45$) и для глубокой сосудистой сети ($r=0,67$).

На фиг. 11 показано отсутствие сколь-либо статистически значимой корреляции между

45 сосудистой и нейрональной защитой под действием Lin⁺ HSC. Сосудистую защиту оценивали количественно, и результаты представлены на фигуре 12. Данные для мышей через 1 месяц (1M), 2 месяца (2M) и 6 месяцев (6M) после введения, показанные на фиг. 12, показывают, что длина сосудистой сети значительно возрастала в глазах, обработанных Lin⁻ HSC по настоящему изобретению (темные столбики) по сравнению с

50 длиной сосудистой сети в необработанных глазах тех же мышей (светлые столбики), в особенности через 1 месяц и 2 месяца после введения. Эффект нейротропной защиты количественно оценивали подсчетом ядер во внутреннем и наружном ядерных слоях через приблизительно два месяца после введения Lin⁻ HSC или Lin⁺ HSC. Результаты представлены на фигурах 13 и 14.

Пример 8. Популяция Lin⁻ HSC человека.

Клетки костного мозга экстрагировали из здоровых взрослых добровольцев с помощью общей процедуры, описанной выше. После этого моноциты отделяли разделением в градиенте плотности с применением градиента полисахарозы HISTOPAQUE® (Sigma, St. Louis, MO). Для выделения популяции Lin⁻ HSC из мононуклеарных клеток костного мозга человека применяли следующую панель конъюгированных с биотином антител линий дифференцировки с системой магнитного разделения (сортер AUTOMACS™, Miltenyi Biotec, Auburn, CA): CD2, CD3, CD4, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD33, CD38, CD45RA, CD64, CD68, CD86, CD235a (Pharmingen).

Популяцию Lin⁻ HSC человека затем разделяли на две субпопуляции на основании экспрессии CD133. Клетки метили конъюгированными с биотином антителами против CD133 и разделяли на CD133 позитивную и CD133 негативную субпопуляции.

Пример 9. Введение в стекловидное тело клеток человека и мыши в мышинных моделях дегенерации сетчатки.

В качестве моделей дегенерации сетчатки применяли линии мышей C3H/HeJ, C3SnSmn.CB17-Prkdc SCID и rd10. Мыши C3H/HeJ и C3SnSmn.CB17-Prkdc SCID (The Jackson Laboratory, Maine) были гомозиготными в отношении мутации дегенерации сетчатки (rd1), мутации, которая вызывает раннее наступление тяжелой дегенерации сетчатки. Мутация локализуется в экзоне 7 гена Pde6b, кодирующего β субъединицу фосфодиэстеразы цГМФ фоторецептора палочек. Мутация данного гена была обнаружена у больных людей с аутосомным рецессивным пигментозным ретинитом (RP). Мыши C3SnSmn.CB17-Prkdc SCID также являются гомозиготными в отношении спонтанной мутации тяжелого сочетанного иммунодефицита (Prkdc SCID), и их применяли для экспериментов по пересадке клеток человека. Дегенерация сетчатки у мышей rd10 вызывается мутацией в экзоне 13 гена Pde6b. Она также является клинически близкой моделью RP при более позднем наступлении и более умеренной дегенерации по сравнению с rd1/rd1. Все оценки производили в соответствии с Правилами по уходу и применению лабораторных животных NIH, и все процедуры были санкционированы сертификатами Комиссии по уходу и применению животных исследовательского института.

В веке мыши делали надрез с помощью тонкого лезвия для экспозиции глазного яблока с P2 по P6. Клетки негативной линии дифференцировки HSC популяции A мыши или популяции C человека (приблизительно 10⁵ клеток в приблизительно от 0,5 мкл до приблизительно 1 мкл среды клеточной культуры) вводили затем в стекловидное тело глаза мыши с помощью шприца с иглой 33 размера (Hamilton, Reno, NV). Для визуализации введенных клеток человека клетки метили красителем (Cell tracker green CMFDA, Molecular Probes) перед введением.

Сетчатки брали в различные моменты времени и фиксировали 4% параформальдегидом (PFA) и метанолом с последующим блокированием в 50% FBS/20% NGS в течение одного часа при комнатной температуре. Для окрашивания сосудистой сети сетчатки инкубировали с антителами против CD31 (Pharmingen) и против коллагена IV (Chemicon) и затем с конъюгированными с Alexa 488 или 594 вторичными антителами (Molecular Probes, Eugene, Oregon). Сетчатки раскладывали плоско с четырьмя радиальными расслабляющими надрезами для получения монтированного целиком препарата. Изображения сосудистой сети в сосудистых сплетениях промежуточной или глубокой сетчатки (смотри Dorrell et al. 2002 Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 43:3500-3510) получали с помощью конфокального микроскопа Radiance MP2100 и программы LASERSHARP® (Biorad, Hercules, California). Для количественной оценки сосудистой сети из средней части промежуточного или глубокого слоев случайным образом отбирали четыре независимых поля (900 мкм x 900 мкм) и измеряли общую длину сосудистой сети с применением анализирующей программы LASERPIX® (Biorad). Для последующего анализа применяли общую длину данных четырех полей в одном и том же сплетении.

Плоско монтированные сетчатки повторно заключали для получения криостатных срезов. Сетчатки помещали в 4% PFA на ночь с последующей инкубацией с 20% сахарозой.

Сетчатки заключали в соединение для получения срезов при оптимальной температуре (OCT: Tissue-Tek; Sakura FineTech, Torrance, CA). Криостатные срезы (10 мкм) повторно гидратировали в 3ФР, содержащем ядерный краситель DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). Конфокальная микроскопия включала меченые DAPI ядерные изображения трех различных областей (шириной 280 мкм, беспристрастный выбор) на одном срезе, который содержал головную часть зрительного нерва и всю периферическую сетчатку. Для анализа подсчитывали и суммировали количество ядер, локализованных в ONL трех независимых полей одного среза. Для оценки взаимосвязи между длиной сосудистой сети в глубоком сплетении и количеством ядер в ONL проводили простой анализ линейной регрессии.

После адаптации к темноте в течение ночи мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией 15 мкг/г кетамина и 7 мкг/г ксилазина. Электроретинограммы (ERG) записывали с поверхности роговицы каждого глаза после расширения зрачка (1% атропинсульфат) с применением электрода для роговицы в виде золотой петли с электродом сравнения во рту и заземляющим электродом на хвосте. Импульсы получали с помощью Grass Photic Stimulator (PS33 Plus, Grass Instruments, Quincy, MA), подсоединенного к выходу высокоэффективного отражателя Гансфельда. Записывали ответы палочек на коротковолновые (Wratten 47 A; $\lambda_{\text{max}} = 470$ нм) вспышки света в диапазоне интенсивности вплоть до максимально допустимой для фотостимулятора (0,668 св.сек/м²). Сигналы ответа усиливали (усилитель CP511 AC, Grass Instruments), оцифровывали (PCI-1200, National Instruments, Austin, TX) и анализировали с помощью компьютера. Каждая мышь служила в качестве своего собственного внутреннего контроля с ERG, записываемых и с обработанного, и с необработанного глаз. Для наиболее слабых сигналов усредняли до 100 кривых. Усредненные ответы необработанного глаза вручную вычитали из ответов обработанного глаза, и данную разницу в сигнале использовали в качестве функциональной защиты.

Для оценки экспрессии генов сетчатки, направляемой Lin⁻ HSC, применяли анализ с микроматрицами. Мышам на P6 rd/rd вводили либо Lin⁻, либо CD31⁻ HSC. Сетчатку данных мышей через 40 дней после введения иссекали в свободной от РНКазы среде (в данный момент времени после введения защиты сосудистой сети и фоторецепторного слоя сетчатки является очевидным). Один квадрант из каждой сетчатки анализировали монтированием целиком для гарантии того, что были достигнуты направленная доставка HSC и сосудистая и нейрональная защита. РНК из сетчаток с успешным введением очищали с помощью тризола (Life Technologies, Rockville, MD), фенол/хлороформного протокола выделения РНК. РНК гибридизовали с чипами Affymetrix Mu74Av2, и экспрессию генов анализировали с помощью программы GENESPRING® (SiliconGenetics, Redwood City, CA). Очищенные HSC человека или мыши вводили в стекловидное тело мышей на P6. На P45 сетчатки вырезали и объединяли во фракции 1) введенных HSC человека с защищенными сетчатками мышей, 2) введенных HSC человека с незащищенными сетчатками мышей и 3) введенных HSC мыши с защитными сетчатками мышей для очистки РНК и гибридизации со специфичными для человека чипами U133A Affymetrix. Для идентификации генов, которые экспрессировались на уровне, превышающем фоновый, и с более высокой экспрессией в сетчатках, защищенных HSC человека, применяли программу GENESPRING®. Профили экспрессии в парах образцов для каждого из данных генов затем индивидуально анализировали и сравнивали с моделью нормальных экспериментов с микроматрицами U133A человека с применением dChip для определения специфичных для человека сигналов гибридизации и для удаления ложнопозитивных сигналов из-за перекрестной межвидовой гибридизации.

Когда CD133 позитивную и CD133 негативную Lin⁻ HSC субпопуляции вводили в стекловидное тело глаз новорожденных мышей SCID, наибольшая степень включения в развивающуюся сосудистую сеть наблюдалась для CD133 негативной субпопуляции, которая экспрессирует поверхностные антигены и CD31, и интегрин $\alpha 6$ (смотри фиг. 21, низ). CD133 позитивная субпопуляция, которая не экспрессирует CD31 или интегрин $\alpha 6$ (фиг. 21, верх), по-видимому, влияет на места направляемой периферической ишемией

неоваскуляризации, но не при введении в глаза, подвергаемые ангиогенезу.

Пример 10. Введение в стекловидное тело клеток мышцы в мышинных моделях индуцированной кислородом дегенерации сетчатки.

Новорожденных мышей дикого типа линии C57B16 подвергали действию гипероксии (75% кислорода) между днями постнатальной жизни с P7 по P12 в модели индуцированной кислородом дегенерации сетчатки (OIR). На фиг. 22 иллюстрировано нормальное постнатальное развитие сосудов у мышей C57B16 с P0 по P30. На P0 можно наблюдать лишь зачаточные поверхностные сосуды вокруг зрительного диска. На протяжении последующих нескольких дней первичная поверхностная сеть распространяется к периферии, достигая дальнюю периферию к дню P10. Между P7 и P12 развивается вторичное (глубокое) сплетение. К P17 имеется мощная поверхностная и глубокая сеть сосудов (фиг. 22, вставки). В последующие дни происходит перестройка наряду с развитием третичного (промежуточного) слоя сосудов до достижения структуры взрослых приблизительно к P21.

Напротив, в модели OIR после экспозиции с 75% кислородом на P7-P12 нормальная последовательность событий сильно нарушается (фиг. 23). Популяции Lin⁻ HSC взрослых мышей по настоящему изобретению вводили в стекловидное тело на P3 в глаз мыши, которую впоследствии подвергали OIR, в другой глаз вводили ЗФР или CD31 негативные клетки в качестве контроля. На фиг. 24 показано, что популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению могут снимать дегенеративное действие высокого уровня кислорода в развивающейся сетчатке мыши. Полностью развитая поверхностная и глубокая сосудистая сеть сетчатки наблюдалась на P17 в обработанных глазах, в то время как в контрольных глазах выявлялись большие лишенные сосудов области с практически полным отсутствием глубоких сосудов. Исследовали приблизительно 100 глаз мышей на модели OIR. Нормальная васкуляризация наблюдалась в 58% глаз, обработанных популяциями Lin⁻ HSC по изобретению, по сравнению с 12% контрольных глаз, обработанных клетками CD31⁻, и 3% контрольных глаз, обработанных ЗФР.

Результаты

Развитие сосудов сетчатки мыши; модель для зрительного ангиогенеза

Глаз мыши служит признанной моделью для исследования развития сосудов сетчатки у млекопитающих, такого как развитие сосудов сетчатки у человека. Во время развития сосудистой сети сетчатки у мыши развиваются направляемые ишемией кровеносные сосуды сетчатки в тесной связи с астроцитами. Данные глиальные элементы мигрируют в третьем триместре у плода человека или у новорожденного грызуна в сетчатку из зрительного диска вдоль слоя клеток ганглиев и распространяются в радиальном направлении. При развитии сосудистой сети сетчатки мыши эндотелиальные клетки используют данную, уже сформированную матрицу для определения сосудистого паттерна сетчатки (смотри фиг. 1a и b). На фиг. 1 (a и b) представлены схематические диаграммы развития сетчатки мыши. На фиг. 1a изображено развитие первичного сплетения (темные линии в верхней левой части диаграммы), наложенное на матрицу астроцитов (светлые линии), тогда как на фиг. 1b изображена вторая фаза формирования сосудов сетчатки. На фигурах GCL обозначает слой клеток ганглиев; IPL обозначает слой внутреннего сплетения; INL обозначает внутренний ядерный слой; OPL обозначает слой наружного сплетения; ONL обозначает наружный ядерный слой; RPE обозначает пигментный эпителий сетчатки; ON обозначает зрительный нерв и P обозначает периферию.

При рождении сосудистая сеть сетчатки практически отсутствует. К постнатальному дню 14 (P14) сетчатка содержит развитые сложные первичный (поверхностный) и вторичный (глубокий) слои сосудов сетчатки одновременно с началом зрительного восприятия. Исходно спицеподобные перипапиллярные сосуды растут радиально поверх предсуществующей сети астроцитов по направлению к периферии с прогрессирующим взаимным соединением путем образования капиллярного сплетения. Данные сосуды растут в виде монослоя в нервном волокне на стадии P10 (фиг. 1a). Между P7-P8 из данного первичного сплетения начинают прорастать коллатеральные ветви, проникающие

в сетчатку в направлении наружного сетчатоподобного слоя, где они формируют вторичное, или глубокое сплетение сетчатки. К P21 вся сеть подвергается крупной перестройке, и на внутренней поверхности внутреннего ядерного слоя образуется третичное, или промежуточное сплетение (фиг. 1b).

- 5 Модель ангиогенеза сетчатки новорожденных мышей пригодна для изучения роли HSC во время зрительного ангиогенеза по нескольким причинам. В данной физиологически значимой модели матрица астроцитов существует до появления эндогенных кровеносных сосудов, что обеспечивает оценку роли межклеточных контактов во время процесса неоваскуляризации. Кроме того, данный стабильный и воспроизводимый процесс
- 10 неонатальной васкуляризации сетчатки, как известно, направляется гипоксией и в данном отношении сходен со многими заболеваниями сетчатки, при которых, как известно, играет важную роль ишемия.

Обогащение эндотелиальных клеток-предшественников (EPC) из костного мозга

- Хотя экспрессию поверхностных маркеров интенсивно оценивали на популяции EPC, обнаруживаемой в препаратах HSC, маркеры, которые избирательно идентифицируют
- 15 EPC, все еще плохо определены. Для обогащения EPC позитивные в отношении маркера гематопозитической линии дифференцировки клетки (Lin^+), т.е. В лимфоциты (CD45), Т лимфоциты (CD3), гранулоциты (Ly-6G), моноциты (CD11) и эритроциты (TER-119) удаляли из мононуклеарных клеток костного мозга мыши. Для дальнейшего обогащения EPC
- 20 использовали антиген Sca-1. Сравнение результатов, полученных после введения в стекловидное тело одинакового количества либо клеток $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$, либо клеток Lin^- , не выявило разницы между двумя группами. Действительно, когда вводили только клетки $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^-$, наблюдалось значительно большее включение в развивающиеся кровеносные
- 25 сосуды.

- По данным функциональных тестов популяции Lin^- HSC по настоящему изобретению обогащены EPC. Более того, популяции Lin^+ HSC в функциональном отношении ведут себя совершенно иначе, чем популяции Lin^- HSC. Оценивали также обычно применяемые
- 30 эпитопы для идентификации EPC в каждой фракции (на основании ранее сообщавшихся исследований по характеристике *in vitro*). В то время, как ни один из данных маркеров не был ассоциирован исключительно с фракцией Lin^- , все они были увеличены от
- приблизительно 70 до приблизительно 1800% в Lin^- HSC по сравнению с фракцией Lin^+ HSC (фиг. 1с). На фиг. 1с иллюстрируется цитометрическая характеристика берущих
- 35 начало из костного мозга разделенных клеток Lin^+ HSC и Lin^- HSC. В верхней части фиг. 1с показан точечный график распределения не промечиваемых антителом клеток гематопозитических стволовых клеток. R1 обозначает доступную для количественного анализа область позитивного PE-окрашивания; R2 обозначает GFP-позитивность. Точечные графики Lin^- HSC показаны в средней части, а точечные графики Lin^+ HSC
- 40 показаны в нижней части. Клетки C57B/6 метили конъюгированными с PE антителами против Sca-1, c-kit, Flk-1/KDR, CD31. Данные по Tie-2 были получены на мышах Tie-2-GFP. Проценты в углах точечных графиков показывают процент позитивно меченых клеток от общей популяции HSC Lin^- или Lin^+ . Интересно, что принятые маркеры EPC типа Flk-1/KDR, Tie-2 и Sca-1 плохо экспрессировались и поэтому не применялись для
- 45 последующего фракционирования.

Введенные в стекловидное тело клетки HSC Lin^- содержат EPC, которые нацелены на астроциты и включаются в развивающуюся сосудистую сеть сетчатки.

- Для определения того, могут ли введенные в стекловидное тело Lin^- HSC быть направлены на конкретные типы клеток сетчатки, использовать матрицу астроцитов и
- 50 участвовать в ангиогенезе сетчатки, приблизительно 10^5 клеток из композиции Lin^- HSC по настоящему изобретению или клеток Lin^+ HSC (контроль, приблизительно 10^5 клеток), выделенных из костного мозга взрослых (GFP или LacZ трансгенных) мышей, вводили в глаза мышей на 2 день после рождения (P2). Через четыре дня после введения (P6) многие клетки из композиции Lin^- HSC по настоящему изобретению, полученные из GFP

или LacZ трансгенных мышей, были связаны с сетчаткой и обладали характерной для эндотелиальных клеток удлинённой формой (фиг. 2a). На фиг. 2 показано внедрение клеток Lin⁻ в развивающуюся сетчатку мыши. Как показано на фиг. 2a, через четыре дня после введения (P6) введенные в стекловидное тело eGFP + Lin⁻ HSC прикрепляются и дифференцируются на сетчатке.

Во многих областях сетчаток экспрессирующие GFP клетки были организованы способом, который согласуется с нижерасположенными астроцитами и напоминает кровеносные сосуды. Данные флуоресцирующие клетки наблюдались впереди эндогенной, развивающейся сосудистой сети (фиг. 2b). Напротив, лишь небольшое количество Lin⁺ HSC (фиг. 2c) или эндотелиальных клеток мезентерия взрослых мышей (фиг. 2d) прикреплялось к поверхности сетчатки. Для определения того, могли ли клетки из вводимой популяции Lin⁻ HSC также прикрепляться к сетчатке с уже сформированными сосудами, заявители вводили композицию Lin⁻ HSC в глаза взрослых особей. Интересно, что не наблюдалось прикрепления клеток к сетчатке или включения в сформированные, нормальные кровеносные сосуды сетчатки (фиг. 2e). Это указывает на то, что композиции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению не повреждают нормально развитую сосудистую сеть и не должны вызывать аномальную васкуляризацию в нормально развитой сетчатке.

