(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103555654 B
(45)授权公告日 2016.04.20

(21)申请号 201310484803.4
(22)申请日 2008.04.27
(30)优先权数据
60/907,818 2007.04.18 US
(62)分案原申请数据
200880020748.0 2008.04.27
(73)专利权人 哈达锡特医学研究服务及发展有限公司
地址 以色列耶路撒冷
(72)发明人 M·伊德尔森 R·阿尔珀-皮努斯 A·奥博伦斯基 E·巴宁 B·鲁比诺夫 Y·荷莫
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 李程达
(51)Int.Cl.
C12N 5/071(2010.01)
(56)对比文件
WO 2006070370 A3,2007.03.08,
WO 2006080952 A2,2006.08.03,
WO 9425569 A1,1994.11.10,
关云谦等.胚胎干细胞“五步法”体外诱导成为神经细胞的实验观察.《中国临床康复》.2004,(第10期),1851-1853.
胡鹭萍 等.胚胎干细胞在视网膜色素上皮细胞移植中的应用研究.《国际眼科纵览》.2006,305-309.
审查员 李有朝

权利要求书1页 说明书26页
序列表3页 附图27页

(54)发明名称

干细胞衍生的视网膜色素上皮细胞

(57)摘要

本发明涉及可通过从干细胞、特别是人类干细胞定向分化获得的RPE细胞。已经特别发现的是,在存在TGF超家族的一种或更多种成员例如激活蛋白A的情况下培养干细胞诱导定向分化为成熟的和功能性的RPE细胞。这通过对成熟RPE细胞特异的标志物,包括MiTF-A、RPE65或斑萎蛋白的表达被证明。根据一个特定的实施方式,所述细胞是在先用烟酰胺(NA)培养的,发现了这增强细胞对TGF超家族的一种或更多种成员的诱导效应的反应。本发明还提供了进行定向分化的方法,以及利用产生的RPE细胞的方法。

CN 103555654 B

1.一种促进商业上可获得的人类胚胎干细胞定向分化为视网膜色素上皮(RPE)结局的方法,所述方法包括:

a.在补充了烟酰胺(NA)的培养基中培养商业上可获得的人类胚胎干细胞,以产生分化中的细胞;和然后

b.在诱导所述分化中的细胞分化为RPE细胞的条件下在补充了激活蛋白A的培养基中培养所述分化中的细胞。

2.权利要求1的方法,其中在补充了烟酰胺的所述培养基中的所述培养进行至少2天,然后在补充了激活蛋白A的所述培养基中进行培养。

3.权利要求1的方法,其中所述培养以悬浮培养进行。

4.权利要求1的方法,其中在补充了烟酰胺的所述培养基中培养所述分化中的细胞2周。

5.权利要求1的方法,其中补充了激活蛋白A的所述培养基进一步补充烟酰胺。

6.权利要求1的方法,其中所述烟酰胺的浓度是10mM。

7.权利要求1的方法,其中所述激活蛋白A的浓度是20-180ng/ml。

干细胞衍生的视网膜色素上皮细胞

[0001] 本申请是申请号为200880020748.0、申请日为2008年4月27日、发明名称为“干细胞衍生的视网膜色素上皮细胞”的中国专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及生产已分化的视网膜色素上皮细胞(RPE)的方法和系统，并涉及由此获得的RPE细胞的治疗用途。

[0003] 相关技术的列表

[0004] 以下是被认为是对描述本发明领域的现有技术水平相关的参考文献的列表。

[0005] (1)Strauss O.,The retinal pigment epithelium in visual function; Physiol.Rev.85:845-881,2005.

[0006] (2)Lund RD.et al.,Cell transplantation as a treatment for retinal disease;Prog Retin Eye Res 20:415-449,2001.

[0007] (3)Haruta M.,Embryonic stem cells:potential source for ocular repair; Semin Ophthalmol.20(1):17-23,2005.

[0008] (4)Haruta M.et al.,In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells;Invest Ophthalmol Vis Sci 45:1020-1024,2004.

[0009] (5)Aoki H.et al.,Embryonic stem cells that differentiate into RPE cell precursors in vitro develop into RPE cell monolayers in vivo;Exp Eye Res.82(2):265-274,2006.

[0010] (6)Klimanskaya I.et al.,Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics;Cloning Stem Cells 6(3):217-245,2004.

[0011] (7)Lund RD.et al.,Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats;Cloning Stem Cells 8(3):189-199,2006.

