(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116323677 A
(43)申请公布日 2023.06.23

(21)申请号 202180039069.3
(22)申请日 2021.05.28
(30)优先权数据
63/032,346 2020.05.29 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/034851 2021.05.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/243203 EN 2021.12.02
(71)申请人 富士胶片细胞动力公司
地址 美国威斯康星
申请人 由卫生与公众服务部部长代表的美利坚合众国
(72)发明人 A·迪亚斯 E·伯恩特 L·查斯 J·阿玛拉尔 A·玛米尼克斯 K·巴哈提
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 谢丽菲
(51)Int.Cl.
C07K 17/08(2006.01)

权利要求书7页 说明书44页 附图20页

(54)发明名称

视网膜色素上皮和光感受器双层及其用途

(57)摘要

本文提供了产生视网膜上皮细胞(RPE)与光感受器细胞和/或光感受器前体细胞(PR/PRP)的清晰双层培养物的方法。本文进一步提供了包括移植所述RPE和PR/PRP双层的疗法以及使用所述双层测试候选药物的方法。

CN 116323677 A

1.一种组织替代植入物,包括在可生物降解支架上的与视网膜色素上皮细胞(RPE)组合的光感受器前体细胞(PRP)和/或光感受器细胞(PR)。

2.权利要求1的组织替代植入物,其中植入物是确定的、无异种的和无饲养层的。

3.权利要求1或2的组织替代植入物,其中RPE是表达Bestrophin-1(BEST1)和/或ZO-1的成熟RPE。

4.权利要求1-3中任一项的组织替代植入物,其中RPE是极化的。

5.权利要求1-4中任一项的组织替代植入物,其中PR/PRP和RPE在双层中。

6.权利要求1-5的组织替代植入物,其中双层PR/PRP通过细胞间接触或附着至共用基质而附着于RPE。

7.权利要求1-6中任一项的组织替代植入物,其中可生物降解支架包含聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLLA)、聚己内酯(PCL)、聚癸二酸甘油酯(PGS)、聚吡咯(PPy)、聚乙烯醇(PVA)、明胶、胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、纤维蛋白、透明质酸、丝、壳聚糖和/或聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)。

8.权利要求1-7的组织替代植入物,其中可生物降解支架包含PLGA。

9.权利要求8的组织替代植入物,其中PLGA具有约1:1的DL-丙交酯/乙交酯比例。

10.权利要求8-9中任一项的组织替代植入物,其中PLGA具有小于约1微米的平均孔径。

11.权利要求8-10中任一项的组织替代植入物,其中PLGA具有约150至约650nm的纤维直径。

12.权利要求1-11中任一项的组织替代植入物,其中可生物降解支架涂覆有细胞外基质(ECM)蛋白。

13.权利要求12的组织替代植入物,其中ECM蛋白包括玻连蛋白、层粘连蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白或纤连蛋白。

14.权利要求13的组织替代植入物,其中ECM蛋白包括玻连蛋白。

15.权利要求1-14中任一项的组织替代植入物,其中可生物降解支架的厚度为约20至约30微米。

16.权利要求1-15中任一项的组织替代植入物,其中PR/PRP和RPE以约2:1至约30:1的比例存在。

17.权利要求1-16中任一项的组织替代植入物,其中PR/PRP和RPE以约1:1至约5:1的比例存在。

18.权利要求1-17中任一项的组织替代植入物,其中RPE和/或PR/PRP衍生自多能干细胞(PSC)。

19.权利要求18的组织替代植入物,其中PSC是诱导多能干细胞(iPSC)或胚胎干细胞(ESC)。

20.权利要求19的组织替代植入物,其中iPSC是通用的、HLA匹配的或低免疫的iPSC。

21.权利要求19的组织替代植入物,其中iPSC是人iPSC(hiPSC)。

22.权利要求1-21中任一项的组织替代植入物,其中PR/PRP不是来源于类器官。

23.权利要求1-21中任一项的组织替代植入物,其中RPE和/或PR/PRP先前已被冷冻保存。

24.权利要求23的组织替代植入物,其中冷冻保存的RPE和/或PR/PRP已被解冻并培养

至少一周。

25.权利要求23的组织替代植入物,其中冷冻保存的RPE和/或PR/PRP已被解冻并培养少于一周。

26.权利要求1-24中任一项的组织替代植入物,其中RPE以约100,000个细胞/cm^2至约1,000,000个细胞/cm^2的密度存在。

27.权利要求1-26中任一项的组织替代植入物,其中RPE以约300,000个细胞/cm^2至约800,000个细胞/cm^2的密度存在。

28.权利要求1-27中任一项的组织替代植入物,其中PR/PRP以约100,000个细胞/cm^2至约10,000,000个细胞/cm^2的密度存在。

29.权利要求1-28中任一项的组织替代植入物,其中PR/PRP以约300,000个细胞/cm^2至约5,000,000个细胞/cm^2的密度存在。

30.权利要求1-29中任一项的组织替代植入物,其中PR/PRP以约4百万个细胞/cm^2的密度存在。

31.权利要求1-30中任一项的组织替代植入物,其中RPE和/或PR/PRP来自同一供体。

32.权利要求1-31中任一项的组织替代植入物,其中PR/PRP是视杆倾向的。

33.权利要求1-31中任一项的组织替代植入物,其中PR/PRP是视锥倾向的。

34.一种药物组合物,其包含权利要求1-33中任一项的组织替代植入物。

35.权利要求34的药物组合物,其进一步包含透明质酸钠。

36.权利要求35的药物组合物,其中透明质酸盐以小于约0.5%的浓度存在。

37.权利要求34-36中任一项的药物组合物,其进一步包含碳酸氢钠、氯化钙、氯化钾、磷酸二氢钾、氯化镁、硫酸镁、氯化钠和/或磷酸氢二钠。

38.一种用于产生权利要求1-33中任一项的组织替代植入物的方法,包括:

(a)将RPE接种在可生物降解支架上;

(b)在第一组织培养基中培养可生物降解支架上的RPE,持续足以产生极化RPE的时间段;

(c)将PR/PRP接种在RPE上以形成组织替代植入物;和

(d)在第二组织培养基中培养组织替代植入物,持续足以使PR/PRP附着于RPE的时间段。

39.权利要求38的方法,其中支架通过塑料O形环固定就位。

40.权利要求38或39的方法,其中极化RPE表达Bestrophin1(BEST1)。

41.权利要求38-40中任一项的方法,其中第二组织培养基与第一组织培养基基本相同。

42.权利要求38-41中任一项的方法,其中可生物降解支架包含聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLLA)、聚己内酯(PCL)、聚癸二酸甘油酯(PGS)、聚吡咯(PPy)、聚乙烯醇(PVA)、明胶、胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、纤维蛋白、透明质酸、丝、壳聚糖或聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)。

43.权利要求42的方法,其中可生物降解支架包含PLGA。

44.权利要求43的方法,其中PLGA具有约1:1的DL-丙交酯/乙交酯比例。

45.权利要求42-44中任一项的方法,其中PLGA具有小于约1微米的平均孔径。

46.权利要求42-45中任一项的方法,其中PLGA具有约150至约650nm的纤维直径。

47.权利要求38-46中任一项的方法,其中可生物降解支架涂覆有细胞外基质(ECM)蛋白。

48.权利要求47的方法,其中ECM蛋白包括玻连蛋白、层粘连蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白或纤连蛋白。

49.权利要求47的方法,其中ECM蛋白包括玻连蛋白。

50.权利要求49的方法,其中玻连蛋白以大于约0.5μg/cm^2的浓度添加到表面。

51.权利要求49的方法,其中玻连蛋白以约10μg/cm^2的浓度添加到表面。

52.权利要求38-51中任一项的方法,其中RPE以约100,000个细胞/cm^2至约1,000,000个细胞/cm^2的密度接种。

53.权利要求38-52中任一项的方法,其中RPE以约300,000个细胞/cm^2至约800,000个细胞/cm^2的密度接种。

54.权利要求38-53中任一项的方法,其中PR/PRP以约100,000个细胞/cm^2至约1千万个细胞/cm^2的浓度接种。

55.权利要求38-54中任一项的方法,其中PR/PRP以约3百万个细胞/cm^2至约5百万个细胞/cm^2的浓度接种。

56.权利要求38-55中任一项的方法,其中PR/PRP以约4百万个细胞/cm^2的浓度接种。

57.权利要求38-56中任一项的方法,其中RPE和/或PR/PRP先前已被冷冻保存。

58.权利要求38-57中任一项的方法,其中可生物降解支架放置在具有组织培养插件的多孔支持物中。

59.权利要求58的方法,其中将第一组织培养基添加到具有组织培养插件的多孔支持物的下部隔室。

60.权利要求58-59中任一项的方法,其中将第二组织培养基添加到具有组织培养插件的多孔支持物的上部隔室。

61.权利要求38-60中任一项的方法,其中第一组织培养基包含牛磺酸和氢化可的松。

62.权利要求61的方法,其中第一组织培养基还包含三碘甲状腺原氨酸。

63.权利要求38-62中任一项的方法,其中第一组织培养基是确定成分培养基或无血清培养基。

64.权利要求38-63中任一项的方法,其中第一组织培养基包含血清替代品。

65.权利要求38-64中任一项的方法,其中第一组织培养基还包含前列腺素E2(PGE2)。

66.权利要求65的方法,其中PGE2的浓度为50μM至100μM。

67.权利要求38-64中任一项的方法,其中第一组织培养基是RPE-MM培养基。

68.权利要求38-67中任一项的方法,其中第二组织培养基与第一组织培养基基本相同。

69.权利要求38-67中任一项的方法,其中第二组织培养基不同于第一组织培养基。

70.权利要求69的方法,其中第二组织培养基是基本培养基(RMN)。

71.权利要求58-70中任一项的方法,其中将第一组织培养基添加到多孔支持物的下部隔室,并且将第二组织培养基添加到多孔支持物的上部隔室。

72.权利要求71的方法,其中来自下部隔室的培养基对组织培养插件的压力高于来自

上部隔室的培养基对组织培养插件的压力。

73.权利要求38-70中任一项的方法,其中步骤(b)持续至少约2周。

74.权利要求38-73中任一项的方法,其中步骤(b)持续至少约3周。

75.权利要求38-74中任一项的方法,其中步骤(d)持续至少约5天。

76.权利要求38-75中任一项的方法,其中步骤(d)持续至少约1周。

77.权利要求38-74中任一项的方法,其中步骤(d)持续约1天。

78.权利要求38-76中任一项的方法,其中PRP是视杆倾向的。

79.权利要求38-76中任一项的方法,其中PRP是视锥倾向的。

80.权利要求38-79中任一项的方法,其中第一组织培养基和第二组织培养基至少每五天交换一次。

81.权利要求38-80中任一项的方法,其中第一组织培养基和第二组织培养基至少每三天交换一次。

82.权利要求38-81中任一项的方法,其中第一组织培养基和第二组织培养基至少每隔一天交换一次。

83.权利要求38-82中任一项的方法,其中组织替代植入物中PR/PRP与RPE的比例为约2:1至约30:1。

84.权利要求38-83中任一项的方法,其中组织替代植入物中PR/PRP与RPE的比例为约1:1至约5:1。

85.权利要求1-32中任一项的组织替代植入物,其根据权利要求38-84中任一项的方法产生。

86.一种产生PR/PRP-RPE双层的方法,包括:

(a)将RPE接种在具有组织培养插件的多孔支持物的上部隔室中的组织培养基中;

(b)将PR/PRP接种在所述多孔支持物的上部隔室中的组织培养基中,直接与RPE接触,其中下部隔室的培养基压力高于上部隔室的培养基压力;和

(c)培养持续足以产生PR/PRP-RPE双层的时间段。

87.权利要求86的方法,其中具有组织培养插件的多孔支持物的下部隔室中的培养基和上部隔室中的培养基基本相同。

88.权利要求86的方法,其中具有组织培养插件的多孔支持物的下部隔室中的培养基和上部隔室中的培养基是不同的。

89.权利要求86-88中任一项的方法,其中RPE是极化RPE。

90.权利要求89的方法,其中极化RPE表达BEST1。

91.权利要求86的方法,其中RPE接种在可生物降解支架上。

92.权利要求91的方法,其中可生物降解支架包含聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLLA)、聚己内酯(PCL)、聚癸二酸甘油酯(PGS)、聚吡咯(PPy)、聚乙烯醇(PVA)、明胶、胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、纤维蛋白、透明质酸、丝、壳聚糖或聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)。

93.权利要求92的方法,其中可生物降解支架包含PLGA。

94.权利要求93的方法,其中PLGA具有约1:1的DL-丙交酯/乙交酯比例。

95.权利要求92-94中任一项的方法,其中PLGA具有小于约1微米的平均孔径。

96.权利要求92-95中任一项的方法,其中PLGA具有约150至约650nm的纤维直径。

97.权利要求91-96中任一项的方法,其中可生物降解支架涂覆有细胞外基质(ECM)蛋白。

98.权利要求97的方法,其中ECM蛋白包括玻连蛋白、层粘连蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白或纤连蛋白。

99.权利要求98的方法,其中ECM蛋白包括玻连蛋白。

100.权利要求99的方法,其中玻连蛋白以大于约0.5μg/cm^2的浓度添加到表面。

101.权利要求99的方法,其中玻连蛋白以约10μg/cm^2的浓度添加到表面。

102.权利要求86-101中任一项的方法,其中RPE以约100,000个细胞/cm^2至约1,000,000个细胞/cm^2的密度接种。

103.权利要求86-102中任一项的方法,其中RPE以约300,000个细胞/cm^2至约800,000个细胞/cm^2的密度接种。

104.权利要求86-103中任一项的方法,其中PR/PRP以约100,000个细胞/cm^2至约1千万个细胞/cm^2的浓度接种。

105.权利要求86-104中任一项的方法,其中PR/PRP以约3百万个细胞/cm^2至约5百万个细胞/cm^2的浓度接种。

106.权利要求86-105中任一项的方法,其中PR/PRP以约4百万个细胞/cm^2的浓度接种。

107.权利要求86-106中任一项的方法,其中RPE和/或PR/PRP先前已被冷冻保存。

108.权利要求86-101中任一项的方法,其中第一组织培养基包含牛磺酸和氢化可的松。

109.权利要求108的方法,其中第一组织培养基还包含三碘甲状腺原氨酸。

110.权利要求86-109中任一项的方法,其中第一组织培养基是确定成分培养基或无血清培养基。

111.权利要求86-110中任一项的方法,其中第一组织培养基包含血清替代品。

112.权利要求86-111中任一项的方法,其中第一组织培养基是RPE-MM培养基。

113.权利要求86-112中任一项的方法,其中第二组织培养基包含牛磺酸和氢化可的松。

114.权利要求113的方法,其中第二组织培养基还包含三碘甲状腺原氨酸。

115.权利要求86-114中任一项的方法,其中第二组织培养基是确定成分培养基或无血清培养基。

116.权利要求86-115中任一项的方法,其中第二组织培养基包含血清替代品。

117.权利要求86-116中任一项的方法,其中第二组织培养基是RPE-MM培养基。

118.权利要求86-118中任一项的方法,其中PR/PRP是视杆倾向的。

119.权利要求86-118中任一项的方法,其中PR/PRP是视锥倾向的。

120.权利要求86-119中任一项的方法,其中第一组织培养基和第二组织培养基至少每五天交换一次。

121.权利要求86-120中任一项的方法,其中第一组织培养基和第二组织培养基至少每三天交换一次。

122.权利要求86-121中任一项的方法,其中第一组织培养基和第二组织培养基至少每

隔一天交换一次。

123.权利要求86-122中任一项的方法，其中组织替代植入物中PR/PRP与RPE的比例为约2:1至约30:1。

124.权利要求86-123中任一项的方法，其中组织替代植入物中PR/PRP与RPE的比例为约1:1至约5:1。

125.一种RPE-PR/PRP双层细胞组合物，其包含在极化RPE上培养的成熟PRP的清晰双层。

126.权利要求125的组合物，其中极化RPE对Bestrophin和/或ZO-1呈阳性。

127.权利要求125或126的组合物，其中成熟PR/PRP对外周蛋白-2和/或神经视网膜亮氨酸拉链(NRL)呈阳性。

128.权利要求125-127中任一项的组合物，其中清晰双层中PR/PRP与RPE的比例为1:1至5:1。

129.一种治疗受试者眼部损伤或病症的方法，包括将有效量的视网膜上皮细胞(RPE)和PR/PRP(RPE-PR/PRP)双层组合物移植到受试者的眼睛。

130.权利要求129的方法，其中眼部病症是由RPE功能障碍或光感受器功能障碍引起的。

131.权利要求129的方法，其中眼部病症是年龄相关性黄斑变性、视网膜色素变性、视锥视杆营养不良或莱伯氏先天性黑朦。

132.权利要求129-131中任一项的方法，其中RPE-PR/PRP双层组合物被移植到受试者的视网膜中。

133.权利要求129-132中任一项的方法，其中RPE-PR/PRP双层组合物被移植到支架上。

134.权利要求129-133中任一项的方法，其中RPE-PR/PRP双层组合物包括权利要求1-33中任一项的组织替代植入物或权利要求34-37中任一项的药物组合物。

135.权利要求134的方法，其中组织替代植入物被移植到视网膜下空间中。

136.权利要求134的方法，其中通过使用视网膜下注射工具来移植组织替代植入物。

137.权利要求129的方法，其中RPE和/或PR/PRP来源于人诱导多能干细胞(hiPSC)。

138.权利要求129的方法，其中RPE和/或PR/PRP先前已被冷冻保存。

139.权利要求129的方法，其中RPE是成熟RPE。

140.权利要求139的方法，其中成熟RPE对Bestrophin和/或ZO1呈阳性。

141.权利要求129-140中任一项的方法，其中RPE在细胞外基质(ECM)蛋白涂覆的表面上。

142.权利要求141的方法，其中ECM蛋白是玻连蛋白、层粘连蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白或纤连蛋白。

143.权利要求141的方法，其中ECM蛋白是玻连蛋白。

144.权利要求129-142中任一项的方法，其中RPE在共聚物支架上。

145.权利要求144的方法，其中共聚物支架包含聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLLA)、聚己内酯(PCL)、聚癸二酸甘油酯(PGS)、聚吡咯(PPy)、聚乙烯醇(PVA)、明胶、胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、纤维蛋白、透明质酸、丝、壳聚糖或聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)。

146.权利要求129-145中任一项的方法,其中PR/PRP不是来源于类器官。

147.权利要求129-146中任一项的方法,其中RPE-PR/PRP双层在包含牛磺酸和氢化可的松的培养基中。

148.权利要求147的方法,其中培养基还包含三碘甲状腺原氨酸。

149.权利要求147或148的方法,其中培养基是确定成分培养基或无血清培养基。

150.权利要求147-149中任一项的方法,其中培养基包含血清替代品。

151.权利要求147的方法,其中培养基是RPE-MM培养基。

152.权利要求129-151中任一项的方法,其中PR/PRP对外周蛋白-2和/或神经视网膜亮氨酸拉链(NRL)呈阳性。

153.权利要求129-152中任一项的方法,其中清晰双层中PR/PRP与RPE的比例为1:1至5:1。

154.权利要求1-33中任一项的组织替代植入物作为模型视网膜的用途。

155.权利要求1-33中任一项的组织替代植入物作为生长组织的生长基质的用途。

视网膜色素上皮和光感受器双层及其用途

优先权声明

[0001] 本申请要求2020年5月29日提交的美国临时申请序列号63/032,346的优先权权益,所述临时申请的全部内容通过引用并入本文。

联合研究协议的各缔约方

[0002] 本发明源于在做出本发明时即生效的联合研究协议范围内开展的活动。所述联合研究协议的缔约方为美国政府、美国卫生与公众服务部(由美国国家卫生研究院下属的美国国家眼科研究代表)和富士胶片细胞动力国际股份有限公司(Fujifilm Cellular Dynamics International,Inc.)。

背景技术

1.技术领域

[0003] 本公开内容主要涉及干细胞生物学领域。更具体地,本发明涉及包含视网膜上皮细胞(RPE)与光感受器(PR)细胞和/或光感受器前体(PRP)细胞的双层的组合物。

2.相关技术描述

[0004] 年龄相关性黄斑变性(AMD)是一种致衰弱性疾病,截至2016年,影响美国1100万人,全球1.7亿人,预计2020年全球患病率将达到1.96亿(Pennington和DeAngelis,2016;Wong等人,2014)。其原因是推定的视网膜色素上皮(RPE)功能障碍,导致光感受器死亡和功能障碍(Bhutto和Lutty,2012)。使用RPE的细胞疗法可能有效治疗AMD、近视性黄斑变性或更罕见形式的遗传性黄斑变性,目前有几项正在进行和计划中的基于干细胞的临床试验以恢复视觉功能(Oner,2018)。虽然AMD是致盲的最常见原因之一,但其他功能障碍,例如视网膜色素变性、视锥视杆营养不良和莱伯氏先天性黑朦,主要由光感受器功能障碍引起且可通过光感受器(PR)移植解决(Barnea-Cramer等人,2016;Zhou等人,2015;Zhao等人,2017)。

[0005] 光感受器延伸出负责光感测的外段。RPE细胞支持脱落的外段和其他光感受器碎片的再循环,并支持整个光感受器健康(Strauss,2005)。因此,将RPE与PR和/或PRP(本文中称为PR/PRP)一起作为双层培养物疗法递送是治疗RPE或光感受器功能障碍病况的潜在机会,其相关应用比单独递送任一种细胞类型更广泛。此外,RPE和PR/PRP之间的共生关系可能使这种治疗更有效。因此,对于由PR/PRP和RPE细胞组成的双层培养物疗法治疗这些疾病的需求尚未得到满足。

发明内容

[0006] 在第一个实施方案中,本公开内容提供了一种组织替代植入物,其包括在可生物降解支架上的光感受器前体细胞(PRP)和/或光感受器细胞(PR)与视网膜色素上皮细胞(RPE)的组合。在特定方面,所述植入物是确定的、无异种的、和无饲养层的。

[0007] 在某些方面,RPE是表达Bestrophin-1(BEST1)和/或ZO-1的成熟RPE。在具体方面,RPE是极化的。

[0008] 在某些方面,PR/PRP和RPE是双层的。在特定方面,所述双层PR/PRP通过细胞间接触或附着至共用基质而附着于RPE。

[0009] 在某些方面,可生物降解支架包含聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLLA)、聚己内酯(PCL)、聚癸二酸甘油酯(PGS)、聚吡咯(PPy)、聚乙烯醇(PVA)、明胶、胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、纤维蛋白、透明质酸、丝、壳聚糖和/或聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)。在特定方面,可生物降解支架包含PLGA。在特定方面,PLGA具有约1:1的DL-丙交酯/乙交酯比例。在某些方面,PLGA具有小于约1微米的平均孔径。在某些方面,PLGA具有约150至约650nm的纤维直径。

[0010] 在某些方面,可生物降解支架涂覆有细胞外基质(ECM)蛋白。例如,ECM蛋白包括玻连蛋白、层粘连蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白或纤连蛋白。在特定方面,ECM蛋白包括玻连蛋白。在某些方面,可生物降解支架的厚度为约20至约30微米,例如约20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30微米。

[0011] 在特定方面,所述组织替代植入物中PR/PRP与RPE的比例为约2:1至约30:1,例如约3:1至约5:1、约5:1至约10:1、约10:1至约15:1或约15:1至约30:1。在某些方面,所述组织替代植入物中PR/PRP与RPE的比例为约1:1至约5:1,例如约1:1至约2:1、约2:1至约3:1、约3:1至约4:1或约4:1至约5:1。

[0012] 在某些方面,RPE和/或PR/PRP衍生自多能干细胞(PSC),例如诱导多能干细胞(iPSC)或胚胎干细胞(ESC)。在某些方面,iPSC是通用的、HLA匹配的或低免疫的iPSC。在特定方面,iPSC是人iPSC(hiPSC)。在特定方面,PR/PRP不是来源于类器官。

[0013] 在某些方面,RPE和/或PR/PRP先前已被冷冻保存。在某些方面,冷冻保存的RPE和/或PR/PRP已被解冻并培养至少一周。在某些方面,冷冻保存的RPE和/或PR/PRP已被解冻并培养少于一周。

[0014] 在某些方面,所述RPE以约100,000个细胞/cm^2至约1,000,000个细胞/cm^2的密度存在,例如约200,000个细胞/cm^2、300,000个细胞/cm^2、400,000个细胞/cm^2、500,000个细胞/cm^2、600,000个细胞/cm^2、700,000个细胞/cm^2、800,000个细胞/cm^2、或900,000个细胞/cm^2。在某些方面,所述RPE以约300,000个细胞/cm^2至约800,000个细胞/cm^2的密度存在,例如约400,000个细胞/cm^2、500,000个细胞/cm^2、600,000个细胞/cm^2、或700,000个细胞/cm^2。在某些方面,所述PR/PRP以约100,000个细胞/cm^2至约10,000,000个细胞/cm^2的密度存在,例如约200,000个细胞/cm^2、300,000个细胞/cm^2、400,000个细胞/cm^2、500,000个细胞/cm^2、600,000个细胞/cm^2、700,000个细胞/cm^2、800,000个细胞/cm^2、或900,000个细胞/cm^2。在某些方面,所述PR/PRP以约200,000个细胞/cm^2至约20,000,000个细胞/cm^2的密度存在,例如约300,000个细胞/cm^2至约5,000,000个细胞/cm^2,例如约400,000个细胞/cm^2、500,000个细胞/cm^2、600,000个细胞/cm^2、700,000个细胞/cm^2、800,000个细胞/cm^2、900,000个细胞/cm^2、1,000,000个细胞/cm^2、2,000,000个细胞/cm^2、3,000,000个细胞/cm^2、4,000,000个细胞/cm^2、5,000,000个细胞/cm^2、6,000,000个细胞/cm^2、7,000,000个细胞/cm^2、8,000,000个细胞/cm^2、9,000,000个细胞/cm^2、10,000,000个细胞/cm^2、11,000,000个细胞/cm^2、12,000,000个细胞/cm^2、13,000,000个细胞/cm^2、14,000,000个细胞/cm^2、15,000,000个细胞/cm^2、或更大密度。在特定方面,所述PR/PRP以约4、5、6、或7百万个细胞/cm^2的密度存在,例如6百万个细胞/cm^2。

[0015] 在某些方面，所述RPE和/或PR/PRP来自同一供体。在某些方面，所述PR/PRP是视杆倾向的。在某些方面，PR/PRP是视锥倾向的。

[0016] 另一个实施方案提供了一种药物组合物，其包含本发明各实施方案或其各方面的组织替代植入物(例如，包含在可生物降解支架上的光感受器前体细胞(PRP)和/或光感受器细胞(PR)与视网膜色素上皮细胞(RPE)的组合的组织替代植入物)。在另外的方面，所述组合物还包含透明质酸钠。在某些方面，透明质酸盐以小于约0.5％的浓度存在，例如0.4％、0.3％或0.2％。在某些方面，所述组合物进一步包含碳酸氢钠、氯化钙、氯化钾、磷酸二氢钾、氯化镁、硫酸镁、氯化钠和/或磷酸氢二钠。

[0017] 另一个实施方案提供了一种用于产生本发明各实施方案或其各方面的组织替代植入物(例如，包含在可生物降解支架上的光感受器前体细胞(PRP)和/或光感受器细胞(PR)与视网膜色素上皮细胞(RPE)的组合的组织替代植入物)的方法，包括(a)将RPE接种在可生物降解支架上；(b)在第一组织培养基中培养可生物降解支架上的RPE，持续足以产生极化RPE的时间段；(c)将PR/PRP接种在RPE上以形成组织替代植入物；和(d)在第二组织培养基中培养组织替代植入物，持续足以使PR/PRP附着于RPE的时间段。

[0018] 在某些方面，支架通过塑料O形环固定就位。在某些方面，极化RPE表达Bestrophin1(BEST1)。在特定方面，第二组织培养基与第一组织培养基基本相同。

[0019] 在某些方面，所述可生物降解支架包含聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLLA)、聚己内酯(PCL)、聚癸二酸甘油酯(PGS)、聚吡咯(PPy)、聚乙烯醇(PVA)、明胶、胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、纤维蛋白、透明质酸、丝、壳聚糖或聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)。在特定方面，可生物降解支架包含PLGA。在某些方面，PLGA具有约1:1的DL-丙交酯/乙交酯比例。在某些方面中，PLGA的平均孔径小于约1微米。在某些方面，PLGA具有约150至约650nm的纤维直径。在特定方面，所述可生物降解支架涂覆有细胞外基质(ECM)蛋白，例如玻连蛋白、层粘连蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白或纤连蛋白。在特定方面，ECM蛋白包括玻连蛋白。在特定方面，玻连蛋白以大于约0.5μg/cm^2的浓度添加到表面，例如约1μg/cm^2、5μg/cm^2或10μg/cm^2的浓度。