Для определения взаимоотношений между введенными композициями Lin⁻ HSC по настоящему изобретению и астроцитами сетчатки использовали трансгенных мышей, которые экспрессировали глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP, маркер астроцитов) и управляемый промотором белок зеленой флуоресценции (GFP). Обследование сетчаток данных GFAP-GFP трансгенных мышей, получавших инъекцию Lin⁻ HSC от eGFP трансгенных мышей, показало совместную локализацию введенных eGFP EPC и имеющих астроцитов (фиг. 2f-h, стрелки). Наблюдалось процессы eGFP + Lin⁻ HSC адаптации к нижележащей сети астроцитов (стрелки, фиг. 2g). Обследование данных глаз показало, что введенные меченые клетки прикрепляются только к астроцитам; в сетчатках мышей на P6, где периферия сетчатки еще не содержит эндогенных сосудов, наблюдалось прикрепление введенных клеток к астроцитам в данных еще не васкуляризированных областях. Неожиданно оказалось, что введенные меченые клетки наблюдаются в более глубоких слоях сетчатки, точно в тех местах, в которых впоследствии должны развиваться нормальные сосуды сетчатки (фиг. 2i, стрелки).

Для определения того, стабильно ли включаются введенные Lin⁻ HSC по настоящему изобретению в развивающуюся сосудистую сеть сетчатки, обследовали сосуды сетчатки в нескольких более поздних моментах времени. Уже на P9 (через 7 дней после введения) Lin⁻ HSC включались в CD31⁺ структуры (фиг. 2j). К P16 (через 14 дней после введения) клетки уже интенсивно включались в подобные сосудам структуры сетчатки (фиг. 2k). При введении родамина-декстрана в сосуды (для выявления функциональных кровеносных сосудов сетчатки) перед забоем животных большинство Lin⁻ HSC соответствовало открытым сосудам (фиг. 2l). Наблюдалось два типа распределения меченых клеток: (1) при одном типе клетки вкрапливались вдоль сосудов между немечеными эндотелиальными клетками; и (2) при другом типе было показано, что сосуды состоят исключительно из меченых клеток. Введенные клетки также включались в сосуды глубокого сосудистого сплетения (фиг. 2m). Хотя ранее сообщалось о единичном включении EPC, происходящих от Lin⁻ HSC, в новообразуемую сосудистую сеть, данное сообщение является первым, в котором сети сосудов полностью состояли из данных клеток. Это показывает то, что клетки из популяции происходящих из костного мозга Lin⁻ HSC по настоящему изобретению, введенные в стекловидное тело, могут эффективно включаться в любой слой формируемого сосудистого сплетения сетчатки.

Гистологическое обследование отличных от сетчатки тканей (например, мозга, печени, сердца, легких, костного мозга) не обнаружило наличия каких-либо GFP позитивных клеток при обследовании до 5 или 10 дней после введения в стекловидное тело. Это указывает на то, что субпопуляция клеток фракции Lin⁻ HSC избирательно направлена на

астроциты сетчатки и стабильно включаются в развивающуюся сосудистую сеть сетчатки. Поскольку данные клетки обладают многими свойствами эндотелиальных клеток (связь с астроцитами сетчатки, удлинённая морфология, стабильное включение в открытые сосуды и отсутствие в местах, отличных от сосудов), данные клетки представляют собой EPC, присутствующие в популяции Lin⁻ HSC. Астроциты-мишени относятся к тому же самому типу, который наблюдается при многих гипоксических ретинопатиях. Хорошо известно, что глиальные клетки являются важным компонентом неоваскулярных листовидных расширений, наблюдаемых в DR и при других формах повреждения сетчатки. В условиях реактивного глиоза и индуцированной ишемией неоваскуляризации активированные астроциты пролиферируют, продуцируют цитокины и увеличивают GFAP, подобно тому, что наблюдается во время неонатального формирования сосудистой матрицы сетчатки у многих видов млекопитающих, включая человека.

Популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению должны быть направлены на активированные астроциты в глазах взрослых мышей, как это происходит в глазах новорожденных, для проверки чего клетки Lin⁻ HSC вводили в глаза взрослых, поврежденных фотокоагуляцией (фиг. 3а) или концом иглы (фиг. 3б). В обеих моделях популяция клеток с выраженной окраской GFAP обнаруживалась лишь вокруг места повреждения (фиг. 3а и б). Клетки из введенных композиций Lin⁻ HSC локализовались в пораженной области и оставались специально связаны с GFAP-положительными астроцитами. В данных местах наблюдалась также миграция клеток Lin⁻ HSC в более глубокий слой сетчатки на уровне, сходном с наблюдаемым во время неонатального формирования глубокой сосудистой сети сетчатки. Неповрежденные части сетчатки не содержали клеток Lin⁻ HSC, сходно с тем, что наблюдается при введении Lin⁻ HSC в нормальные, неповрежденные сетчатки взрослых особей (фиг. 2е). Данные результаты указывают на то, что композиции Lin⁻ HSC могут быть избирательно направлены на активированные глиальные клетки в поврежденных сетчатках взрослых особей с глиозом, а также в сетчатках новорожденных, подлежащих васкуляризации.

Вводимые в стекловидное тело Lin⁻ HSC могут защищать и стабилизировать дегенерирующую сосудистую сеть.

Поскольку вводимые в стекловидное тело композиции Lin⁻ HSC направлены на астроциты и включаются в нормальную сосудистую сеть сетчатки, данные клетки также стабилизируют дегенерирующую сосудистую сеть при ишемических или дегенеративных заболеваниях сетчатки, связанных с глиозом или дегенерацией сосудов. Мыши rd/rd представляют собой модель дегенерации сетчатки, при которой происходит сильная дегенерация сосудов в слоях фоторецепторов и сетчатки к одному месяцу после рождения. Сосудистая сеть сетчатки у данных мышей развивается нормально до P16, после чего более глубокий слой сосудистого сплетения подвергается регрессии; у большинства мышей глубокое и промежуточное сплетения почти полностью дегенерируют к P30.

Для определения того, могут ли HSC защищать регрессирующие сосуды, Lin⁺ или Lin⁻ HSC (от мышей Balb/c) вводили в стекловидное тело мышей rd/rd на P6. К P33 после введения клеток Lin⁺ сосуды наиболее глубокого слоя сетчатки почти полностью отсутствовали (фиг. 4а и б). Напротив, большая часть сетчаток, с введением Lin⁻ HSC, к P33 содержала почти нормальную сосудистую сеть с тремя параллельными, хорошо сформированными слоями сосудов (фиг. 4а и 4б). Количественная оценка данного эффекта показала, что средняя длина сосудов в глубоком сосудистом сплетении глаз rd/rd с введением Lin⁻, была в три раза больше, чем в необработанных или обработанных Lin⁺ глазах (фиг. 4е). Неожиданно оказалось, что введение композиции Lin⁻ HSC, полученной из костного мозга взрослой мыши rd/rd (FVB/N), также защищает дегенерирующую сосудистую сеть сетчатки новорожденных мышей rd/rd (фиг. 4ф). Дегенерация сосудистой сети в глазах мышей rd/rd наблюдается уже через 2-3 недели после рождения. Введение Lin⁻ HSC даже на P15 также приводило к стабилизации дегенерирующей сосудистой сети у мышей rd/rd, по меньшей мере, в течение одного

месяца (фиг. 4g и 4h).

Композиция Lin⁻ HSC, введенная более молодым (например, на P2) мышам rd/rd, также включалась в развивающуюся поверхностную сосудистую сеть. К P11 данные клетки, как выявлено, мигрировали до уровня глубокого сосудистого сплетения и образовывали паттерн, идентичный наблюдаемому в поверхностном сосудистом слое сетчатки дикого типа (фиг. 5a). Для того, чтобы более понятно описать способ, которым клетки из введенной композиции Lin⁻ HSC включаются в дегенерирующую сосудистую сеть сетчатки мышей rd/rd и стабилизируют ее, композицию Lin⁻ HSC от мышей Balb/c вводили в глаза мышей Tie-2-GFP FVB. Мыши FVB имеют генотип rd/rd, и, так как они экспрессируют гибридный белок Tie-2-GFP, все их эндогенные кровеносные сосуды флуоресцируют.

Когда немеченые клетки из композиции Lin⁻ HSC вводят в глаза новорожденных Tie-2-GFP FVB и они затем включаются в развивающуюся сосудистую сеть, в ней должны возникать немеченые разрывы в эндогенных, меченных у Tie-2-GFP FVB сосудах, что соответствует включению немеченых введенных Lin⁻ HSC. Последующее окрашивание другим маркером сосудов (например, CD31) затем очерчивает сосуд целиком, позволяя определить, составляют ли неэндогенные эндотелиальные клетки часть сосудистой сети. Через два месяца после введения в сетчатках глаз с введением композиции Lin⁻ HSC выявлялись CD31-позитивные, Tie-2-GFP-негативные сосуды (фиг. 5b). Интересно, что большинство защищенных сосудов содержало Tie-2-GFP-позитивные клетки (фиг. 5c). Распределение перицитов, определяемое по окрашиванию на актин гладких мышц, не изменялось в результате введения Lin⁻ HSC, независимо от того, была ли защита сосудов (фиг. 5d). Эти данные ясно демонстрируют, что введенные в стекловидное тело композиции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению мигрируют в сетчатку, участвуют в образовании нормальных кровеносных сосудов сетчатки и стабилизируют эндогенную дегенерирующую сосудистую сеть у мыши с генетическим дефектом.

Ингибирование ангиогенеза сетчатки трансфецированными клетками из Lin⁻ HSC

Большинство сосудистых заболеваний сетчатки чаще вовлекает аномальную пролиферацию сосудов, чем их дегенерацию. Трансгенные клетки, направленные на астроциты, могут быть использованы для доставки антиангиогенного белка и торможения ангиогенеза. Клетки из композиций Lin⁻ HSC трансфецировали T2-триптофанил-тРНК-синтетазой (T2-TrpRS). T2-TrpRS представляет собой 43 кДа фрагмент TrpRS, который эффективно ингибирует ангиогенез сетчатки (фиг. 6a). Сетчатки глаз на P12, после введения композиции Lin⁻ HSC, трансфецированных контрольной плазмидой (без гена T2-TrpRS), на P2, имели нормальные первичное (фиг. 6c) и вторичное (фиг. 6d) сосудистые сплетения сетчатки. Когда в глаза на P2 вводили композиции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению, трансфецированные T2-TrpRS, и оценивали через 10 дней, первичная сеть имела существенные аномалии (фиг. 6e), и образование глубокой сосудистой сети сетчатки было почти полностью ингибировано (фиг. 6f). Немногие сосуды, выявляемые в данных глазах, были существенно ослаблены с большими промежутками между сосудами. Степень ингибирования Lin⁻ HSC, секретирующими T2-TrpRS, подробно представлена в таблице 2.

T2-TrpRS продуцируется и секретируется клетками в композиции Lin⁻ HSC *in vitro*, и после введения данных трансфецированных клеток в стекловидное тело в сетчатке выявляется 30 кДа фрагмент T2-TrpRS (фиг. 6b). Данный 30 кДа фрагмент специфично выявлялся только в сетчатках с введением трансфецированных Lin⁻ HSC по настоящему изобретению, и данное очевидное снижение молекулярной массы по сравнению с рекомбинантным белком, синтезируемым *in vitro*, может быть обусловлено процессингом или деградацией T2-TrpRS *in vivo*. Эти данные указывают на то, что композиции Lin⁻ HSC могут быть использованы для доставки функционально активных генов, таких как гены, экспрессирующие ангиостатические молекулы, к сосудистой сети сетчатки с помощью направленной доставки к активированным астроцитам. Несмотря на то, что возможно, что наблюдаемый ангиостатический эффект обусловлен опосредованной клетками

активностью, это очень маловероятно, так как глаза с лечением идентичными, но не трансфецированными T2 композициями Lin⁻ HSC имели нормальную сосудистую сеть сетчатки.

Таблица 2.
Ингибирование сосудистой сети Lin⁻ HSC, секретирующими T2-TrpRS

	Первичное сплетение		Глубокое сплетение		
	Ингибированное	Нормальное	Полное	Частичное	Нормальное
T2-TrpRSs (15 глаз)	60% (9 глаз)	40% (6 глаз)	33,3% (5 глаз)	60% (9 глаз)	6,7% (1 глаз)
Контроль (13 глаз)	0% (0 глаз)	100% (13 глаз)	0% (0 глаз)	38,5% (5 глаз)	61,5% (8 глаз)

Введенные в стекловидное тело популяции Lin⁻ HSC располагаются у астроцитов сетчатки, включаются в сосуды и могут использоваться для лечения многих заболеваний сетчатки. В то время как большинство клеток из введенных композиций HSC прикрепляются к матрице астроцитов, небольшое их количество мигрирует глубоко в сетчатку, располагаясь в тех областях, где в последующем развивается глубокая сосудистая сеть. Даже несмотря на то, что в данной области не наблюдалось GFAP-позитивных астроцитов до 42 дня после рождения, это не исключает возможности того, что уже присутствуют GFAP-негативные клетки глии, подавая сигнал для расположения Lin⁻ HSC. Предшествующие исследования показали, что многие заболевания связаны с реактивным глиозом. При DR, в частности, клетки глии и их внеклеточный матрикс связаны с патологическим ангиогенезом.

Так как клетки из введенных композиций Lin⁻ HSC специфически прикрепляются к клеткам глии, экспрессирующим GFAP, независимо от типа повреждения, композиции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению могут использоваться для направленной доставки к предангиогенным повреждениям в сетчатке. Например, при ишемических ретинопатиях, таких как диабетические, неоваскуляризация представляет собой ответ на гипоксию. С помощью направленной доставки композиций Lin⁻ HSC к местам патологической неоваскуляризации, развивающаяся неоваскуляризация может быть стабилизирована с предотвращением аномалий неоваскуляризации, таких как кровоизлияние или отек (причины потери зрения, связанные с DR), и можно потенциально смягчить гипоксию, которая первоначально стимулировала неоваскуляризацию. Аномальные кровеносные сосуды могут быть восстановлены до нормального состояния. Более того, ангиостатические белки, такие как T2-TrpRS, могут быть доставлены к местам патологического ангиогенеза с помощью применения композиций трансфецированных Lin⁻ HSC и индуцированной лазером активации астроцитов. Так как в клинической офтальмологии обычно применяют лазерную фотокоагуляцию, данный подход применим для многих заболеваний сетчатки. Несмотря на то, что подходы на основе клеток исследуют при терапии рака, их применение для глазных заболеваний имеет больше преимуществ, так как введение в глаз дает возможность для доставки большого числа клеток непосредственно к месту заболевания.

Нейротрофическая и васкулотрофическая защита с помощью Lin⁻ HSC

MACS применяли для выделения Lin⁻ HSC из костного мозга мышей C3H (rd/rd), FVB (rd/rd) с белком с усиленной зеленой флуоресценцией (eGFP). Lin⁻ HSC, содержащие EPC из данных мышей, вводили в стекловидное тело глаз мышей C3H или FVB на P6. Сетчатки собирали в различные временные точки (1 месяц, 2 месяца и 6 месяцев) после введения. Сосудистую сеть анализировали с помощью сканирующего лазерного конфокального микроскопа после окрашивания антителами против CD31 и гистологии сетчатки после окрашивания ядер DAPI. Для идентификации генов, потенциально вовлеченных в эффект, применяли также анализ экспрессии генов с помощью микроматриц для мРНК из сетчаток в различные временные точки.

Глаза мышей rd/rd характеризовались выраженной дегенерацией как нейросенсорной сетчатки, так и сосудистой сети сетчатки на P21. В глазах мышей rd/rd с лечением Lin⁻ HSC

на P6 поддерживалась нормальная сосудистая сеть сетчатки в течение до 6 месяцев; как глубокий, так и промежуточный слои были существенно лучше по сравнению с контролем во все временные точки (1M, 2M и 6M) (смотри фиг. 12). Кроме того, заявители наблюдали, что сетчатки с лечением Lin⁻ HSC были также толще (1M; 1,2 раза, 2M; 1,3
 5 раза, 6M; 1,4 раза) и имели большее количество клеток во внешнем ядерном слое по отношению к глазам с введением в качестве контроля Lin⁺ HSC. Анализ с помощью широкомасштабной геномики «защищенной» (например, Lin⁻ HSC) по сравнению с контрольной (без лечения или с лечением не Lin⁻) сетчаткой rd/rd продемонстрировал
 10 существенную позитивную регуляцию генов, кодирующих sHSP (малые белки теплового шока) и конкретные факторы роста, что коррелирует с защитой сосудистой и нейрональной сетей, включая гены, кодирующие белки, перечисленные на фигуре 20, панели А и В.

Происходящие из костного мозга популяции Lin⁻ HSC по настоящему изобретению существенно и воспроизводимо индуцировали поддержание нормальной сосудистой сети и
 15 значительно увеличивали слои фоторецепторов и других нервных клеток у мыши rd/rd. Данный эффект нейротрофической защиты, коррелирующий с существенной позитивной регуляцией малых белков теплового шока и факторов роста, позволяет проникнуть в терапевтические подходы к неизлечимым в настоящее время дегенеративным заболеваниям сетчатки.

**Сетчатки мышей rd1/rd1 характеризуются существенной дегенерацией сосудистой и
 20 нейрональной сетей.**

Нормальное постнатальное развитие сосудистой и нейрональной сетей сетчатки у мышей хорошо описано и является аналогичным изменениям, наблюдаемым в третьем
 триместре у плода человека (Dorrell et al., 2002, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43: 3500-3510). Мыши, гомозиготные по гену rd1, проявляют многие характеристики
 25 дегенерации сетчатки человека (Frasson *et al.*, 1999, Nat. Med. 5:1183-1187) и характеризуются быстрой потерей фоторецепторов (PR), сопровождающейся тяжелой атрофией сосудов, в результате мутации в гене, кодирующем фосфодиэстеразу цГМФ PR (Bowes et al. 1990, Nature 347:677-680). Для исследования сосудистой сети в процессе
 30 развития сетчатки и ее последующей дегенерации применяли антитела против коллагена IV (CIV), белка внеклеточного матрикса (ECM) зрелой сосудистой сети и против CD31 (PECAM-1), маркера эндотелиальных клеток (фигура 15). Сетчатки rd1/rd1 (C3H/HeJ) развивались нормально до приблизительно 8 дня после рождения (P), когда начиналась дегенерация внешнего ядерного слоя (ONL), содержащего рецепторы. ONL быстро
 35 дегенерировал и клетки гибли от апоптоза, так что только единственный слой ядер оставался на P20. Двойное окрашивание целиком смонтированных сетчаток антителами против как CIV, так и CD31, выявило подробности дегенерации сосудистой сети у мышей rd1/rd1, сходные с описанными другими авторами (Blanks et al., 1986, J. Comp. Neurol. 254:543-553). Первичный и глубокий сосудистые слои, очевидно, развиваются нормально
 40 хотя бы до P12, после чего наблюдается быстрая потеря эндотелиальных клеток, о чем свидетельствует отсутствие окрашивания на CD31. Позитивные по CD31 эндотелиальные клетки присутствовали с нормальным распределением хотя бы до P12, но после этого быстро исчезали. Интересно, что позитивное окрашивание на CIV оставалось в наличии в тестируемые временные точки, предполагая, что сосуды и связанный с ними ECM
 45 формировались нормально, но только матрикс оставался после P13, в то время, когда позитивные по CD31 клетки не выявлялись (фигура 15, средние панели). Промежуточное сосудистое сплетение также дегенерирует после P21, но прогрессия является более медленной, чем наблюдаемая в глубоком сплетении (фигура 15, верхняя панель). Сосудистый слой и слой нервных клеток сетчатки нормальной мыши показан для
 50 сравнения с мышью rd1/rd1 (правые панели, фигура 15).

Нейропротекторный эффект Lin⁻ HSC, происходящих из костного мозга, у мышей rd1/rd1.

Введенные в стекловидное тело Lin⁻ HSC включаются в эндогенную сосудистую сеть сетчатки во всех трех сосудистых сплетениях и предохраняют сосуды от дегенерации.

Интересно, что введенные клетки фактически никогда не выявляются в наружном ядерном слое. Данные клетки либо включаются в формирующиеся сосуды сетчатки, либо выявляются в непосредственной близости к данным сосудам. Мышиные Lin⁻ HSC (из C3H/HeJ) вводили в стекловидное тело глаз мышей C3H/HeJ (rd1/rd1) на P6 как раз перед наступлением дегенерации. На P30 в глазах с введением контрольных клеток (CD31⁻) проявлялся типичный фенотип rd1/rd1, т.е. наблюдалась почти полная дегенерация глубокого сосудистого сплетения и ONL в каждой исследованной сетчатке. В глазах с введением Lin⁻ HSC поддерживались промежуточное и глубокое сосудистые сплетения нормального вида. Неожиданно оказалось, что существенно больше клеток выявлялось в межъядерном слое (INL) и ONL глаз с введением Lin⁻ HSC по сравнению с глазами с введением контрольных клеток (фигура 16A). Данный эффект защиты Lin⁻ HSC может наблюдаться через 2 месяца (фигура 16B) и до 6 месяцев после введения (фигура 16C). Различия в сосудистой сети промежуточного и глубокого сплетений в глазах с введением Lin⁻ HSC, а также в INL и ONL, содержащих нервные клетки, были существенными во все измеренные временные точки при сравнении защищенных и незащищенных глаз (фигура 16B и C). Данный эффект был количественно оценен с помощью измерения суммарной длины сосудистой сети (фигура 16D) и подсчета количества DAPI-позитивных клеточных ядер, выявляемых в ONL (фигура 16E). Для данных во всех временных точках использовали простой линейный регрессионный анализ.

Статистически значимая корреляция выявлена между васкулярной защитой и защитой нервных клеток (например, толщина ONL) на P30 ($p < 0,024$) и P60 ($p < 0,034$) в глазах с введением Lin⁻ HSC (фигура 16F). Корреляция остается высокой, хотя статистически не значимой ($p < 0,14$) на P180, при сравнении сетчаток с введением Lin⁻ HSC с сетчатками с введением контрольных клеток (фигура 16F). Напротив, в сетчатках с введением контрольных клеток не обнаружено значимой корреляции между предохранением сосудистой сети и ONL ни в одной временной точке (фигура 16F). Эти данные демонстрируют, что введение Lin⁻ HSC в стекловидное тело сетчаток мышей rd1/rd1 сопровождается защитой сосудистой и нейрональной сетей сетчатки. Введенные клетки не выявлялись в ONL или в любом другом месте, отличном от кровеносных сосудов сетчатки или непосредственной близости к ним.

Функциональная защита сетчаток rd/rd с введением Lin⁻ HSC

Электроретинограммы (ERG) делали у мышей через 2 месяца после введения контрольных клеток или Lin⁻ HSC мыши (фигура 17). Иммуногистохимический и микроскопический анализ осуществляли для каждого глаза после записей ERG для подтверждения наличия защиты сосудистой и нейрональной сетей. Примеры записей ERG в леченных, защищенных и контрольных, незащищенных глазах показывают, что в защищенных глазах вычтенный вручную сигнал (глаза с лечением минус без лечения) продуцировал четко определяемый сигнал с амплитудой порядка 8-10 микровольт (фигура 17). Ясно, что сигналы из обоих глаз являются крайне аномальными. Однако стойкие и определяемые ERG были записаны с глаз с лечением Lin⁻ HSC. Во всех случаях в контрольном глазу ERG была неопределима. Хотя амплитуды сигналов в защищенных глазах были существенно ниже, чем в нормальных, сигналы стойко наблюдались, когда бы ни выявлялась гистологическая защита, и соответствовали порядку величин, о которых сообщалось в других исследованиях защиты на основе генов. Вместе данные результаты демонстрируют некоторую степень функциональной защиты в глазах с лечением Lin⁻ HSC по изобретению.

Lin⁻ HSC, происходящие из костного мозга человека (hBM), также защищают дегенерирующие сетчатки.

Lin⁻ HSC, выделенные из костного мозга человека, ведут себя сходно с мышиными Lin⁻ HSC. Костный мозг собирали от людей доноров и очищали от Lin⁺ HSC с получением популяции Lin⁻ HSC человека (hLin⁻ HSC). Данные клетки метили ex vivo флуоресцентным

красителем и вводили в глаза мышей C3SnSmn.CB17-Prkdc SCID. Введенные hLin⁺ HSC мигрировали и направленно доставлялись к местам ангиогенеза сетчатки способом, идентичным наблюдаемому при введении мышинных Lin⁺ HSC (фигура 18A). В дополнение к направленной доставке к сосудам Lin⁺ HSC человека также обеспечивали надежный эффект защиты как сосудистого, так и нейронального клеточных слоев мышей rd1/rd1 (фигура 18B и 18C). Данное наблюдение подтверждает присутствие в костном мозге человека клеток, которые направленно доставляются к сосудистой сети сетчатки и могут предотвращать дегенерацию сетчатки.

Lin⁺ HSC обладают васкуло- и нейротрофическими эффектами у мыши rd10/rd10.

Хотя мышь rd1/rd1 является наиболее широко используемой и лучше всего охарактеризованной моделью дегенерации сетчатки Chang et al. 2002, Vision Res. 42:517-525), дегенерация является очень быстрой и в данном отношении отличается от обычного, замедленного во времени течения, наблюдаемого при заболевании человека. У данной линии дегенерация фоторецепторных клеток сетчатки начинается около P8, времени, когда сосудистая сеть сетчатки все еще быстро расширяется (фигура 15). Последующая дегенерация глубокой сосудистой сети сетчатки наступает даже в то время, как промежуточное сплетение все еще образуется, и, таким образом, сетчатки мышей rd1/rd1 никогда не развиваются полностью, в отличие от наблюдаемого у большинства людей с данным заболеванием. Мышиную модель rd10, которая характеризуется более медленным протеканием во времени дегенерации и более близко сходна с состоянием дегенерации сетчатки человека, применяли для исследования защиты сосудистой сети, опосредованного Lin⁺ HSC. У мыши rd10 дегенерация фоторецепторных клеток начинается около P21 и дегенерация сосудов начинается через короткое время после этого.

Так как нормальное развитие нейросенсорного аппарата сетчатки в значительной степени заканчивается на P21, дегенерация, как выявлено, начинается после окончания дифференцировки сетчатки и в этом отношении более похожа на дегенерацию сетчатки человека, чем мышинная модель rd1/rd1. Lin⁺ HSC или контрольные клетки от мышей rd10 вводили в глаза на P6, и сетчатки оценивали в различные временные точки. На P21 сетчатки глаз как с введением Lin⁺ HSC, так и с введением контрольных клеток, выглядели нормальными с полным развитием всех сосудистых слоев и нормальным развитием INL и ONL (фигура 18D и 18H). На приблизительно P21 начиналась дегенерация сетчатки и прогрессировала с возрастом. К P30 сетчатки с введением контрольных клеток проявляли тяжелую дегенерацию сосудистой и нейрональной сетей (фигура 18I), в то время как сетчатки с введением Lin⁺ HSC поддерживали почти нормальные сосудистые слои и фоторецепторные клетки (фигура 18E). Различие между защищенными и незащищенными глазами было более выраженным в более поздние временные точки (сравнение фигур 18F и с 18G по 18J и 18K). В глазах с лечением контрольными клетками прогрессия дегенерации сосудов была очень ясно выявлена с помощью иммуногистохимического окрашивания на CD31 и коллаген IV (фигура 18I-K). Глаза с лечением контрольными клетками были почти полностью негативными в отношении CD31, в то время как позитивные по коллагену IV сосудистые «пути» оставались явными, указывая на то, что происходила регрессия сосудов, а не неполное образование сосудов. Напротив, глаза с лечением Lin⁺ HSC имели сосуды, позитивные как в отношении CD31, так и коллагена IV, что выглядит очень сходно с нормальными глазами дикого типа (сравнение фигур 18F и 18I).

Анализ экспрессии генов сетчаток мышей rd/rd после лечения Lin⁺ HSC

Широкомасштабную геномику (анализ с помощью микроматриц) применяли для анализа защищенных и незащищенных сетчаток для идентификации предполагаемых посредников нейротрофической защиты. Экспрессию генов в сетчатках мышей rd1/rd1 с лечением Lin⁺ HSC сравнивали с сетчатками без введения, а также с сетчатками с введением контрольных клеток (CD31⁺). Каждое данное сравнение было сделано в трех повторах. Для того чтобы рассматриваться как присутствующие, для генов требовалось иметь уровни

экспрессии, по меньшей мере, в 2 раза выше, чем фоновый уровень во всех трех повторях. Гены, которые позитивно регулировались в сетчатках, защищенных Lin⁻ HSC, по сравнению с сетчатками мышей rd/rd с введением контрольных клеток и без введения показаны на фиг. 20, панели А и В. Большинство из существенной степени позитивно регулируемых генов, включая MAD и Ying Yang-1 (YY-1), кодируют белки с функциями, вовлеченными в защиту клеток от апоптоза. Ряд генов кристаллина, которые обладают гомологией последовательностей и функциями, сходными с известными белками теплового шока, вовлеченными в защиту клеток от стресса, также позитивно регулировались в сетчатках с лечением Lin⁻ HSC. Экспрессия α -кристаллина с помощью иммуногистохимического анализа определена в ONL (фиг. 19).

Матричную РНК из сетчаток мышей rd1/rd1, защищенных с помощью Lin⁻ HSC человека, гибридизовали со специфичными для человека чипами микроматрицы Affymetrix U133A. После строгого анализа был найден ряд генов, для которых экспрессия мРНК была специфичной для человека, выше фона и существенно выше в сетчатках, защищенных с помощью Lin⁻ HSC человека, по сравнению с сетчатками, защищенными с помощью Lin⁻ HSC мыши, и незащищенными сетчатками с введением контрольных клеток человека (фиг. 20, панель С). CD6, молекула клеточной адгезии, экспрессирующаяся на поверхности примитивных и недавно дифференцированных CD34⁺ гематопоэтических стволовых клеток, и интерферон альфа 13, другой ген, экспрессируемый гематопоэтическими стволовыми клетками, оба были найдены с помощью способов биоинформатики для микроматриц на основе протокола определения. Кроме того, несколько факторов роста и нейротрофических факторов экспрессировались выше фонового уровня образцами сетчаток мыши, защищенных Lin⁻ HSC человека (фиг. 20, панель D).

Обсуждение

Маркеры коммитированной линии дифференцировки гематопоэтических клеток применяли для отбора полученной из костного мозга негативной популяции Lin⁻ HSC, содержащих EPC. Несмотря на то, что субпопуляция полученных из костного мозга Lin⁻ HSC, которая может служить в качестве EPC, не охарактеризована с помощью обычно применяемых маркеров клеточной поверхности, поведение данных клеток в развивающейся или поврежденной сосудистой сети сетчатки полностью отличается от такового, наблюдаемого для популяций Lin⁺ или взрослых эндотелиальных клеток. Эти клетки избирательно направляются к местам ангиогенеза сетчатки и участвуют в образовании проходимых кровеносных сосудов.

Наследственные дегенеративные заболевания сетчатки часто сопровождаются потерей сосудистой сети сетчатки. Эффективное лечение таких заболеваний требует восстановления функции, а также поддержания комплексной архитектоники ткани. Несмотря на то, что в нескольких последних исследованиях пробовали применять опосредованную клетками доставку трофических факторов или самих стволовых клеток, может быть необходимо некоторое сочетание обоих способов. Например, применение терапии ростовыми факторами для лечения дегенеративного заболевания сетчатки ведет к нерегулируемому повышенному росту кровеносных сосудов, что ведет к серьезной дезинтеграции нормальной архитектоники ткани сетчатки. Применение стволовых клеток нейронов или сетчатки для лечения дегенеративного заболевания сетчатки может восстановить нейрональную функцию, но функционирующая сосудистая сеть должна быть также необходимой для поддержания функциональной целостности сетчатки. Включение клеток из Lin⁻ HSC по настоящему изобретению в сосуды сетчатки мышей rd/rd стабилизировало дегенерирующую сосудистую сеть без дезинтеграции структуры сетчатки. Этот защитный эффект наблюдался также, когда клетки вводили мышам rd/rd на P15. Так как дегенерация сосудов у мышей rd/rd начинается на P16, это наблюдение расширяет терапевтические рамки для эффективного лечения Lin⁻ HSC. Нейроны сетчатки и фоторецепторы глаз были защищены при введении Lin⁻ HSC по настоящему изобретению и в них поддерживалась зрительная функция.

Lin⁻ HSC, полученные из костного мозга взрослых, обладают сильным васкуляторным и нейротрофическим эффектом при введении в стекловидное тело мышам с дегенеративным заболеванием сетчатки. Это защитный эффект сохраняется до 6 месяцев после лечения и наиболее эффективен при введении Lin⁻ HSC до полной дегенерации сетчатки (до 16 дня после рождения у мышей, у которых обычно полная дегенерация сетчатки проявляется на 30 день после рождения). Этот защитный эффект наблюдается в 2 мышинных моделях дегенерации сетчатки и, замечательно, что может достигаться с помощью Lin⁻ HSC, происходящих из костного мозга взрослого человека, когда реципиентом является иммунодефицитный грызун с дегенерацией сетчатки (например, мышь SCID) или когда донором является мышь с дегенерацией сетчатки. Несмотря на то, что в нескольких последних сообщениях описана частичная фенотипическая защита у мышей и собак с дегенерацией сетчатки после защиты на основе конструкции вирусного гена и гена дикого типа (Ali, et al. 2000, Nat Genet 25:306-310; Takahashi et al. 1999, J. Virol. 73: 7812-7816; Acland et al. 2001, Nat. Genet. 28:92-95.), настоящее изобретение является первым по общему терапевтическому эффекту на основе клеточной терапии, достигнутому с помощью защиты сосудистой сети. Таким образом, возможно применение такого подхода при терапии группы заболеваний (например, пигментозного ретинита) с более 100 известными связанными с ними мутациями является более практичным, чем создание индивидуальной генной терапии для лечения каждой известной мутации.

Точная молекулярная основа эффекта нейротрофической защиты остается неизвестной, но она наблюдается только при наличии сопутствующей стабилизации/защиты сосудов. Присутствие введенных стволовых клеток *per se* недостаточно для индукции нейротрофической защиты и явное отсутствие нейронов, полученных из стволовых клеток, во внешнем ядерном слое исключает возможность того, что введенные клетки трансформируются в фоторецепторы. Данные, полученные с помощью анализа на экспрессионных генных микроматрицах, демонстрируют существенную позитивную регуляцию генов, которые, как известно, обладают антиапоптозными эффектами. Так как большей частью гибель нейронов, наблюдаемая при дегенерации сетчатки, происходит в форме апоптоза, такая защита может иметь существенное терапевтическое преимущество в увеличении продолжительности жизни фоторецепторов и других нейронов, ключевых для зрительной функции при данных заболеваниях. С-тус является транскрипционным фактором, который участвует в апоптозе путем позитивной регуляции различных факторов сигнального пути, индуцирующих апоптоз. Экспрессия с-тус была увеличена в 4,5 раза у мышей rd/rd по сравнению с диким типом, что указывает на его возможное вовлечение в дегенерацию фоторецепторов, наблюдаемую у мыши rd1/rd1. Mad1 и YY-1, два гена, регуляция которых существенно активируется в сетчатке, защищенной Lin⁻ HSC (фиг. 20, панель A), известны как подавляющие активность с-тус, ингибируя таким образом апоптоз, индуцируемый с-тус. Гиперэкспрессия Mad1, как было также показано, подавляет индуцируемую Fas активацию каспазы-8, другого ключевого компонента апоптозного пути. Позитивная регуляция этих двух молекул может играть роль в защите сетчатки от дегенерации сосудов и нейронов путем предотвращения инициации апоптоза, которая обычно ведет к дегенерации у мышей rd/rd.

Другой набор генов, регуляция которых существенно активируется в сетчатке, защищенной Lin⁻ HSC, включает члены семейства кристаллина (фиг. 20, панель B). Сходные с белками теплового шока и другими стресс-индуцируемыми белками кристаллины могут активироваться при стрессе сетчатки и обеспечивать защитный эффект в отношении апоптоза. Аномально низкая экспрессия α A-кристаллинов коррелирует с потерей фоторецепторов крысиной модели дистрофии сетчатки, и недавний протеомный анализ сетчатки у мыши rd/rd показал индукцию позитивной регуляции кристаллина в ответ на дегенерацию сетчатки. Основываясь на полученных на микроматрицах данных заявителей о защищенной с помощью EPC сетчатке мышей rd/rd, позитивная регуляция кристаллинов, очевидно, играет ключевую роль в опосредованной EPC нейропротекции сетчатки.

Гены, такие как *c-myc*, *Mad1*, *Yx-1* и кристаллины, являются, вероятно, медиаторами сигнального пути защиты нервных клеток. Нейротрофические агенты могут регулировать экспрессию антиапоптозных генов, хотя проведенный заявителями анализ на микроматрицах защищенных с помощью стволовых клеток мыши сетчаток не показал

5 индукцию увеличенного уровня известных нейротрофических факторов. Анализ с помощью специфичных для человека чипов защиты, опосредованных происходящими из костного мозга человека стволовыми клетками, с другой стороны, действительно показал низкое, но значимое увеличение экспрессии многих генов ростовых факторов.

Позитивно регулируемые гены включают несколько членов семейства фактора роста фибробластов и отоферлин. Мутации в гене отоферлина связаны с генетическими нарушениями, ведущими к глухоте, обусловленной слуховой нейропатией. Возможно, что продукция отоферлина введенными *Lin⁻ HSC* вносит вклад также в предотвращение нейропатии сетчатки. Исторически, долгое время предполагалось, что сосудистые изменения, наблюдаемые у больных и животных с дегенерацией сетчатки, являются

15 вторичными по отношению к снижению метаболической потребности в случае гибели фоторецепторов. Данные по настоящему изобретению указывают на то, что, по меньшей мере, для мышей с наследственной дегенерацией сетчатки сохранение нормальной сосудистой сети может помочь также в поддержании компонентов внешнего ядерного слоя. Последние сообщения в литературе, вероятно, поддерживают концепцию о том, что

20 специфичная для ткани сосудистая сеть обладает трофическими эффектами, которые превышают ожидаемые от простого обеспечения «питанием» через сосуды. Например, в эндотелиальных клетках печени после стимуляции *VEGFR1* можно индуцировать продукцию факторов роста, ключевых для регенерации и поддержания гепатоцитов в ответ на повреждение печени (LeCouter et al. 2003, Science 299:890-893).

Сходные показательные взаимодействия между эндотелиальными клетками сосудов и прилегающими паренхиматозными клетками печени, как сообщалось, вовлечены в органогенез печени как раз перед образованием функционирующих кровеносных сосудов. Эндогенная сосудистая сеть сетчатки у индивидуумов с дегенерацией сетчатки может так существенно не содействовать защите, но если данная сосудистая сеть поддерживается

30 эндотелиальными клетками-предшественниками, происходящими из популяций гематопозитических стволовых клеток костного мозга, они могут сделать сосудистую сеть более устойчивой к дегенерации и в то же время содействовать выживанию нервных клеток, так же как и клеток сосудов. У людей с дегенерацией сетчатки задержка наступления полной дегенерации сетчатки может обеспечить дополнительными годами

35 зрелой жизни. Животные, которым вводили *Lin⁻ HSC* по настоящему изобретению, характеризовались существенным сохранением ERG, которое может быть достаточным для поддержки зрения.