[0020] 在某些方面，RPE以约100,000个细胞/cm^2至约1,000,000个细胞/cm^2的密度接种，例如约200,000个细胞/cm^2、300,000个细胞/cm^2、400,000个细胞/cm^2、500,000个细胞/cm^2、600,000个细胞/cm^2、700,000个细胞/cm^2、800,000个细胞/cm^2、或900,000个细胞/cm^2。在某些方面，RPE以约300,000个细胞/cm^2至约800,000个细胞/cm^2的密度接种，例如约400,000个细胞/cm^2、500,000个细胞/cm^2、600,000个细胞/cm^2、或700,000个细胞/cm^2。在某些方面，PR/PRP以约100,000个细胞/cm^2至约1千万个细胞/cm^2的浓度接种，例如约200,000个细胞/cm^2、300,000个细胞/cm^2、400,000个细胞/cm^2、500,000个细胞/cm^2、600,000个细胞/cm^2、700,000个细胞/cm^2、800,000个细胞/cm^2、或900,000个细胞/cm^2。在特定方面，PR/PRP以约3百万个细胞/cm^2至约5百万个细胞/cm^2的浓度接种，例如约4百万个细胞/cm^2。

[0021] 在某些方面，RPE和/或PR/PRP先前已被冷冻保存。

[0022] 在某些方面，可生物降解支架放置在具有组织培养插件的多孔支持物中。在某些方面，将第一组织培养基添加到具有组织培养插件的多孔支持物的下部隔室。在特定方面，将第二组织培养基添加到具有组织培养插件的多孔支持物的上部隔室。在某些方面，第一组织培养基包含牛磺酸和氢化可的松。在某些方面，第一组织培养基还包含三碘甲状腺原

氨酸。在特定方面，第一组织培养基是确定成分培养基或无血清培养基。在某些方面，第一组织培养基包含血清替代品。在特定方面，第一组织培养基还包含前列腺素E2(PGE2)，例如浓度为50μM至100μM，例如50-75μM或75-100μM。在特定方面，第一组织培养基是RPE-MM培养基。在某些方面，第二组织培养基与第一组织培养基基本相同。在某些方面，第二组织培养基不同于第一组织培养基。在某些方面，第二组织培养基是基本培养基(RMN)。在具体方面，将第一组织培养基添加到多孔支持物的下部隔室，并且将第二组织培养基添加到多孔支持物的上部隔室。在某些方面，来自下部隔室的培养基对组织培养插件的压力高于来自上部隔室的培养基对组织培养插件的压力。

[0023] 在某些方面，步骤(b)持续至少约2周，例如3周或4周。在某些方面，步骤(d)持续至少约5天，例如6天、7天或10天。在某些方面，步骤(d)持续约1天，例如约2天、3天或4天。

[0024] 在某些方面，PRP是视杆倾向的。在某些方面，PRP是视锥倾向的。

[0025] 在某些方面，第一组织培养基和第二组织培养基至少每五天交换一次，例如至少每四天、每三天或每隔一天交换一次。

[0026] 在特定方面，所述组织替代植入物中PR/PRP与RPE的比例为约2:1至约30:1，例如约3:1至约5:1、约5:1至约10:1、约10:1至约15:1或约15:1至约30:1。在某些方面，所述组织替代植入物中PR/PRP与RPE的比例为约1:1至约5:1，例如约1:1至约2:1，约2:1至约3:1，约3:1至约4:1或约4:1至约5:1。

[0027] 进一步的实施方案提供了根据本发明各实施方案或其各方面的方法产生的本发明各实施方案或其各方面的组织替代植入物。

[0028] 另一个实施方案提供了一种产生PR/PRP-RPE双层的方法，包括(a)将RPE接种在具有组织培养插件的多孔支持物的上部隔室中的组织培养基中；(b)将PR/PRP接种在所述多孔支持物的上部隔室中的组织培养基中，直接与RPE接触，其中下部隔室的培养基压力高于上部隔室的培养基压力；和(c)培养持续足以产生PR/PRP-RPE双层的时间段。

[0029] 在某些方面，具有组织培养插件的多孔支持物的下部隔室中的培养基和上部隔室中的培养基基本相同。在某些方面，具有组织培养插件的多孔支持物的下部隔室中的培养基和上部隔室中的培养基是不同的。

[0030] 在某些方面，RPE是极化RPE。在特定方面，极化RPE表达BEST1。在某些方面，将RPE接种在可生物降解支架上。在特定方面，可生物降解支架包含聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLLA)、聚己内酯(PCL)、聚癸二酸甘油酯(PGS)、聚吡咯(PPy)、聚乙烯醇(PVA)、明胶、胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、纤维蛋白、透明质酸、丝、壳聚糖或聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)。在某些方面，可生物降解支架包含PLGA。在特定方面，PLGA具有约1:1的DL-丙交酯/乙交酯比例。在某些方面中，PLGA的平均孔径小于约1微米。在某些方面，PLGA具有约150至约650nm的纤维直径。

[0031] 在某些方面，可生物降解支架涂覆有细胞外基质(ECM)蛋白。在特定方面，ECM蛋白包括玻连蛋白、层粘连蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白或纤连蛋白。在特定方面，ECM蛋白包括玻连蛋白。在某些方面，玻连蛋白以大于约0.5μg/cm^2的浓度添加到表面，例如约1μg/cm^2，例如约5μg/cm^2，或约10μg/cm^2。

[0032] 在某些方面，RPE以约100,000个细胞/cm^2至约1,000,000个细胞/cm^2的密度接种，例如约200,000个细胞/cm^2、300,000个细胞/cm^2、400,000个细胞/cm^2、500,000个细胞/cm^2、

600,000个细胞/cm^2、700,000个细胞/cm^2、800,000个细胞/cm^2、或900,000个细胞/cm^2。在某些方面,RPE以约300,000个细胞/cm^2至约800,000个细胞/cm^2的密度接种,例如约400,000个细胞/cm^2、500,000个细胞/cm^2、600,000个细胞/cm^2、或700,000个细胞/cm^2。在特定方面,PR/PRP以约100,000个细胞/cm^2至约1千万个细胞/cm^2的浓度接种,例如约200,000个细胞/cm^2、300,000个细胞/cm^2、400,000个细胞/cm^2、500,000个细胞/cm^2、600,000个细胞/cm^2、700,000个细胞/cm^2、800,000个细胞/cm^2、或900,000个细胞/cm^2。在某些方面,PR/PRP以约3百万个细胞/cm^2至约5百万个细胞/cm^2的浓度接种,例如约4百万个细胞/cm^2。

[0033] 在特定方面,RPE和/或PR/PRP先前已被冷冻保存。

[0034] 在某些方面,第一组织培养基包含牛磺酸和氢化可的松。在另外的方面,第一组织培养基还包含三碘甲状腺原氨酸。在某些方面,第一组织培养基是确定成分培养基或无血清培养基。在某些方面,第一组织培养基包含血清替代品。在特定方面,第一组织培养基是RPE-MM培养基。在某些方面,第二组织培养基包含牛磺酸和氢化可的松。在某些方面,第二组织培养基还包含三碘甲状腺原氨酸。在特定方面,第二组织培养基是确定成分培养基或无血清培养基。在特定方面,第二组织培养基包含血清替代品。在某些方面,第二组织培养基是RPE-MM培养基。

[0035] 在某些方面,PR/PRP是视杆倾向的。在某些方面,PR/PRP是视锥倾向的。

[0036] 在某些方面,第一组织培养基和第二组织培养基至少每五天交换一次,例如至少每四天、每三天或每隔一天交换一次。

[0037] 在特定方面,所述组织替代植入物中PR/PRP与RPE的比例为约2:1至约30:1,例如约3:1至约5:1、约5:1至约10:1、约10:1至约15:1或约15:1至约30:1。在某些方面,所述组织替代植入物中PR/PRP与RPE的比例为约1:1至约5:1,例如约1:1至约2:1,约2:1至约3:1,约3:1至约4:1或约4:1至约5:1。

[0038] 另一个实施方案提供了RPE-PR/PRP双层细胞组合物,其包含在极化RPE上培养的成熟PRP的清晰双层。在特定方面,极化RPE对Bestrophin和/或ZO-1呈阳性。在某些方面,成熟的PR/PRP对外周蛋白-2和/或神经视网膜亮氨酸拉链(NRL)呈阳性。

[0039] 一种治疗受试者眼部损伤或病症的方法,包括将有效量的视网膜上皮细胞(RPE)和PR/PRP(RPE-PR/PRP)双层组合物移植到受试者的眼睛。

[0040] 在某些方面,眼部病症是由RPE功能障碍或光感受器功能障碍引起的。在特定方面,眼部病症是年龄相关性黄斑变性、视网膜色素变性、视锥视杆营养不良或莱伯氏先天性黑朦。在某些方面,RPE-PR/PRP双层组合物被移植到受试者的视网膜中。在某些方面,RPE-PR/PRP双层组合物被移植到支架上。在某些方面,RPE-PR/PRP双层组合物包括本发明各实施方案或其各方面的组织替代植入物或本发明各实施方案或其各方面的药物组合物。在某些方面,组织替代植入物被移植到视网膜下空间。在某些方面,通过使用视网膜下注射工具来移植组织替代植入物。在特定方面,RPE和/或PR/PRP来源于人诱导多能干细胞(hiPSC)。在某些方面,RPE和/或PR/PRP先前已被冷冻保存。在特定方面,RPE是成熟的RPE,例如对Bestrophin和/或ZO1呈阳性的成熟RPE。在某些方面中,RPE在细胞外基质(ECM)蛋白涂覆的表面上。在某些方面,ECM蛋白是玻连蛋白、层粘连蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白或纤连蛋白。在特定方面,ECM蛋白是玻连蛋白。在某些方面,RPE在共聚物支架上。在某些方面,共聚物支架包含聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLLA)、聚己内酯(PCL)、聚癸二酸甘油

酯(PGS)、聚吡咯(PPy)、聚乙烯醇(PVA)、明胶、胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、纤维蛋白、透明质酸、丝、壳聚糖或聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)。在特定方面,PR/PRP不是来源于类器官。在某些方面,RPE-PR/PRP双层在包含牛磺酸和氢化可的松的培养基中。在某些方面,所述培养基还包含三碘甲状腺原氨酸。在特定方面,培养基是确定成分培养基或无血清培养基。在特定方面,培养基包含血清替代品。在某些方面,培养基是RPE-MM培养基。在特定方面,PR/PRP对外周蛋白-2和/或神经视网膜亮氨酸拉链(NRL)呈阳性。在某些方面,所述清晰双层中PR/PRP与RPE的比例为1:1至5:1,例如约1:1至约2:1、约2:1至约3:1、约3:1至约4:1或约4:1至约5:1。

[0041] 另一实施方案提供了本发明各实施方案或其各方面的组织替代植入物作为模型视网膜的用途。

[0042] 另一个实施方案提供了本发明各实施方案或其各方面的组织替代植入物作为生长组织的生长基质的用途。

[0043] 通过以下详细描述,本公开内容的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应当理解的是,虽然发明详述和具体实施例指示了本发明的优选实施方案,但仅是以说明的方式给出,因为在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员来说将从所述发明详述中变得显而易见。

附图说明

[0044] 以下附图构成本说明书的一部分,并被包括以用于进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文所呈现的具体实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0045] 图1A-1E:RPE/PRP共培养。(图1A)共培养前的PRP的流式图,(图1B-1C)一天后的RPE/PRP共培养。(图1B)2X和(图1C)10X的相差显微术显示了汇合的RPE层顶部的PRP层。(图1D-1E)七天后的RPE/PRP共培养。荧光显微术显示(图1D)所有细胞核(蓝色)和(图1E)RPE特异性CRALBP(绿色)、PRP特异性恢复蛋白(红色)和视网膜祖细胞特异性CHX10(紫色)。RPE和PRP都是明显的,PRP(恢复蛋白阳性细胞)以亚汇合集簇粘附。极少视网膜祖细胞是明显的。

[0046] 图2A-2B:ZO-1和恢复蛋白共染色,(图2A)聚焦于PRP和(图2B)聚焦于RPE。PRP焦距中明显存在的恢复蛋白阳性细胞以及RPE周围ZO-1突出显示的典型六边形紧密连接形态显示了两个不同的层。

[0047] 图3A-3H:具有PRP(在解冻后计数为3×10^6和1×10^7细胞/cm^2)的(RPE/PRP)双层的免疫细胞化学。对较低密度的细胞针对(图3A)ZO-1(绿色)、(图3B)恢复蛋白(红色)、和(图3C)CRALBP(绿色)/恢复蛋白(红色)进行染色。对较高密度的细胞针对(图3D)ZO-1和(图3E)恢复蛋白进行染色,(图3F)用ZO-1染色的细胞的放大图像显示预期的RPE“鹅卵石”紧密连接形态。侧视图重建的共聚焦图像显示了RPE/PRP双层的多个层,其中(图3G)ZO-1(绿色)/恢复蛋白(红色)和(图3H)CRALBP(绿色)/恢复蛋白(红色)显示了这两种细胞类型的分层。

[0048] 图4A-4F:在将4e6 PRP铺板在汇合的RPE单层上7天后量化RPE/PRP比例。RPE由TYRP1表示,PRP由AIPL1表示。(图4A)iPRP对照的流式细胞术图,(图4B)iRPE对照的流式细胞术图,(图4C)在单一培养中在Snapwell上培养的RPE的流式细胞术图,(图4D)在共培养中在极化RPE上方培养7天的PRP的流式细胞术图。(图4E)标记物的定量显示RPE(TYRP1)和PRP

(AIPL1)均存在于共培养的样品中,和(图F)表达AIPL1的细胞百分比除以表达TYRP2的细胞百分比的比例(其是PRP/RPE比例的替代)在该样品中为约6。这些细胞来自iPSC系HLA-A。

[0049] 图5A-5C:Snap-well支架上RPE/PRP共培养的表征。(图5A)流式图显示了每种细胞类型的不同群体,但在具有RPE-MM(5% FBS)的培养物中具有较高的恢复蛋白表达。(图5B)RPE-MM(5% FBS)和(图5C)RPE-MM(15% KOSR)中的ICC形态相似。

[0050] 图6A-6C:涂覆有VTN的PLGA支架上的RPE/PRP双层的共聚焦显微图。(图6A)5×10^6个细胞/cm^2的双层和(图6B)1×10^7个细胞/cm^2的双层,(C)Z堆叠部分的侧视图清楚地显示了不同的RPE和PRP层。

[0051] 图7A-7D:调整Snapwell中的培养基体积时改善的附着。示意图显示了顶侧压力较高时的Snapwell体积(A)和底侧压力较高时的Snapwell体积(B)。ZO-1(绿色)和恢复蛋白(红色)的免疫细胞化学表明,(C)较高的顶侧压力导致更差的PRP连接,而(D)较高的底侧压力获得更好的PRP连接。

[0052] 图8A-8D:将PRP在(图8A、图8B)低或(图8C、图8D)高的玻连蛋白浓度下和以(图8A、图8B)3百万个PRP/cm^2或(图8C、图8D)1千万个PRP/cm^2接种到RPE上。PRP用恢复蛋白染色(红色)。

[0053] 图9A-9C:移植iPSC-RPE/PRP支架2个月后猪视网膜的免疫细胞化学。用人细胞核抗体鉴定移植的人细胞。由(图9A)ARR3指示的移植的人细胞核与视锥的共定位,和由(图9B)NRL和(图9C)视紫红质指示的与视杆的共定位。光感受器层与宿主神经视网膜接触。猪是RPE和光感受器受损的激光猪模型。

[0054] 图10:移植iPSC-RPE/PRP支架2个月后猪视网膜-RPE-脉络膜切片的免疫细胞化学,显示人细胞核(Ku80)和RPE(MITF)重叠。移植的人RPE层位于移植的PRP层上方。

[0055] 图11:移植iPSC-RPE/PRP支架2个月后猪视网膜-RPE-脉络膜切片的免疫细胞化学,显示了由恢复蛋白指示的光感受器。

[0056] 图12A-12C:移植iPSC-RPE/PRP支架2个月后猪视网膜-RPE-脉络膜切片的免疫细胞化学,显示(图12A)Muller胶质细胞(GFAP)重塑外界膜,但停止在移植的RPE层处。(图12B)DIC图像显示了视网膜切片的背景和方向,着色的移植细胞和宿主细胞明显可见。(图12C)没有明显可见的Ki67阳性增殖细胞。

[0057] 图13A-13B:移植iPSC-RPE/PRP支架2个月后猪视网膜-RPE-脉络膜切片的免疫细胞化学,显示(图13A)突触前标记物VGLUT1与移植的光感受器的接近程度和(图13B)宿主双极细胞(PKCα)迁移到移植的光感受器层中。箭头指示整合的可能性。

[0058] 图14A-14B:移植iPSC-RPE/PRP支架2个月后猪视网膜-RPE-脉络膜切片的免疫细胞化学,显示(图14A)移植细胞中人特异性突触前标记物突触生长蛋白的广泛表达,以及(图14B)与ARR3阳性视锥的共标记。

I.说明性实施方案的描述

[0059] RPE和神经视网膜以一组有序的层在体内发育和存在。天然RPE和PR/PRP结构关系的重演在治疗中可能至关重要,特别是因为这些层的适当并列和正确序列可以实现功能。此外,分层RPE-PR/PRP的体外重演也可以切实可行的作为测试药物或细胞疾病模型的平台。因此,在某些实施方案中,本公开内容提供了在“双重治疗”双层中培养人诱导多能干细胞(hiPSC)衍生的RPE(iRPE)与hiPSC衍生的PR细胞和/或hiPSC衍生的PRP(iPRP)的方法。在

某些方面,RPE和/或PR/PRP来源于PSC,例如胚胎干细胞。本研究表明,本文提供的RPE-PR/PRP清晰双层在几种培养形式中表现出层粘附、预期标记物的维持和分层。

[0060] 在特定方面,首先在表面上培养RPE。RPE可被培养以产生对晚期极化标记物Bestrophin呈阳性的极化RPE。RPE可衍生自hiPSC,例如通过PCT/US2016/050543和PCT/US2016/050554中公开的方法,两者均通过引用整体并入本文,或可为胚胎或胎儿RPE。PR/PRP也可衍生自hiPSC,例如通过PCT/US2019/028557中公开的方法(通过引用整体并入本文)或衍生自ES细胞。接下来,可以将有能力在PRP后的后期成熟为视杆细胞和视锥细胞和/或光感受器细胞的未成熟PRP成层在RPE的顶部上。可以将PR/PRP解冻并直接接种在RPE上,或者可以在接种在RPE上之前培养一段时间。在某些方面,可以向培养系统中添加因子以补充RPE-PR/PRP连接,例如ROCK抑制剂(例如Y-27632)、层粘连蛋白521、花生凝集素(PNA)、更高浓度的玻连蛋白(VTN)、或PGE2。

[0061] 本文提供的RPE-PR/PRP双层可用于多种体内和体外方法。例如,RPE-PR/PRP双层可在体内用于治疗视网膜或RPE的病况,包括但不限于年龄相关性或遗传性黄斑变性和视网膜色素变性或其他遗传性外视网膜变性疾病或导致RPE和/或PR/PRP功能障碍和/或丧失的损伤。RPE-PR/PRP双层也可在体外用于筛选试验,以鉴定推定的治疗性或预防性治疗候选物。RPE-PR/PRP双层也可用作构建更复杂组织的基体。下面描述了本公开内容的其他实施方案和优点。

I.定义

[0062] 术语“纯化”不要求绝对纯度;相反,它是一个相对的术语。因此,经过纯化的细胞群具有大于约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯度,或最优选基本上不含其他细胞类型。

[0063] 如本说明书中所用,“一个”或“一种”可指一个或多个,或一种或多种。如在权利要求中所用,当与词语“包括”结合使用时,词语“一个”或“一种”可指一个或多个,或一种或多种。

[0064] 在权利要求书中使用术语“或”是指“和/或”,除非明确指出仅指一个选项或选项相互排斥,尽管本公开内容支持仅指一个选择项的限定和“和/或”。如本文所用,“另一个”可指至少第二个或更多个。

[0065] 术语“基本上”应理解为方法或组合物仅包括特定的步骤或材料,以及不会对这些方法和组合物的基本和新颖特性产生实质性影响的步骤和材料。

[0066] 如本文所用,“基本上不含”特定物质或材料的组合物或培养基含有≤30%、≤20%、≤15%,更优选≤10%,甚至更优选≤5%或最优选≤1%的所述物质或材料。

[0067] 如本文所用,术语“实质上”或“近似”可用于修饰任何定量比较、数值、测量或其他表示,他们可以允许变化而不会导致与之相关的基本功能发生变化。

[0068] 术语“约”通常指在使用标准分析技术测量表述值时确定的表述值的标准偏差范围内。这些术语也可以用于表示表述值的加减5%。

[0069] 如本文所用,就特定组分而言,“基本上不含”在本文中用于指任何特定组分没有被特意配制到组合物中和/或仅作为污染物或以痕量存在。因此,源于组合物的任何意外污染的特定组分的总量远低于0.05%,优选低于0.01%。最优选的是用标准分析方法不能检测到任何量的特定组分的组合物。

[0070] 术语“细胞群”在本文中用于指一组细胞，通常为同一类型。细胞群可以来源于共同的祖细胞或可以包括一种以上的细胞类型。“富集”细胞群是指源自起始细胞群(例如，未分级的异质细胞群)的细胞群，其含有比起始细胞群中该细胞类型的百分比更大的特定细胞类型百分比。细胞群可以富集一种或多种细胞类型，而耗尽一种或多种细胞类型。

[0071] 术语“干细胞”在本文中是指这样的细胞，其在合适的条件下能够分化成多种特化细胞类型的细胞，而在其他合适条件下能够自我更新并保持基本上未分化的多能状态。术语“干细胞”还包括多能细胞、全能细胞、前体细胞和祖细胞。示例性的人干细胞可以从以下细胞获得：从骨髓组织获得的造血干细胞或间充质干细胞、从胚胎组织获得的胚胎干细胞、或从胎儿生殖器组织获得的胚性生殖细胞。示例性多能干细胞还可以通过表达与多能性相关的某些转录因子将体细胞重编程为多能性状态而从体细胞产生；这些细胞被称为“诱导多能干细胞”或“iPSC”。

[0072] 术语“多能”是指细胞分化为生物体内所有其他细胞类型的特性，胚胎外细胞或胎盘细胞除外。即使在长时间培养后，多能干细胞也能够分化为所有三个胚层的细胞类型(例如，外胚层、中胚层和内胚层细胞类型)。多能干细胞是一种胚胎干细胞，来源于囊胚的内部细胞团。在其他实施方案中，多能干细胞是通过重编程体细胞衍生的诱导多能干细胞。

[0073] 术语“分化”是指非特化细胞随着结构和/或功能性质的变化而成为更特化类型的过程。成熟细胞通常具有改变的细胞结构和组织特异性蛋白质。

[0074] 如本文所用，“未分化”是指显示未分化细胞的特征标记物和形态学特征的细胞，这些特征明显地将其与胚胎或成人来源的最终分化细胞区分开来。

[0075] “类胚体(EB)”是可分化为内胚层、中胚层和外胚层胚层细胞的多能干细胞的聚合体。当允许多能干细胞在非粘附培养条件下聚集时形成球状结构并由此在悬浮液中形成EB。

[0076] “分离的”细胞已与生物体或培养物中的其他细胞基本分离或从其纯化。分离的细胞可以是例如至少99％、至少98％纯、至少95％纯或至少90％纯。

[0077] “胚胎”是指通过受精卵或带有人工重编程细胞核的激活卵母细胞的一次或多次分裂获得的细胞团。

[0078] “胚胎干(ES)细胞”是一种未分化的多能细胞，从早期胚胎中获得，例如囊胚期的内细胞团，或通过人工手段(例如核移植)产生，可在胚胎或成人中产生任何分化的细胞类型，包括生殖细胞(例如精子和卵子)。

[0079] “诱导多能干细胞(iPSC)”是通过表达多种因子(本文中称为重编程因子)的组合或诱导其表达而对体细胞进行重编程而产生的细胞。可以使用胎儿、产后、新生儿、少年或成年体细胞生成iPSC。在某些实施方案中，可用于将体细胞重编程为多能干细胞的因子包括例如Oct4(有时称为Oct3/4)、Sox2、c-Myc、和Klf4、Nanog、和Lin28。在某些实施方案中，通过表达至少两种重编程因子、至少三种重编程因子或四种重编程因子来重编程体细胞，以将体细胞重编程为多能干细胞。

[0080] “等位基因”是指基因的两种或多种形式中的一种。二倍体生物，例如人，每个染色体都有两个拷贝，因此各自携带一个等位基因。

[0081] 术语“纯合”被定义为在特定基因座包含两个相同的等位基因。术语“杂合”是指在特定基因座上包含两个不同的等位基因。

[0082] “单倍型”是指沿着单个染色体的多个位点的等位基因的组合。单倍型可以基于单个染色体上的一组单核苷酸多态性(SNP)和/或主要组织相容性复合体中的等位基因。

[0083] 如本文所用,术语“单倍型匹配”定义为细胞(例如iPS细胞)和所治疗的受试者共享一个或多个主要组织相容性位点单倍型。受试者的单倍型可以使用本领域公知的测定法容易地确定。单倍型匹配的iPS细胞可以是自体或异体细胞。在组织培养物中生长并分化为PRP细胞的自体细胞天然是与受试者匹配的单倍型。

[0084] “基本上相同的HLA类型”表明,供体的人白细胞抗原(HLA)类型与患者的类型在一定程度上相匹配,使得通过诱导源自供体体细胞的iPSC分化而获得的移植细胞在移植到患者时可以进行移植。

[0085] “超级供体”在本文中是指某些I类MHC和II类MHC基因纯合的个体。这些纯合个体可以作为超级供体,其细胞(包括组织和包含其细胞的其他材料)可以移植到对于该单倍型纯合或杂合的个体中。超级供体可分别为HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DP或HLA-DQ中一个或多个位点等位基因纯合。

[0086] 本文中使用“无饲养层”或“不依赖饲养层”是指补充有细胞因子和生长因子(例如TGFβ、bFGF、LIF)的培养物,作为饲养细胞层的替代。因此,“无饲养层”或不依赖饲养层的培养系统和培养基可用于培养和维持多能细胞处于未分化和增殖状态。在某些情况下,无饲养层培养利用基于动物的基质(例如MATRIGEL™)或生长在诸如纤连蛋白、胶原蛋白或玻连蛋白的基质上。这些方法允许人干细胞保持基本上未分化的状态,而不需要小鼠成纤维细胞“饲养层”。

[0087] “饲养层”在本文中定义为细胞的涂层,例如在培养皿底部。饲养细胞可以将营养物质释放到培养基中,并提供其他细胞(例如多能干细胞)可以附着的表面。

[0088] 当涉及培养基、细胞外基质或培养条件使用时,术语“确定的”或“完全确定的”是指培养基、细胞外基质或培养条件的几乎所有成分的化学组成和量都已知。例如,确定成分培养基不包含未确定的因子,例如胎牛血清、牛血清白蛋白或人血清白蛋白。通常,确定成分培养基包含补充有重组白蛋白、化学上确定的脂质和重组胰岛素的基础培养基(例如,Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)、F12或Roswell Park Memorial Institute培养基(RPMI)1640,其含有氨基酸、维生素、无机盐、缓冲剂、抗氧化剂和能量源)。完全确定成分培养基的一个实例是Essential 8™培养基。

[0089] 对于与人细胞一起使用的培养基、细胞外基质或培养系统,术语“无异种(XF)”是指所用材料不是非人动物来源的情况。

[0090] “汇合前”是指细胞培养,其中细胞覆盖的培养表面的比例为约60-80%。通常,汇合前是指培养物中约70%的培养表面被细胞覆盖。

[0091] 术语“视网膜祖细胞”,也称为“视网膜前体细胞”或“RPC”,包括有能力产生视网膜所有细胞类型的细胞(包括神经视网膜细胞,例如视杆细胞、视锥细胞、光感受器前体细胞),以及可分化为RPE的细胞。

[0092] 术语“神经视网膜祖细胞”或“NRP”是指分化潜能被限于神经视网膜细胞类型的细胞。

[0093] 术语“光感受器”或“PR”细胞是指在视紫红质(视杆)或三种视锥视蛋白中任一种(视锥)表达上调之前和之后,处于光感受器谱系(即成熟)途径内的细胞,其包括光感受器

细胞(视杆细胞、视锥细胞、或两者)的早期和晚期标记物。

[0094] 术语“光感受器前体细胞”或“PRP”是指从胚胎干细胞或诱导多能干细胞分化而来的细胞,这些细胞可分化为表达细胞标记物视紫红质或三种视锥视蛋白中任一种的光感受器细胞。光感受器可以是视杆和/或视锥光感受器。