Клинически широко признано, что может происходить существенная потеря фоторецепторов и других нейронов, в то время как все еще сохраняется зрительная

40 функция. На некоторой точке переступается критический порог и зрение теряется. Так как почти все из типов наследуемой дегенерации сетчатки человека являются рано, но медленно наступающими, может быть возможной идентификация индивидуумов с дегенерацией сетчатки, лечение их введением в стекловидное тело трансплантата аутологичных стволовых клеток костного мозга и задержка дегенерации сетчатки,

45 сопровождаемой потерей зрения. Для усиления направленной доставки и включения данных стволовых клеток должно быть желательным присутствие активированных астроцитов. Это может быть достигнуто с помощью раннего лечения, когда существует ассоциированный глиоз, или путем применения лазера для стимуляции локальной пролиферации активированных астроцитов.

Популяции *Lin⁻ HSC* по настоящему изобретению содержат популяцию EPC, которая может стимулировать ангиогенез с помощью направленной доставки реактивированных астроцитов и включения в установленную матрицу без дезинтеграции структуры сетчатки. *Lin⁻ HSC* по настоящему изобретению также обеспечивают неожиданный долговременный

эффект нейротрофической защиты в глазах, страдающих дегенерацией сетчатки. Кроме того, генетически модифицированные аутологичные композиции Lin⁻ HSC, содержащие ЕРС, могут быть трансплантированы в ишемические или аномально васкуляризованные глаза и могут стабильно включаться в новые сосуды и непрерывно доставлять

5 терапевтические молекулы локально в течение продолжительных периодов времени. Такая локальная доставка генов, которые экспрессируют фармакологические агенты в физиологически значимых дозах, представляет собой новую парадигму лечения не

излечимых в настоящее время глазных заболеваний.

Многочисленные вариации и модификации описанных выше вариантов осуществления

10 может быть сделано, не выходя из сущности и области данного изобретения. Никаких ограничений конкретными проиллюстрированными здесь вариантами осуществления не рассматривается и не подразумевается.

Формула изобретения

15 1. Выделенная популяция гематопозитических стволовых клеток млекопитающих негативной линии дифференцировки, содержащая гематопозитические стволовые клетки, негативные по CD133 и эндотелиальные клетки-предшественники, где, по меньшей мере, 50% клеток экспрессирует поверхностный антиген интегрина αβ и, по меньшей мере, 50% клеток экспрессирует поверхностный антиген CD31.

20 2. Выделенная популяция стволовых клеток по п.1, где клетки получены из костного мозга взрослой особи.

3. Выделенная популяция стволовых клеток по п.1, где клетки являются клетками человека.

4. Выделенная популяция стволовых клеток по п.1, дополнительно включающая

25 клеточную культуральную среду.

5. Выделенная популяция гематопозитических стволовых клеток млекопитающих негативной линии дифференцировки, содержащая гематопозитические стволовые клетки, позитивные по CD133 и эндотелиальные клетки-предшественники, где, по меньшей мере, 30% клеток экспрессирует поверхностный антиген интегрина αβ и, по меньшей мере, 30%

30 клеток экспрессирует поверхностный антиген CD31.

6. Выделенная популяция стволовых клеток по п.5, где клетки получены из костного мозга взрослой особи.

7. Выделенная популяция стволовых клеток по п.5, где клетки являются клетками человека.

8. Выделенная популяция стволовых клеток по п.5, дополнительно включающая

35 клеточную культуральную среду.

9. Выделенная популяция гематопозитических стволовых клеток млекопитающих негативной линии дифференцировки, позитивных или негативных по CD133, полученная из костного мозга взрослой особи млекопитающего, содержащая эндотелиальные клетки-

40 предшественники, полученная

(a) экстракцией костного мозга взрослой особи млекопитающего;

(b) выделением множества моноцитов из костного мозга;

(c) мечением моноцитов набором конъюгированных с биотином антител против одного или нескольких поверхностных антигенов линии дифференцировки, выбранных из группы,

45 состоящей из CD2, CD3, CD4, CD11, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD24, CD33, CD36, CD38, CD45, Ly-6G, TER-119, CD45RA, CD56, CD64, CD68, CD86, CD66b, HLA-DR и CD235a;

(d) удалением моноцитов, которые являются позитивными в отношении указанного одного или нескольких поверхностных антигенов линии дифференцировки из множества

50 моноцитов, и получением популяции гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, содержащей эндотелиальные клетки-предшественники;

(e) мечением стволовых клеток негативной линии дифференцировки стадией (d) антителом, конъюгированным с биотином, против CD133; и

(f) отделением стволовых клеток, положительных по CD133, от стволовых клеток, негативных по CD133, находящихся в популяции стволовых клеток негативной линии дифференцировки.

10. Выделенная популяция стволовых клеток по п.9, где млекопитающим является человек, клетки являются негативными по CD 133, по меньшей мере, 50% клеток экспрессирует поверхностный антиген интегрина $\alpha\beta$ и, по меньшей мере, 50% клеток экспрессирует поверхностный антиген CD31.

11. Выделенная популяция стволовых клеток по п.9, где млекопитающим является человек, клетки являются позитивными по CD 133, менее 30% клеток экспрессирует поверхностный антиген интегрина $\alpha\beta$ и менее 30% клеток экспрессирует поверхностный антиген CD31.

12. Выделенная популяция стволовых клеток по п.9, где клетки являются клетками человека и моноциты метят на стадии (с) набором конъюгированных с биотином антител против CD2, CD3, CD4, CD 11 а, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD33, CD38, CD45RA, CD64, CD68, CD86 и CD235a.

13. Способ выделения популяции гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, позитивных или негативных по CD133, из костного мозга взрослой особи, содержащей эндотелиальные клетки-предшественники, включающий стадии

(а) экстрагирования костного мозга взрослой особи млекопитающего;

(b) выделения множества моноцитов из костного мозга;

(с) мечения моноцитов набором конъюгированных с биотином антител против одного или нескольких поверхностных антигенов линии дифференцировки, выбранных из группы, состоящей из CD2, CD3, CD4, CD11, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD24, CD33, CD36, CD38, CD45, Ly-6G, TER-119, CD45RA, CD56, CD64, CD68, CD86, CD66b, HLA-DR и CD235a;

(d) удаления моноцитов, которые являются позитивными в отношении указанного одного или нескольких поверхностных антигенов линии дифференцировки из множества моноцитов, и получения популяции гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, содержащей эндотелиальные клетки-предшественники;

(е) мечения стволовых клеток негативной линии дифференцировки конъюгированным с биотином антителом против CD133; и

(f) отделения стволовых клеток, положительных по CD133, от стволовых клеток, негативных по CD133, находящихся в популяции стволовых клеток негативной линии дифференцировки.

14. Способ по п.13, где млекопитающим является человек, и моноциты метят на стадии (с) набором конъюгированных с биотином антител против CD2, CD3, CD4, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD33, CD38, CD45RA, CD64, CD68, CD86 и CD235a.

15. Способ усиления неоваскуляризации сетчатки млекопитающего, включающий введение в стекловидное тело глаза млекопитающего, при необходимости неоваскуляризации сетчатки, популяции гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки по п.1, где стволовые клетки получают из костного мозга того же вида млекопитающего, в чей глаз вводят клетки.

16. Способ лечения глазного заболевания у млекопитающего, включающий выделение из костного мозга млекопитающего популяции гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, позитивных или негативных по CD 133, которая содержит эндотелиальные клетки-предшественники, путем

(а) экстракции костного мозга млекопитающего, страдающего глазным заболеванием;

(b) отделения множества моноцитов из костного мозга;

(с) мечения моноцитов набором конъюгированных с биотином антител линий дифференцировки против одного или нескольких поверхностных антигенов, выбранных из группы, состоящей из CD2, CD3, CD4, CD11, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD24, CD33, CD36, CD38, CD45, Ly-6G, TER-119, CD45RA, CD56, CD64, CD68, CD86, CD66b, HLA-

DR и CD235a;

(d) отделения моноцитов, которые являются позитивными в отношении указанного одного или нескольких поверхностных антигенов линии дифференцировки из множества моноцитов, и получения популяции гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, содержащей эндотелиальные клетки-предшественники;

(e) мечения стволовых клеток негативной линии дифференцировки антителом, конъюгированным с биотином, против CD133;

(f) отделения стволовых клеток, положительных по CD133, от стволовых клеток, негативных по CD133, находящихся в популяции стволовых клеток негативной линии дифференцировки;

и последующего введения в стекловидное тело глаза млекопитающего выделенных стволовых клеток негативной линии дифференцировки, позитивных или негативных по CD133, в количестве, достаточном для снижения эффектов заболевания.

17. Способ по п.16, где заболевание представляет собой дегенеративное заболевание сетчатки.

18. Способ по п.16, где заболевание представляет собой дегенеративное заболевание сосудов сетчатки.

19. Способ по п.16, где заболевание представляет собой, связанную с возрастом дегенерацию желтого пятна.

20. Способ по п.16, где заболевание представляет собой диабетическую ретинопатию.

21. Популяция трансфецированных гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, содержащая популяцию стволовых клеток по п.1 или п.8, трансфецированных операбельным геном, который кодирует терапевтически эффективный пептид, содержащий T2-триптофанил-тРНК синтетазу (T2-TrpRS).

22. Популяция трансфецированных гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, позитивная или негативная по CD133, полученная путем

(a) экстракции костного мозга из взрослой особи млекопитающего;

(b) выделения множества моноцитов из костного мозга;

(c) мечения множества моноцитов набором конъюгированных с биотином антител линий дифференцировки против CD2, CD3, CD4, CD11, CD11a, Mac-1, CD14, CD16, CD19, CD24, CD33, CD36, CD38, CD45, Ly-6G, TER-119, CD45RA, CD56, CD64, CD68, CD86, CD66b, HLA-DR и CD235a;

(d) отделения моноцитов, которые являются позитивными в отношении указанного одного или нескольких поверхностных антигенов линии дифференцировки, из множества моноцитов и получения популяции гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, содержащей эндотелиальные клетки-предшественники;

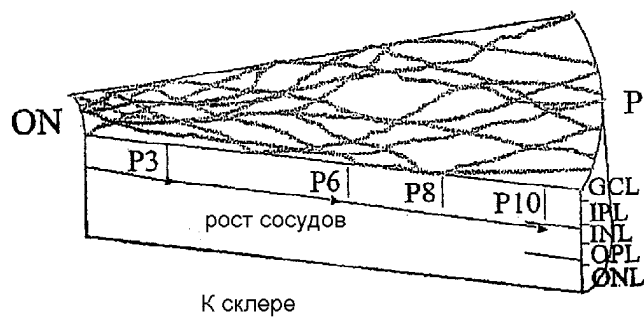
(e) мечения стволовых клеток негативной линии дифференцировки антителом, конъюгированным с биотином, против CD133;

(f) отделения стволовых клеток, положительных по CD133, от стволовых клеток, негативных по CD133, находящихся в популяции стволовых клеток негативной линии дифференцировки; и

(g) трансфекции гематопозитических стволовых клеток негативной линии дифференцировки, позитивных или негативных по CD133, полученных на стадии (f), полинуклеотидом, который операбельно кодирует терапевтически эффективный пептид, содержащий T2-триптофанил-тРНК синтетазу (T2-TrpRS).

A

К стекловидному телу



B

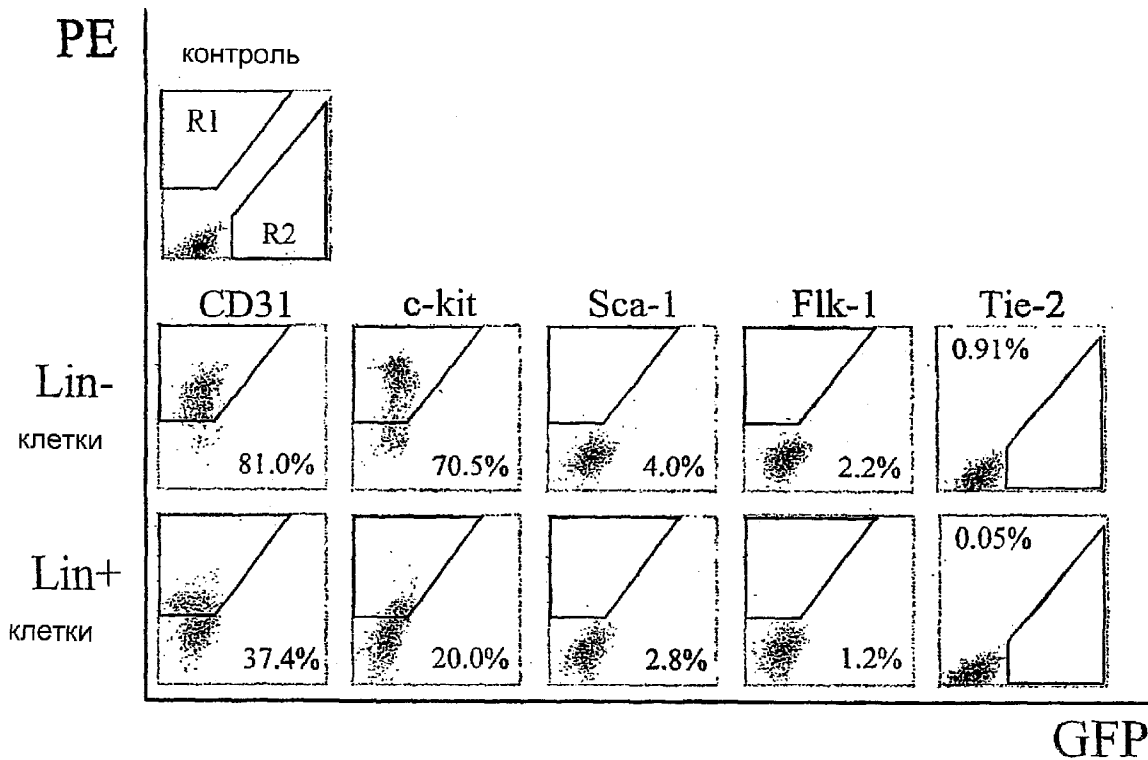
К стекловидному телу



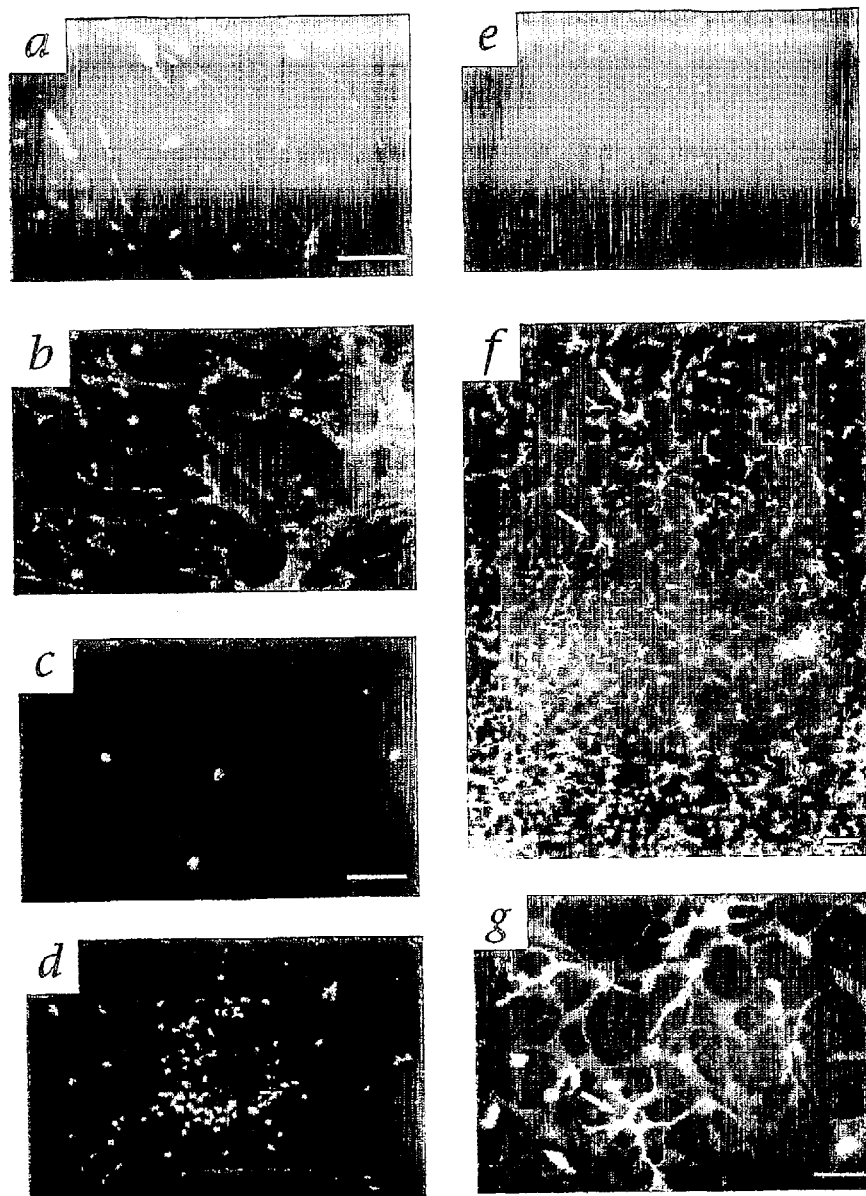
К склере

ФИГ.1

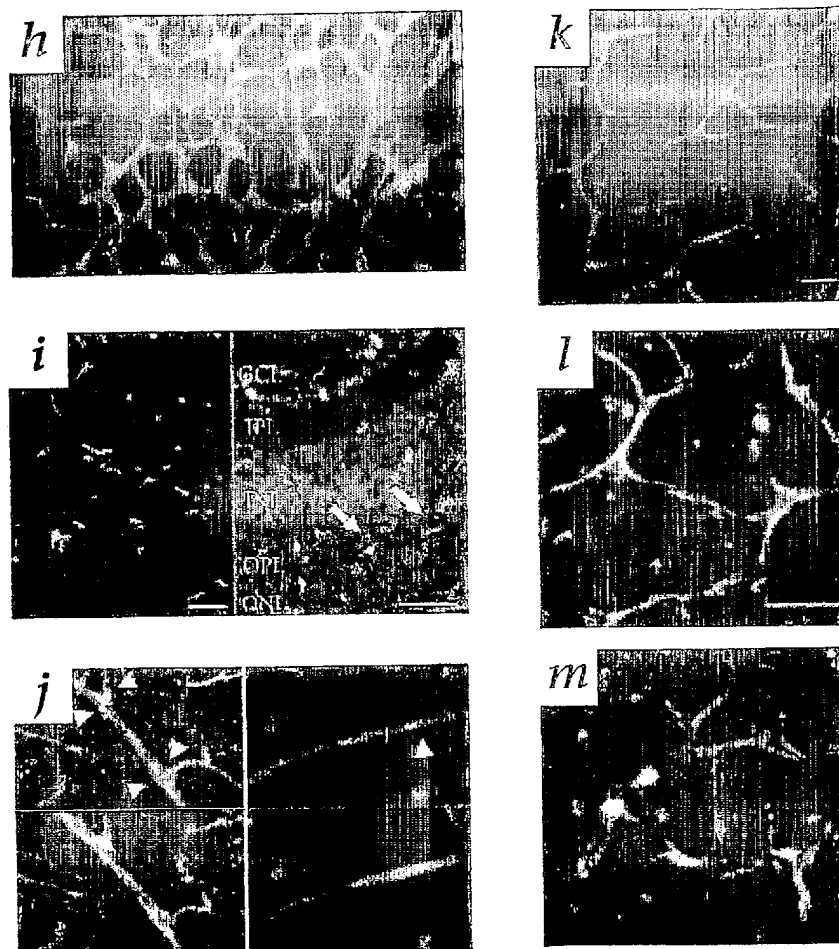
C



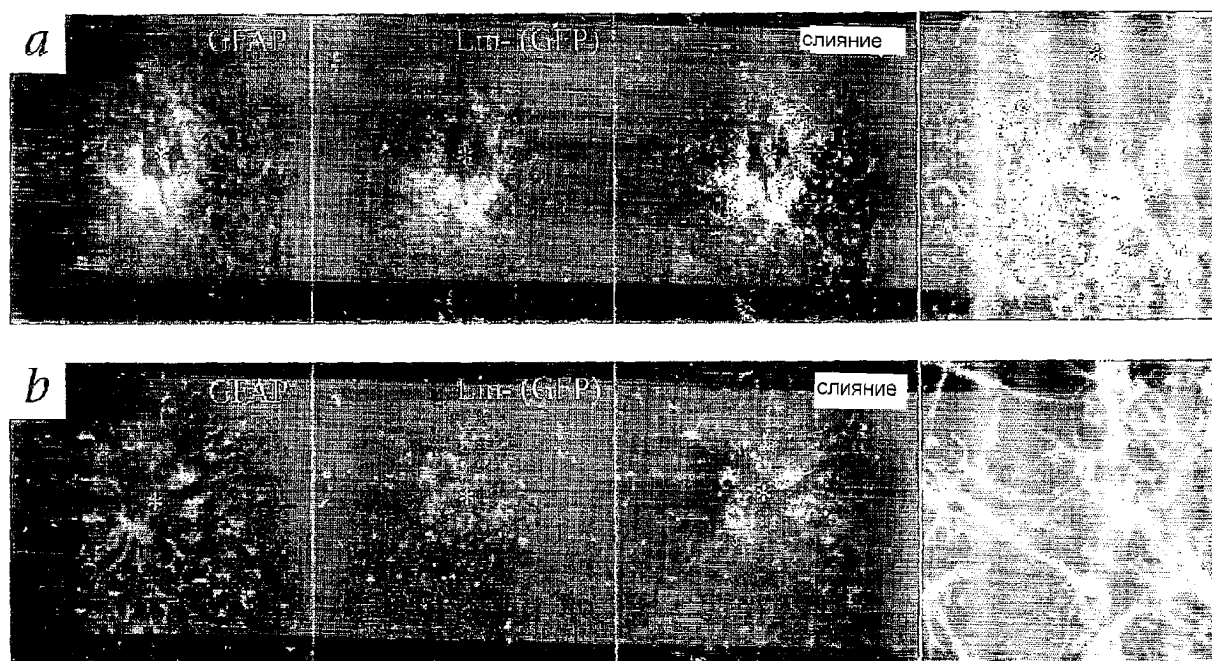
ФИГ. 1, продол.



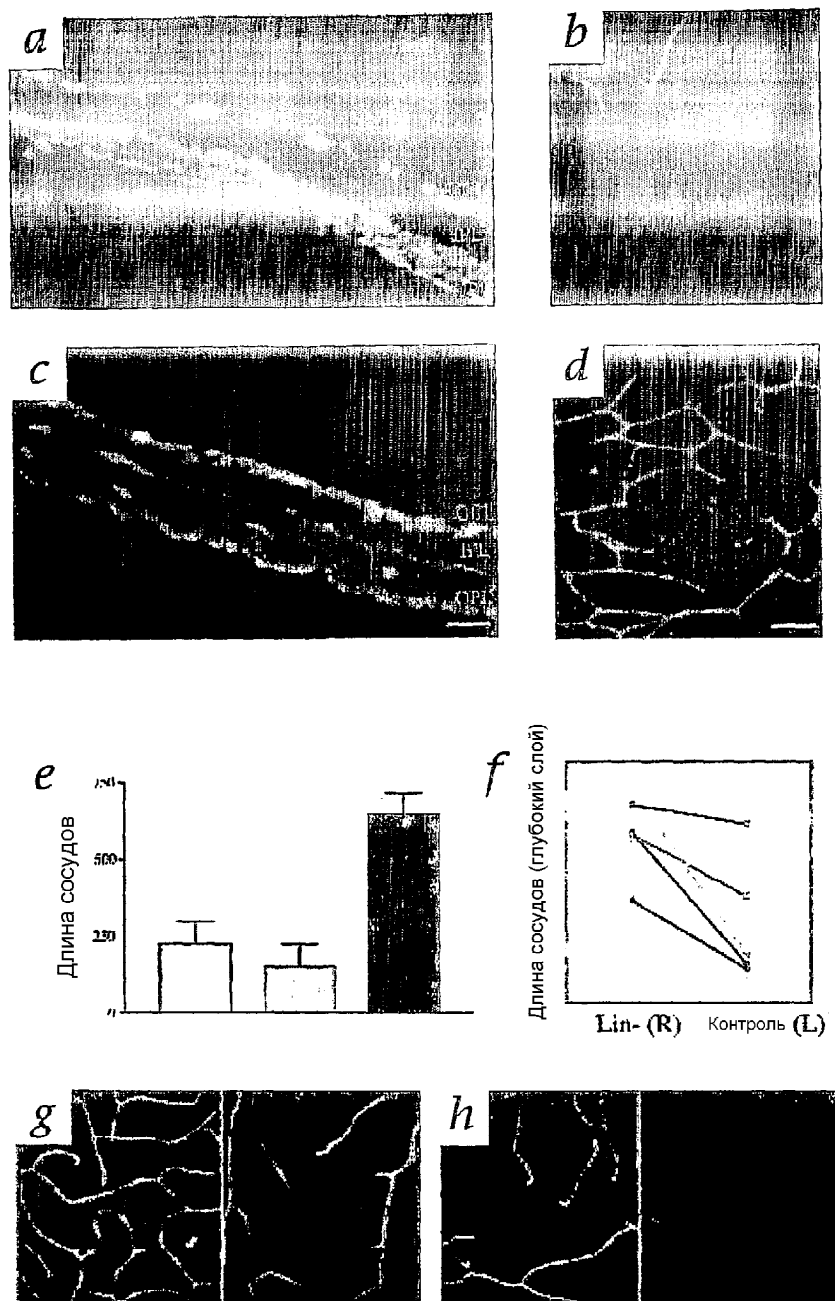
ФИГ.2



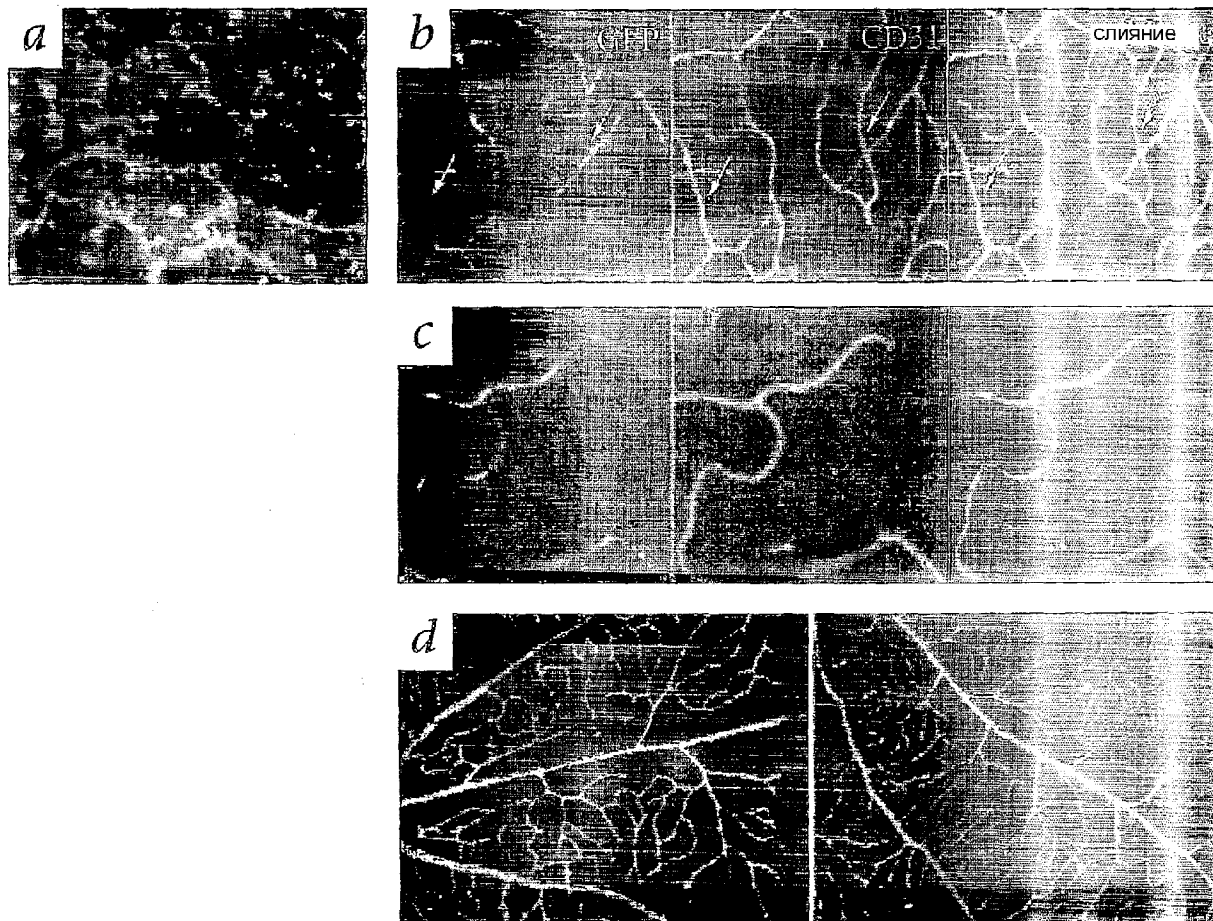
ФИГ. 2, продол.



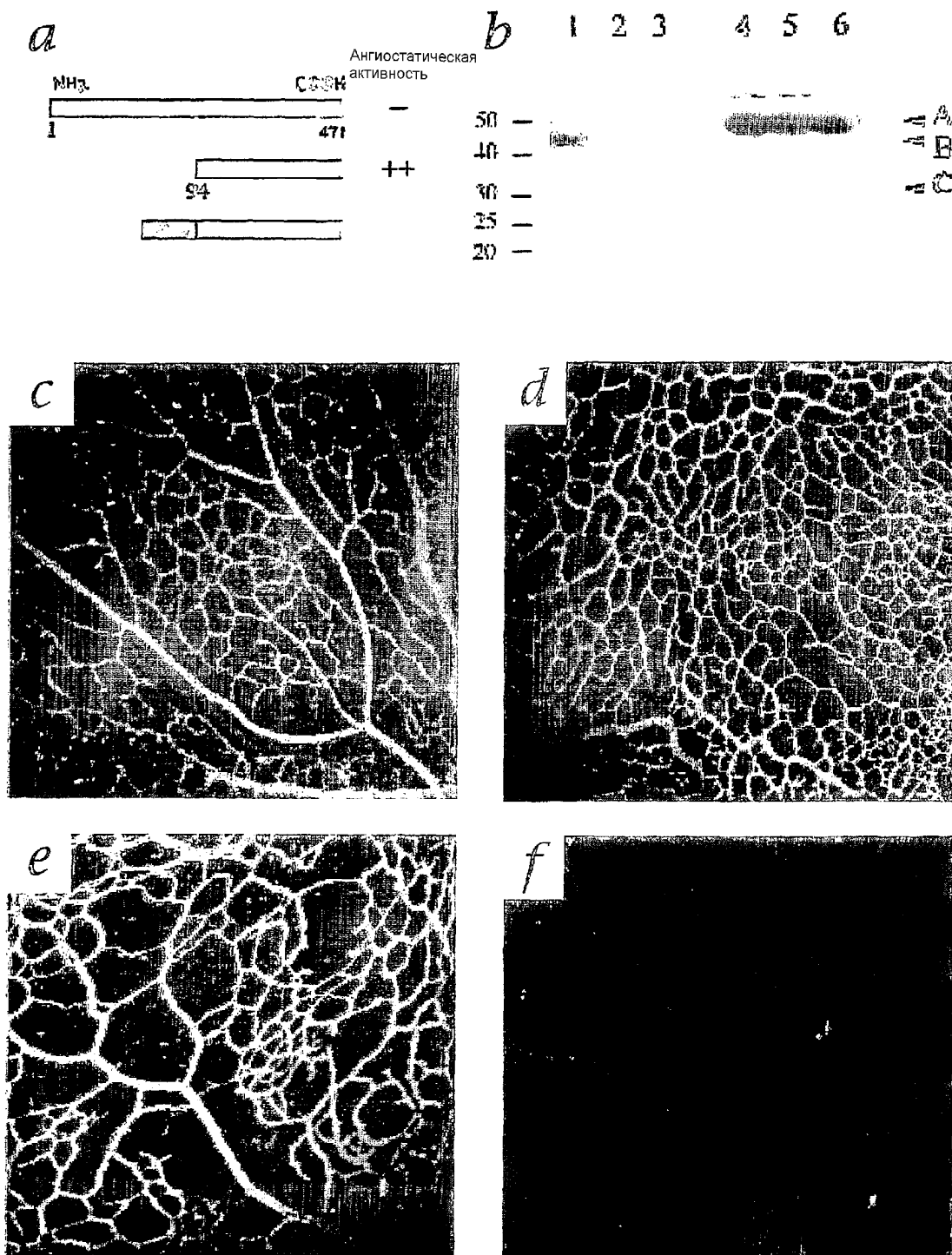
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ.5



ФИГ. 6

ДНК, кодирующая фрагмент Т2 TrpRS человека с гистидиновой меткой

tggcgaatgg	gacgcgcacct	gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	60
cagcgtgacc	gctacacttg	ccagcgcacct	agcgcgccgt	cctttcgctt	tcttcccttc	120
ctttctcgcc	acgttcgcgc	gctttccccc	tcaagctcta	aatcgggggc	tccctttagg	180
gttccgattt	agtgcctttac	ggcacctcga	ccccaaaaaa	cttgattagg	gtgatgggtc	240
acgtagtggg	ccatcgccct	gatagaacgt	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtcacagtt	300
ctttaatagt	ggactcctgt	tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	cggtctattc	360
ttttgattta	taagggattt	tgcgcgattc	ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	420
acaaaaattt	aacgcgaatt	ttaacaaaaa	attaacgttt	acaatttcag	gtggcacttt	480
tcggggaaat	gtgcgcggaa	ccctattttg	tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	540
tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	600
gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	gcggcatttt	gccttccctg	660
ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	720
agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	780
agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcg	tattatcccc	840
tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggtcg	cgcatacac	tattctcaga	atgacttggt	900
tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	960
cagtgtctgc	ataaccatga	gtgataaac	tgcggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	1020
aggaccgaag	gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccctga	1080
tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaaccgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	1140
tgcagcaaat	gcaacaacgt	tgcgcaaac	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	1200
ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggg	ggataaaagt	gcaggaccac	ttctgcgctc	1260
ggcccttccg	gctggctggt	ttattgctga	taaatctgga	gccgggtgagc	gtgggtctcg	1320
cggtatcatt	gcagactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	1380
gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	1440
actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	1500
aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	1560
caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	1620
aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaacc	1680
accgctacca	gcggtggttt	gtttgocgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	1740
aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	1800
ccaccacttc	aagaactctg	tagcaaccgc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	1860
agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	1920
accggataag	gcgcagcggg	cgggctgaac	ggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttgga	1980
gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	ctatgagaaa	gcgccacgct	2040
tcccgaaggg	agaaaaggcg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	caggagagcg	2100
cacgagggag	cttccagggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgccca	2160
cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggcggagcc	tatggaaaaa	2220
cggcagcaac	gcggcctttt	taoggttcct	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatggt	2280
ctttcctgcg	ttatccctcg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	agtgagctga	2340
taccgctcgc	cgcagccgaa	cgcagcagcg	cagcgagtca	gtgagcggag	aagcgggaaga	2400
gcgcctgatg	cggtatcttc	tccttacgca	tctgtgcggg	atttcacacc	gcataatag	2460
tgcactctca	gtacaatctg	ctctgatgcc	gcatagttaa	gccagtatac	actccgctat	2520
cgtacgtga	ctgggtcatg	gctgcgcccc	gacacccgct	aacacccgct	gacgcgccct	2580
gacgggcttg	tctgctcccg	gcatccgctt	acagacaagc	tgtgaccgtc	tccgggagct	2640
gcatgtgtca	gaggttttca	ccgtcatcac	cgaaacgcgc	gaggcagctg	cggtaaagct	2700
catcagcgtg	gtcgtgaagc	gattcacaga	tgtctgcctg	ttcatccgcg	tccagctcgt	2760
tgagtttctc	cagaagcgtt	aatgtctggc	ttctgataaa	gcggggccatg	ttaaggcgcg	2820
tttttccctg	tttggtcaat	gatgcctccg	tgtaaggggg	atttctgttc	atgggggtaa	2880
tgataccgat	gaaacgagag	aggatgctca	cgatacgggt	tactgatgat	gaacatgccc	2940
ggttactgga	acgttgtgag	ggtaaacac	tggcgggtatg	gatgcggcgg	gaccagagaa	3000
aaatcactca	gggtcaatgc	cagcgccttc	ttaatacaga	tgtagggtgtt	ccacagggta	3060
gccagcagca	tcctgcgatg	cagatccgga	acataatggt	gcagggcgct	gacttccgcg	3120
ttccagact	ttacgaaacg	cggaaaccga	agaccattca	tgttgttgct	caggtcgcag	3180
acgttttgca	gcagcagtcg	cttcacgttc	gctcgcgtat	cgggtgattca	ttctgctaac	3240
cagtaaggca	accccgccag	cctagccggg	tcctcaacga	caggagcacg	atcatgcgca	3300