[0095] “视网膜色素上皮”是指脉络膜(一个充满血管的层)和神经视网膜之间的一层色素细胞。

[0096] 术语“视网膜变性相关疾病”意指先天或后天视网膜变性或异常导致的任何疾病。视网膜变性相关疾病的实例包括视网膜发育不良、视网膜变性、年龄相关性黄斑变性、Stargardt病、Best病、脉络膜缺损、遗传性黄斑变性、近视变性、RPE撕裂、黄斑裂孔、糖尿病性视网膜病变、视网膜色素变性、遗传性视网膜疾病或变性、遗传性黄斑变性、视锥视杆营养不良、视杆视锥营养不良、先天性视网膜营养不良、莱伯氏先天性黑朦、视网膜脱离和视网膜外伤。

[0097] 本文所用的“治疗有效量”是指当向受试者施用用于治疗疾病或病况时,足以实现所述治疗的化合物的量。

[0098] “成熟”RPE细胞在本文中被称为RPE细胞,其具有下调的不成熟RPE标记物例如Pax6的表达和上调的成熟RPE标记物例如RPE65的表达。

[0099] RPE细胞“成熟”在本文中是指RPE发育途径被调节以产生成熟RPE细胞的过程。例如,纤毛功能的调节可导致RPE成熟。

[0100] “诱导剂”在本文中定义为调节基因表达的分子,例如激活细胞内的基因。诱导剂可以与阻遏剂或激活剂结合。诱导剂通过禁用阻遏剂发挥作用。

[0101] 如本文所用,术语“RPE-PR/PRP清晰双层”是指共培养物,其具有层连接、维持每种细胞类型中的预期标记物、且分层。

[0102] 如本文所用,术语“移植的”双层是指将所移植的细胞移植到宿主视网膜中并形成突触前和突触后机制,从而使移植细胞和宿主细胞准备形成突触。

[0103] 如本文所用,术语“可生物降解”是指为递送的细胞提供初始结构支持,但随着时间的推移降解为对移植宿主无毒且不会导致供体部位发病的产品的材料。

II.诱导多能干细胞

[0104] 多能性的诱导最初是在2006年使用小鼠细胞(Yamanaka等人,2006)和2007年使用人细胞(Yu等人,2007;Takahashi等人,2007)通过引入与多能性相关的转录因子对体细胞进行重编程实现的。多能干细胞可以维持在未分化状态,并可以分化成任何成体细胞类型。

[0105] 除生殖细胞外,任何体细胞均可作为iPSC的起点。例如,细胞类型可以是角质形成细胞、成纤维细胞、造血细胞、间充质细胞、肝细胞或胃细胞。T细胞也可用作体细胞的来源用于重编程(美国专利号8,741,648)。对细胞分化的程度或收集细胞的动物的年龄没有限制;在本文公开的方法中,甚至未分化的祖细胞(包括体干细胞)和最终分化的成熟细胞也可用作体细胞的来源。在一个实施方案中,体细胞本身是PR/PRP或RPE细胞,例如人PR/PRP和RPE细胞。PR/PRP或RPE细胞可以是成人或胎儿PR/PRP或者RPE细胞。iPSC可以在已知使人ES细胞分化为特定细胞类型的条件下生长,并表达人ES细胞标记物,包括:SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60和TRA-1-81。

A.起始细胞的HLA

[0106] 主要组织相容性复合物(MHC)是同种异体器官移植免疫排斥的主要原因。有三种主要I类MHC单倍型(A、B和C)和三种主要II类MHC单倍型(DR、DP和DQ)。

[0107] 如果供体细胞是HLA纯合的,即每个抗原呈递蛋白含有相同的等位基因,供体和受体之间的MHC兼容性显著增加。大多数个体对I类MHC和II类MHC基因是杂合的,但某些个体对这些基因是纯合的。这些纯合个体可以作为超级供体,由其细胞产生的移植物可以移植到该单倍型纯合或杂合的所有个体中。此外,如果纯合供体细胞具有在群体中高频率发现的单倍型,这些细胞可能在大量个体的移植治疗中有应用。

[0108] 因此,iPSC可从待治疗受试者的体细胞或与患者具有相同或基本相同HLA类型的另一受试者产生。在一种情况下,供体的主要HLA(例如,HLA-A、HLA-B和HLA-DR的三个主要位点)与接受者的主要HLA相同。在某些情况下,体细胞供体可能是超级供体;因此,源于MHC纯合超级供体的iPSC可用于产生PR/PRP细胞。因此,源自超级供体的iPSC可以移植到对该单倍型纯合或杂合的受试者中。例如,iPSC可以在两个HLA等位基因例如HLA-A和HLA-B上是纯合的。因此,从超级供体产生的iPSC可用于本文公开的方法中,以产生可能潜在地“匹配”大量潜在接受者的PR/PRP细胞。

B.重编程因子

[0109] 可以使用本领域技术人员已知的方法对体细胞进行重编程以产生诱导多能干细胞(iPSC)。本领域技术人员可以容易地产生诱导多能干细胞(iPSC),参见例如,公布的美国专利申请号20090246875、公布的美国专利申请号2010/0210014、公布的美国专利申请号20120276636、美国专利号8,058,065、美国专利号8,129,187、美国专利号8,278,620、PCT公开号WO2007/069666A1、和美国专利号8,268,620,其全部通过引用并入本文。通常,细胞核重编程因子用于从体细胞产生多能干细胞。在某些实施方案中,使用Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、Nanog和Lin28中的至少两种、至少三种或至少四种。在其他实施方案中,使用Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4。

[0110] 用细胞核重编程物质处理细胞,所述物质通常是一种或多种能够从体细胞诱导iPSC的因子或编码这些物质的核酸(包括整合在载体中的形式)。细胞核重编程物质通常包括至少Oct3/4、Klf4和Sox2或编码这些分子的核酸。p53的功能性抑制剂、L-myc或编码L-myc的核酸、和Lin28或Lin28b或编码Lin28或Lin28b的核苷酸可以用作另外的细胞核重编程物质。Nanog也可以用于细胞核重编程。如公布的美国专利申请号20120196360中所公开的,用于产生iPSC的示例性重编程因子包括(1)Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc(Sox2可替换为Sox1、Sox3、Sox15、Sox17或Sox18;Klf4可替换为Klf1、Klf2或Klf5);(2)Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、TERT、SV40大T抗原(SV40LT);(3)Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、TERT、人乳头瘤病毒(HPV)16E6;(4)Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、TERT、HPV16 E7;(5)Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、TERT、HPV16 E6、HPV16 E7;(6)Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、TERT、Bmil;(7)Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、Lin28;(8)Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、Lin28、SV40LT;(9)Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、Lin28、TERT、SV40LT;(10)Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、SV40LT;(11)Oct3/4、Esrrb、Sox2、L-Myc(Esrrb可替换为Esrrg);(12)Oct3/4、Klf4、Sox2;(13)Oct3/4、Klf4、Sox2、TERT、SV40LT;(14)Oct3/4、Klf4、Sox2、TERT、HP VI 6E6;(15)Oct3/4、Klf4、Sox2、TERT、HPV16 E7;(16)Oct3/4、Klf4、Sox2、TERT、HPV16 E6、HPV16 E7;(17)Oct3/4、Klf4、Sox2、TERT、Bmil;(18)Oct3/4、Klf4、Sox2、Lin28;(19)Oct3/4、Klf4、Sox2、Lin28、SV40LT;

(20)Oct3/4、Klf4、Sox2、Lin28、TERT、SV40LT;(21)Oct3/4、Klf4、Sox2、SV40LT;或(22)Oct3/4、Esrrb、Sox2(Esrrb可替换为Esrrg)。在一个非限制性示例中,使用Oct3/4、Klf4、Sox2和c-Myc。在其他实施方案中,使用Oct4、Nanog和Sox2;参见例如,美国专利号7,682,828,其通过引用并入本文。这些因子包括但不限于Oct3/4、Klf4和Sox2。在其他示例中,这些因子包括但不限于Oct3/4、Klf4和Myc。在某些非限制性示例中,使用Oct3/4、Klf4、c-Myc和Sox2。在其他非限制性示例中,使用Oct3/4、Klf4、Sox2和Sal4。Nanog、Lin28、Klf4或c-Myc等因子可提高重编程效率,并可从几种不同的表达载体表达。例如,可以使用整合载体,例如基于EBV元件的系统(美国专利号8,546,140)。在另一方面,重编程蛋白可以通过蛋白转导直接引入到体细胞中。重编程可进一步包括使细胞与一种或多种信号传导受体接触,包括糖原合酶激酶3(GSK-3)抑制剂、促分裂原活化蛋白质激酶激酶(MEK)抑制剂、转化生长因子β(TGF-β)受体抑制剂或信号传导抑制剂、白血病抑制因子(LIF)、p53抑制剂、NF-κB抑制剂或其组合。这些调节剂可包括小分子、抑制性核苷酸、表达盒或蛋白质因子。预期实际上可以使用任何iPS细胞或细胞系。

[0111] 这些细胞核重编程物质的小鼠和人cDNA序列可参考WO2007/069666中提到的NCBI登录号获得,该文献通过引用并入本文。引入一种或多种重编程物质或编码这些重编程物质的核酸的方法在本领域中是已知的,并且例如如公布的美国专利申请号2012/0196360和美国专利号8,071,369中所公开的,两者均通过引用并入本文中。

[0112] 在衍生之后,可以将iPSC在足以维持多能性的培养基中培养。iPSC可与用于培养多能干细胞(更具体地,胚胎干细胞)的各种培养基和技术一起使用,如美国专利号7,442,548和美国专利公开号2003/0211603中所描述的。在小鼠细胞的情况下,在普通培养基中添加白血病抑制因子(LIF)作为分化抑制因子进行培养。在人细胞的情况下,预期添加碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)代替LIF。可以使用本领域技术人员已知的用于培养和维持iPSC的其他方法。

[0113] 在某些实施方案中,可以使用非确定的条件;例如,可以在成纤维细胞饲养细胞或已暴露于成纤维细胞饲养细胞的培养基上培养多能干细胞,以使干细胞维持在未分化状态。在某些实施方案中,细胞在与小鼠胚胎成纤维细胞共同存在的情况下培养,该小鼠胚胎成纤维细胞经辐射或抗生素处理以终止细胞分裂而作为饲养细胞。可替代地,多能细胞可以使用确定的、不依赖饲养层的培养系统,例如TESR™培养基(Ludwig等人,2006a;Ludwig等人,2006b)或E8™培养基(Chen等人,2011)培养并维持在基本上未分化的状态。

C.质粒

[0114] 在某些实施方案中,iPSC可以被修饰以表达外源核酸,例如包括可操作地连接到启动子的增强子和编码第一标记物的核酸序列。合适的启动子包括但不限于在光感受器细胞中表达的任何启动子,例如视紫红质激酶启动子。构建体还可以包括其他元件,例如用于翻译起始的核糖体结合位点(内部核糖体结合序列)和转录/翻译终止子。通常,用构建体转染细胞是有利的。用于稳定转染的合适载体包括但不限于逆转录病毒载体、慢病毒载体和仙台病毒。

[0115] 在某些实施方案中,编码标记物的质粒由以下组成:(1)高拷贝数复制起点,(2)可选择标记物,例如但不限于用卡那霉素进行抗生素选择的neo基因,(3)转录终止序列,包括酪氨酸酶增强子,和(4)用于掺入各种核酸盒的多克隆位点;和(5)编码可操作地连接到酪

氨酸酶启动子的标记物的核酸序列。本领域已知许多用于诱导编码蛋白质的核酸的质粒载体。这些包括但不限于美国专利号6,103,470、美国专利号7,598,364、美国专利号7,989,425和美国专利号6,416,998中公开的载体，全部通过引用并入本文。

[0116] 病毒基因递送系统可以是基于RNA或DNA的病毒载体。附加体基因递送系统可以是质粒、基于EB病毒(EBV)的附加型载体、基于酵母的载体、基于腺病毒的载体、猿猴病毒40(SV40)的附加型载体、基于牛乳头瘤病毒(BPV)的载体或慢病毒载体。

[0117] 标记物包括但不限于荧光蛋白(例如，绿色荧光蛋白或红色荧光蛋白)、酶(例如，辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶或萤火虫/海肾萤光素酶或nanoluc)或其他蛋白。标记物可以是蛋白质(包括分泌的、细胞表面的或内部的蛋白质；由细胞合成或摄取的)、核酸(例如mRNA或具有酶活性的核酸分子)、或多糖。包括可通过对感兴趣的细胞类型的标记物具有特异性的抗体、凝集素、探针或核酸扩增反应检测的任何此类细胞组分的决定簇。标记物也可以通过生物化学或酶测定或生物反应来鉴定，这取决于基因产物的功能。编码这些标记物的核酸序列可以与酪氨酸酶增强子可操作地连接。此外，可以包括其他基因，例如可能影响干细胞向PRP分化或光感受器功能或生理学或病理学的基因。

D.递送系统

[0118] 根据本公开内容将核酸(例如DNA或RNA)引入到多能干细胞中以将其编程为RPE或PR/PRP可使用任何合适的递送核酸转化细胞的方法，如本文所述的或本领域普通技术人员已知的。此类方法包括但不限于：直接递送DNA，例如通过离体转染(Wilson等人，1989；Nabel等人，1989)；通过注射(美国专利号5,994,624、5,981,274、5,945,100、5,780,448、5,736,524、5,702,932、5,656,610、5,589,466和5,580,859，各自通过引用并入本文)，包括显微注射(Harland和Weintraub，1985；美国专利号5,789,215，通过引用并入本文)；通过电穿孔(美国专利号5,384,253，通过引用并入本文；Tur-Kaspa等人，1986；Potter等人，1984)；通过磷酸钙沉淀(Graham和Van Der Eb，1973；Chen和Okayama，1987；Rippe等人，1990)；通过使用DEAE-葡聚糖，然后使用聚乙二醇(Gopal，1985)；通过直接声波加载(Fechheimer等人，1987)；通过脂质体介导的转染(Nicolau和Sene，1982；Fraley等人，1979；Nicolau等人，1987；Wong等人，1980；Kaneda等人，1989；Kato等人，1991)和受体介导的转染(Wu和Wu，1987；Wu和Wu，1988)；通过微粒轰击(PCT申请号WO 94/09699和95/06128；美国专利号：5,610,042；5,322,783、5,563,055、5,550,318、5,538,877和5,538,880，各自通过引用并入本文)；通过用碳化硅纤维搅拌(Kaeppler等人，1990；美国专利号5,302,523和5,464,765，各自通过引用并入本文)；通过农杆菌介导的转化(美国专利号5,591,616和5,563,055，各自通过引用并入本文)；通过干燥/抑制介导的DNA摄取(Potrykus等人，1985)以及这些方法的任何组合。通过应用例如这些技术，可以稳定或瞬时地转化细胞器、细胞、组织或生物体。

1.病毒载体

[0119] 本公开内容的某些方面可以提供病毒载体。在产生重组病毒载体时，非必需基因通常被异源(或非天然)蛋白的基因或编码序列取代。病毒载体是一种利用病毒序列将核酸和可能的蛋白质引入细胞的表达构建体。某些病毒通过受体介导的内吞作用感染细胞或进入细胞，并整合到宿主细胞基因组中并稳定高效地表达病毒基因的能力使其成为将外源核酸转移到细胞(例如哺乳动物细胞)中的有吸引力的候选物。下文描述了可用于递送本公开内容的某些方面的核酸的病毒载体的非限制性示例。

[0120] 由于逆转录病毒能够将其基因整合到宿主基因组中,转移大量外来遗传物质,感染广泛的物种和细胞类型,并在特殊的细胞系中包装,因此逆转录病毒有望成为基因递送载体(Miller,1992)。

[0121] 为了构建逆转录病毒载体,将核酸插入病毒基因组中以代替某些病毒序列,从而产生具有复制缺陷的病毒。为了产生病毒粒子,构建了含有gag、pol和env基因但不含LTR和包装组分的包装细胞系(Mann等人,1983)。当含有cDNA的重组质粒与逆转录病毒LTR和包装序列一起被引入特殊细胞系(例如通过磷酸钙沉淀)时,包装序列允许重组质粒的RNA转录物被包装成病毒颗粒,然后将其分泌到培养基中(Nicolas和Rubenstein,1988;Temin,1986;Mann等人,1983)。然后收集含有重组逆转录病毒的培养基,任选地浓缩,并用于基因转移。逆转录病毒载体能够感染多种细胞类型。然而,整合和稳定表达需要宿主细胞的分裂(Paskind等人,1975)。

[0122] 慢病毒是复杂的逆转录病毒,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env外,还含有其他具有调节功能或结构功能的基因。慢病毒载体在本领域是众所周知的(参见例如,Naldini等人,1996;Zufferey等人,1997;Blomer等人,1997;美国专利6,013,516和5,994,136)。

[0123] 重组慢病毒载体能够感染非分裂细胞,可用于体内和离体基因转移和核酸序列表达。例如,美国专利5,994,136中描述了能够感染非分裂细胞的重组慢病毒,其中用携带包装功能(即gag、pol和env)以及rev和tat的两种或多种载体转染合适的宿主细胞,该专利通过引用并入本文。

2.附加型载体

[0124] 还可在本公开内容的某些方面提供基于质粒或脂质体的染色体外(即附加体)载体的使用。这样的附加型载体可以包括,例如,基于oriP的载体和/或编码EBNA-1衍生物的载体。这些载体可以允许将大片段的DNA引入细胞并保持在染色体外,每个细胞周期复制一次,有效地分配给子细胞,并且基本上不引起免疫反应。

[0125] 特别是,EBNA-1是复制基于oriP的表达载体所需的唯一病毒蛋白,它不会引发细胞免疫反应,因为它已经开发出一种有效的机制来绕过在I类MHC分子上呈递其抗原所需的处理(Levitskaya等人,1997)。此外,EBNA-1可以反式作用以增强克隆基因的表达,在某些细胞系中诱导克隆基因表达高达100倍(Langle-Rouault等人,1998;Evans等人,1997)。最后,这种基于oriP的表达载体的制造是廉价的。

[0126] 在某些方面,重编程因子从表达盒表达,所述表达盒包含在一个或多个外源性附加体遗传元件中(参见美国专利公开2010/0003757,通过引用并入本文)。因此,iPSC可以基本上不含外源性遗传元件,例如来自逆转录病毒或慢病毒载体元件。这些iPSC是通过使用染色体外复制载体(即,附加型载体)制备的,这些载体能够进行附加体复制,使iPSC基本上不含外源载体或病毒元件(参见美国专利号8,546,140,通过引用并入本文;Yu等人,2009)。许多DNA病毒,例如腺病毒、猿猴空泡病毒40(SV40)或牛乳头瘤病毒(BPV),或含芽殖酵母酵母ARS(自主复制序列)的质粒,在哺乳动物细胞中以染色体外复制或附加体复制。这些附加型质粒本质上没有与整合载体相关的所有这些缺点(Bode等人,2001)。例如,包括基于淋巴营养性heRPE病毒的或如上所述的EB病毒(EBV)可在染色体外复制,并有助于将重编程基因递送至体细胞。有用的EBV元件是OriP和EBNA-1,或它们的变体或功能等效物。附加型载体

的另一个优点是,外源元件在引入细胞后会随着时间的推移而丢失,产生基本上不含这些元件的自我维持的iPSC。

[0127] 其他染色体外载体包括其他基于淋巴营养性疱疹病毒的载体。淋巴营养性疱疹病毒是一种疱疹病毒,在淋巴母细胞(例如人B淋巴母细胞)中复制并在其自然生命周期的一部分中成为质粒。单纯疱疹病毒(HSV)不是"淋巴营养性"疱疹病毒。示例性淋巴营养性疱疹病毒包括但不限于EBV、卡波西肉瘤疱疹病毒(KSHV)、松鼠猴疱疹病毒(HS)和马立克氏病病毒(MDV)。此外,还考虑了基于附加体的载体的其他来源,例如酵母ARS、腺病毒、SV40或BPV。

[0128] 本领域技术人员完全有能力通过标准重组技术构建载体(参见例如,Maniatis等人,1988和Ausubel等人,1994,均通过引用并入本文)。

[0129] 载体还可以包含其他成分或功能,其进一步调节基因递送和/或基因表达,或以其他方式为靶向细胞提供有益特性。此类其他成分包括,例如,影响与细胞结合或靶向细胞的成分(包括介导细胞类型或组织特异性结合的成分)、影响细胞对载体核酸摄取的成分、摄取后影响多核苷酸在细胞内定位的成分(例如介导细胞核定位的试剂);以及影响多核苷酸表达的成分。

[0130] 此类成分还可包括标记物,例如可检测标记物和/或选择标记物,其可用于检测或选择已摄取并表达载体递送的核酸的细胞。这些成分可以作为载体的自然特征提供(例如使用具有介导结合和摄取的成分或功能的某些病毒载体),或者可以修饰载体以提供这些功能。本领域已知并且通常是可获得多种这样的载体。当载体保持在宿主细胞中时,载体可以在有丝分裂期间作为自主结构被细胞稳定复制,掺入宿主细胞的基因组中,或者保持在宿主细胞核或细胞质中。

3.调节元件

[0131] 包含在用于本公开内容的重编程载体中的表达盒优选包含(在5'-3'方向上)可操作地连接到蛋白质编码序列的真核转录启动子、包括插入序列的剪接信号和转录终止/聚腺苷酸化序列。

b.启动子/增强子

[0132] 本文提供的表达构建体包含驱动编程基因表达的启动子。启动子通常包括用于定位RNA合成起始位点的序列。这方面最为人所知的例子是TATA盒,但在某些缺乏TATA盒的启动子中,例如哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因启动子和SV40晚期基因启动子,覆盖起始位点本身的离散元件有助于固定起始位置。另外的启动子元件调节转录起始的频率。通常,这些启动子位于起始位点上游30-110bp的区域,尽管已经显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。为了使编码序列"置于"启动子的控制之下,将转录阅读框的转录起始位点的5'端定位于所选启动子的"下游"(即3')。"上游"启动子刺激DNA转录并促进所编码RNA的表达。

[0133] 启动子元件之间的间距通常是灵活的,使得当元件相互反转或移动时,启动子功能得以保留。在tk启动子中,在活性开始下降之前,启动子元件之间的间隔可以增加到50bp。取决于启动子,似乎各个元件可以协同或独立地激活转录。启动子可以与"增强子"结合使用或可以不与"增强子"结合使用,"增强子"是指参与核酸序列转录激活的顺式作用调控序列。

[0134] 启动子可以是与核酸序列天然相关的启动子,这可以通过分离位于编码片段和/

或外显子上游的5'非编码序列获得。这种启动子可以称为“内源性”。类似地，增强子可以是与核酸序列天然相关的增强子，位于该序列的下游或上游。可替代地，通过将编码核酸片段定位在重组或异源启动子的控制下将获得某些优势，所述重组或异源启动子是指在其自然环境中通常不与核酸序列相关的启动子。重组或异源增强子也是指在其自然环境中通常不与核酸序列相关的增强子。此类启动子或增强子可包括其他基因的启动子或增强子，以及从任何其他病毒、原核细胞或真核细胞分离的启动子或增强子，以及非“天然存在”的启动子或者增强子，即含有不同转录调控区的不同元件和/或改变表达的突变。例如，在重组DNA构建中最常用的启动子包括β-内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖和色氨酸(trp)启动子系统。除了合成产生启动子和增强子的核酸序列外，还可以结合本文公开的组合物使用重组克隆和/或核酸扩增技术(包括PCR™)产生序列(参见美国专利号4,683,202和5,928,906，各自通过引用并入本文)。此外，预期也可以使用指导非核细胞器(例如线粒体、叶绿体等)内序列转录和/或表达的控制序列。

[0135] 自然地，重要的是使用在被选择用于表达的细胞器、细胞类型、组织、器官或生物体中有效指导DNA片段表达的启动子和/或增强子。分子生物学领域的技术人员通常知道用于蛋白质表达用途的启动子、增强子和细胞类型组合(参见例如Sambrook等人，1989，通过引用并入本文)。所用的启动子可以是组成型的、组织特异性的、诱导型的和/或可用于在适当的条件下指导所引入DNA片段的高水平表达，例如有利于大规模产生重组蛋白和/或肽。启动子可以是异源的或内源性的。

[0136] 此外，任何启动子/增强子组合(例如，根据真核启动子数据库EPDB)也可用于驱动表达。使用T3、T7或SP6细胞质表达系统是另一个可能的实施方案。如果提供合适的细菌聚合酶(或者作为递送复合物的一部分，或者作为额外的基因表达构建体)，真核细胞可以支持来自某些细菌启动子的细胞质转录。

[0137] 启动子的非限制性示例包括早期或晚期病毒启动子，例如SV40早期或晚期启动子、巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、肉瘤病毒(RSV)早期启动子；真核细胞启动子，例如β-肌动蛋白启动子(Ng，1989；Quitsche等人，1989)、GADPH启动子(Alexander等人，1988；Ercolani等人，1988)、金属硫蛋白启动子(Karin等人，1989；Richards等人，1984)；以及串联响应元件启动子，例如环AMP响应元件启动子(cre)、血清响应元件启动子(sre)、佛波酯启动子(TPA)和在最小TATA盒附近的响应元件启动子(tre)。也可以使用人生长激素启动子序列(例如，Genbank以登录号X05244描述的人生长激素最小启动子，核苷酸283-341)或小鼠乳腺肿瘤启动子(可从ATCC获得，目录号ATCC 45007)。

[0138] 组织特异性转基因表达，尤其是在编程衍生的造血细胞和造血细胞前体中的报告基因表达，可能是鉴定所衍生造血细胞和前体的理想方法。为了增加特异性和活性，已经考虑使用顺式作用的调节元件。例如，可以使用造血细胞特异性启动子。许多这样的造血细胞特异性启动子是本领域已知的。

[0139] 在某些方面，本公开内容的方法还涉及增强子序列，即，增加启动子活性并具有顺式作用潜力的核酸序列，无论其方向如何，甚至在相对长的距离上(距离目标启动子可达几千个碱基)。然而，增强子功能不一定局限于如此长的距离，因为它们也可能在给定的启动子附近发挥作用。

[0140] 已经鉴定了许多造血细胞启动子和增强子序列，这些序列可能在本发明的方法中

有用。例如,参见美国专利5,556,954、美国专利申请20020055144、美国专利申请20090148425。

c.启动信号和关联表达

[0141] 特定起始信号也可用于本公开内容中提供的表达构建体中,以有效翻译编码序列。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可能需要提供外源翻译控制信号,包括ATG起始密码子。本领域普通技术人员将能够容易地确定这一点并提供必要的信号。众所周知,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框"在读框中",以确保整个插入物的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。通过包含适当的转录增强元件可以提高表达效率。

[0142] 在某些实施方案中,内部核糖体进入位点(IRES)元件用于产生多基因或多顺反子信息。IRES元件能够绕过5'甲基化的帽依赖性翻译的核糖体扫描模型并在内部位点开始翻译(Pelletier和Sonenberg,1988)。已经描述了来自小核糖核酸病毒家族两个成员(脊髓灰质炎和脑心肌炎)的IRES元件(Pelletier和Sonenberg,1988),以及来自哺乳动物信使的IRES(Macejak和Sarnow,1991)。IRES元件可以连接到异源开放阅读框。多个开放阅读框架可以被一起转录,各自通过IRES分隔,从而产生多顺反子信息。由于IRES元件,核糖体可以访问每个开放阅读框以进行有效翻译。使用单个启动子/增强子可以高效表达多个基因以转录单个信使(参见美国专利号5,925,565和5,935,819,各自通过引用并入本文)。

[0143] 此外,某些2A序列元件可用于在本公开内容提供的构建体中创建编程基因的连锁表达或共表达。例如,切割序列可以通过连接开放阅读框形成单个顺反子来共同表达基因。示例性切割序列是F2A(口蹄疫病毒2A)或"2A样"序列(例如,Thosea asigna病毒2A;T2A)(Minskaia和Ryan,2013)。在特定实施方案中,F2A切割肽用于连接多谱系构建体中基因的表达。

d.复制起点

[0144] 为了在宿主细胞中繁殖载体,载体可以包含一个或多个复制位点的起点(通常称为"ori"),例如,与上述EBV的oriP相对应的核酸序列,或在编程中具有类似或提高功能的基因工程oriP,这是启动复制的特定核酸序列。可替代地,可以采用如上所述的其他染色体外复制病毒的复制起点或自主复制序列(ARS)。

e.选择标记物和可筛选标记物

[0145] 在某些实施方案中,可通过在表达载体中包含标记物在体外或体内鉴定含有核酸构建体的细胞。这样的标记物将赋予细胞可识别的变化,允许容易地识别含有表达载体的细胞。通常,选择标记物是赋予允许选择的性能的标记物。正选择标记物是指标记物的存在允许其选择的标记物,而阴性选择标记物是其存在阻止其选择的标记物。正选择标记物的一个例子是耐药性标记物。