ФИГ. 7

```

cccggtggcca ggacccaacg ctgcccgaga tctcgatccc gcgaaattaa tacgactcac 3360
tataggggaga ccacaacggt ttccctctag aaataatttt gtttaacttt aagaaggaga 3420
tatacat atg agt gca aaa ggc ata gac tac gat aag ctc att gtt cgg 3469
ttt gga agt agt aaa att gac aaa gag cta ata aac cga ata gag aga 3517
gcc acc ggc caa aga cca cac cac ttc ctg cgc aga ggc atc ttc ttc 3565
tca cac aga gat atg aat cag gtt ctt gat gcc tat gaa aat aag aag 3613
cca ttt tat ctg tac acg ggc cgg ggc ccc tct tct gaa gca atg cat 3661
gta ggt cac ctc att cca ttt att ttc aca aag tgg ctc cag gat gta 3709
ttt aac gtg ccc ttg gtc atc cag atg acg gat gac gag aag tat ctg 3757
tgg aag gac ctg acc ctg gac cag gcc tat ggc gat gct gtt gag aat 3805
gcc aag gac atc atc gcc tgt ggc ttt gac atc aac aag act ttc ata 3853
ttc tct gac ctg gac tac atg ggg atg agc tca ggt ttc tac aaa aat 3901
gtg gtg aag att caa aag cat gtt acc ttc aac caa gtg aaa ggc att 3949
ttc ggc ttc act gac agc gac tgc att ggg aag atc agt ttt cct gcc 3997
atc cag gct gct ccc tcc ttc agc aac tca ttc cca cag atc ttc cga 4045
gac agg acg gat atc cag tgc ctt atc cca tgt gcc att gac cag gat 4093
cct tac ttt aga atg aca agg gac gtc gcc ccc agg atc ggc tat cct 4141
aaa cca gcc ctg ttg cac tcc acc ttc ttc cca gcc ctg cag ggc gcc 4189
cag acc aaa atg agt gcc agc gac cca aac tcc tcc atc ttc ctc acc 4237
gac acg gcc aag cag atc aaa acc aag gtc aat aag cat gcg ttt tct 4285
gga ggg aga gac acc atc gag gag cac agg cag ttt ggg ggc aac tgt 4333
gat gtg gac gtg tct ttc atg tac ctg acc ttc ttc ctc gag gac gac 4381
gac aag ctc gag cag atc agg aag gat tac acc agc gga gcc atg ctc 4429
acc ggt gag ctc aag aag gca ctc ata gag gtt ctg cag ccc ttg atc 4477
gca gag cac cag gcc cgg cgc aag gag gtc acg gat gag ata gtg aaa 4525
gag ttc atg act ccc cgg aag ctg tcc ttc gac ttt cag aag ctt gcg 4573
gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac tgagatccgg ctgctaacaa 4623
agcccgaaag gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag caataactag cataacccct 4683
tggggcctct aaacgggtct tgagggggttt tttgctgaaa ggaggaacta tatccggat 4742

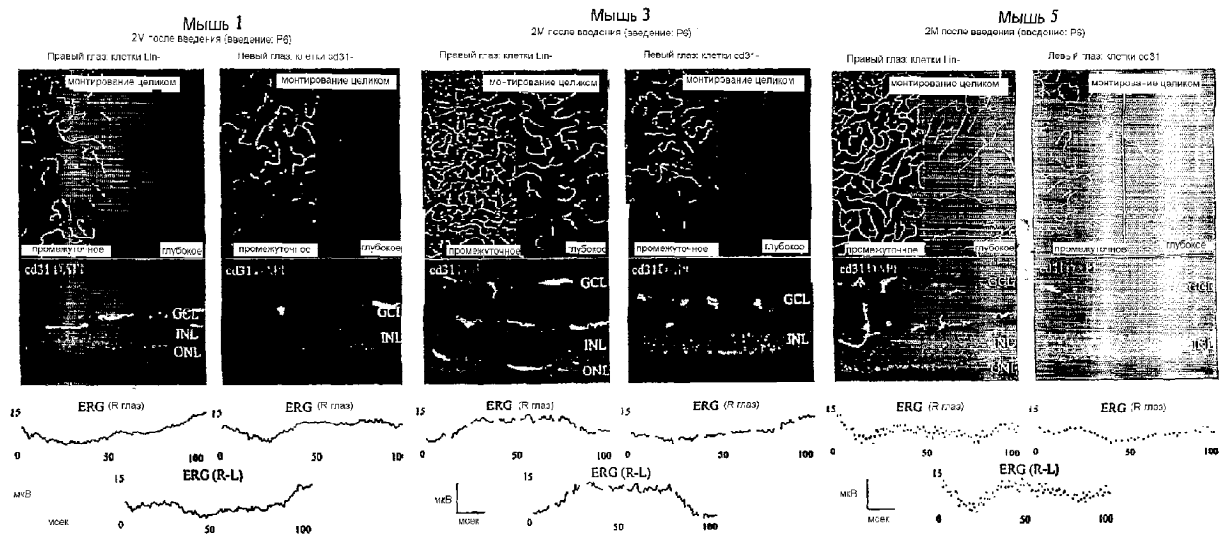
```

ФИГ. 7, продол.

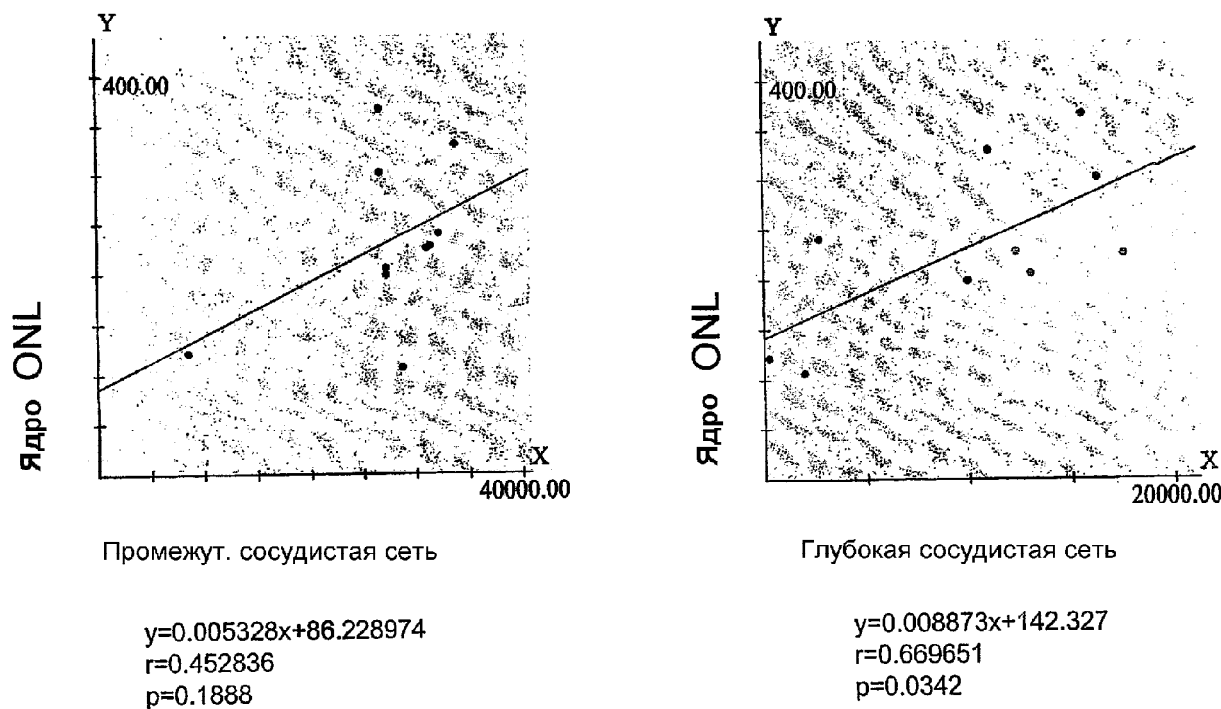
Фрагмент T2 TrpRS человека с гистидиновой меткой

Met	Ser	Ala	Lys	Gly	Ile	Asp	Tyr	Asp	Lys	Leu	Ile	Val	Arg	Phe	Gly	1	5	10	15
Ser	Ser	Lys	Ile	Asp	Lys	Glu	Leu	Ile	Asn	Arg	Ile	Glu	Arg	Ala	Thr	20	25	30	
Gly	Gln	Arg	Pro	His	His	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Ile	Phe	Phe	Ser	His	35	40	45	
Arg	Asp	Met	Asn	Gln	Val	Leu	Asp	Ala	Tyr	Glu	Asn	Lys	Lys	Pro	Phe	50	55	60	
Tyr	Leu	Tyr	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	Ser	Glu	Ala	Met	His	Val	Gly	65	70	75	80
His	Leu	Ile	Pro	Phe	Ile	Phe	Thr	Lys	Trp	Leu	Gln	Asp	Val	Phe	Asn	85	90	95	
Val	Pro	Leu	Val	Ile	Gln	Met	Thr	Asp	Asp	Glu	Lys	Tyr	Leu	Trp	Lys	100	105	110	
Asp	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Asn	Ala	Lys	115	120	125	
Asp	Ile	Ile	Ala	Cys	Gly	Phe	Asp	Ile	Asn	Lys	Thr	Phe	Ile	Phe	Ser	130	135	140	
Asp	Leu	Asp	Tyr	Met	Gly	Met	Ser	Ser	Gly	Phe	Tyr	Lys	Asn	Val	Val	145	150	155	160
Lys	Ile	Gln	Lys	His	Val	Thr	Phe	Asn	Gln	Val	Lys	Gly	Ile	Phe	Gly	165	170	175	
Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Ile	Gly	Lys	Ile	Ser	Phe	Pro	Ala	Ile	Gln	180	185	190	
Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Ser	Asn	Ser	Phe	Pro	Gln	Ile	Phe	Arg	Asp	Arg	195	200	205	
Thr	Asp	Ile	Gln	Cys	Leu	Ile	Pro	Cys	Ala	Ile	Asp	Gln	Asp	Pro	Tyr	210	215	220	
Phe	Arg	Met	Thr	Arg	Asp	Val	Ala	Pro	Arg	Ile	Gly	Tyr	Pro	Lys	Pro	225	230	235	240
Ala	Leu	Leu	His	Ser	Thr	Phe	Phe	Pro	Ala	Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Thr	245	250	255	
Lys	Met	Ser	Ala	Ser	Asp	Pro	Asn	Ser	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Asp	Thr	260	265	270	
Ala	Lys	Gln	Ile	Lys	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	His	Ala	Phe	Ser	Gly	Gly	275	280	285	
Arg	Asp	Thr	Ile	Glu	Glu	His	Arg	Gln	Phe	Gly	Gly	Asn	Cys	Asp	Val	290	295	300	
Asp	Val	Ser	Phe	Met	Tyr	Leu	Thr	Phe	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Lys	305	310	315	320
Leu	Glu	Gln	Ile	Arg	Lys	Asp	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ala	Met	Leu	Thr	Gly	325	330	335	
Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Leu	Ile	Glu	Val	Leu	Gln	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu	340	345	350	
His	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Glu	Phe	355	360	365	
Met	Thr	Pro	Arg	Lys	Leu	Ser	Phe	Asp	Phe	Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala	370	375	380	
Leu	Glu	His	His	His	His	His	His									385	390		