[0146] 通常,药物选择标记物的加入有助于转化体的克隆和鉴定,例如,赋予新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、zeocin和组氨醇抗性的基因是有用的选择标记物。除了赋予允许基于条件的实施来区分转化体的表型的标记物外,还考虑了其他类型的标记物,包括可筛选标记物,例如GFP,其基础是比色分析。可替代地,可以使用可筛选的酶作为阴性选择标记物,例如heRPE单纯疱疹病毒属胸苷激酶(tk)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。本领域技术人员还将知道如何使用免疫标记物,可能结合FACS分析。认为所使用的标记物并不重要,只要

它能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。本领域技术人员熟知选择和可筛选标记物的其他示例。

III.iPSC分化为视网膜色素上皮细胞或光感受器/光感受器前体细胞

A.RPE分化

[0147] 在某些方面，通过本文公开的方法从iPSC产生RPE细胞，例如通过PCT/US2016/050543和PCT/US2016/050554中公开的方法。视网膜中对光直接敏感的细胞是光感受器细胞。光感受器是视网膜外侧部分的感光神经元，可以是视杆细胞或视锥细胞。在光转导过程中，光感受器细胞将角膜和晶状体聚焦的入射光能转换为电信号，最终通过视神经发送到大脑。脊椎动物有两种类型的光感受器细胞，包括视锥细胞和视杆细胞。视锥细胞适用于检测精细细节、中心视觉和彩色视觉，并在明亮的光线下工作良好。视杆细胞负责外围视觉和暗光视觉。来自视杆细胞和视锥细胞的神经信号经过视网膜其他神经元的处理。

[0148] 视网膜色素上皮作为血流和视网膜之间屏障的一部分，在维持视觉功能和脉络膜供血方面与光感受器细胞密切相互作用。视网膜色素上皮由单层六边形细胞组成，所述细胞内密布黑色素颗粒。特化的RPE细胞的主要功能包括：将来自血液的葡萄糖、视黄醇和脂肪酸等营养物质输送到光感受器；将水、代谢终产物和离子从视网膜下空间输送到血液；吸收光和保护免于光氧化；全反式视黄醇再异构化为11-顺式视黄醛；脱落光感受器膜的吞噬作用；以及分泌视网膜结构完整性所需的各种必需因子。

[0149] 成熟的视网膜色素上皮表达标记物，例如细胞视黄醛结合蛋白(CRALBP)、RPE65、Best卵黄样黄斑营养不良基因(VMD2)和色素上皮衍生因子(PEDF)。视网膜色素上皮的功能障碍与多种视力改变病况有关，例如视网膜色素上皮脱离、发育不良、萎缩、视网膜病变、视网膜色素变性、黄斑营养不良、或变性，包括年龄相关性黄斑变性。

[0150] 成熟的视网膜色素上皮(RPE)细胞可根据其色素沉着、上皮形态和顶端-基底极性进行表征。分化的RPE细胞可以通过其鹅卵石状形态和色素的初始出现进行视觉识别。此外，分化的RPE细胞层具有跨上皮电阻/TER，并在单层上产生跨上皮电位/TEP(TER>100ohms.cm^2;TEP>2mV)，将液体、乳酸和CO_2从顶端输送到底侧，并调节细胞因子的极化分泌。

[0151] RPE细胞表达几种蛋白质，这些蛋白质可作为标记物，通过使用免疫细胞化学、Western印迹分析、流式细胞术和酶联免疫分析(ELISA)等方法检测其身份和成熟状态。例如，RPE特异性标记物可包括：细胞视黄醛结合蛋白(CRALBP)、小眼畸形相关转录因子(MITF)、酪氨酸酶相关蛋白1(TYRP-1)、视网膜色素上皮特异性65kDa蛋白(RPE65)、前黑素体蛋白(PMEL17)、bestrophin 1(BEST1)和c-mer原癌基因酪氨酸激酶(MERTK)。同时，RPE细胞不表达(以任何可检测的水平)胚胎干细胞标记物Oct-4、nanog或Rex-1。具体而言，当通过定量RT-PCR评估时，这些基因在RPE细胞中的表达比在ES细胞或iPSC细胞中的表达低约100-1000倍。

[0152] RPE细胞标记物可在mRNA水平上检测，例如，通过逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)、Northern印迹分析或使用公开可获得的序列数据(GENBANK®)的标准扩增方法中的序列特异性引物进行点印迹杂交分析。如果以蛋白质或mRNA水平检测的组织特异性标记物的表达至少为或为对照细胞(例如未分化多能干细胞或其他无关细胞类型)的约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍，更特别是超过10倍、20倍、30倍、40倍、50倍或更高，则认为

组织特异性标记物的表达为阳性。

[0153] RPE细胞的功能障碍、损伤和损失是许多眼部疾病和病症的因素，包括年龄相关性黄斑变性(AMD)、遗传性黄斑变性，包括Best病、Stargardt病和脉络膜缺损，以及其他形式的遗传性视网膜疾病和后天性视网膜功能障碍、疾病和损伤，包括但不限于RPE撕裂/开裂。此类疾病的潜在治疗方法是将RPE细胞移植到需要此类治疗的患者的视网膜下空间。据推测，通过移植RPE细胞来补充RPE细胞可能会延缓、停止或逆转变性，改善视网膜功能，并防止因此类情况导致的失明。然而，直接从人供体和胚胎中获得RPE细胞具有挑战性。

2.从PSC的类胚体衍生RPE细胞

[0154] 使用众所周知的重编程因子重编程的iPSC可以产生神经元谱系的眼细胞，包括RPE细胞(Hirami等人,2009)。PCT公开号2014/121077(通过引用整体并入本文)公开了一种方法，其中在悬浮培养中用Wnt和Nodal拮抗剂处理由iPSC产生的类胚体(EB)以诱导视网膜祖细胞标记物的表达。该专利公开公开了通过将iPSC的EB分化为RPE细胞高度富集的培养物的过程从iPSC衍生RPE细胞的方法。例如，通过添加rho相关卷曲螺旋激酶(ROCK)抑制剂从iPSC产生类胚体，并在包含两种WNT途径抑制剂和一种Nodal途径抑制剂的第一培养基中培养。进一步地，将EB铺板在第二培养基中的MATRIGEL™涂覆的组织培养物上，以形成分化的RPE细胞，所述培养基不含碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)，包含Nodal途径抑制剂，包含约20ng至约90ng的Noggin，并且包含约1％至约5％的KNOCKOUT血清替代品。将分化RPE细胞在包含ACTIVIN和WNT3a的第三培养基中培养。然后将RPE细胞在RPE培养基中培养，该培养基包含约5％的胎儿血清、经典WNT抑制剂、非经典WNT抑制剂以及Sonic Hedgehog和FGF途径的抑制剂，以产生人RPE细胞。

[0155] 使用EB产生分化细胞类型有几个缺点。例如，从iPSC产生EB是一个非一致和不可重复的过程，因为效率不同，EB的大小或形状也不同。本公开内容提供的方法允许大规模产生不依赖EB的临床、研究或治疗应用所需的从iPSC或ES衍生的细胞。

3.从基本上单细胞PSC衍生RPE细胞

[0156] 在某些实施方案中，提供了从多能干细胞(PSC)(例如人iPSC)的基本单细胞悬浮液产生RPE细胞的方法。在某些实施方案中，将PSC培养至汇合前以防止任何细胞聚集。在某些方面，PSC通过与细胞解离酶孵育而解离，例如TRYPSIN或TRYPLE™所示例的。PSC也可以通过移液分离成基本上单细胞悬浮液。此外，可以在细胞未贴附于培养容器的情况下向培养基中添加Blebbistatin(例如，约2.5μM)，以在分离成单细胞后提高PSC存活率。也可以使用ROCK抑制剂代替Blebbistatin来提高分离成单细胞后的PSC存活率。

[0157] 一旦获得PSC的单细胞悬浮液后，通常将细胞接种在适当的培养容器中，例如组织培养板，例如烧瓶、多层烧瓶、6孔板、12孔板、24孔板、96孔板或10厘米板。用于培养细胞的培养容器可以包括但不特别地限于：烧瓶、组织培养烧瓶、培养皿、有盖培养皿、组织培养皿、多培养皿、微板、微孔板、多板、多孔板、微玻片、腔室玻片、管、托盘、CELLSTACK®腔室、培养袋和滚瓶，只要其能够在其中培养干细胞即可。根据培养的需要，细胞可以以如下体积进行培养：至少为或为约0.2mL、0.5mL、1mL、2mL、5mL、10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、100mL、150mL、200mL、250mL、300mL、350mL、400mL、450mL、500mL、550mL、600mL、800mL、1000mL、1500mL或其中可衍生的任何范围。在某些实施方案中，培养容器可以是生物反应器，其可以指支持生物活性环境以使细胞能够繁殖的任何离体装置或系统。生物反应器的

体积可以至少为或为约2升、4升、5升、6升、8升、10升、15升、20升、25升、50升、75升、100升、150升、200升、500升、1立方米、2立方米、4立方米、6立方米、8立方米，10立方米、15立方米或其中可衍生的任何范围。

[0158] 在某些方面，PSC(例如iPSC)以适合于有效分化的细胞密度进行铺板。通常，细胞以约1,000至约75,000个细胞/cm^2的细胞密度铺板，例如约5,000至约40,000个细胞/cm^2的细胞密度。在6孔板中，细胞可以以每孔约50,000至约400,000个细胞的细胞密度接种。在示例性方法中，细胞以每孔约100,000、约150,000、约200,000、约250,000、约300,000或约350,000个细胞的细胞密度接种，例如每孔约200,000个细胞。

[0159] PSC，例如iPSC，通常在涂覆一种或多种细胞粘附蛋白的培养板上培养，以促进细胞粘附，同时保持细胞活力。例如，优选的细胞粘附蛋白包括细胞外基质蛋白，例如玻连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白和/或纤连蛋白，其可用于涂覆培养表面，作为为多能细胞生长提供固体支持的手段。术语“细胞外基质”是本领域公认的。细胞外基质组分包括以下一种或多种蛋白质：纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白、生腱蛋白、巢蛋白、血小板应答蛋白、弹性蛋白、明胶、胶原蛋白、原纤蛋白、分区蛋白(merosin)、锚定蛋白、软骨粘连蛋白、连接蛋白、骨唾液蛋白、骨钙素、骨桥蛋白、epinectin、透明质粘连蛋白、粗纤维调节素、表皮整联配体蛋白和缰蛋白(kalinin)。在示例性方法中，使PSC生长在涂覆有玻连蛋白或纤连蛋白的培养板上。在某些实施方案中，细胞粘附蛋白是人蛋白。

[0160] 细胞外基质(ECM)蛋白可以是天然来源并从人或动物组织中纯化，或者，可替代地，ECM蛋白可以是基因工程重组蛋白或天然合成蛋白。ECM蛋白可以是完整蛋白或天然或工程化的肽片段形式。可用于细胞培养基质的ECM蛋白的实例包括层粘连蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白、纤连蛋白和玻连蛋白。在某些实施方案中，基质组合物包括纤连蛋白的合成生成的肽片段或重组纤连蛋白。在某些实施方案中，基质组合物是无异种的。例如，在培养人细胞的无异种基质中，可以使用人来源的基质成分，其中可以排除任何非人的动物成分。

[0161] 在某些方面，基质组合物中的总蛋白质浓度可为约1ng/mL至约1mg/mL。在某些优选实施方案中，基质组合物中的总蛋白浓度为约1μg/mL至约300μg/mL。在更优选的实施方案中，基质组合物中的总蛋白浓度为约5μg/mL至约200μg/mL。

[0162] 细胞，例如RPE细胞或PSC，可与支持每个特定细胞群生长所需的营养物质一起培养。通常，细胞在生长培养基和缓冲液中培养以维持pH。培养基还可以含有脂肪酸或脂质、氨基酸(例如非必需氨基酸)、维生素、生长因子、细胞因子、抗氧化物质、丙酮酸、缓冲剂和无机盐。示例性生长培养基包含基本必需培养基，例如Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)或ESSENTIAL 8^{TM}($E8^{TM}$)培养基，补充各种营养素，例如非必需氨基酸和维生素，以促进干细胞生长。基本必需培养基的实例包括但不限于基本必需培养基Eagle(MEM)、Alpha MEM、Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)、RPMI-1640培养基、199培养基和F12培养基。此外，所述基本必需培养基可以补充添加剂，例如马血清、牛血清或胎牛血清。可替代地，培养基可以不含血清。在其他情况下，生长培养基可含有“KNOCKOUT血清替代品”，其在本文中是指经过优化以在培养物中生长和维持未分化细胞(例如干细胞)的无血清制剂。KNOCKOUT^{TM}血清替代品公开于例如美国专利申请号2002/0076747中，其通过引用并入本文。优选地，将PSC在完全确定的且无饲养层的培养基中培养。

[0163] 相应地，通常将单细胞PSC在铺板后在完全确定成分培养基中培养。在某些方面，在接种后约18-24小时，将培养基抽出并向培养物添加新鲜培养基，例如E8™培养基。在某些方面，单细胞PSC在铺板后在完全确定成分培养基中培养约1、2或3天。优选地，在进行分化过程之前，将单细胞PSC在完全确定成分培养基中培养约2天。

[0164] 在某些实施方案中，培养基可以含有或可以不含有任何血清替代品。血清替代品可以包括适当含有白蛋白(例如富含脂质的白蛋白、白蛋白替代物例如重组白蛋白、植物淀粉、葡聚糖和蛋白水解物)、转铁蛋白(或其他铁转运蛋白)、脂肪酸、胰岛素、胶原前体、微量元素、2-巯基乙醇、1’-硫代甘油或其等效物的材料。血清替代品可以通过例如国际公开号WO98/30679中公开的方法制备。可替代地，为了更方便，可以使用任何市售材料。市售材料包括KNOCKOUT™血清代替品(KSR)、化学确定脂质浓缩物(Gibco)和GLUTAMAX™(Gibco)。

[0165] 其他培养条件可以适当限定。例如，培养温度可以为约30至40℃，例如至少为或为约31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃，但不特别地限于此。在一个实施方案中，将细胞在37℃培养。CO_2浓度可为约1至10％，例如约2至5％，或其中可衍生的任何范围。氧张力可以至少为、至多为或为约1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、20％或其中可衍生的任何范围。

4.分化培养基

视网膜诱导培养基

[0166] 在单细胞PSC贴附到培养板上后，优选将细胞在视网膜诱导培养基中培养，以开始向视网膜谱系细胞的分化过程。视网膜诱导培养基(RIM)包括WNT途径抑制剂，并可导致PSC分化为视网膜谱系细胞。RIM还包括TGFβ途径抑制剂和BMP途径抑制剂。

[0167] RIM可以包括约1:1比例的DMEM和F12。在示例性方法中，RIM中包括WNT途径抑制剂例如CKI-7，包括BMP途径抑制剂例如LDN193189，以及包括TGFβ途径抑制剂例如SB431542。例如，RIM包括约5nM至约50nM，例如约10nM的LDN193189；约0.1μM至约5μM，例如约0.5μM的CKI-7；以及约0.5μM至约10μM，例如约1μM的SB431542。此外，RIM可包括KNOCKOUT血清替代品(例如约1％至约5％)、MEM非必需氨基酸(NEAA)、丙酮酸钠、N-2补充剂、B-27补充剂、抗坏血酸和胰岛素生长因子1(IGF1)。优选地，IGF1是无动物成分的IGF1(AF-IGF1)，并且以约0.1ng/mL至约10ng/mL，例如约1ng/mL包含在RIM中。每天将培养基抽出，并替换为新鲜的RIM。细胞通常在RIM中培养约1至约5天，例如约1天、2天、3天、4天或5天，例如约2天，以产生视网膜谱系细胞。

视网膜分化培养基

[0168] 然后可以将视网膜谱系细胞在视网膜分化培养基(RDM)中培养以进一步分化。RDM包括WNT途径抑制剂、BMP途径抑制剂、TGFβ途径抑制剂和MEK抑制剂。在一个实施方案中，RDM包括WNT途径抑制剂，例如CKI-7；BMP途径抑制剂，例如LDN193189；TGFβ途径抑制剂，例如SB431542；和MEK抑制剂，例如PD0325901。可替代地，RDM可以包括WNT途径抑制剂、BMP途径抑制剂、TGFβ途径抑制剂和bFGF抑制剂。通常，与RIM相比，RDM中的Wnt途径抑制剂、BMP途径抑制剂和TGFβ途径抑制剂的浓度更高，例如高约9至约11倍，例如高10倍。在示例性方法中，RDM包含约50nM至约200nM的LDN193189，例如约100nM；约1μM至约10μM的CKI-7，例如约5μM；约1μM至约50μM的SB431542，例如约10μM；以及约0.1μM至约10μM的PD0325901，例如约1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、或9μM。

[0169] 通常,RDM包含约1:1比例的DMEM和F12、KNOCKOUT血清替代品(例如,约1%至约5%,例如约1.5%)、MEM NEAA、丙酮酸钠、N-2补充剂、B-27补充剂、抗坏血酸和IGF1(例如,约1ng/mL至约50ng/mL,例如约10ng/mL)。在特定方法中,在抽出前一天的培养基后,给细胞每天施用细胞新鲜RDM。通常,细胞在RDM中培养约2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天或16天,例如约7天,以获得分化的视网膜细胞。

视网膜培养基

[0170] 接下来,可以通过将分化的视网膜细胞在视网膜培养基(RM)中培养,使细胞进一步分化。视网膜培养基包含激活素A并且可以另外包含烟酰胺。RM可包含约50至约200ng/mL的激活素A,例如约100ng/mL;和约1mM至约50mM的烟酰胺,例如约10mM。可替代地,RM可以包含其他TGF-β途径活化剂例如GDF1,和/或WNT途径活化剂例如CHIR99021、WAY-316606、IQ1、QS11、SB-216763、BIO(6-溴靛玉红-3'-肟)或2-氨基-4-[3,4-(亚甲二氧基)苄基-氨基]-6-(3-甲氧基苯基)嘧啶。可替代地,RM可另外包含WNT3a。

[0171] RM可包含约1:1比例的DMEM和F12、约1%至约5%(例如约1.5%)的KNOCKOUT血清替代品、MEM非必需氨基酸(NEAA)、丙酮酸钠、N-2补充剂、B-27补充剂和抗坏血酸。培养基可以每天用室温RM更换。细胞通常在RM中培养约8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天或17天,例如约10天,以获得分化的RPE细胞。

RPE成熟培养基

[0172] 为了使RPE细胞进一步分化,优选将细胞在RPE成熟培养基(RPE-MM)中培养。示例性RPE-MM培养基如表3所示。RPE成熟培养基可包含约100μg/mL至约300μg/mL的牛磺酸,例如约250μg/mL;约10μg/L至约30μg/L的氢化可的松,例如约20μg/L;和约0.001μg/L至约0.1μg/L的三碘甲状腺原氨酸,例如约0.013μg/L/。此外,RPE-MM可包含MEM Alpha、N-2补充剂、MEM非必需氨基酸(NEAA)、丙酮酸钠,以及胎牛血清(或KNOCKOUT™血清替代品)(例如,约0.5%至约10%,例如约1%至约5%)。所述培养基可以每隔一天用室温RPE-MM更换。细胞通常在RPE-MM中培养约5至约10天,例如约5天。然后,细胞可以例如用细胞解离酶解离,重新接种,并培养另外一段时间,例如另外的约5至约30天,例如约15至20天,以进一步分化为RPE细胞。在进一步的实施方案中,RPE-MM不包含WNT途径抑制剂。可在此阶段将RPE细胞冷冻保存。

b.RPE细胞的成熟

[0173] 然后可以将RPE细胞在RPE-MM中继续培养一段时间使其成熟。在某些实施方案中,使RPE细胞在孔中生长,例如在烧瓶、多层烧瓶、6孔板、12孔板、24孔板或10cm板。可以将RPE细胞在RPE培养基中维持约4至约10周,例如约6至8周,例如6周、7周或8周。在RPE细胞继续成熟的示例性方法中,可以将细胞在细胞解离酶如TRYPLE™中解离并再接种在RPE-MM中的可降解支架组件(如专用的SNAPWELL™)上持续约1到10周,例如五周。RPE-MM可以包含bFGF抑制剂或MEK抑制剂。在可降解支架上培养RPE细胞的方法在PCT公开号WO 2014/121077中教导和描述,该专利通过引用整体并入本文。简而言之,该方法的主要组成部件是CORNING® COSTAR® SNAPWELL™板、生物惰性0形环和可生物降解支架。SNAPWELL™板(例如,0.4μm孔径,可以使用更小或更大的孔径,包括但不限于0.3μm或0.5μm)为可生物降解支架提供结构和平台。形成顶侧和底侧的微孔膜非常适合为支架提供支持,以及分离极化细胞层的不同侧。SNAPWELL™插件用于分离膜的能力允许将插件的支持环用

作支架的锚。由此产生的分化的、极化的和汇合的功能性RPE细胞单层可在此阶段冷冻保存(例如,在无异种CS10培养基中)。

[0174] 在某些实施方案中,通过在RPE-MM中与促进RPE成熟的额外化学物质或小分子继续培养,可以使成熟RPE细胞进一步发育为功能性RPE细胞单层,其表现为完整的RPE组织。例如,这些小分子是初级纤毛诱导剂,例如前列腺素E2(PGE2)或阿非迪霉素。PGE2可以以约25μM至约250μM的浓度添加到培养基中,例如约50μM至约100μM。可替代地,RPE-MM可以包括经典的WNT途径抑制剂。示例性经典WNT途径抑制剂是N-(6-甲基-2-苯并噻唑基)-2-[(3,4,6,7-四氢-4-氧代-3-苯基噻吩并[3,2-d]嘧啶-2-基)硫代]-乙酰胺(IWP2)或4-(1,3,3a,4,7,7a-六氢-1,3-二氧代-4,7-甲桥-2H-异吲哚-2-基)-N-8-喹啉基-苯甲酰胺(endo-IWR1)。可以将细胞在该培养基中培养另外的一段时间,例如另外约一周至约五周,例如另外的约两周至四周,以获得成熟且功能性的RPE细胞单层。因此,本文公开的方法从多能细胞的单细胞悬浮液提供成熟的RPE细胞,其可以持续大规模复制用于临床应用。

B.光感受器细胞

[0175] 在某些实施方案中,通过本文公开的方法产生光感受器和/或光感受器前体细胞。视网膜中对光直接敏感的细胞是光感受器细胞。光感受器是视网膜外部的感光神经元,且可以是视杆细胞或视锥细胞。在光转导过程中,光感受器细胞将角膜和晶状体聚焦的入射光能转换为电信号,最终通过视神经发送到大脑。脊椎动物有两种类型的光感受器细胞,包括视锥细胞和视杆细胞。视锥细胞适用于检测精细细节、中心视觉和彩色视觉,并在明亮的光线下工作良好。视杆细胞负责外围视觉和暗光视觉。来自视杆细胞和视锥细胞的神经信号经过视网膜的其他神经元的处理。

[0176] 光感受器可以表达标记物,例如OTX2、CRX、PRDM1(BLIMP1)、NEUROD1、RCVRN、TUBB3和L1CAM(CD171)。光感受器表达几种蛋白质,这些蛋白质可作为标记物,通过使用免疫细胞化学、Western印迹分析、流式细胞术和酶联免疫分析(ELISA)等方法检测。例如,一种特征性光感受器标记物是RCVRN。光感受器可能不表达(以任何可检测水平)胚胎干细胞标记物OCT-4、NANOG或REX-1。具体而言,当通过定量RT-PCR评估时,这些基因在光感受器中的表达比在ES细胞或iPSC细胞中的表达低约100-1000倍。

[0177] 可在mRNA水平上检测光感受器标记,例如,通过逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)、Northern印迹分析、微阵列或RNA测序,包括在使用公开可获得的序列数据(GENBANK®)的标准扩增方法中使用序列特异性引物进行的单细胞RNA测序点印迹杂交分析。如果以蛋白质或mRNA水平检测的组织特异性标记物的表达至少为或为对照细胞(例如未分化多能干细胞或其他无关细胞类型)的约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍,更特别是超过10倍、20倍、30倍、40倍、50倍或更高,则认为组织特异性标记物的表达为阳性。

[0178] 光感受器细胞的功能障碍、损伤和损失是许多眼部疾病和病症的因素,包括年龄相关性黄斑变性(AMD);遗传性黄斑变性,包括Best病、Stargardt病和脉络膜缺损;视网膜色素变性;以及其他形式的遗传性视网膜疾病和后天性视网膜功能障碍、疾病和损伤。这些疾病的潜在治疗方法是将PRP和/或PR移植到需要这种治疗的患者的视网膜中。据推测,PRP和/或PR的移植补充可能会延迟、停止或逆转变性,改善视网膜功能,并防止此类病况导致的失明。然而,直接从人供体和胚胎中获得PRP和/或PR是一项挑战。

[0179] 在某些实施方案中，提供了从PSC(例如人iPSC)的基本单细胞悬浮液产生光感受器的方法。在某些实施方案中，将PSC培养至汇合前。在某些方面，通过与细胞解离溶液或酶(例如，Versene、胰蛋白酶、ACCUTASE™或TRYPLE™)孵育而将PSC解离。PSC也可以通过移液分离成基本上单细胞悬浮液。

[0180] 此外，可在细胞未贴附于培养容器的情况下向培养基中添加Blebbistatin(例如，约2.5μM)，以提高分离成单个细胞后的PSC存活率。也可以使用ROCK抑制剂代替Blebbistatin来提高分离成单细胞后的PSC存活率。

[0181] 一旦获得PSC的单细胞悬浮液后，通常将细胞接种在适当的培养容器中，例如组织培养板，例如烧瓶、多层烧瓶、6孔板、12孔板、24孔板、96孔板或10cm板。用于培养细胞的培养容器可以包括但不特别地限于：烧瓶、组织培养烧瓶、培养皿、有盖培养皿、组织培养皿、多培养皿、微板、微孔板、多板、多孔板、微玻片、腔室玻片、管、托盘、CELLSTACK®腔室、培养袋和滚瓶，只要其能够在其中培养干细胞即可。根据培养的需要，细胞可以以如下体积进行培养：至少为或为约0.2mL、0.5mL、1mL、2mL、5mL、10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、100mL、150mL、200mL、250mL、300mL、350mL、400mL、450mL、500mL、550mL、600mL、800mL、1000mL、1500mL或其中可衍生的任何范围。在某些实施方案中，培养容器可以是生物反应器，其可以指支持生物活性环境以使细胞能够繁殖的任何离体装置或系统。生物反应器的体积可以至少为或为约2升、4升、5升、6升、8升、10升、15升、20升、25升、50升、75升、100升、150升、200升、500升、1立方米、2立方米、4立方米、6立方米、8立方米，10立方米、15立方米或其中可衍生的任何范围。

[0182] 在某些方面，PSC(例如iPSC)以适合于有效分化的细胞密度进行铺板。通常，细胞以约1,000至约75,000个细胞/cm^2的细胞密度进行铺板，例如约5,000至约40,000个细胞/cm^2的细胞密度。在6孔板中，细胞可以以每孔约50,000至约400,000个细胞的细胞密度接种。在示例性方法中，细胞以每孔约100,000、约150,000、约200,000、约250,000、约300,000或约350,000个细胞的细胞密度接种，例如每孔约50,000个细胞。

[0183] PSC，例如iPSC，通常在涂覆一种或多种细胞粘附蛋白的培养板上培养，以促进细胞粘附，同时保持细胞活力。例如，优选的细胞粘附蛋白包括细胞外基质蛋白，例如玻连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白和/或纤连蛋白，其可用于涂覆培养表面，作为为多能细胞生长提供固体支持的手段。术语“细胞外基质(ECM)”是本领域公认的。细胞外基质组分可包括但不限于以下一种或多种蛋白质：纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白、生腱蛋白、巢蛋白、血小板应答蛋白、弹性蛋白、明胶、胶原蛋白、原纤蛋白、分区蛋白、锚定蛋白、软骨粘连蛋白、连接蛋白、骨唾液蛋白、骨钙素、骨桥蛋白、epinectin、透明质粘连蛋白、粗纤维调节素、表皮整联配体蛋白和缰蛋白。其他ECM组分可包括用于粘附的合成肽(例如RGD或IKVAV基序)、合成水凝胶(例如PEG、PLGA等)或天然水凝胶例如藻酸盐。在示例性方法中，PSC生长在涂覆玻连蛋白的培养板上。在某些实施方案中，细胞粘附蛋白是人蛋白。

[0184] 细胞外基质蛋白可以是天然来源并从人或动物组织中纯化，或者，可替代地，ECM蛋白可以是基因工程重组蛋白或天然合成蛋白。ECM蛋白可以是完整蛋白或天然或工程化的肽片段形式。可用于细胞培养基质的ECM蛋白的实例包括层粘连蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白、纤连蛋白和玻连蛋白。在某些实施方案中，基质组合物是无异种的。例如，在培养人细胞的无异种基质中，可以使用人来源的基质成分，其中可以排除任何非人的动物成分。

[0185] 在某些方面，基质组合物中的总蛋白质浓度可为约1ng/mL至约1mg/mL。在某些优选实施方案中，基质组合物中的总蛋白浓度为约1μg/mL至约300μg/mL。在更优选的实施方案中，基质组合物中的总蛋白浓度为约5μg/mL至约200μg/mL。

[0186] 细胞，例如光感受器或PSC，可以与支持每个特定细胞群生长所需的营养物质一起培养。通常，细胞在包括碳源、氮源和用于维持pH的缓冲剂的生长培养基中培养。培养基还可以含有脂肪酸或脂质、氨基酸(例如非必需氨基酸)、维生素、生长因子、细胞因子、抗氧化物质、丙酮酸、缓冲剂、pH指示剂和无机盐。示例性生长培养基包含基本必需培养基，例如Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)或ESSENTIAL 8™(E8™)培养基，补充各种营养素例如非必需氨基酸和维生素，以促进干细胞生长。基本必需培养基的实例包括但不限于基本必需培养基Eagle(MEM)Alpha培养基、Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)、RPMI-1640培养基、199培养基和F12培养基。此外，基本必需培养基可以补充添加剂，例如马血清、牛血清或胎牛血清。可替代地，培养基可以是无血清的。在其他情况下，生长培养基可能含有“KNOCKOUT血清替代品”，本文中称为无血清制剂，其经优化以在培养物中生长和维持未分化细胞，例如干细胞。KNOCKOUT™血清替代品例如在美国专利申请号2002/0076747中公开，其通过引用并入本文。优选地，PSC在完全确定的且无饲养层的培养基中培养。

[0187] 因此，单细胞PSC通常在铺板后在完全确定成分培养基中培养。在某些方面，在接种后约18-24小时，将培养基抽出并向培养物中添加新鲜培养基例如E8™培养基。在某些方面，将单细胞PSC在铺板后在完全确定成分培养基中培养约1天、2天或3天。优选地，在进行分化过程之前，将单细胞PSC在完全确定成分培养基中培养约2天。

[0188] 在某些实施方案中，培养基可以含有或可以不含有任何血清替代品。血清替代品可以包括适当含有白蛋白(例如富含脂质的白蛋白、白蛋白替代物例如重组白蛋白、植物淀粉、葡聚糖和蛋白水解物)、转铁蛋白(或其他铁转运蛋白)、脂肪酸、胰岛素、胶原前体、微量元素、2-巯基乙醇、3’-硫代甘油或其等效物的材料。血清替代品可以通过例如国际公开号WO98/30679中公开的方法制备。可替代地，为了更方便，可以使用任何市售材料。市售材料包括KNOCKOUT™血清代替品(KSR)、化学确定脂质浓缩物(Gibco)和GLUTAMAX™(Gibco)。

[0189] 其他培养条件可以适当限定。例如，培养温度可以为约30至40℃，例如至少为或为约31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃，但不特别地限于此。在一个实施方案中，细胞在37℃下培养。CO_2浓度可为约1至10％，例如约2至5％，或其中可衍生的任何范围。氧张力可以至少为、至多为或为约1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、20％或其中可衍生的任何范围。

2.分化培养基

视网膜成熟培养基

[0190] 如上所述在RDM中培养的分化的视网膜细胞可以通过在视网膜成熟培养基(RM)中培养细胞以产生RPC而进一步分化和扩增。RM可以包含烟酰胺。RM可包含约1mM至约50mM的烟酰胺，例如约10mM。RM可进一步包含抗坏血酸，例如50-500μm，特别是约100-300μm，例如约200μm。优选地，RM不含或基本不含激活素A。示例性RM培养基如表1所示。RM(例如RM2)可进一步包含γ-分泌酶抑制剂，例如DAPT、碱性FGF和/或TGFβ途径抑制剂例如SB431542。

[0191] RM可包含约1:1比例的DMEM和F12、约1％至约5％(例如约1.5％)的KNOCKOUT血清替代品、MEM非必需氨基酸(NEAA)、丙酮酸钠、N-2补充剂、B-27补充剂和抗坏血酸。培养基可

以每天用室温RM更换。细胞通常在RM中培养约8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天或17天，例如约10天，以获得扩增的RPC。

PRP成熟培养基(PM)

[0192] PRP可在PRP成熟培养基(PM)中成熟。示例性PM培养基如表1所示。PM培养基包含抗坏血酸、烟酰胺和γ-分泌酶抑制剂例如DAPT(例如，约1μM至约10μM，例如约5μM的DAPT)。PM(例如PM2)还可以包含CDK抑制剂，例如CDK4/6抑制剂，例如PD0332991(例如，约1μM至约50μM的PD0332991，例如约10μM)。

[0193] PM培养基可包含约1:1比例的DMEM和F12、约1％至约5％(例如约1.5％)的KNOCKOUT血清替代品、MEM非必需氨基酸(NEAA)、丙酮酸钠、N-2补充剂、B-27补充剂和抗坏血酸。培养基可以每天用室温PM培养基更换。细胞通常在PM培养基中培养约4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天或20天，例如约10天，以获得成熟的光感受器。

表1:示例性培养基成分

Essential 8 培养基			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
Essential 8™基础培养基	Thermo Fisher	A1517001	98%
Essential 8™补充剂	Thermo Fisher		2%
Essential 8 解冻培养基			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
完全 Essential 8™培养基	Thermo Fisher	如上所述制备	100%
Rho 激酶抑制剂(H1152)	Millipore Sigma	555550	1 μM
Essential 8 铺板培养基			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
完全 Essential 8™培养基	Thermo Fisher	如上所述制备	100%
Blebbistatin	Millipore Sigma	B0560	2.5 μM
视网膜诱导培养基(RIM)			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
DMEM/F12	Thermo Fisher	11330-032	99%
CTS™ KnockOut™ SR XenoFree	Thermo Fisher	A1099201	1.50%
MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM

丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
CTS™ N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
B-27®补充剂(+VitA)	Thermo Fisher	17504-044	2%
抗坏血酸	Millipore Sigma	A4544	200μM
LDN-193189	Stemgent	04-0074	10nM
SB 431542	R&D Systems	1614/10	1.0μM
CKI-7 二盐酸盐	Millipore Sigma	C0742	0.5μM
AF-IGF-1	R&D Systems	AFL291	1ng/ml
视网膜分化培养基#1(RD1)			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
DMEM/F12	Thermo Fisher	11330-032	99%
CTS™ KnockOut™ SR XenoFree	Thermo Fisher	A1099201	1.50%
MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
B-27®补充剂(+VitA)	Thermo Fisher	17504-044	2%
抗坏血酸	Millipore Sigma	A4544	200μM
LDN-193189	Stemgent	04-0074	100nM
SB 431542	R&D Systems	1614/10	10μM
CKI-7 二盐酸盐	Millipore Sigma	C0742	5μM
AF-IGF-1	R&D Systems	AFL291	10ng/ml
PD0325901	Stemgent	04-0006	1μM
视网膜分化培养基#2(RD2)			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
DMEM/F12	Thermo Fisher	11330-032	99%
CTS™ KnockOut™ SR XenoFree	Thermo Fisher	A1099201	1.50%
MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
B-27®补充剂(+VitA)	Thermo Fisher	17504-044	2%
抗坏血酸	Millipore Sigma	A4544	200μM
SB 431542	R&D Systems	1614/10	10μM

CKI-7 二盐酸盐	Millipore Sigma	C0742	5μM
AF-IGF-1	R&D Systems	AFL291	10ng/ml
PD0325901	Stemgent	04-0006	1μM
视网膜成熟培养基#1(RM1)			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
DMEM/F12	Thermo Fisher	11330-032	99%
CTS™ KnockOut™ SR XenoFree Kit	Thermo Fisher	A1099201	1.50%
MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
CTS™ N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
B-27®补充剂(+VitA)	Thermo Fisher	17504-044	2%
抗坏血酸	Millipore Sigma	A4544	200μM
烟酰胺	Millipore Sigma	N0636	10mM
视网膜成熟培养基#2(RM2)			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
DMEM/F12	Thermo Fisher	11330-032	99%
CTS™ KnockOut™ SR XenoFree Kit	Thermo Fisher	A1099201	1.50%
MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
CTS™ N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
B-27®补充剂(+VitA)	Thermo Fisher	17504-044	2%
抗坏血酸	Millipore Sigma	A4544	200μM
烟酰胺	Millipore Sigma	N0636	10mM
碱性 FGF	R&D Systems	AFL233	10-100ng/mL
SB 431542	R&D Systems	1614/10	10μM
PRP 成熟培养基#1(PM1)			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
DMEM/F12	Thermo Fisher	11330-032	99%
CTS™ KnockOut™ SR XenoFree Kit	Thermo Fisher	A1099201	1.50%
MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM

CTS™ N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
B-27®补充剂(+VitA)	Thermo Fisher	17504-044	2%
抗坏血酸	Millipore Sigma	A4544	200μM
烟酰胺	Millipore Sigma	N0636	10mM
DAPT	Millipore Sigma	D5942	5μM
PRP 成熟培养基#1(PM2)			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
DMEM/F12	Thermo Fisher	11330-032	99%
CTS™ KnockOut™ SR XenoFree Kit	Thermo Fisher	A1099201	1.50%
MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
CTS™ N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
B-27®补充剂(+VitA)	Thermo Fisher	17504-044	2%
抗坏血酸	Millipore Sigma	A4544	200μM
烟酰胺	Millipore Sigma	N0636	10mM
DAPT	Millipore Sigma	D5942	5μM
PD0332991	Tocris	4786	10 μM
MACS 缓冲液			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
DPBS(不含钙和镁)	Thermo Fisher	14190-144	98%
胎牛血清	GE Life Sciences	SH30071.03	2%
UltraPure™ EDTA 溶液	Thermo Fisher	15575-020	2mM
解冻后培养基#1(PT1)			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
Neurobasal CTS Grade	Thermo Fisher	A13712-01	99%
CTS™ N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
Glutamax	Thermo Fisher	35050-061	1%
Y-27632	Tocris	1254/10	10 μM
解冻后培养基#2(PT2)			
成分	**供应商**	**目录号**	**最终浓度**
DMEM/F12	Thermo Fisher	11330-032	99%
CTS™ KnockOut™ SR XenoFree Kit	Thermo Fisher	A1099201	1.50%

MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
CTS™ N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
B-27®补充剂(+VitA)	Thermo Fisher	17504-044	2%
抗坏血酸	Millipore Sigma	A4544	200μM
烟酰胺	Millipore Sigma	N0636	10mM
Y-27632(可选的)	Tocris	1254/10	10 μM

RPE-MM

成分	供应商	目录号	最终浓度
MEM Alpha	Thermo Fisher	12571-063	94%
胎牛血清	Hyclone	SH30071.03	5%
CTS™ N-2补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
MEM非必需AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
牛磺酸	Sigma	T4571	250μg/ml
氢化可的松	Sigma	H6909	55.2nM(20μg/L)
3,3′,5-三碘代-L-甲状腺素	Sigma	T5516	0.013μg/L

RPE-MM XF

成分	供应商	目录号	最终浓度
MEM Alpha	Thermo Fisher	12571-063	94%
CTS™ KnockOut™ SR XenoFree 试剂盒	Thermo Fisher	A1099201	5%
CTS™ N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
牛磺酸	Sigma	T4571	250 μg/ml
氢化可的松	Sigma	H6909	55.2nM (20 μg/L)
3,3′,5-三碘代-L-甲状腺素	Sigma	T5516	13 ng/L

RPE-MM+PGE2

成分	供应商	目录号	最终浓度
MEM Alpha	Thermo Fisher	12571-063	94%
胎牛血清	Hyclone	SH30071.03	5%
CTS™ N-2补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
MEM非必需AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
牛磺酸	Sigma	T4571	250μg/ml
氢化可的松	Sigma	H6909	55.2nM(20μg/L)

3,3′,5-三碘代-L-甲状腺素	Sigma	T5516	13ng/L
PGE2	Tocris	2296	100μM

RPE-MM XF+PGE2

成分	供应商	目录号	最终浓度
MEM Alpha	Thermo Fisher	12571-063	94%
CTS™ KnockOut™ SR XenoFree Kit	Thermo Fisher	A1099201	5%
CTS™ N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
牛磺酸	Sigma	T4571	250 μg/ml
氢化可的松	Sigma	H6909	55.2nM (20 μg/L)
3,3′,5-三碘代-L-甲状腺素	Sigma	T5516	13 ng/L
PGE2	Tocris	2296	100μM

RPE-MM解冻

成分	供应商	目录号	最终浓度
MEM Alpha	Thermo Fisher	12571-063	94%
胎牛血清	Hyclone	SH30071.03	5%
CTS™ N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
牛磺酸	Sigma	T4571	250 μg/ml
氢化可的松	Sigma	H6909	55.2nM (20 μg/L)

3,3′,5-三碘代-L-甲状腺素	Sigma	T5516	0.013μg/L
Y-27632	Tocris	1254	10μM

RPE-MM XF解冻

成分	供应商	目录号	最终浓度
MEM Alpha	Thermo Fisher	12571-063	94%
CTS™ KnockOut™ SR XenoFree Kit	Thermo Fisher	A1099201	5%
CTS™ N-2 补充剂	Thermo Fisher	A13707-01	1%
MEM 非必需 AA	Thermo Fisher	11140	0.1mM
丙酮酸钠	Thermo Fisher	11360-070	1mM
牛磺酸	Sigma	T4571	250 μg/ml
氢化可的松	Sigma	H6909	55.2nM (20 μg/L)
3,3′,5-三碘代-L-甲状腺素	Sigma	T5516	13 ng/L
Y-27632	Tocris	1254	10μM

[0194] 此外,可以向培养基中添加Blebbistatin(例如,约2.5μM),以通过促进聚集体形成来增加光感受器并保持纯度。也可以使用ROCK抑制剂代替Blebbistatin来提高分离成单细胞后的光感受器细胞存活率,例如通过使用TRYPLE™。

C.细胞的冷冻保存

[0195] 通过本文公开的方法产生的RPE、光感受器细胞或PRP可以冷冻保存,参见例如PCT公开号2012/149484 A2,其通过引用并入本文。细胞可以在有或没有基底的情况下冷冻保存。在几个实施方案中,储存温度的范围为约-50℃至约-60℃、约-60℃至约-70℃、约-70℃至约-80℃、约-80℃至约-90℃、约-90℃至约-100℃,以及它们的重叠范围。在某些实施方案中,使用较低的温度用于冷冻保存细胞的储存(例如,维持)。在几个实施方案中,使用液氮(或其他类似的液体冷却剂)来存储细胞。在进一步的实施方案中,将细胞储存大于约6小时。在另外的实施方案中,将细胞储存约72小时。在几个实施方案中,将细胞储存48小时至约1周。在另一些实施方案中,将细胞储存约1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周。在进一步的实施方案中,将细胞储存1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月。细胞也可以储存更长时间。细胞可以单独冷冻保存或在基底上冷冻保存,例如本文公开的任何基底。

[0196] 在某些实施方案中,可以使用另外的冷冻保护剂。例如,细胞可以在包含一种或多种冷冻保护剂例如DM80、血清白蛋白例如人或牛血清白蛋白的冷冻保存溶液中冷冻保存。在某些实施方案中,所述溶液包含约1%、约1.5%、约2%、约2.5%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%或约10%的DMSO。在其他实施方案中,所述溶液包含约1%至约3%、约2%至约4%、约3%至约5%、约4%至约6%、约5%至约7%、约6%至约8%、约7%至约9%或约8%至约10%二甲基亚砜(DMSO)或白蛋白。在特定实施方案中,所述溶液包含2.5%DMSO。在另一个具体实施方案中,所述溶液包含10% DMSO。

[0197] 在冷冻保存过程中,可以例如以约1℃/分钟将细胞冷却。在某些实施方案中,冷冻保存温度为约-80℃至约-180℃,或约-125℃至约-140℃。在某些实施方案中,在以约1℃/分钟冷却之前,将细胞冷却至4℃。冷冻保存的细胞可以在解冻使用之前转移到液氮的气相。在某些实施方案中,例如,一旦细胞达到约-80℃,就将它们转移到液氮储存区。冷冻保存也可以使用控制速率的冷冻机进行。冷冻保存的细胞可以解冻,例如在约25℃至约40℃的温度下解冻,通常在约37℃的温度下解冻。

D.抑制剂

WNT途径抑制剂

[0198] WNT是一个高度保守的分泌信号传导分子家族,其调节细胞间的相互作用并与果蝇体节极性基因wingless有关。在人中,WNT基因家族编码38至43kDa的富含半胱氨酸的糖蛋白。WNT蛋白具有疏水性信号序列、保守的天冬酰胺连接的寡糖共有序列(参见例如Shimizu等人,Cell Growth Differ 8:1349-1358(1997))和22个保守的半胱氨酸残基。由于WNT蛋白能够促进细胞质β-连环蛋白的稳定化,因此可以作为转录激活剂并抑制细胞凋亡。特定WNT蛋白的过度表达已被证明与某些癌症有关。

[0199] 本文中的WNT抑制剂(也称为WNT途径抑制剂)是指总的WNT抑制剂。因此,WNT抑制剂是指WNT家族蛋白成员包括Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt4、Wnt5A、Wnt6、Wnt7A、Wnt7B、Wnt8A、Wnt9A、Wnt10a、Wnt11和Wnt16的任何抑制剂。本发明方法的某些实施方案涉及分化

培养基中的WNT抑制剂。本领域已知的合适的WNT抑制剂的实例包括N-(2-氨基乙基)-5-氯异喹啉-8-磺酰胺二盐酸盐(CKI-7)、N-(6-甲基-2-苯并噻唑基)-2-[(3,4,6,7-四氢-4-氧代-3-苯基噻吩并[3,2-d]嘧啶-2-基)硫代]-乙酰胺(IWP2)、N-(6-甲基-2-苯并噻唑基)-2-[(3,4,6,7-四氢-3-(2-甲氧基苯基)-4-氧代噻吩并[3,2-d]嘧啶-2-基)硫代]-乙酰胺(IWP4)、2-苯氧基苯甲酸-[(5-甲基-2-呋喃基)亚甲基]酰肼(PNU 74654)、2,4-二氨基-喹唑啉、槲皮素、3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-硫代吡喃酮[4,3-d]嘧啶-4-酮(XAV939)、2,5-二氯-N-(2-甲基-4-硝基苯基)苯磺酰胺(FH 535)、N-[4-[2-乙基-4-(3-甲基苯基)-5-噻唑基]-2-吡啶基]苯甲酰胺(TAK 715)、Dickkopf相关蛋白1(DKK1)和分泌型卷曲相关蛋白1(SFRP1)。此外,WNT抑制剂可包括针对WNT的显性负性变体的抗体以及抑制WNT表达的siRNA和反义核酸。也可以使用RNA介导的干扰(RNAi)实现对WNT的抑制。

BMP途径抑制剂

[0200] 骨形态发生蛋白(BMP)是多功能生长因子,属于转化生长因子β(TGFβ)超家族。BMP被认为构成了一组关键的形态发生信号,协调身体结构。病理过程中失调的BMP信号传导的多种作用强调了BMP信号在生理学中的重要作用。

[0201] BMP途径抑制剂(本文也称为BMP抑制剂)通常可包括BMP信号传导抑制剂或对BMP1、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP10或BMP15具有特异性的抑制剂。示例性BMP抑制剂包括4-(6-(4-(哌嗪-1-基)苯基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)喹啉盐酸盐(LDN193189)、6-[4-[2-(1-哌啶基)乙氧基]苯基]-3-(4-吡啶基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶二盐酸盐(Dorsomorphin)、4-[6-[4-(1-甲基乙氧基)苯基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基]-喹啉(DMH1)、4-[6-[4-[2-(4-吗啉基)乙氧基]苯基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基]喹啉(DMH-2)和5-[6-(4-甲氧基苯基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基]喹啉(ML 347)。

TGFβ途径抑制剂

[0202] 转化生长因子β(TGFβ)是一种分泌蛋白,控制大多数细胞的增殖、细胞分化和其他功能。它是一种细胞因子,在免疫、癌症、支气管哮喘、肺纤维化、心脏病、糖尿病和多发性硬化症中发挥作用。TGF-β至少存在三种同种型,分别称为TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3。TGF-β家族是一个被称为转化生长因子β超家族的蛋白质超家族的一部分,其中包括抑制素、激活素、抗苗勒管激素(anti-müllerian hormone)、骨形态发生蛋白、decapentaplegic和Vg-1。

[0203] TGFβ途径抑制剂(本文也称为TGFβ抑制剂)通常可包括TGFβ信号传导抑制剂中的任一种。例如,TGFβ抑制剂是4-[4-(1,3-苯并二噁唑(benzodioxol)-5-基)-5-(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]苯甲酰胺(SB431542)、6-[2-(1,1-二甲基乙基)-5-(6-甲基-2-吡啶基)-1H-咪唑-4-基]喹喔啉(SB525334)、2-(5-苯并[1,3]二氧杂-5-基-2-ieri-丁基-3H-咪唑-4-基)-6-甲基吡啶盐酸盐水合物(SB-505124)、4-(5-苯并[1,3]二氧杂-5-基-4-吡啶-2-基-1H-咪唑-2-基)-苯甲酰胺水合物、4-[4-(1,3-苯并二噁唑-5-基)-5-(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]-苯甲酰胺水合物、左右决定因子(Lefty)、3-(6-甲基-2-吡啶基)-N-苯基-4-(4-喹啉基)-1H-吡唑-1-硫代甲酰胺(A 83-01)、4-[4-(2,3-二氢-1,4-苯并二氧杂苯-6-基)-5(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]苯甲酰胺(D 4476)、4-[4-[3-(2-吡啶基)-1H-吡唑-4-基]-2-吡啶基]-N-(四氢-2H-吡喃-4-基)-苯甲酰胺(GW 788388)、4-[3-(2-吡啶基)-1H-吡唑-4基]-喹啉(LY 364847)、4-[2-氟-5-[3-(6-甲基-2-吡啶基)-1H-吡唑-4-基]苯基]-1H-吡啶-1-乙醇(R 268712)或2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶(RepSox)。

MEK抑制剂

[0204] MEK抑制剂是一种抑制促分裂原活化蛋白质激酶MEK1或MEK2的化学物质或药物。它们可用于影响MAPK/ERK途径。例如,MEK抑制剂包括N-[(2R)-2,3-二羟基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-苯甲酰胺(PD0325901)、N-[3-[3-环丙基-5-(2-氟-4碘苯胺基)-6,8-二甲基-2,4,7-三氧代吡啶并[4,3-d]嘧啶-1-基]苯基]乙酰胺(GSK1120212)、6-(4-溴-2-氟苯胺基)-7-氟-N-(2-羟基乙氧基)-3-甲基苯并咪唑-5-甲酰胺(MEK162)、N-[3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘代苯胺基)-6-甲氧基苯基]-1-(2,3-二羟基丙基)环丙烷-1-磺酰胺(RDEA119)和6-(4-溴-2-氯苯胺基)-7-氟-N-(2-羟基乙氧基)-3-甲基苯并咪唑-5-甲酰胺(AZD6244)。

γ-分泌酶抑制剂

[0205] γ-分泌酶是一种多亚基蛋白酶复合物,本身是一种完整的膜蛋白,在跨膜结构域内的残基处切割单程跨膜蛋白。这类蛋白酶被称为膜内蛋白酶。γ-分泌酶最著名的底物是淀粉样前体蛋白,一种大的整合膜蛋白,当被γ-和β-分泌酶切割时,产生一种短的氨基酸肽,称为β-淀粉样蛋白,其异常折叠的纤维状形式是阿尔茨海默病患者大脑中淀粉样斑块的主要成分。

[0206] 本文中的γ-分泌酶抑制剂是指总的γ-分泌酶抑制剂。例如,γ-分泌酶抑制剂包括但不限于N-[(3,5-二氟苯基)乙酰基]-L-丙氨酰基-2-苯基]甘氨酸-1,1-二甲基乙酯(DAPT)、5-氯-N-[(1S)-3,3,3-三氟-1-(羟甲基)-2-(三氟甲基)丙基]-2-噻吩磺酰胺(Begacestat)、MDL-28170、3,5-双(4-硝基苯氧基)苯甲酸(化合物W)、7-氨基-4-氯-3-甲氧基-1H-2-苯并吡喃(JLK6)、(5S)-(叔丁氧基羰基氨基)-6-苯基-(4R)-羟基-(2R)-苄基己酰基)-L-亮氨酰基-L-苯丙氨酸酰胺(L-685,485)、(R)-2-氟-α-甲基[1,1'-联苯]-4-乙酸((R)-氟比洛芬;Flurizan)、N-[(1S)-2-[[(7S)-6,7-二氢-5-甲基-6-氧代-5H-二苯并[b,d]氮杂卓-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代乙基]-3,5-二氟苯乙酰胺(二苯并氮卓;DBZ)、N-[顺-4-[(4-氯苯基)磺酰基]-4-(2,5-二氟苯基)环己基]-1,1,1-三氟甲烷磺酰胺(MRK560)、(2S)-2-[[(2S)-6,8-二氟-1,2,3,4-四氢-2-萘基]氨基]-N-[1-[2-[(2,2-二甲基丙基)氨基]-1,1-二甲基乙基]-1H-咪唑-4-基]戊酰胺二氢溴酸盐(PF3084014氢溴酸盐)和2-[(1R)-1-[[(4-氯苯基)磺酰基](2,5-二氟苯基)氨基]乙基-5-氟苯丁酸(BMS299897)。

细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂

[0207] 细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)是一个糖激酶家族,因其在调节细胞周期中的作用而首次被发现。它们还参与调节转录、mRNA加工和神经细胞分化。在许多人癌症中,CDK过度活跃或CDK抑制蛋白不起作用。CDK抑制剂可以是CDK1、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK8和/或CDK9抑制剂。在特定方面,CDK抑制剂是CDK4/6抑制剂。

[0208] CDK抑制剂可包括但不限于帕博西尼(Palbociclib,PD-0332991)HCl、Roscovitine(塞利西利,CYC202)、SNS-032(BMS-387032)、Dinaciclib(SCH727965)、夫拉平度(Flavopiridol,阿伏西地(Alvocidib))、MSC2530818、JNJ-7706621、AZD5438、MK-8776(SCH 900776)、PHA-793887、BS-181HCl、A-674563、阿贝西利(abemaciclib,LY2835219)、BMS-265246、PHA-767491或嘧西利(Milciclib,PHA-848125)。

bFGF抑制剂

[0209] 碱性成纤维细胞生长因子(也称为bFGF、FGF2或FGF-β)是成纤维细胞生长因子家

族的成员。bFGF存在于基底膜中和血管内皮下细胞外基质中。此外，bFGF是人ESC培养基的常见成分，该成分对于保持细胞的未分化状态是不可缺少的。

[0210] 本文中的bFGF抑制剂是指总的bFGF抑制剂。例如，bFGF抑制剂包括但不限于N-[2-[[4-(二乙基氨基)丁基]氨基-6-(3,5-二甲氧基苯基)吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基]-N'-(1,1-二甲基乙基)脲(PD173074)、2-(2-氨基-3-甲氧基苯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮(PD98059)、1-叔丁基-3-[6-(2,6-二氯苯基)-2-[[4-(二乙基氨基)丁基]氨基]吡啶并[2,3-d]吡啶-7-基]脲(PD161570)、6-(2,6-二氯苯基)-2-[[4-[2-(二乙基氨基)乙氧基]苯基]氨基]-8-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮二盐酸盐一水合物(PD166285)、N-[2-氨基-6-(3,5-二甲氧基苯基)吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基]-N'-(1,1-二甲基乙基)-脲(PD166866)和MK-2206。

IV.RPE-光感受器细胞/光感受器前体双层培养

[0211] 在特定方面，RPE可以在任何合适的培养表面上培养，特别是允许移植的培养表面，例如在符合GMP的条件下在支架上培养。在特定方面，将RPE在涂覆有ECM(例如，玻连蛋白)的表面例如多孔板(例如6孔板、12孔板、24孔板、48孔板或96孔板)上培养，或在TRANSWELL支持物上的涂覆有聚合物(例如聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA))的支架(例如，snapwell插件)上培养。RPE也可以在胶原蛋白或层粘连蛋白上培养。在特定方面，培养表面涂覆有高浓度的玻连蛋白，例如大于1μg/cm^2，特别是2μg/cm^2、3μg/cm^2、4μg/cm^2、5μg/cm^2、6μg/cm^2、7μg/cm^2、8μg/cm^2、9μg/cm^2、10μg/cm^2或更大。RPE可在包含牛磺酸、氢化可的松和牛磺酸的培养基中培养，例如本文所述的RPE-MM培养基。在特定方面，培养基是无血清培养基或确定成分培养基，并且可以包括KNOCKOUT血清替代品。RPE可以以100,000个细胞/cm^2至500,000个细胞/cm^2的密度培养，例如150,000个细胞/cm^2、200,000个细胞/cm^2、250,000个细胞/cm^2、300,000个细胞/cm^2或350,000个细胞/cm^2，特别是约300,000个细胞/cm^2。