ФИГ.8

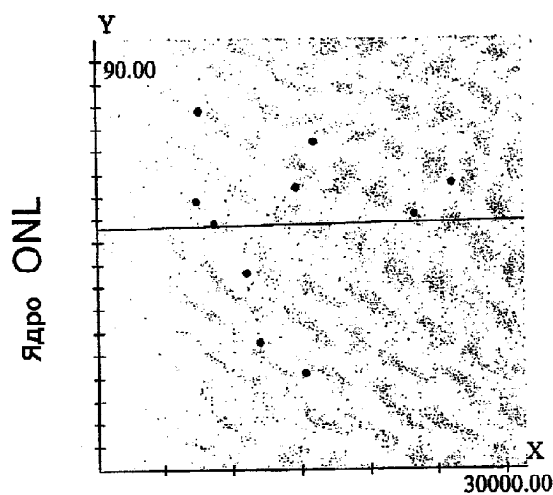


ФИГ.9
Простой регрессионный анализ - 2М



ФИГ. 10

Простой регрессионный анализ - 2М контроль

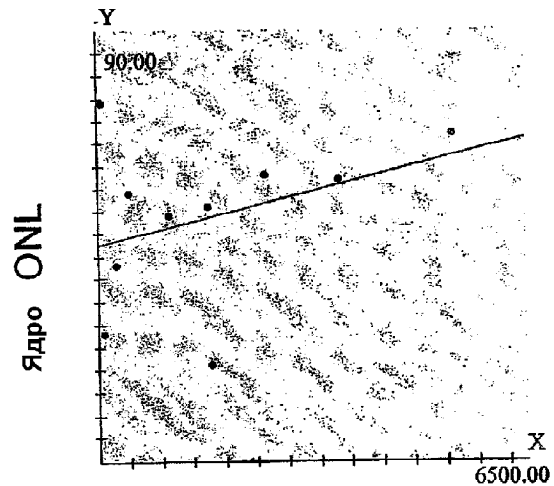


Промежут. сосудистая сеть

$$y=0.000056x+52.905069$$

$$r=0.019418$$

$$p=0.9575$$



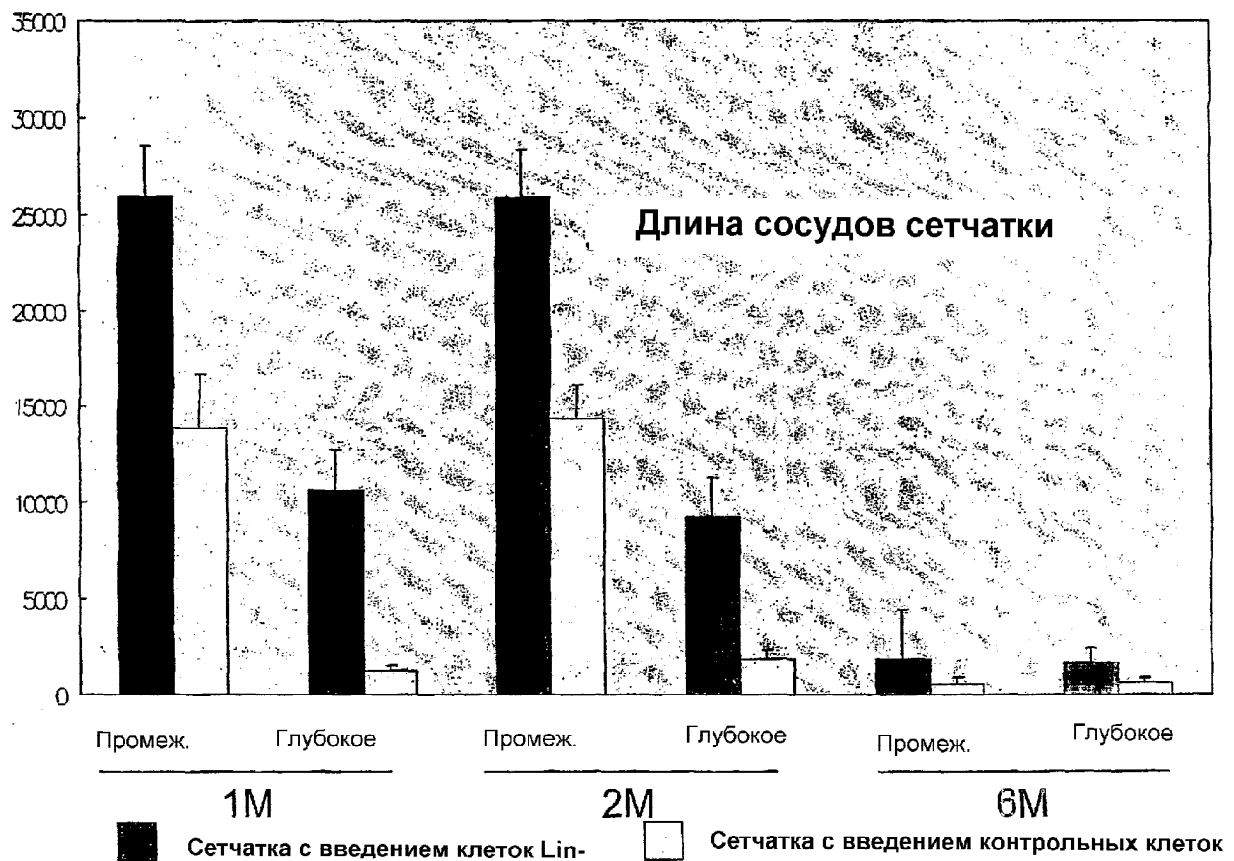
Глубокая сосудистая сеть

$$y=0.003517x+47.465646$$

$$r=0.349191$$

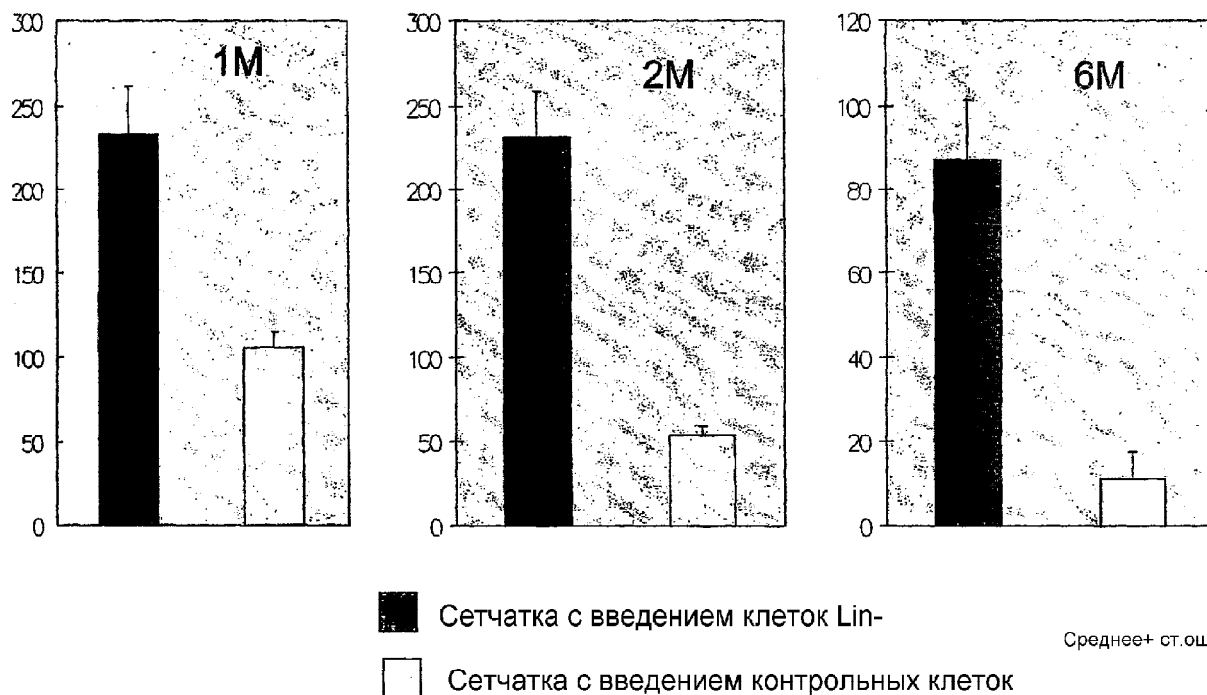
$$p=0.3227$$

ФИГ. 11

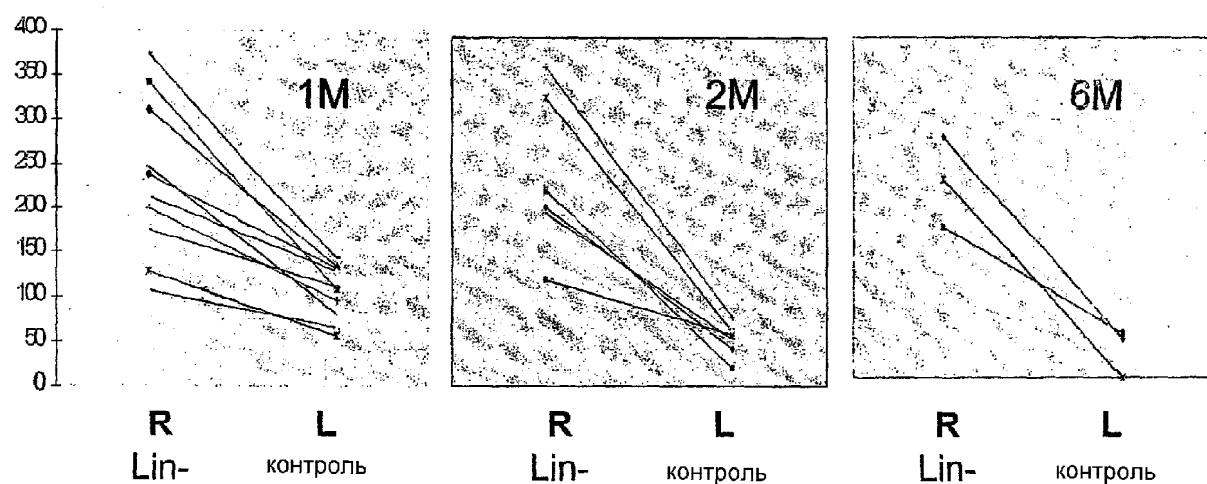


ФИГ. 12

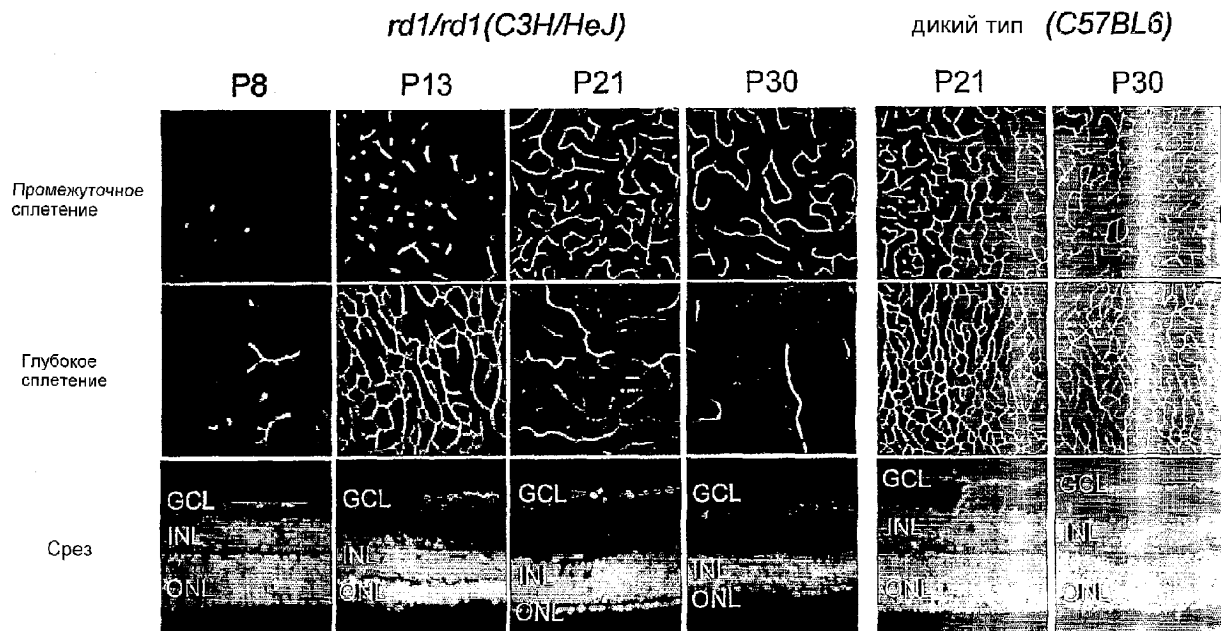
Количество ядер в ONL



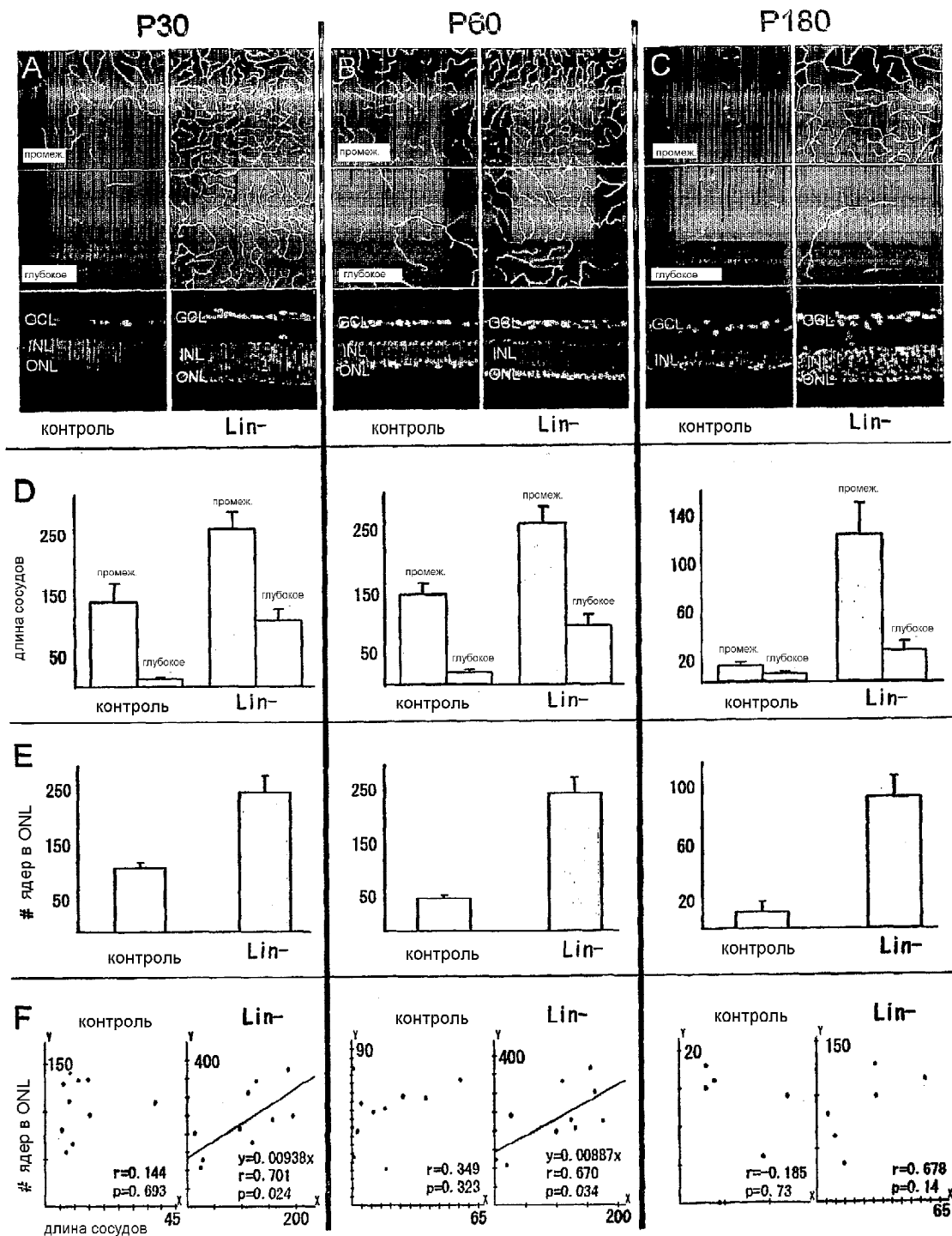
ФИГ. 13
Количество ядер в ONL



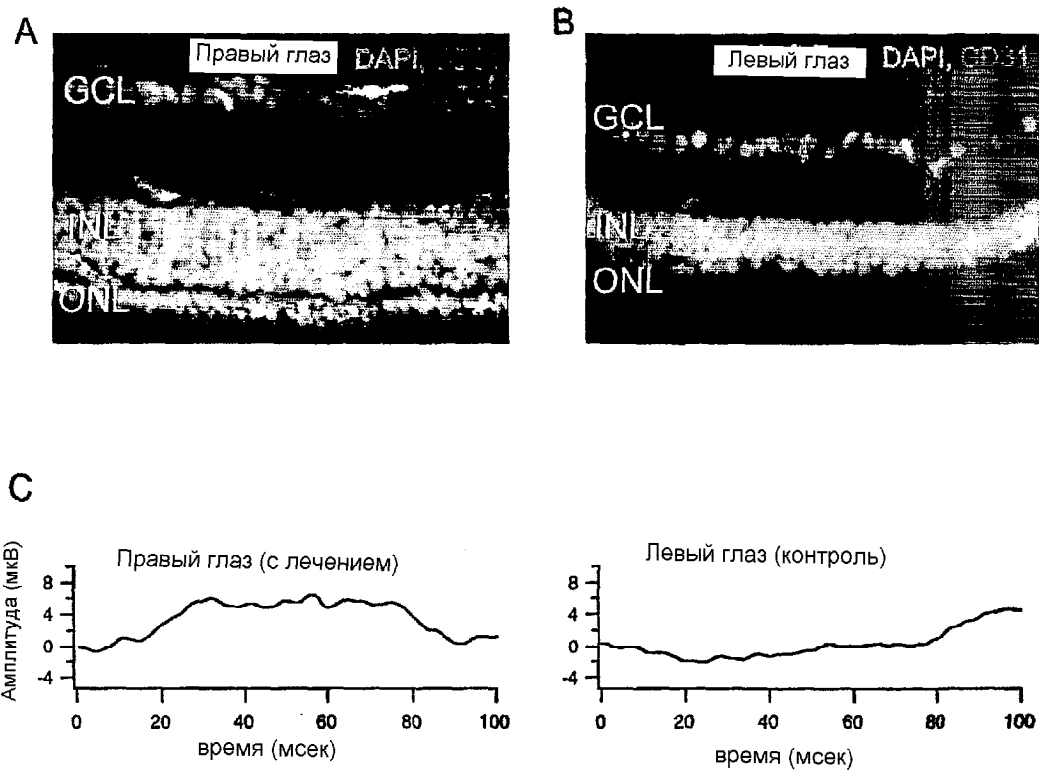
ФИГ.14



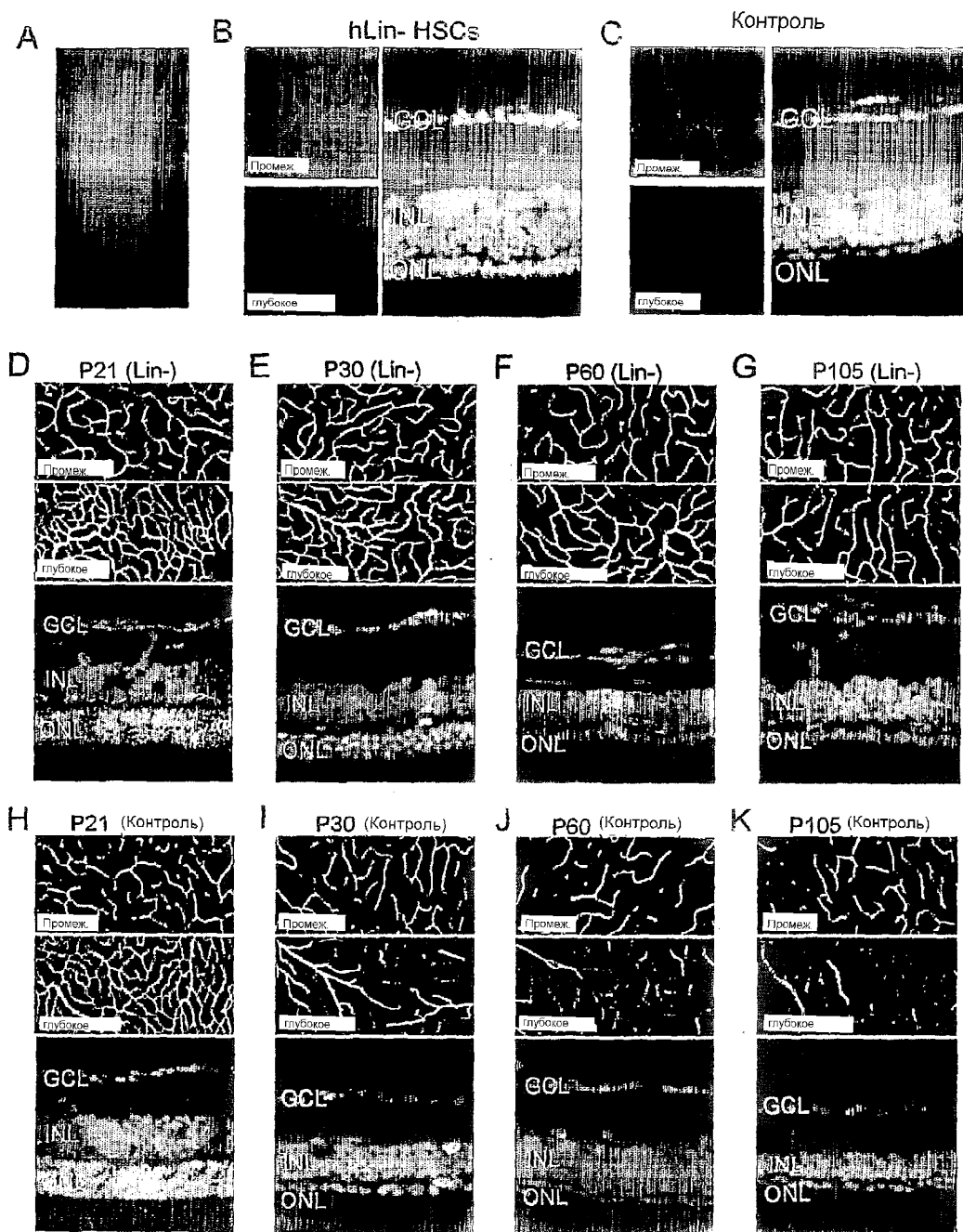
ФИГ.15



ФИГ.16

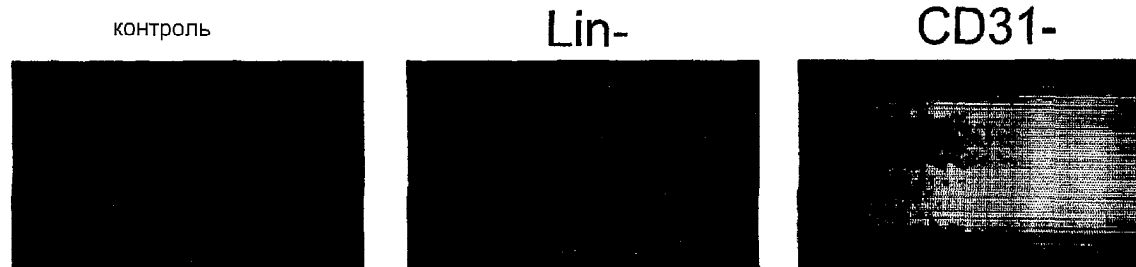


ФИГ.17



ФИГ.18

Экспрессия α -кристаллина в спасенной сетчатке rd/rd



зеленый : α -кристаллин, синий: DAPI

ФИГ.19

(А) Гены, экспрессия которых увеличивается в 3 раза в сетчатках с введением Lin-HSC

Обычное обозначение	(нормализованные данные)			Genbank	Ключевые слова
	Lin (-)	CD31 (-)	NI rd/rd		
Tgtp	11.86	0.53	0.66	L38444	Белок, специфичный для T-клеток
H-2D4(q)	7.09	0.92	0.69	X52914	Трансплантационный антиген
H2-K2; H-2K2	4.51	0.70	0.55	M27134	гликопротеин клеточной поверхности
Lzp-s	6.51	0.65	0.99	X51547	лизоцим; лизоцим Р
Kcnj5	4.50	0.85	0.72	U33631	управляемый G-белком K ⁺ канал
Scya8	5.19	0.47	1.00	AB023418	предшественник MCP-2
Ly6a	4.02	0.96	0.79	X04653	аллоантиген Ly-6
Anxa1	2.49	0.60	0.51	AV003419	EST
Pip5k1c	3.40	0.94	0.78	AB006916	фосфатидилинозитолкиназа
MAD	3.76	0.56	0.89	X83106	белок димеризации MAX
Cxadr	3.98	0.81	1.00	U90715	рецептор аденовируса коксаки
Isg15	2.22	0.64	0.45	X56602	белок, индуцируемый интерфероном
EST	3.51	0.90	0.98	AA790936	EST
Tm4sf1	3.02	0.49	0.70	AV087000	EST
IgG VH-II	2.64	0.95	0.91	X02463	тяжелая цепь Ig; переменная область
YY1	2.97	0.85	0.87	M74590	транскрипционный фактор дельта
Psmb9	3.29	0.49	0.97	D44456	субъединица 2 полипептидного комплекса
H2-Aa	2.63	0.88	0.94	X52643	I-E альфа NON, MHC

(В) Гены кристаллина

Обычное обозначение	(нормализованные данные)			Genbank	Ключевые слова
	Lin (-)	CD31 (-)	NI rd/rd		
Crybb2	8.73	0.55	0.83	M60559	бета-В2-кристаллин
Cryaa	4.00	0.57	1.00	J00376	альфа-А-кристаллин
CrygD	2.09	0.74	0.97	AJ224342	гамма-D-кристаллин
Cryba1	6.52	0.93	0.60	AJ239052	бета-A3/A1-кристаллин
Crygs	2.89	0.97	0.85	AF032995	гамма- S-кристаллин
CrygC	5.07	1.00	0.83	Z22574	гамма- C-кристаллин
CrygF	1.94	1.00	0.69	AJ224343	гамма- F-кристаллин

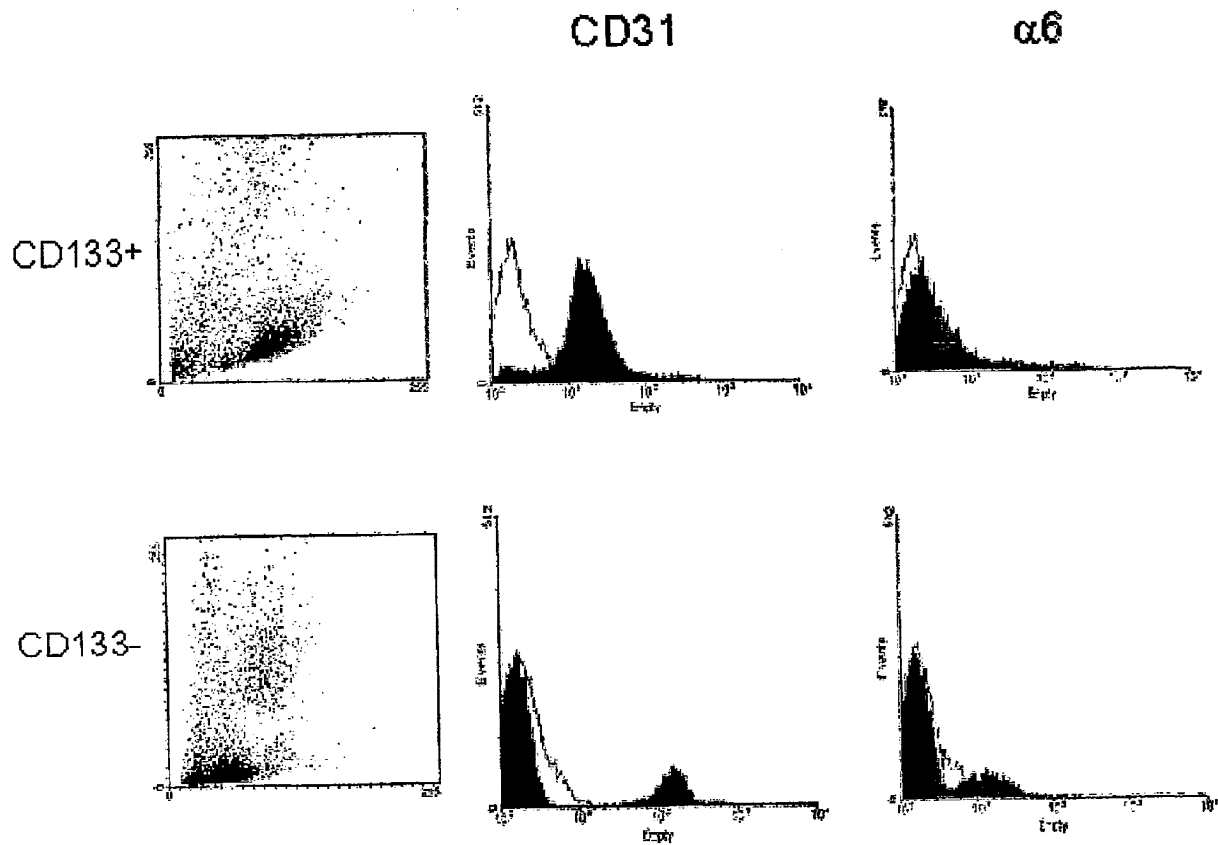
(С) Гены, позитивно регулируемые, по меньшей мере, в 2 раза в сетчатках, спасенных стволовыми клетками человека

Обычное обозначение	(необработанные данные)			Genbank	Ключевые слова
	MR	HR	HNR		
EST	397	1885	489	AK024177	EST
CD6	960	2155	840	NM_006725	антиген CD6
IFN α 13	241	506	220	NM_006900	интерферон альфа 13
TRAG3	269	543	229	NM_004909	ген 3, ассоциированный с устойчивостью к тасолу
ELA2	229	442	187	NM_001972	эластаза 2, нейтрофил
PP32D	179	345	146	NM_012404	кислый ядерный фосфопротеин 32D
otoferlin	232	485	239	NM_004802	отоферлин
acyl oxidase	175	332	164	NM_004035	оксидаза ацил-коэнзима А
HS6ST1	204	385	210	NM_004807	6-O-сульфотрансфераза гепарансульфата
ACCN3	187	337	181	NM_004769	чувствительный к амилориду катионный канал 3 семенников

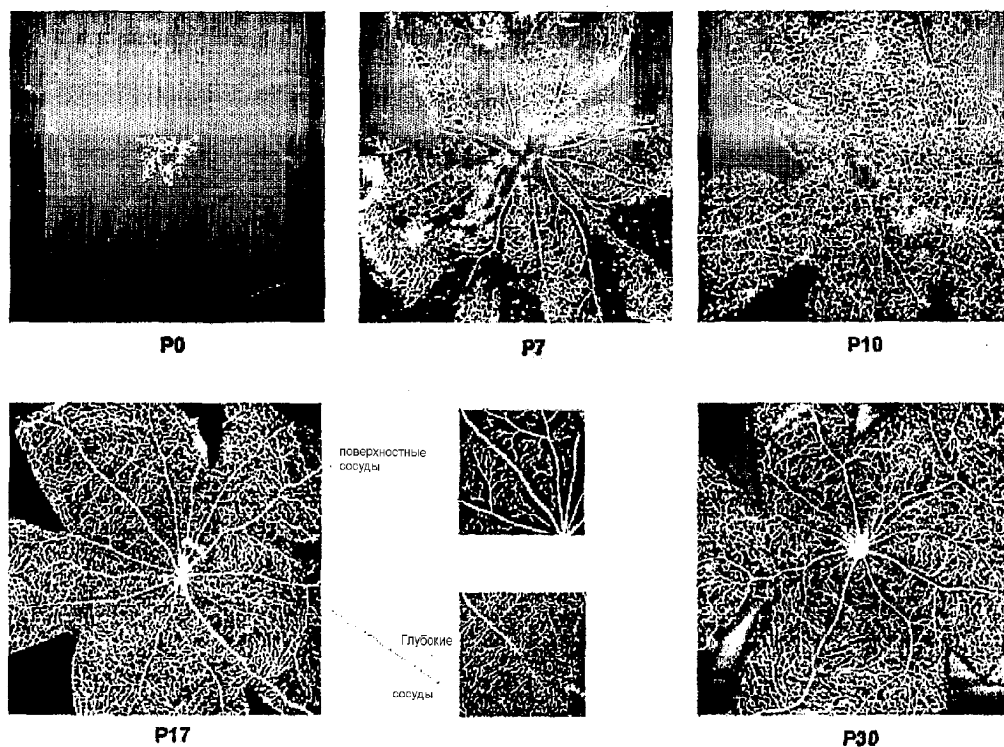
(D) Гены нейротрофических факторов или факторов роста, позитивно регулируемые в сетчатках, спасенных стволовыми клетками человека

Обычное обозначение	(необработанные данные)			Genbank	Ключевые слова
	MR	HR	HNR		
IGF2	743	1245	839	NM_016412	инсулиноподобный фактор роста 2
SCGF	474	547	402	NM_002975	фактор роста стволовых клеток
TGF, beta1	841	1011	819	NM_000660	трансформирующий фактор роста бета 1
EGFR S8	499	593	491	A1343292	бел. 1, относящийся к субстрату 8 сигнального пути рецептора эпидермального фактора роста
FGF-6	524	611	526	NM_020996	фактор роста фибробластов 6
IGFBP	927	991	895	AW338791	связывающий бел. инсулиноподобного фактора роста
FGF-12	471	523	507	AL119322	фактор роста фибробластов 12
EGF-like	991	1092	1088	M60278	подобный EGF рецептор дифтерийного токсина
FGF-21	592	615	590	NM_019113	фактор роста фибробластов 21

ФИГ.20

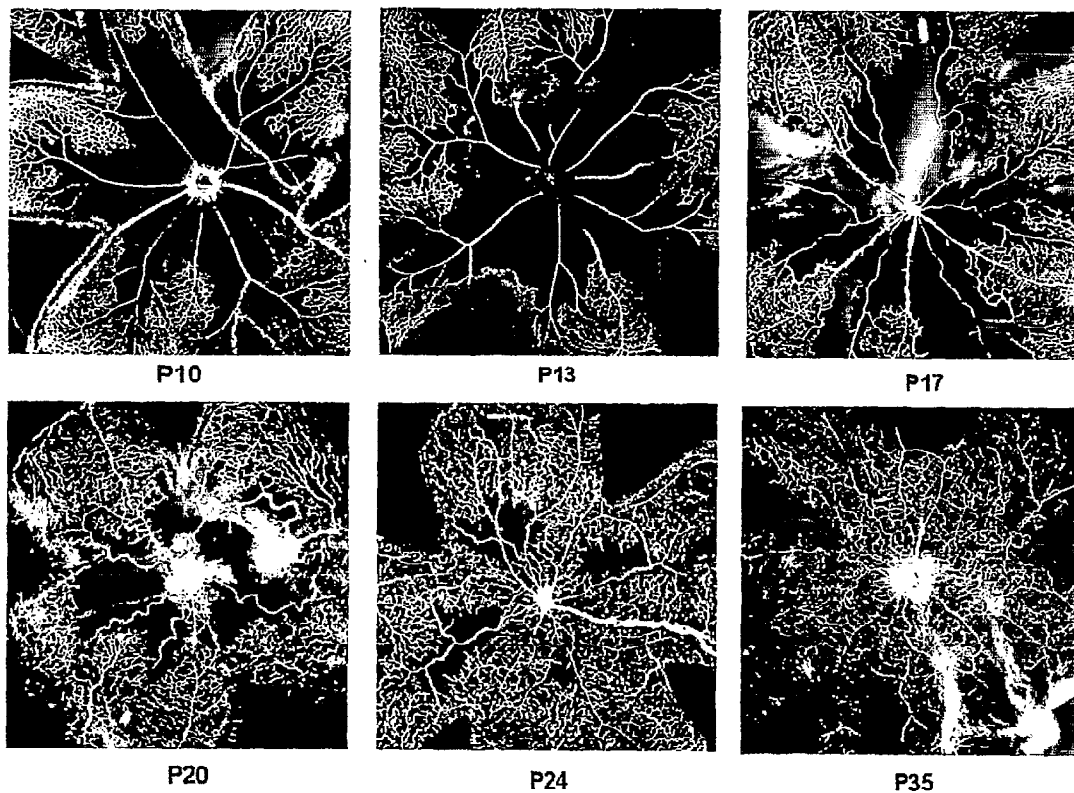


ФИГ.21



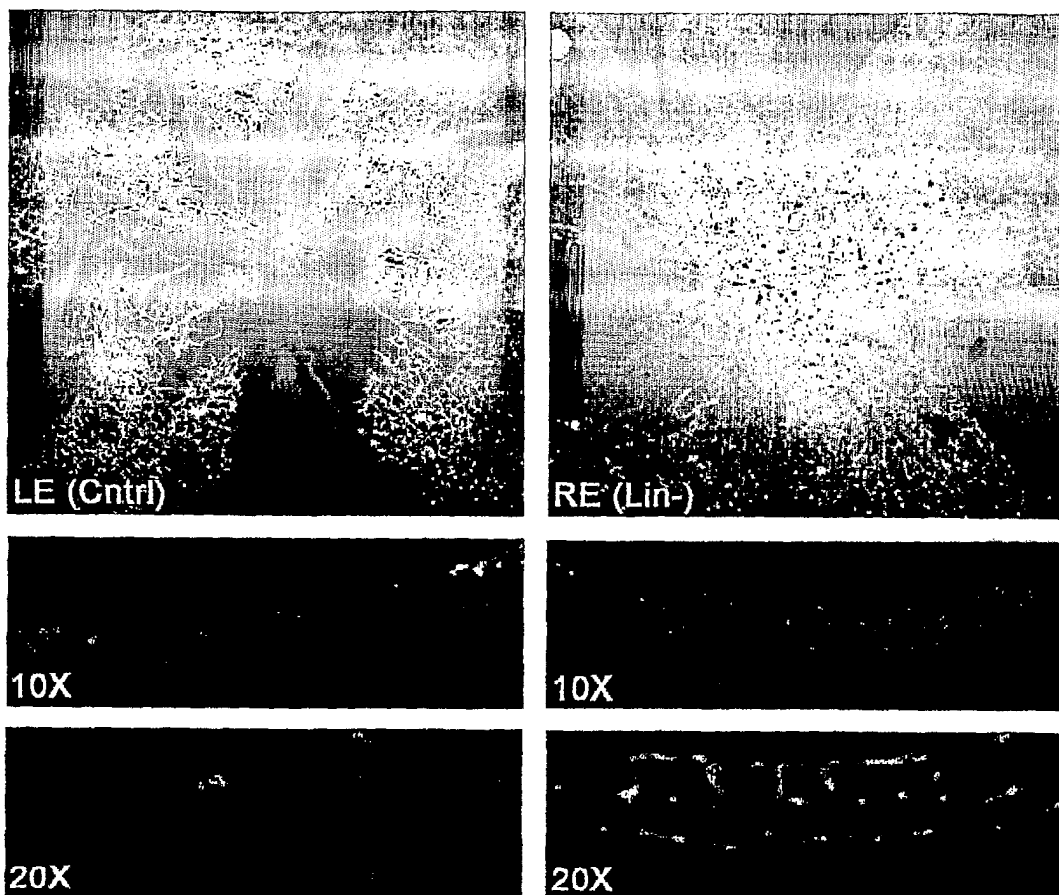
Постнатальное развитие сосудистой сети сетчатки у мышей дикого типа C57/B16, содержащихся при нормоксии

ФИГ.22



Модель индуцированной кислородом ретинопатии: постнатальное развитие сосудистой сети сетчатки у мышей C57/B16, содержащихся при 75% кислорода между P7 и P12 с возвращением с нормоксией с P12-P17 и анализом изображений с помощью флуоресцин-декстрана на конфокальном микроскопе на P17.

ФИГ. 23



Эффект спасения Lin- HSC в модели OIR. CD31-CD34-CD11b-HSC (левые панели, "Ctrl") или Lin-HSC (правые панели) вводили в стекловидное тело на P3 в левый или правый глаз того же животного, соответственно. На P7 животное экспонировали с 75% кислородом в течение 5 дней с нормоксией на P12 и анализировали с помощью конфокальной микроскопии на P17. Красное окрашивание представляет собой лектин, синее - окрашивание DAPI.

ФИГ.24

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> The Scripps Research Institute
 Friedlander, Martin
 Otani, Atsushi
 DaSilva, Karen
 Moreno, Stacey (Hanekamp)

<120> Гематопоетические клетки и способы лечения неоваскулярных заболеваний глаз
 с их помощью

<130> TSRI-988.1

<150> 10/628,783

<151> 2003-07-25

<150> 60/467,051

<151> 2003-05-02

<150> 60/398,522

<151> 2002-07-25

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 4742

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДНК, кодирующая T2-TrpRS человека с гистидиновой меткой

<400> 1

```

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatgggtc 240
acgtagtggg ccacgcgccct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aacctatctt cggctctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcgggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600
gagtattcaa catttcctgt tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt 660
ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720
agtgggttac atcgaaactg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780
agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 840
tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt 900
tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960
cagtgcgtcc ataaccatga gtgataaacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020
aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga 1080
tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140
tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc 1200
ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggg ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260
ggcccttcog gctgggtggg ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320
cggatcattt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380
gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc 1440
actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1500
aaaaacttcatt ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560
caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620
aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 1680

```

```

accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 1740
aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800
ccaccacttc aagaactctg tagcacccgc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc 1860
agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920
accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga 1980
gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040
tcccgaaggg agaaaaggcg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2100
cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 2160
cctctgactt gagegtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcgagacc tatggaaaaa 2220
cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggcccttttg tggccttttg ctacatgtt 2280
ctttcctgcg ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcagg aagcggaaga 2400
gcgcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggg atttcacacc gcatatatgg 2460
tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520
cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacaccgct gacgcgccct 2580
gacgggcttg tctgtcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 2640
gcattgtgtc gaggttttca ccgtcatcac cgaacgcgc gaggcagctg ccgtaaaagt 2700
catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcacccgct tccagctcgt 2760
tgagttttct cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcggggccatg ttaaggggcg 2820
ttttttcctg tttggtcact gatgcctcgg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880
tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940
ggttactgga acgttgtgag ggtaacaac tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000
aaatcactca ggggtcaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggta 3060
gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg 3120
tttccagact ttacgaaaca cggaaaaccg agaccattca tgttgttget caggtcgcag 3180
acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac 3240
cagtaaggga accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca 3300
ccgtgggcca ggacccaacg ctgccgaga tctcgatccc gcgaaattaa taccatcac 3360
tatagggaga ccacaacggt ttccctctag aaataatttt gtttaacttt aagaaggaga 3420
tatacatatg agtgcaaaag gcatagacta cgataagctc attgttcggg ttggaagtag 3480
taaaattgac aaagagctaa taaaccgaat agagagagcc accggccaaa gaccacacca 3540
cttctgcgc agaggcatct tcttctcaca cagagatatg aatcaggttc ttgatgcta 3600
tgaaaataag aagccatttt atctgtacac gggccggggc cctcttctg aagcaatgca 3660
tgtaggtcac ctcatccat ttattttcac aaagtggctc caggatgtat ttaacgtgcc 3720
cttggtcate cagatgacgg atgacgagaa gtatctgtgg aaggacctga cctggacca 3780
ggcctatggc gatgctgttg agaatgccaa ggacatcatc gcctgtggct ttgacatcaa 3840
caagactttc atattctctg acctggacta catggggatg agctcaggt tctacaaaaa 3900
tgtggtgaag attcaaaagc atgttacctt caaccaagt aaaggcattt tcggcttcac 3960
tgacagcgac tgcattggga agatcagttt tcctgccatc caggctgctc cctccttcag 4020
caactcatc ccacagatct tccgagacag cagggatata cagtgcctta tcccatgtgc 4080
cattgaccag gatccttact ttagaatgac aagggacgtc gccccagga tcggctatcc 4140
taaaccagcc ctggtgcact ccaccttctt cccagccctg cagggcgccc agacccaaa 4200
gagtgccage gacccaaact cctccatctt cctcaccgac acggccaagc agatcaaaac 4260
caaggtcaat aagcatgctt tttctggagg gagagacacc atcgaggagc acaggcagtt 4320
tgggggcaac tgtgatgtgg acgtgtcttt catgtacctg accttcttcc tcgaggacga 4380
cgacaagctc gagcagatca ggaaggatta caccagcgga gccatgctca ccggtgagct 4440
caagaaggca ctcatagagg ttctgcagcc cttgatcgca gagcaccagg cccggcgcaa 4500
ggaggtcacg gatgagatag tgaaagagtt catgactccc cggaagctgt ccttcgactt 4560
tcagaagctt gcggccgcac tcgagacca ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa 4620
caaagcccga aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc 4680
ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg ttttttgcgt aaaggaggaa ctatatccgg 4740
at

```

<210> 2

<211> 392

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> T2-TrpRS человека с гистидиновой меткой

<400> 2

Met Ser Ala Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly

1

5

10

15

Ser	Ser	Lys	Ile	Asp	Lys	Glu	Leu	Ile	Asn	Arg	Ile	Glu	Arg	Ala	Thr
			20					25					30		
Gly	Gln	Arg	Pro	His	His	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Ile	Phe	Phe	Ser	His
		35					40					45			
Arg	Asp	Met	Asn	Gln	Val	Leu	Asp	Ala	Tyr	Glu	Asn	Lys	Lys	Pro	Phe
	50					55					60				
Tyr	Leu	Tyr	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	Ser	Glu	Ala	Met	His	Val	Gly
65					70					75					80
His	Leu	Ile	Pro	Phe	Ile	Phe	Thr	Lys	Trp	Leu	Gln	Asp	Val	Phe	Asn
				85				90						95	
Val	Pro	Leu	Val	Ile	Gln	Met	Thr	Asp	Asp	Glu	Lys	Tyr	Leu	Trp	Lys
			100					105					110		
Asp	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ala	Val	Glu	Asn	Ala	Lys
		115					120					125			
Asp	Ile	Ile	Ala	Cys	Gly	Phe	Asp	Ile	Asn	Lys	Thr	Phe	Ile	Phe	Ser
	130					135					140				
Asp	Leu	Asp	Tyr	Met	Gly	Met	Ser	Ser	Gly	Phe	Tyr	Lys	Asn	Val	Val
145					150					155					160
Lys	Ile	Gln	Lys	His	Val	Thr	Phe	Asn	Gln	Val	Lys	Gly	Ile	Phe	Gly
				165				170						175	
Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Ile	Gly	Lys	Ile	Ser	Phe	Pro	Ala	Ile	Gln
			180					185					190		
Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Ser	Asn	Ser	Phe	Pro	Gln	Ile	Phe	Arg	Asp	Arg
		195					200					205			
Thr	Asp	Ile	Gln	Cys	Leu	Ile	Pro	Cys	Ala	Ile	Asp	Gln	Asp	Pro	Tyr
	210					215					220				
Phe	Arg	Met	Thr	Arg	Asp	Val	Ala	Pro	Arg	Ile	Gly	Tyr	Pro	Lys	Pro
225					230					235					240
Ala	Leu	Leu	His	Ser	Thr	Phe	Phe	Pro	Ala	Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Thr
				245					250					255	
Lys	Met	Ser	Ala	Ser	Asp	Pro	Asn	Ser	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Asp	Thr
			260				265						270		
Ala	Lys	Gln	Ile	Lys	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	His	Ala	Phe	Ser	Gly	Gly
	275						280					285			
Arg	Asp	Thr	Ile	Glu	Glu	His	Arg	Gln	Phe	Gly	Gly	Asn	Cys	Asp	Val
	290					295					300				
Asp	Val	Ser	Phe	Met	Tyr	Leu	Thr	Phe	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Lys
305					310					315					320
Leu	Glu	Gln	Ile	Arg	Lys	Asp	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ala	Met	Leu	Thr	Gly
				325					330					335	
Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Leu	Ile	Glu	Val	Leu	Gln	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu
			340				345						350		
His	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Glu	Phe
		355					360					365			
Met	Thr	Pro	Arg	Lys	Leu	Ser	Phe	Asp	Phe	Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala
	370					375					380				
Leu	Glu	His	His	His	His	His	His								
385						390									