[0212] 在某些方面，可以培养RPE以产生对Bestrophin和/或ZO1呈阳性的极化RPE。极化RPE对PRE65和/或Ezrin呈阳性。RPE可来源于hiPSC且可以是成熟的，例如对PMEL17、TYRP1和CRALBP呈阳性的RPE。成熟RPE，例如通过上述方法培养的第42天RPE，可以直接培养或者可以解冻(如果预先冷冻保存)。然后可以将RPE培养足以使RPE极化的一段时间，例如1周、2周、3周、4周、5周或更长。特别地，RPE可培养20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天以极化。

[0213] 在RPE顶部成层的光感受器可能是不成熟的光感受器，未来可能变为视杆或视锥。具体地，光感受器可以衍生自本文所述的混合分化方法。光感受器可以从培养物或冷冻保存物直接接种到RPE上，或者它们可以在接种到RPE上之前重新铺板和培养。可以将光感受器接种在RPE上，然后培养3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或更多天，以允许附着和产生清晰双层。光感受器可以以50万个细胞/cm^2、1百万个细胞/cm^2、2百万个细胞/cm^2、3百万个细胞/cm^2、4百万个细胞/cm^2、5百万个细胞cm^2、6百万个细胞/cm^2、7百万个细胞s/cm^2、8百万个细胞/cm^2、9百万个细胞/cm^2、1千万个细胞/cm^2或更多的密度接种。具体地，光感受器可以以约3百万个细胞/cm^2的密度接种。在特定实施方案中，光感受器来源于hiPSC，而不是来源于类器官的分选。被接种的光感受器可以基本上是没有聚集体的单个细胞。RPE可在包含牛磺酸、氢化可的松和牛磺酸的培养基中培养，例如本文所述的RPE-MM培养基。在特定方面，培

养基是无血清培养基或确定成分培养基，并且可以包括KNOCKOUT血清替代品。

[0214] 在某些方面，可以在添加光感受器之前将ROCK抑制剂、ECM蛋白和/或前列腺素E2(PGE2)添加到RPE培养物中，例如用于增加光感受器对RPE的附着。ROCK抑制剂可以是Y-27632。ECM蛋白可以是层粘连蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白、纤连蛋白或玻连蛋白，特别是层粘连蛋白-521。ROCK抑制剂、ECM蛋白或PGE2可以在添加光感受器之前至少10分钟添加，例如30分钟、60分钟或90分钟。

[0215] 所述清晰双层中光感受器与RPE的比例可以是1:1、1:2、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1或30:1。

V.双层PR/PRP:RPE共培养的用途

[0216] PR/PRP:RPE双层培养物可用于移植，例如细胞拯救疗法或全组织替代疗法。某些实施方案可以提供PR/PRP:RPE双层培养物增强对其有需求的任何病况包括视网膜变性或严重损伤的眼组织维护和修复的用途。视网膜变性可能与以下相关：年龄相关性黄斑变性(AMD)、遗传性黄斑变性、Stargardt黄斑营养不良、Best病、脉络膜缺损、遗传性视网膜变性(包括视网膜色素变性、视锥/视杆和视杆/视锥营养不良)、糖尿病性视网膜病变、视网膜血管病、早产儿视网膜病变(ROP)引起的损害、眼睛的病毒感染和其他视网膜/眼部疾病或损伤/创伤。

[0217] 在另一方面，本公开内容提供了一种治疗有需要的个体的方法，包括将包含PR/PRP:RPE双层的组合物移植到所述个体。所述组合物可以施用至眼睛，例如视网膜下空间。这些个体可能具有遗传性黄斑或视网膜变性，例如视网膜色素变性、视锥/视杆或视杆/视锥营养不良、Stargardt病、Best病、脉络膜缺损、视网膜发育不良、视网膜变性、糖尿病性视网膜病变、先天性视网膜营养不良、莱伯氏先天性黑朦、视网膜脱离、早产儿视网膜病变(ROP)引起的损害、或其他视网膜创伤或损伤。

[0218] 为了确定细胞组合物对治疗施用的适用性，可以首先在合适的动物模型(例如啮齿动物或猪)中测试细胞。在一个方面，评估PR/PRP:RPE双层培养物在体内存活和维持其表型的能力。将组合物移植到免疫缺陷动物(例如裸小鼠或大鼠或通过化学或辐射使其免疫缺陷的动物)。生长一段时间后收获组织，并评估是否仍存在多能干细胞衍生的细胞。

[0219] 本文所述的人PR/PRP:RPE双层培养物或包括所述双层的药物组合物可用于制备用于治疗有需要的患者病况的药物。光感受器或RPE可以预先冷冻保存。在某些方面，所公开的光感受器或RPE源自于iPSC，因此可用于为眼病患者提供“个性化药物”。在某些实施方案中，可对从患者获得的体细胞进行基因工程以纠正致病突变，分化为PR/PRP或RPE，并进行改造以形成PR/PRP:RPE双层培养物。该组织可用于替换同一患者的内源性变性的PR/PRP和RPE。可替代地，可以使用从健康供体或HLA纯合“超级供体”产生的iPSC。

[0220] 通过引入使用本文公开的方法获得的PR/PRP:RPE双层培养物，可以治疗或预防多种眼部病况。这些病况包括通常与视网膜功能障碍或变性有关的视网膜疾病或病症、视网膜损伤、和/或视网膜色素上皮和/或光感受器损失。可治疗的病况包括但不限于视网膜退行性疾病，例如Stargardt黄斑营养不良、视网膜色素变性、视杆/视锥和视锥/视杆营养不良、黄斑变性(例如年龄相关性黄斑变性、近视性黄斑变性或其他后天性或遗传性黄斑变性)、早产儿视网膜病变(ROP)和糖尿病性视网膜病变引起的视网膜损伤。其他病况包括莱伯氏先天性黑朦、遗传性或后天性黄斑或视网膜变性、Best病、视网膜脱离、回旋萎缩、脉络

膜缺损、模式性营养不良、其他光感受器细胞营养不良，以及由于光、激光、炎性、感染性、辐射、新生血管性或创伤性损伤中的任何一种造成的损伤引起的视网膜损伤。在某些实施方案中，提供了用于治疗或预防以视网膜变性为特征的病况的方法，包括向有需要的受试者施用有效量的包含PR/PRP:RPE双层培养物的组合物。这些方法可以包括选择患有一种或多种这些病况的受试者，并施用足以治疗病况和/或改善病况症状的治疗有效量的PR/PRP:RPE双层培养物。PR/PRP:RPE双层培养物可以以各种形式移植。例如，可以将粘附在基质、细胞外基质或基体(例如可生物降解聚合物)上的PR/PRP:RPE双层培养物引入目标位置。

[0221] 有利地，本公开内容的药物制剂可用于补偿RPE和/或PR/PRP细胞功能的缺乏或减少。可通过本发明的视网膜细胞群和方法治疗的视网膜功能障碍的实例包括但不限于：光感受器变性(如发生在例如视网膜色素变性、视锥营养不良、视锥视杆和/或视杆视锥营养不良、遗传性和年龄相关性或近视性黄斑变性中)；视网膜脱离和视网膜创伤；激光或阳光引起的光损伤；黄斑裂孔；黄斑水肿；夜盲症和色盲；糖尿病或血管闭塞引起的缺血性视网膜病变；早产儿/早产引起的视网膜病变/视网膜损伤；传染性疾病，例如CMV、视网膜炎和弓形虫病；炎性疾病，例如葡萄膜炎；肿瘤，例如视网膜母细胞瘤和眼部黑色素瘤。

[0222] 在一个方面，所述细胞可以治疗或减轻需要治疗的患者的遗传性视网膜变性的症状，所述遗传性视网膜变性例如视网膜色素变性、视锥/视杆或视杆/视锥营养不良、莱伯氏先天性黑朦或视网膜损伤/创伤/破损。在另一方面，所述细胞可以治疗或减轻需要这种治疗的患者的后天性或遗传性黄斑变性的症状，所述后天性或遗传性黄斑变性例如年龄相关性黄斑变性(湿性或干性)、Stargardt病、Best病、近视性黄斑变性等。对于所有这些治疗，细胞可以是患者的自体或异体细胞。在另一方面，本公开内容的细胞可以与其他治疗组合施用。

[0223] 在某些实施方案中，所述PR/PRP:RPE双层培养物可用于适合接受再生医学的受试者的自体移植物。PR/PRP:RPE双层培养物可与其他视网膜细胞联合移植。通过所公开的方法产生的PR/PRP:RPE双层培养物的移植可以通过本领域已知的各种技术进行。根据一个实施例，如下进行移植：进行睫状体平坦部手术方法然后通过小的视网膜开口将细胞递送到视网膜下空间，或通过直接注射进行。PR/PRP:RPE双层培养物可以作为粘附在基质(例如细胞外基质)上或在基体(例如可生物降解聚合物)上提供的形式引入目标位置。

[0224] PR/PRP:RPE双层培养物可用于生成神经感觉视网膜结构。这些结构可用于药物筛选、用作疾病模型或用作或用于药物制剂。在后一种情况下，药物制剂可以是RPE光感受器移植物，其可以被布置在生物相容性固体支持物或基质(优选生物可吸收的基质或支持物)上，可以像“贴片”一样植入。

[0225] 为了进一步说明，细胞的生物相容性支持物可以是用于RPE的可生物降解的合成膜支持物，例如聚酯。可生物降解聚酯可以是适合用作支持视网膜祖细胞增殖和分化的基体或支架的任何可生物降解聚酯。聚酯应能形成薄膜，优选微纹理薄膜，并且如果用于组织或细胞移植，则应该是可生物降解的。用于本发明的合适的可生物降解聚酯包括聚乳酸(PLA)，聚丙交酯，均聚和共聚的聚羟基链烷酸酯，例如聚羟基丁酸酯(PHB)，聚羟基丁酸酯-共-羟基戊酸酯(PHBV)、聚羟丁酸酯-共-羟基己酸酯(PHBHx)、聚羟基丁酸酯-共-羟基辛酸酯(PHBO)和聚羟基丁酸酯-共-羟基十八烷酸酯(PHBOd)，聚己内酯(PCL)，聚酯酰胺(PEA)，脂肪族共聚酯，例如聚丁二酸丁二醇酯(PBS)和聚丁二酸-己二酸丁二酯(PBSA)；芳香族共

聚酯。可以使用高分子量和低分子量聚酯，取代的和未取代的聚酯，嵌段、支化或无规的聚酯，以及聚酯混合物和共混物。

[0226] 还提供了通过本文公开的方法制备的PR/PRP:RPE双层培养物的药物组合物。这些组合物可以包括至少约$1x10^3$个细胞、约$1x10^4$个细胞、约$1x10^5$个细胞、约$1x10^6$个细胞、约$1x10^7$个细胞、约$1x10^8$个细胞或约$1x10^9$个细胞。在某些实施方案中，所述组合物是基本上纯化的(相对于非PR/PRP:RPE细胞)制剂，其包含通过本文公开的方法产生的分化的PR/PRP:RPE细胞。还提供了组合物，其包括支架、作为聚合物载体和/或细胞外基质的PR/PRP和通过本文公开的方法产生的有效量的光感受器:RPE细胞。基质材料通常在生理上是可接受的，并且适合在体内应用中使用。例如，生理上可接受的材料包括但不限于可吸收和/或不可吸收的固体基质材料，例如小肠粘膜下层(SIS)、交联或非交联藻酸盐、水胶体、泡沫、胶原凝胶、胶原海绵、聚乙醇酸(PGA)网、羊毛和生物粘合剂。

[0227] 合适的聚合物载体还包括由合成或天然聚合物形成的多孔网或海绵，以及聚合物溶液。例如，基质是聚合物网或海绵，或聚合物水凝胶。可使用的天然聚合物包括蛋白质，例如胶原蛋白、白蛋白和纤维蛋白；和多糖，例如藻酸盐和透明质酸聚合物。合成聚合物包括可生物降解聚合物和不可生物降解聚合物。例如，可生物降解聚合物包括羟基酸的聚合物，例如聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)和聚乳酸-乙醇酸(PGLA)；聚原酸酯、聚酸酐、聚磷腈及其组合。不可生物降解聚合物包括聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、乙烯-醋酸乙烯酯和聚乙烯醇。

[0228] 可使用可形成有延展性的离子或共价交联水凝胶的聚合物。水凝胶是有机聚合物(天然或合成)通过共价键、离子键或氢键交联以产生三维晶格结构时形成的一种物质，所述结构可捕获水分子形成凝胶。可用于形成水凝胶的材料的实例包括离子交联的多糖，例如藻酸盐、聚磷嗪(polyphosphazine)和聚丙烯酸酯，或嵌段共聚物，例如分别通过温度或H交联的聚环氧乙烷-聚丙二醇嵌段共聚物PLURON1CS™或TETRON1CS™。其他材料包括蛋白质例如纤维蛋白、聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮、透明质酸和胶原蛋白。

[0229] 可任选地将药物组合物包装在适当的容器中，并附有用于所需目的的书面说明，例如重建光感受器功能以改善视网膜组织的疾病或异常。在某些实施方案中，由所公开的方法产生的光感受器可用于替换有需要的受试者的变性的光感受器细胞。

VI.试剂盒

[0230] 在某些实施方案中，提供了一种试剂盒，该试剂盒可以包括例如用于产生PR/PRP:RPE双层培养物的一种或多种培养基和组分。这种制剂可以包括视网膜分化因子和/或营养因子的混合物，其形式适合与光感受器前体细胞或光感受器细胞结合。试剂系统可在适当的情况下以水培养基或冻干形式包装。试剂盒的容器装置通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其他容器装置，可将组分置于其中，并且优选适当等分。如果试剂盒中有多个组分，试剂盒通常还将包含第二个、第三个或其他另外的容器，另外的组分可单独置于其中。然而，小瓶中可以包括各种组分的组合。试剂盒的组分可以作为干粉提供。当试剂和/或组分以干粉形式提供时，可以通过添加合适的溶剂来重构粉末。考虑了还可以在另一容器装置中提供溶剂。试剂盒通常还将包括一种将一种或多种试剂盒组分封闭起来用于商业销售的工具。这种容器可以包括注塑或吹塑的塑料容器，在其中保持所需的小瓶。试剂盒还可包括使用说明书(例如，用于双层培养物疗法)，例如以印刷或电子格式，例如数字格式。

VII.实施例

[0231] 包括以下实施例用于说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解,以下实施例中公开的技术代表发明人发现的在本发明实践中起良好作用的技术,因此可以认为构成其实践的优选模式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所公开的具体实施方案进行许多改变,并且仍然获得相似或类似的结果。

实施例1-双层培养的开发

[0232] 在极化RPE上接种PRP:使用CD56阴性选择根据本文所述的方法使源自于iPSC的RPE生长(参见PCT/US2016/050554),并且使源自于iPSC的PRP根据混合眼泡PRP分化方法(参见PCT/US2019/028557)生长。RPE在第42天解冻,并在48孔板中以100,000或300,000个细胞/cm^2允许极化直至第68天。此时,将第75天的PRP从层粘连蛋白-521涂覆的容器中取出,并以6百万个细胞/mL重新悬浮在RPE-MM中。将PRP在RPE-MM中以3百万个细胞/cm^2(0.5mL培养基体积)接种在RPE的顶部,无培养基修饰。

[0233] 一天后,通过相差显微镜明显观察到所有条件下PRP都附着至RPE层。代表性的输入PRP流式图和附着后的显微照片如图1所示。在两种RPE密度和两种PRP输入细胞的情况下,PRP都附着至RPE,无论在接种PRP之前是否进行30分钟的层粘连蛋白-521培养。此外,RPE和PRP似乎保持为不同的层(图2)。RPE-MM中PRP对RPE的附着以及共培养7天后两种细胞类型的明显存在表明这种形式是双层培养物疗法的潜在坚实基础。

[0234] 将PRP解冻并接种到极化RPE上:为了直接使用PRP并最小化同时培养和使RPE和PRP成熟的复杂时间挑战,将PRP直接解冻到极化RPE层上。此外,因为PRP层是汇合前的,所以在两种不同的密度下测试PRP铺板:3百万个细胞/cm^2和1千万个细胞/cm^2。在第42天解冻RPE,并允许其极化直至第68天。第75天将PRP成功解冻到在RPE-MM中的RPE层上,无需任何Blebbistatin或ROCK抑制剂。培养7天后,将细胞固定,免疫细胞化学显示双层形态(图3)。此外,流式细胞术数据还显示两种细胞类型为不同的群体,大多数RPE表达成熟的Bestrophin1$^+$表型(图4)。

[0235] 该实验证明了双层培养产物的若干进步。首先,PRP可以直接解冻到RPE上,允许模块化过程,其中PRP产品可以储存起来,然后在所需的时间使用。RPE和PRP形成不同的层,这表明这种形式既可用作将这种细胞双层植入视网膜的治疗,也可用作简易的体外模型。最后,以高密度(1×10^7个细胞/cm^2)接种PRP产生接近汇合的PRP层。该实验显示了汇合PRP层的条件是可实现的。

[0236] Snap-well形式的RPE/PRP共培养物:RPE/PRP共培养物以Snap-well形式接种在RPE-MM和用15% KNOCKOUT血清替代品(KOSR)代替5% FBS的RPE-MM中。在第42天以300,000个细胞/cm^2接种RPE,并使其极化直至第68天。将PRP以1×10^7个细胞/cm^2解冻到RPE上。一些样品的铺板使用含有15%KOSR的RPE-MM代替RPE-MM。培养7天后,通过流式细胞术或免疫细胞化学分析细胞(图5)。该实验表明了在Snap-well插件上以及在含有FBS和KOSR的RPE-MM中共培养RPE/PRP的可行性。

[0237] PLGA支架上的RPE/PRP共培养:接下来,在Snap-well培养系统中组装的涂覆有玻连蛋白(VTN)的PLGA支架上进行共培养。在第42天以300,000个细胞/cm^2接种RPE,并使其极化直至第68天。PRP以两种密度解冻:5×10^6个细胞/cm^2和1×10^7个细胞/cm^2。培养7天后,通

过免疫细胞化学和共聚焦显微镜分析细胞(图6)。本实验证实了在涂覆有VTN的PLGA支架上培养RPE/PRP双层的可行性,并证实了在较低(5×10^6个细胞/cm^2)和较高(1×10^7个细胞/cm^2)细胞密度下接种后的PRP形态,较高密度实现了PRP层的接近汇合。

[0238] 将RPE和PRP作为双层培养的能力证明了这种培养形式用于基于细胞的疗法的可行性。与单独的RPE或PRP相比,这种"双重疗法"可适用于治疗更广泛的病况,因为这两种细胞类型是以清晰的、适当分层的结构存在和组织的,PR覆盖在极化RPE上。此外,PRP可以直接解冻到RPE上,因此这两种细胞类型可以独立制备并冷冻保存。双重疗法的这一特点将能够在模块化系统中使用不同的PRP亚型(例如,视杆倾向的或视锥倾向的)。

实施例2-优化PRP连接

[0239] 在将RPE解冻到48孔板上之前,与0.5μg/cm^2的玻连蛋白浓度相比,10μg/cm^2的玻连蛋白浓度导致更好的PRP附着于RPE(图13)。该实验还说明了PRP铺板密度的影响,因为在0.5μg/cm^2的玻连蛋白浓度时,与1千万个PRP/cm^2相比,在3百万PRP/cm^2铺板时PRP更好地附着。

[0240] Snapwell培养物体积调整:调整Snapwell培养物中的培养基体积,使得Snapwell的上(顶部)侧的来自培养基的压力较低或Snapwell的下(底部)侧的来自培养基的压力较低。增加Snapwell底侧的体积,从而增加该侧的压力,对培养有两个影响。首先,细胞双层更容易与Snapwell分离。第二,PRP似乎更强地附着于RPE,如通过用活检打孔器将样品打孔后的完整PRP覆盖所证明的(图8)。

[0241] PRP密度滴定:在48孔板中对RM1中的RPE上的PRP的密度滴定显示,随着接种密度的增加,PRP的面积覆盖率增加,但在约5百万PRP/cm^2以上,PRP因剥离而脱离(图7)。这一趋势表明,改善RPE/PRP附着的另一种方法是降低PRP密度。虽然优选高PRP:RPE比(理想情况下为30:1),但较低的PRP密度可实现附着。

[0242] 总之,对培养基或培养系统的几项修改似乎定性地改善RPE/PRP细胞粘附。RPE层下方较高浓度的玻连蛋白也改善了PRP的附着。Snapwell下侧的更大的培养基体积也改善了PRP附着。最后,降低PRP密度可以改善PRP附着。当密度低于3百万PRP/cm^2时,PRP以集落而不是以网络聚集。

实施例3-RPE-PRP双层体内移植

[0243] 开发了一种由RPE和PRP细胞双层组成的双重眼细胞疗法。在猪眼睛中进行双重疗法PLGA-RPE-PRP的移植,并通过免疫细胞化学分析移植物。

[0244] 手术前,在制备在PLGA支架上RPE和PRP双层。简而言之,将RPE(第42天)解冻并以3×10^5个细胞/cm^2铺板和接种在PLGA支架上。将RPE培养26天(直到第68天分化)以允许RPE极化,包括从第54天到第68天添加PGE2。在RPE第68天,将PRP(第75天或第77天)作为单细胞以4×10^6个细胞/cm^2铺板在RPE上。培养细胞双层7天,每1-2天进行培养基(RPE-MM)交换。

[0245] 手术前两天,用532/577微脉冲激光对一些猪视网膜进行激光照射,该激光具有很短的占空度(1%-3%)和阈值能量(几乎看不到损伤),从而限制能量释放到外视网膜。激光能量被宿主RPE摄取并破坏光感受器。在激光处理前5至8天开始,猪还用免疫抑制药物进行处理,并持续接受免疫抑制药物直到安乐死当天。

[0246] 在手术当天,对猪进行麻醉、插管、麻痹并准备进行视网膜下移植。准备双重疗法双层样品用于手术。制备0.42%的Healon-GV溶液,并通过上下拉动穿过针(18G)约30-50次

而均匀化。将几滴所述溶液置于切割垫上。从6孔板中取出Snapwell插件，在HBSS+中洗涤，并置于一滴Healon-GV溶液上。使用8mm活检打孔器将整个Snapwell插件底部打孔。用镊子或刮刀从PLGA-RPE-PRP层机械去除Snapwell插件塑料底。使用2x4mm椭圆形活检打孔器再次将PLGA-RPE-PRP打孔，并将其转移到0.42％ Healon-GV的液滴中。此时，将2x4mm打孔的PLGA-RPE-PRP移植物装载到视网膜下注射工具中(图9A)。

[0247] 视网膜下注射工具装填透明质酸溶液(例如Healon-GV)。注射器产生压力以将液体吸入工具，注射器还控制将样品加载到工具的前部。在外科医生进行睫状体平坦部玻璃体切除术和准备两步2.4mm操作口以准备视网膜下移植时，将样品加载到工具中。

[0248] 使用视网膜下注射工具将PLGA-RPE-PRP移植物递送至视网膜下空间。术中光学相干断层扫描(iOCT)成像证实了样品递送至视网膜下空间。确认样品递送成功后，进行流体/空气/气体交换。外科医生缝合操作口并移除眼睛中的其他无缝合手术端口。手术后，每两周进行OCT成像以监测猪视网膜。

[0249] 在足够的时间以允许移植物移植到宿主视网膜后，通过组织学对眼睛进行分析。通过将眼睛冷冻切片进行组织学检查。简而言之，将解剖的眼睛嵌入Optimal Cutting Temperature(OCT)化合物中，冷冻，并使用低温切片机垂直于视网膜进行切片。切片样品安装在Superfrost Plus载玻片上。切片按顺序编号，使得切片编号对应于视网膜的中间/外侧区域。

[0250] 对切片的猪视网膜进行免疫细胞化学后，视杆和视锥的标记物都很明显(图9)。人RPE通过MITF指示在感光层附近明显可见(图10)。还通过恢复蛋白指示光感受器的存在(图11)。移植细胞区域中表达GFAP的细胞为人细胞核阴性，是宿主Muller胶质细胞。宿主Muller胶质细胞试图重塑外界膜，但停止在移植的RPE层(图12)。通过突触前标记物VGLUT1与移植的光感受器的接近程度以及PKCα所指示的宿主双极细胞的接近程度指示了移植细胞与宿主视网膜整合的可能性(图13)。突触前标记物突触生长蛋白在移植细胞中也很明显，并似乎与视锥标记物Arrestin-3共定位(图14)。

[0251] RPE/PRP双层成功移植到猪视网膜的视网膜下空间。手术后，移植的PRP成熟为视杆光感受器和视锥光感受器，移植的RPE和PRP移植到宿主视网膜中，并似乎准备整合。整合能力的证据得到了在所移植的光感受器附近突触前标记物的存在以及宿主双极细胞迁移到所移植的光感受层中的支持。

[0252] 本文公开和要求保护的所有方法都可以根据本公开内容在无需过度实验的情况下进行和执行。虽然已经根据优选实施方案描述了本发明的组合物和方法，但是对于本领域技术人员来说显而易见的是，在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下，可以对本文所述的方法和所述方法的步骤或步骤序列进行改变。更具体地，显而易见的是，化学和生理相关的某些试剂可以替代本文所述的试剂，同时可以获得相同或类似的结果。本领域技术人员显而易见的所有此类类似替代和修改都被认为在所附权利要求书所定义的本发明的精神、范围和概念内。

参考文献

以下参考文献在其提供示例性程序或其他补充本文所述内容的细节的范围内，通过引用具体并入本文。

Alexander等人，Proc.Nat.Acad.Sci.USA，85:5092-5096，1988；

Barnea-Cramer等人,Sci Rep.6:29784,2016;
Bhutto和Lutty.Mol Aspects Med.33(4):295-317,2012;
Ercolani等人,J.Biol.Chem.,263:15335-15341,1988;
Hirami等人,Neurosci.Lett.,48:126-131,2009;
Hirami等人,Neurosci.Lett.,48:126-131,2009;
国际专利号PCT/US2016/050543;
国际专利号PCT/US2016/050554;
国际专利号PCT/US2019/028557;
国际公开号WO 98/30679;
Karin等人,Cell,36:371-379,1989;
Ludwig等人,Nat.Biotechnol.,24:185-187,2006b;
Ludwig等人,Nat.Methods,3:637-646,2006a;
Macejak和Sarnow,Nature,353:90-94,1991;
Ng,Nuc.Acid Res.,17:601-615,1989;
Oner.Turk J Ophthalmol.48(1):33-8,2018;
PCT公开号WO 2007/069666;
PCT公开号WO 2014/121077;
Pelletier和Sonenberg,Nature,334(6180):320-325,1988;
Pennington和DeAngelis,Eye Vis(Lond).3:34,2016;
Richards等人,Cell,37:263-272,1984;
Sambrook和Russel,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版.Cold Spring Harbor Lab.Press,2001;
Shimizu等人,Cell Growth Differ 8:1349-1358,1997;
Strauss等人,Physiological Reviews,85:845-881,2005;
Strauss,Physiol Rev.85(3):845-81,2005;
Takahashi等人,Cell,126,663-676,2006;
Takahashi等人,Cell,131,861-872,2007;
Thomson和Marshall,Curr.Top.Dev.Biol.,38:133-165,1998;
Thomson和Odorico,Trends Biotechnol.,18(2):53-57,2000;
Thomson等人,Proc.Natl.Acad.Scie.USA,92:7844-7848,1995;
美国专利申请号2002/0055144;
美国专利申请号2002/0076747;
美国专利申请号2009/0148425;
美国专利申请号2009/0246875.
美国专利申请号2010/0210014;
美国专利申请号2012/0196360;
美国专利申请号2012/0276636;
美国专利号4,683,202;
美国专利号5,556,954;

美国专利号5,843,780；
美国专利号5,925,565；
美国专利号5,928,906；
美国专利号5,935,819；
美国专利号6,103,470；
美国专利号6,200,806；
美国专利号6,416,998；
美国专利号6,833,269；
美国专利号7,029,913；
美国专利号7,442,548；
美国专利号7,598,364；
美国专利号7,682,828；
美国专利号7,989,425；
美国专利号8,058,065；
美国专利号8,071,369；
美国专利号8,129,187；
美国专利号8,268,620；
美国专利号8,278,620；
美国专利号8,546,140；
美国专利号8,741,648；
美国专利公开号2003/0211603；
美国专利公开号2010/0003757；
Wong等人,The Lancet Global Health.2(2):e106-e1,2014；
Yu等人,Science,318:1917-1920,2007；
Zhao等人,Development.144(8):1368-81,2017；
Zhou等人,Development.142(19):3294-306,2015。

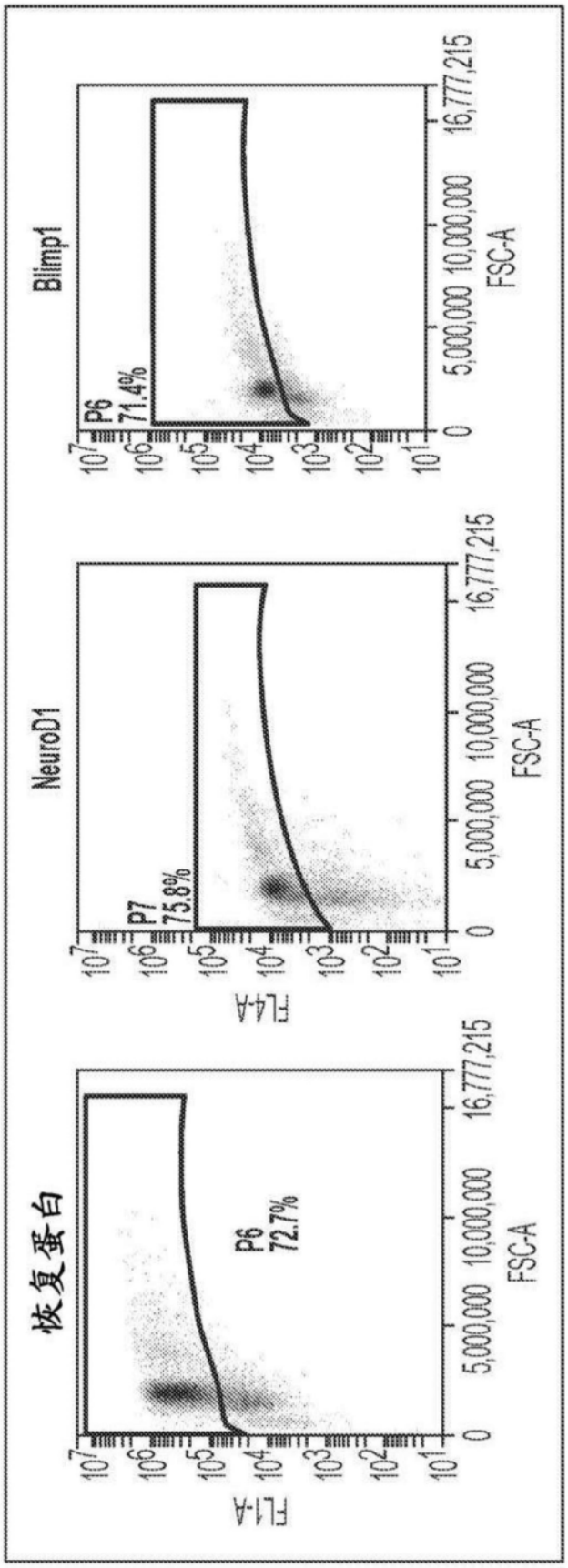

恢复蛋白
P6
72.7%
FL1-A
FSC-A
0
5,000,000
10,000,000
16,777,215
NeuroD1
P7
75.8%
FL4-A
Blimp1
P6
71.4%

图1A

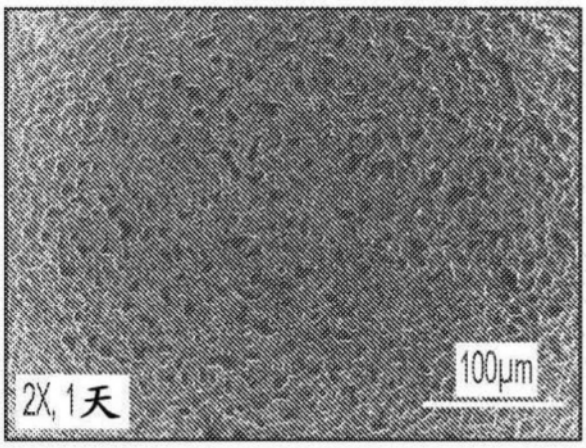


图1B

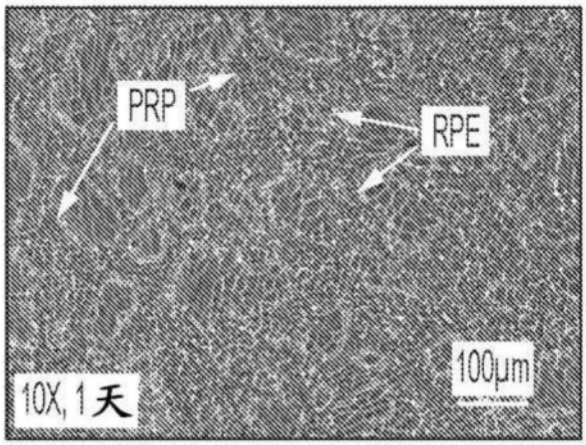


图1C

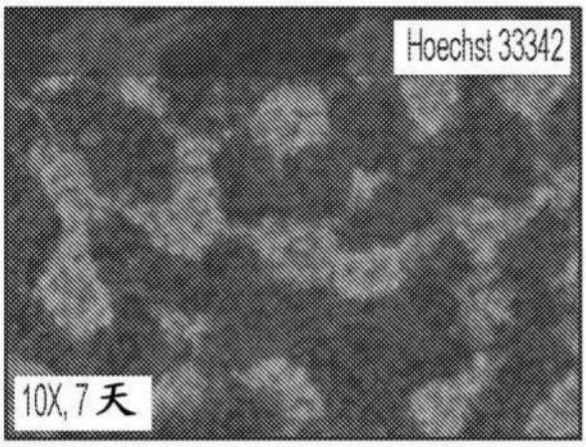


图1D

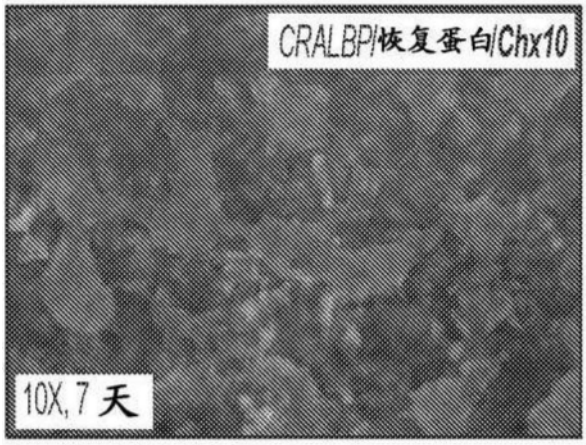


图1E

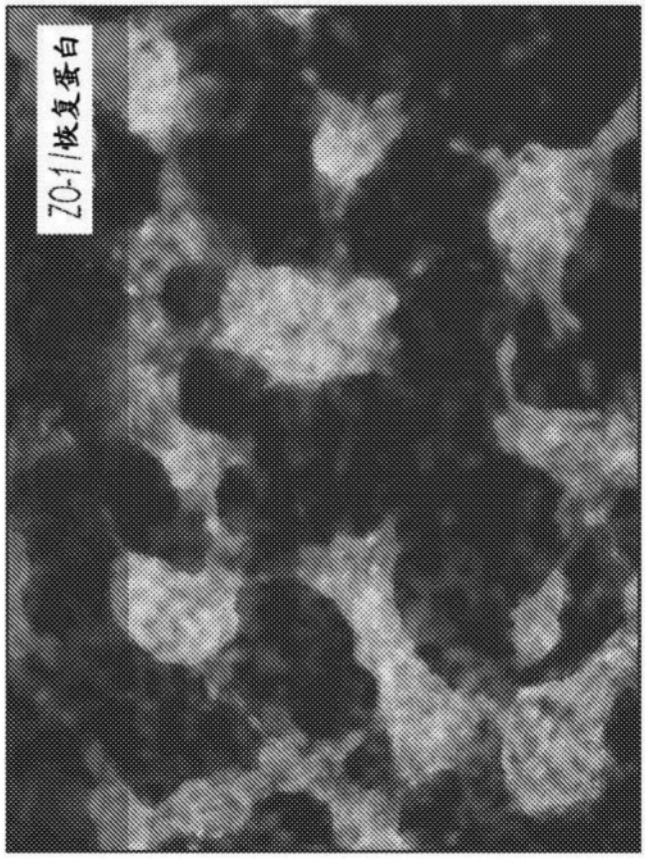


图2A

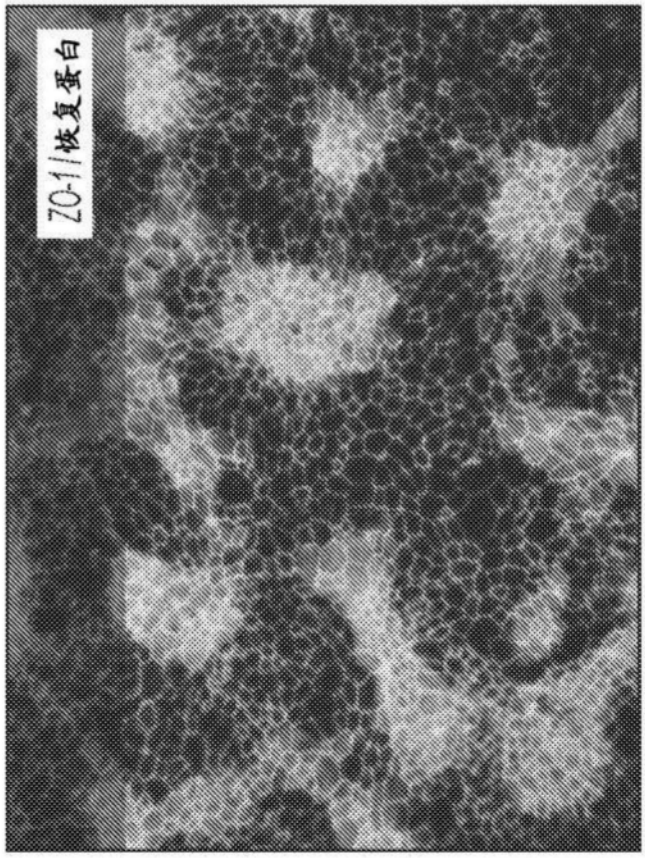


图2B

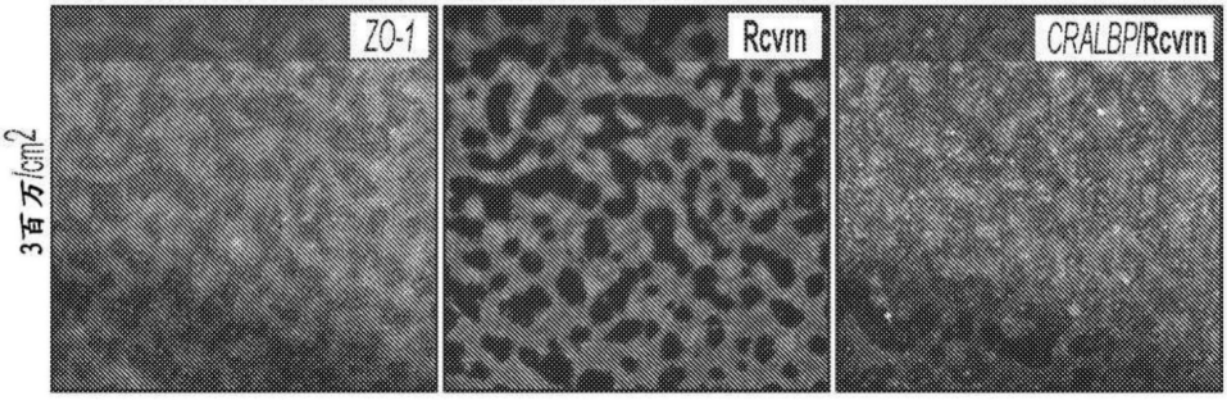


图 3A 图 3B 图 3C

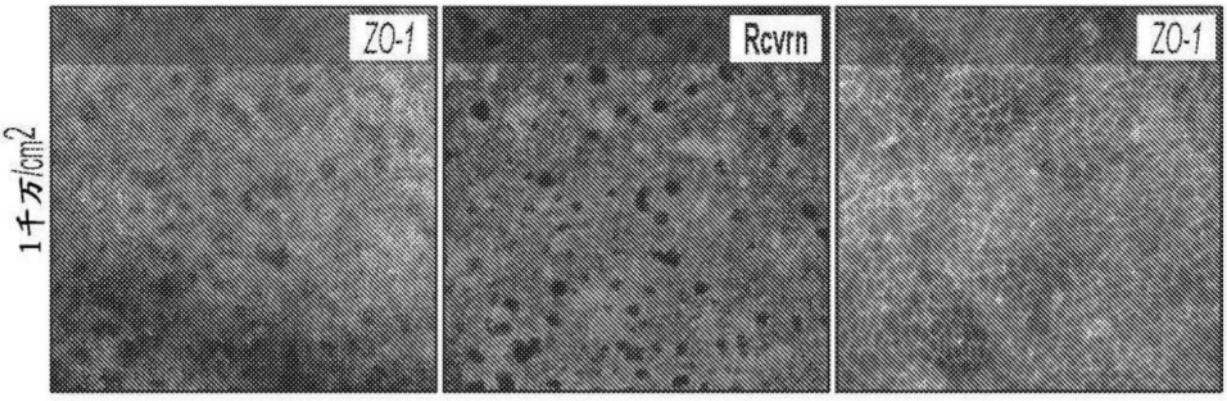


图3D 图3E 图3F



图3G



图3H

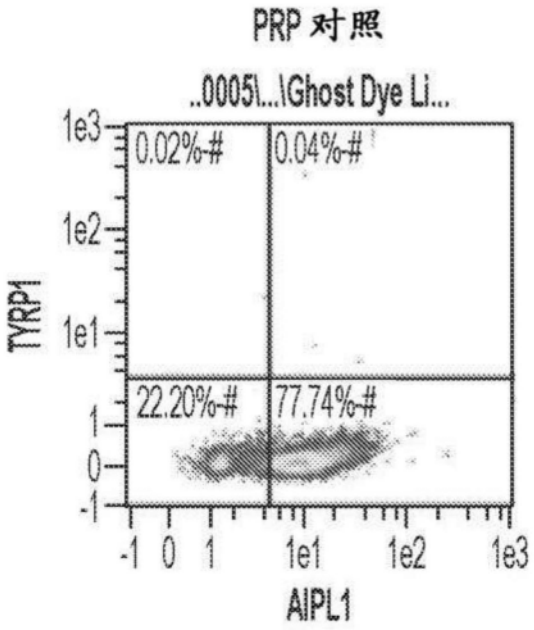

PRP 对照
..0005\...\Ghost Dye Li...
0.02%-#
0.04%-#
22.20%-#
77.74%-#
TYRP1
AIPL1
1e3
1e2
1e1
1
0
-1
-1 0 1 1e1 1e2 1e3

图4A

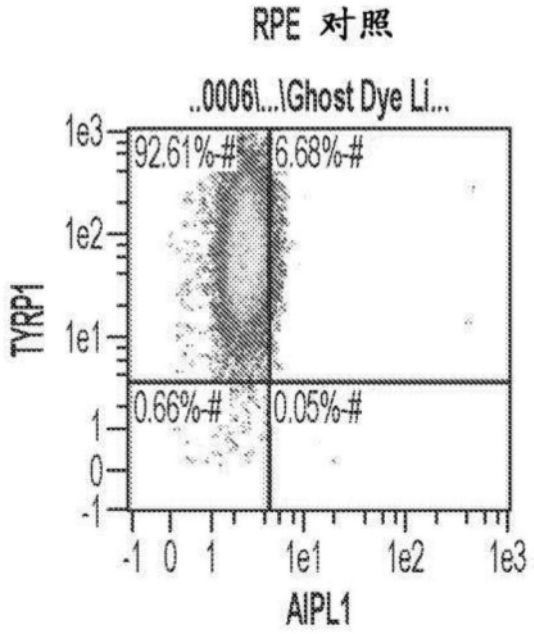

RPE 对照
..0006\...\Ghost Dye Li...
92.61%-#
6.68%-#
0.66%-#
0.05%-#
TYRP1
AIPL1
1e3
1e2
1e1
1
0
-1
-1 0 1 1e1 1e2 1e3

图4B

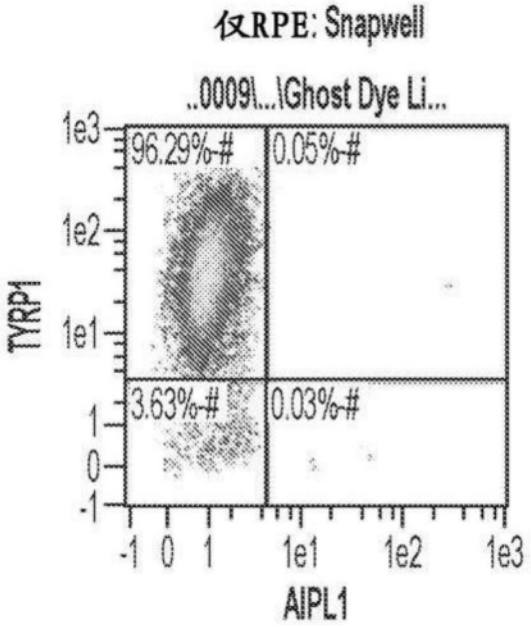

仅RPE: Snapwell
..0009\...\Ghost Dye Li...
96.29%-#
0.05%-#
3.63%-#
0.03%-#
TYRP1
AIPL1
1e3
1e2
1e1
1
0
-1
-1 0 1 1e1 1e2 1e3

图4C

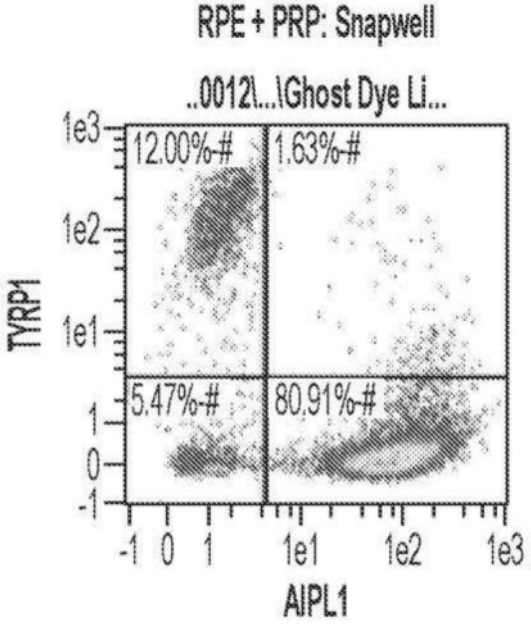

RPE + PRP: Snapwell
..0012\...\Ghost Dye Li...
12.00%-#
1.63%-#
5.47%-#
80.91%-#
TYRP1
AIPL1
1e3
1e2
1e1
1
0
-1
-1 0 1 1e1 1e2 1e3

图4D

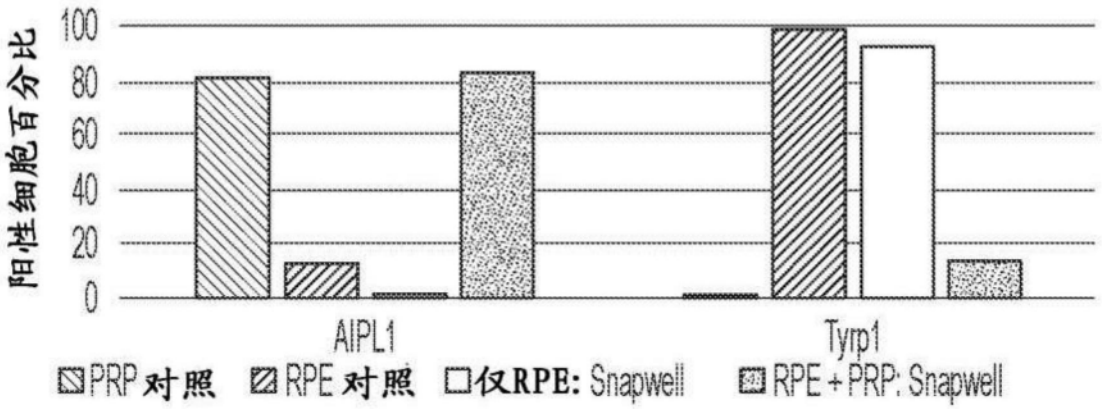

阳性细胞百分比
100
80
60
40
20
0
AIPL1
Tyrp1
PRP 对照
RPE 对照
仅RPE: Snapwell
RPE + PRP: Snapwell

图4E

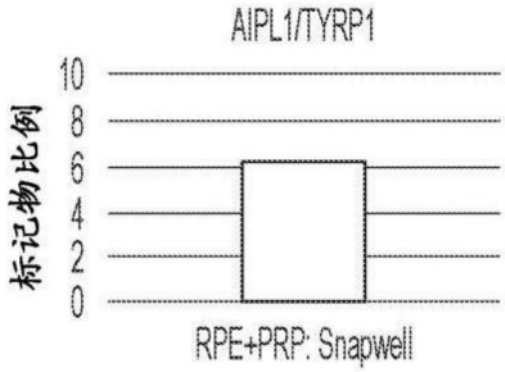

AIPL1/TYRP1
标记物比例
10
8
6
4
2
0
RPE+PRP: Snapwell

图4F

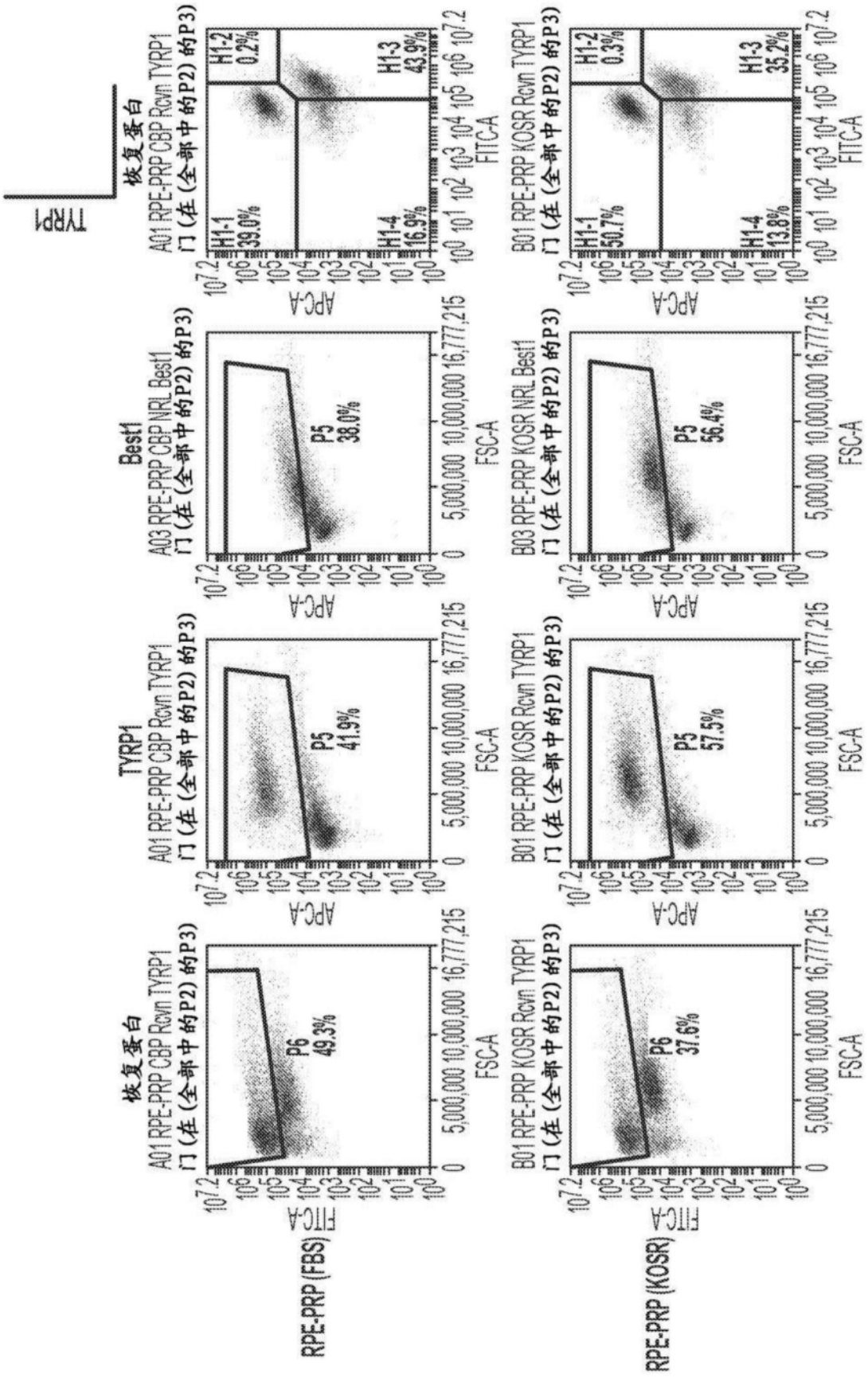

TYRP1
恢复蛋白
A01 RPE-PRP CBP Rcvn TYRP1
门 (在 (全部 中 的P2) 的P3)
P6
49.3%
FITC-A
FSC-A
RPE-PRP (FBS)
TYRP1
A01 RPE-PRP CBP Rcvn TYRP1
门 (在 (全部 中 的P2) 的P3)
P5
41.9%
APC-A
FSC-A
Best1
A03 RPE-PRP CBP NRL Best1
门 (在 (全部 中 的P2) 的P3)
P5
38.0%
APC-A
FSC-A
恢复蛋白
A01 RPE-PRP CBP Rcvn TYRP1
门 (在 (全部 中 的P2) 的P3)
H1-1
39.0%
H1-2
0.2%
H1-3
43.9%
H1-4
16.9%
APC-A
FITC-A
B01 RPE-PRP KOSR Rcvn TYRP1
门 (在 (全部 中 的P2) 的P3)
P6
37.6%
FITC-A
FSC-A
RPE-PRP (KOSR)
B01 RPE-PRP KOSR Rcvn TYRP1
门 (在 (全部 中 的P2) 的P3)
P5
57.5%
APC-A
FSC-A
B03 RPE-PRP KOSR NRL Best1
门 (在 (全部 中 的P2) 的P3)
P5
56.4%
APC-A
FSC-A
B01 RPE-PRP KOSR Rcvn TYRP1
门 (在 (全部 中 的P2) 的P3)
H1-1
50.7%
H1-2
0.3%
H1-3
35.2%
H1-4
13.8%
APC-A
FITC-A

图5A

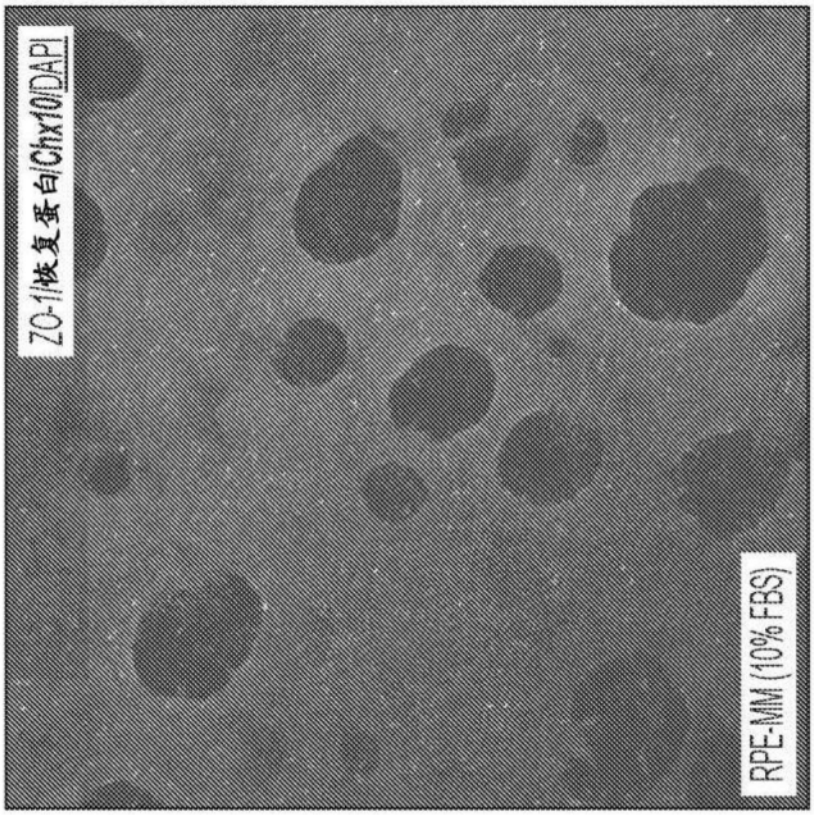


图5B

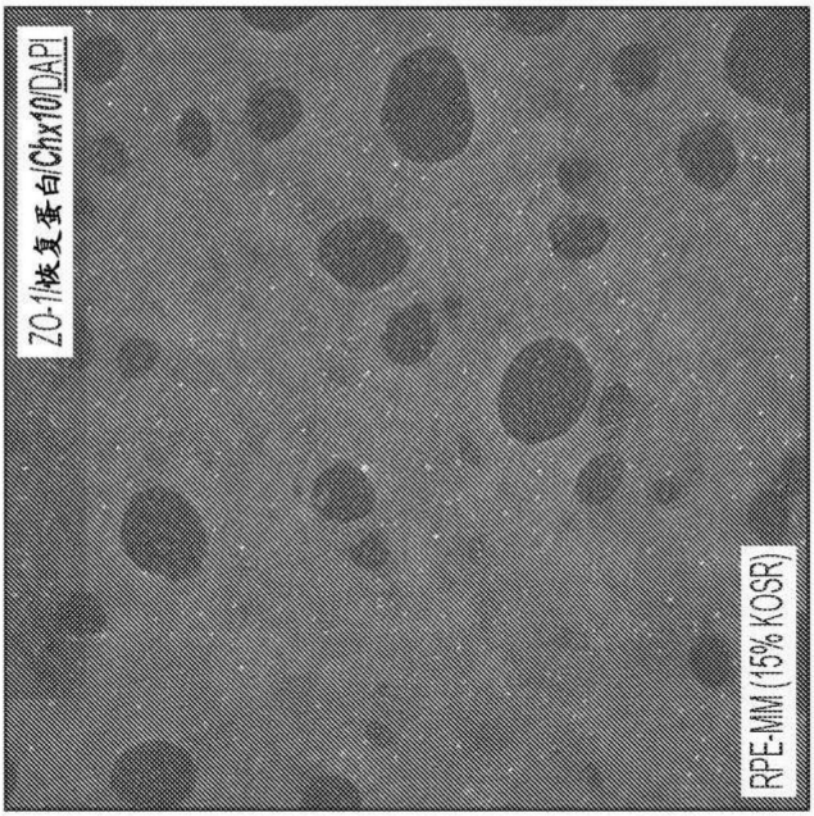

ZO-1/恢复蛋白/Chx10/DAPI
RPE-MM (15% KOSR)

图5C

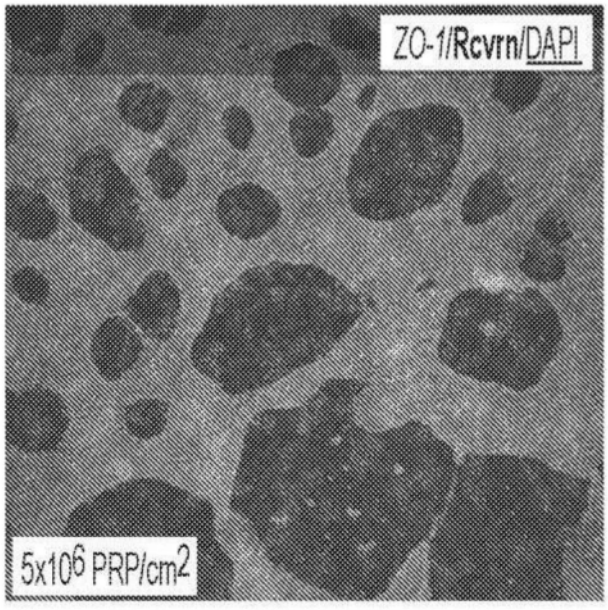

ZO-1/Rcvrn/DAPI
5x10^6 PRP/cm^2

图6A

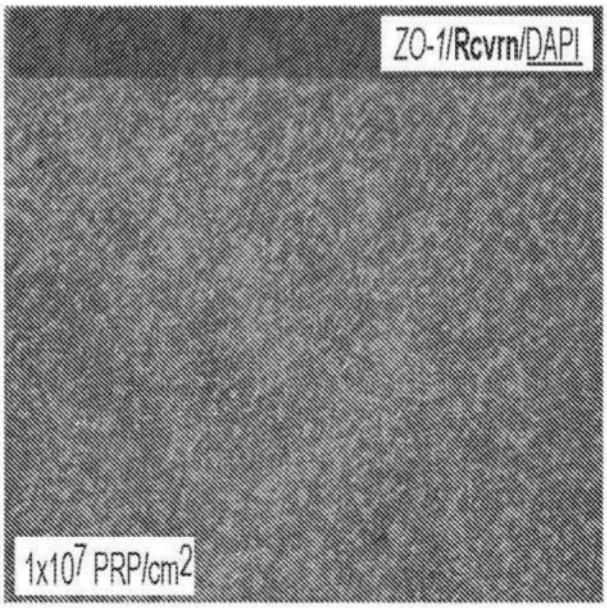

ZO-1/Rcvrn/DAPI
1x10^7 PRP/cm^2

图6B

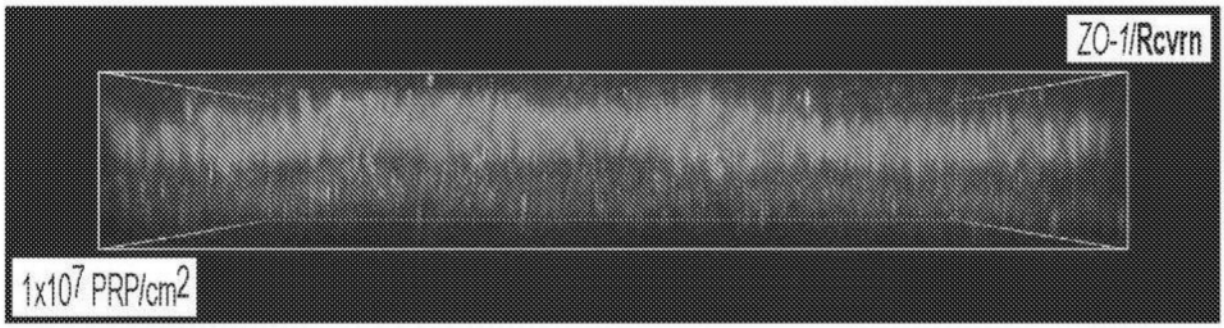

ZO-1/Rcvrn
1x10^7 PRP/cm^2

图6C

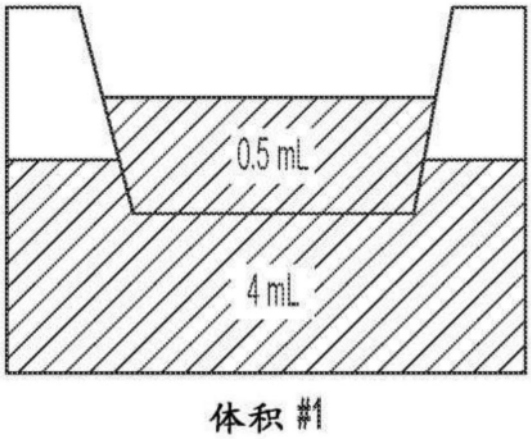

0.5 mL
4 mL
体积 #1

图7A

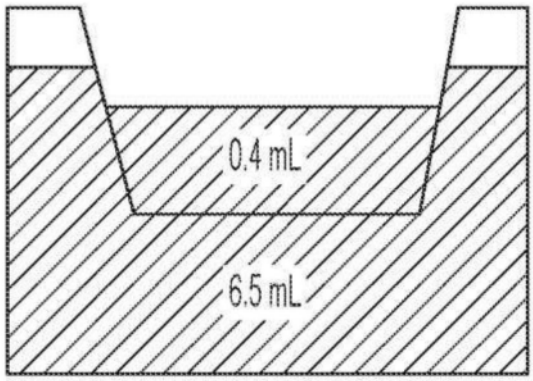


图7B

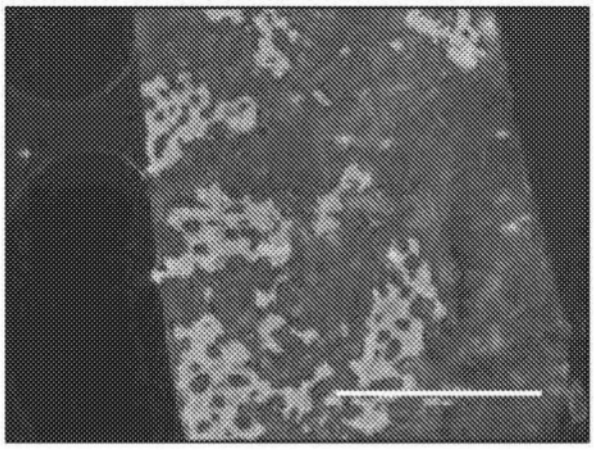


图7C

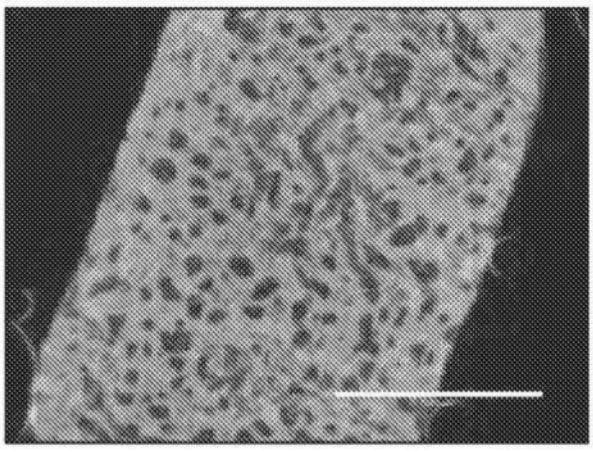


图7D

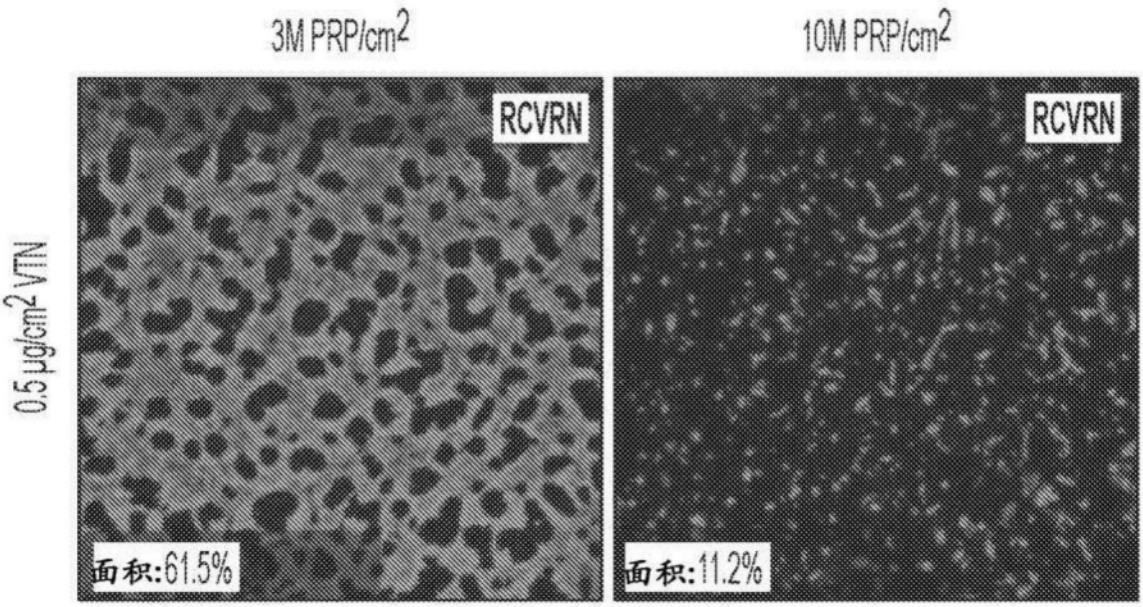


图8A 图8B

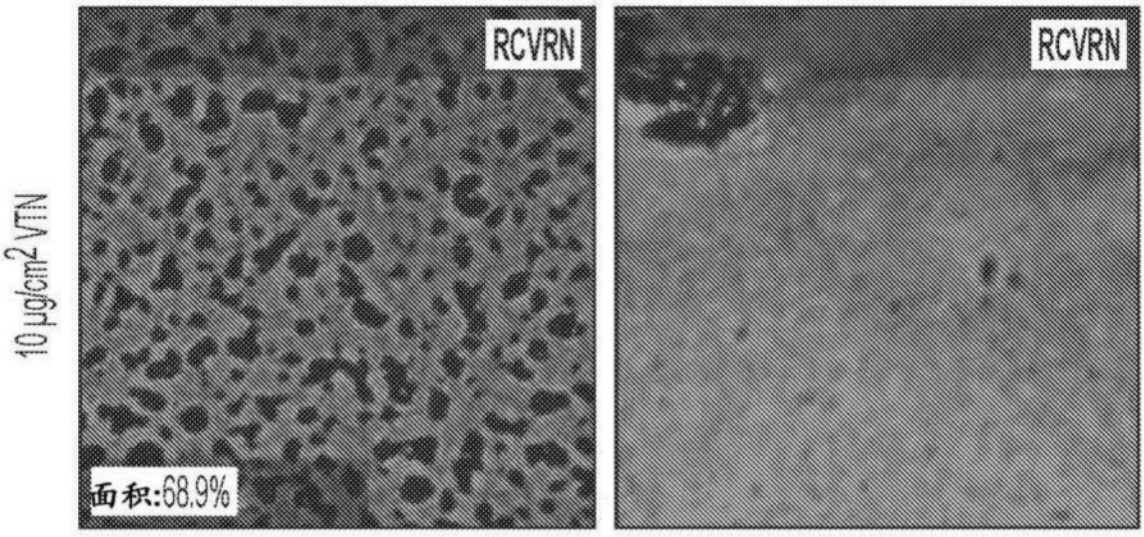


图8C 图8D

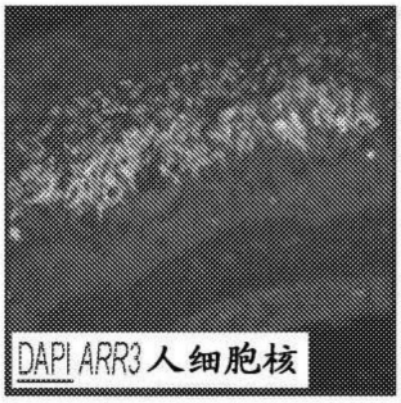


图9A

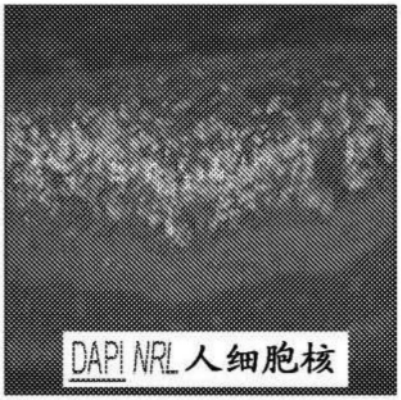


图9B

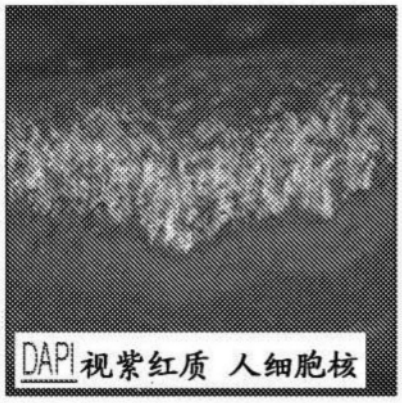


图9C

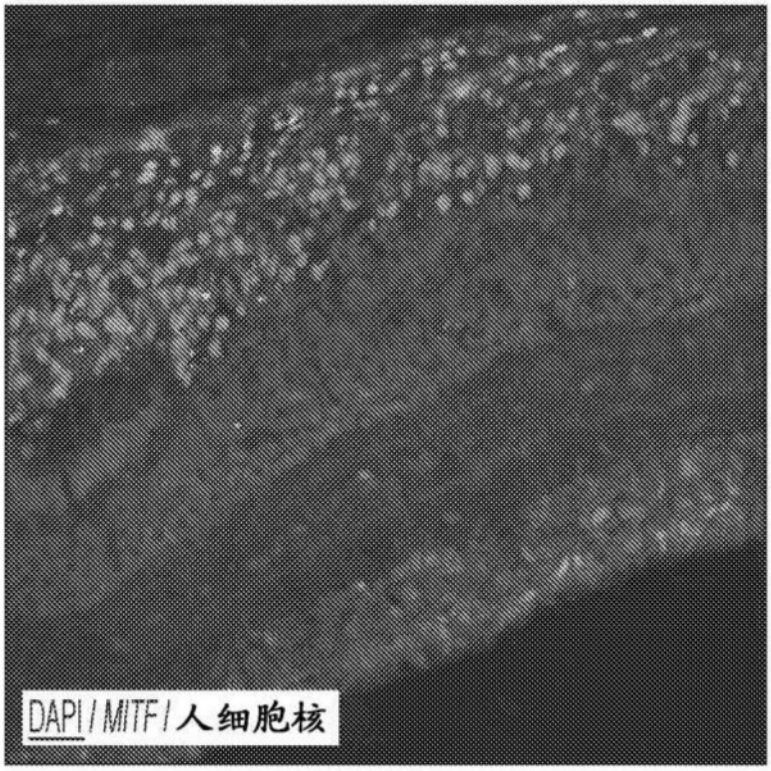


图10

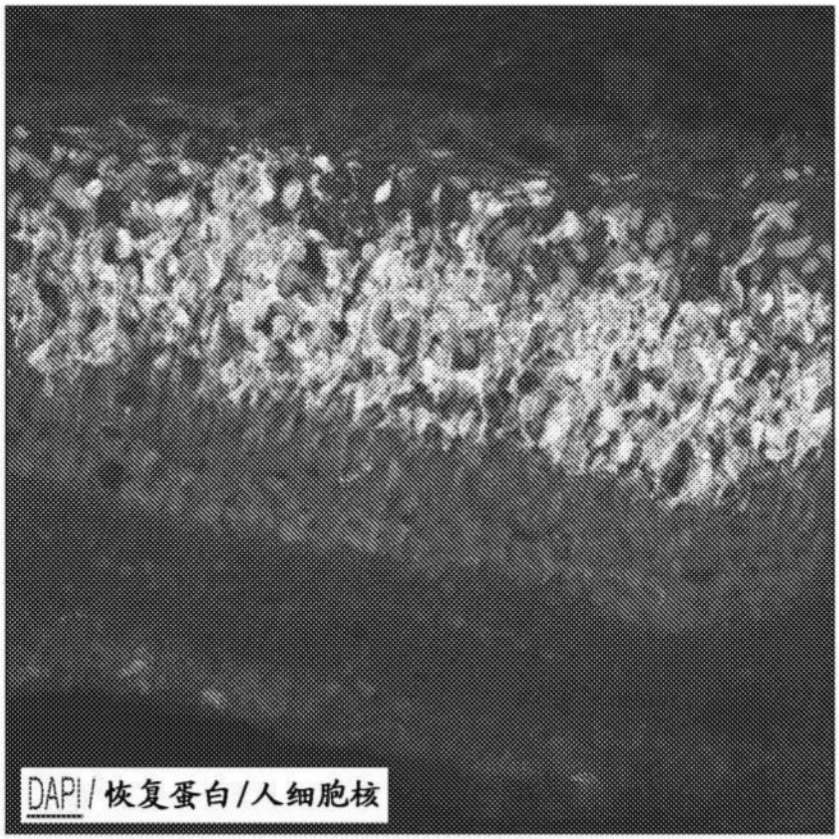


图11

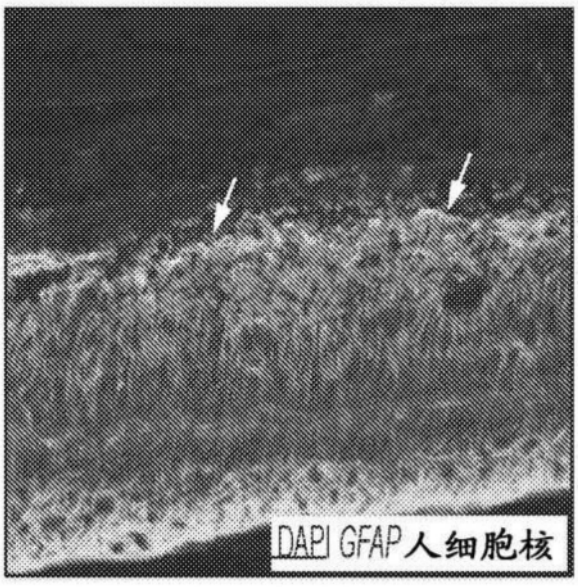


图12A

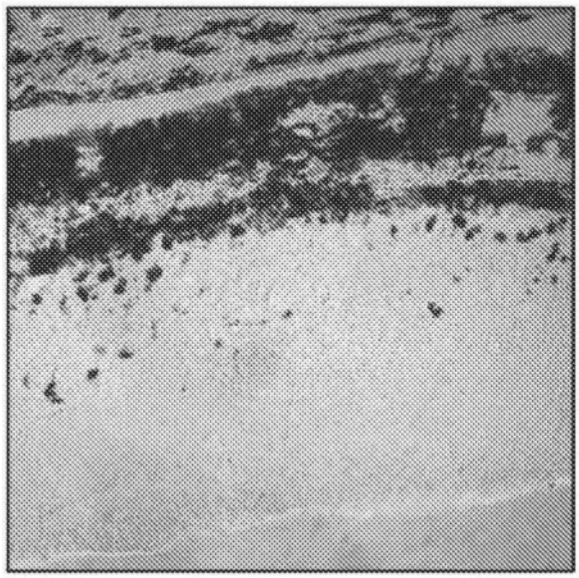


图12B

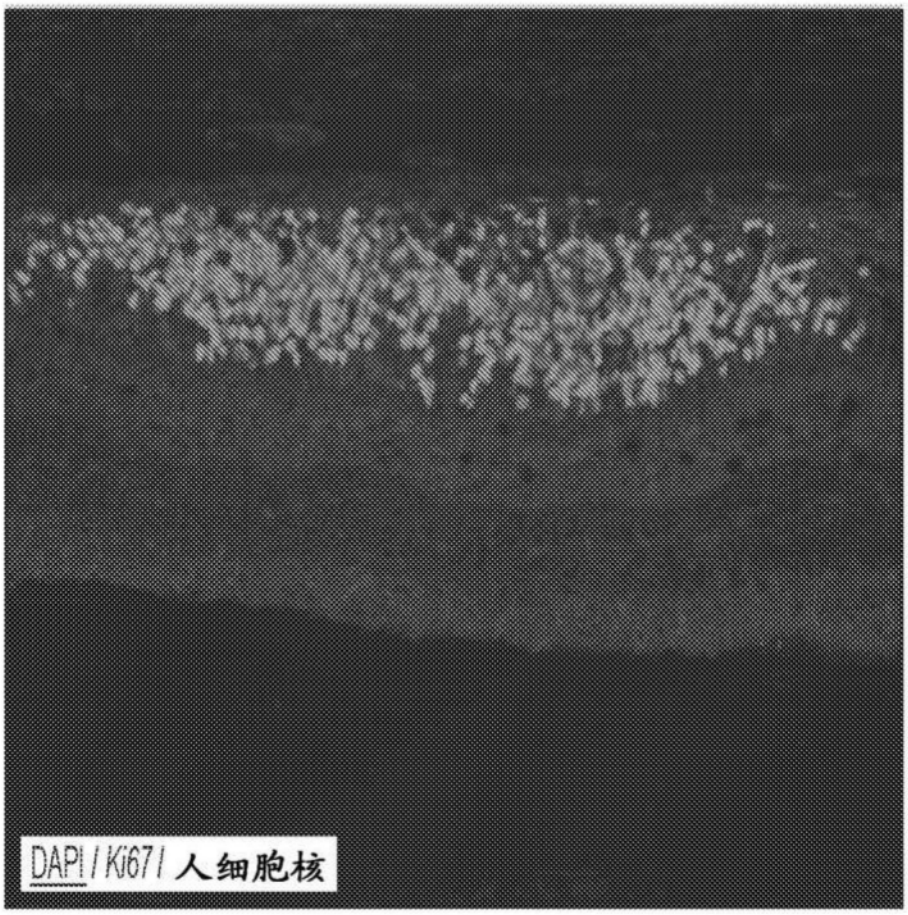


图12C

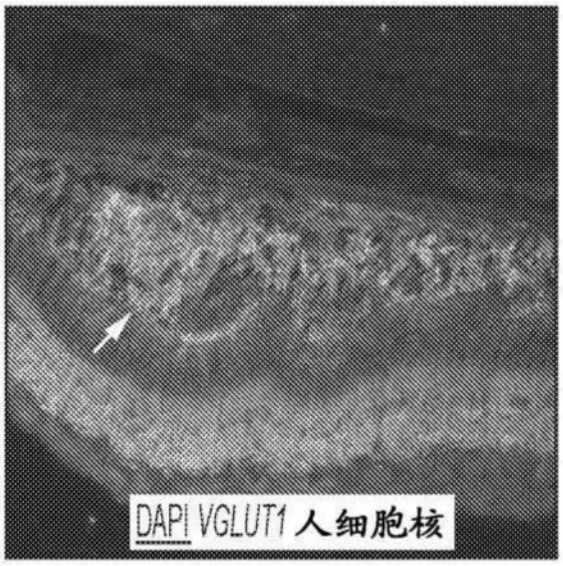


图13A

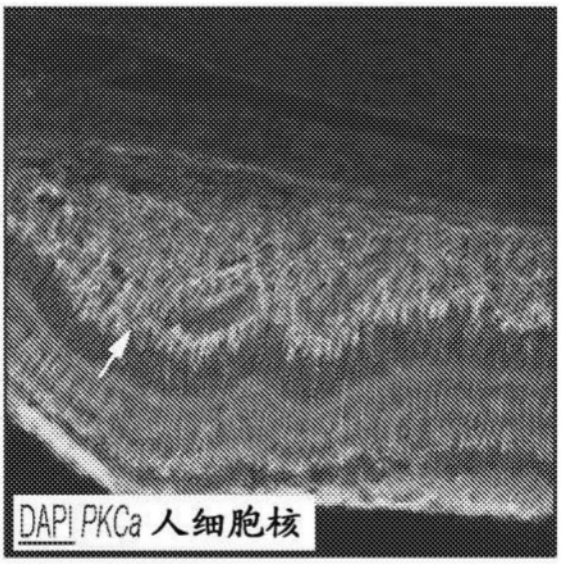


图13B

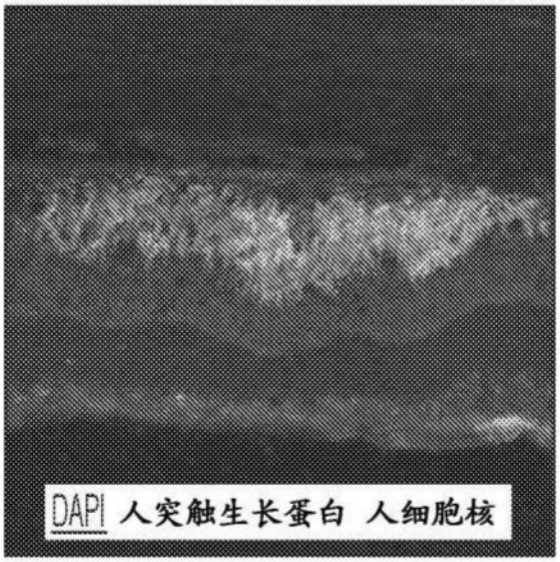


图14A

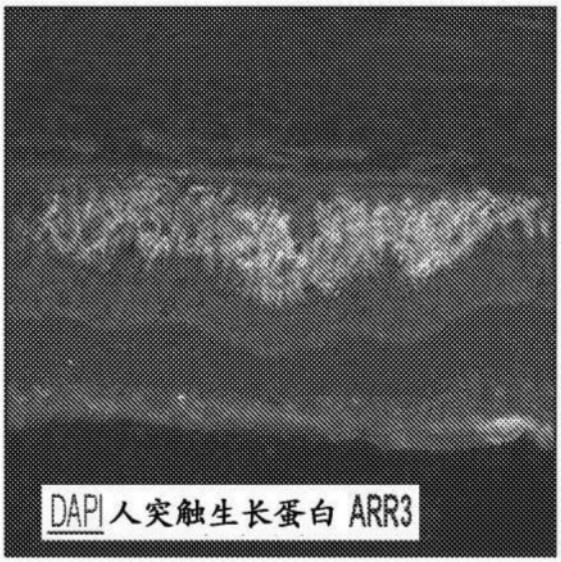


图14B