[0012] (8)PCT申请公开No.WO 06/070370。

[0013] 发明背景

[0014] 视网膜色素上皮细胞(RPE)的功能障碍、损伤和丧失是某些眼部疾病和病症的突出特征，例如年龄相关的黄斑变性(AMD)、遗传性黄斑变性，包括Best病(卵黄样黄斑营养不良的早期发作的形式)和色素性视网膜炎(RP)的亚型。这些疾病的可能的治疗是RPE(和光受体)移植到受疾病影响的那些的视网膜中。相信的是，通过RPE细胞移植的RPE细胞补充可以延缓、停止或逆转退化，改善视网膜功能和预防源自这些状况的失明。

[0015] 斑(macula)，视网膜的中心部分，对于精细的可视细节和色彩感觉负责，并且对于我们许多日常的视觉工作例如面部识别和阅读是关键的。在普遍的视网膜退化例如色素性视网膜炎(RP)中，以及在更特异性地靶向斑区域的不同疾病如年龄相关的黄斑变性(AMD)和Best病中，作为疾病过程的部分，斑常常受影响。在许多这些疾病中，原发的功能障碍和

衰竭在视网膜色素上皮细胞(RPE)中发生,视网膜色素上皮细胞位于光受体的底部。

[0016] 高度专门化的RPE细胞在支持光受体功能方面起到重要作用:它们从脉络膜血管主动转运营养物,参与维生素A的再循环,维生素A是光受体中发色团所必需的,以及作为这些细胞的正常更新过程的一部分摄取并再循环脱落的光受体外部片段[1]。

[0017] 在RP的亚型Best病和AMD中,RPE的衰竭最终导致视觉丧失和失明。替换这些细胞是可能的治疗介入[2],但是从人类供体或胚胎获得这样的细胞是困难的。如果可以阐明使人类胚胎干细胞细胞定向分化成为功能性RPE细胞的方式,人类胚胎干细胞(hESC)可以充当RPE细胞潜在无限的供体来源[3]。早先已经描述了使hESC定向分化成为神经前体细胞(NP)高度富集的培养物的方法(Reubinoff BE.et al.,Neural progenitors from human embryonic stem cells;Nat Biotechnol 19:1134-1140,2001;Itsykson P.et al.,Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin;Mol Cell Neurosci.30(1):24-36,2005)。此外,已经体外和体内地显示了hESC在啮齿动物中移植到视网膜下间隙之后产生视网膜细胞的潜力(Banin E.et al.,Retinal Incorporation and Differentiation of Neural Precursors Derived from Human Embryonic Stem Cells;Stem Cells 24(2):246-257,2006.)

[0018] 已经展现了小鼠和非人灵长类ESC分化成为RPE细胞,以及在移植后存活和减慢视网膜退化的潜力[4,5]。显示了hESC向RPE的自发的分化,然而,分化过程的效率是低的,需要相当的分化时间,在4-8周的分化后仅获得仅很低百分比(<1%)的含RPE细胞的群集。此外,虽然在RCS大鼠中在这些RPE细胞的视网膜下移植之后观察到改善的视网膜功能,移植的细胞作为真正的成熟RPE细胞的功能没有展现,这种效应可能潜在地与非RPE特异性营养效应相关[6,7,9,10]。

[0019] 近来还显示了,hESC可以被定向可再生地分化成为RPE细胞,其中hESC的定向的而非自发的分化成为RPE的结局在存在烟酰胺(NA)的情况下发生[8]。

[0020] 发明概述

[0021] 根据第一个方面,本发明提供了转化生长因子-β(TGF-β)超家族的成员用于制备培养系统的用途,所述培养系统用于促进人类干细胞(hSC)定向和增加分化为视网膜色素上皮(RPE)细胞。

[0022] 根据第二个方面,本发明提供了促进hSC定向分化为RPE结局的方法,所述方法包括:

[0023] (a)提供包含hSC的细胞培养物;和

[0024] (b)在培养系统中培养所述细胞培养物中的细胞,所述培养系统包含补充有TGFβ超家族的一种或更多种成员的基础培养基,从而所述hSC被促使趋向定向分化为RPE结局。

[0025] 根据第三个方面,提供了细胞培养物,其包含通过在存在TGFβ超家族的一种或更多种成员的情况下hSC的定向分化所获得的RPE细胞。优选的,所述RPE细胞是通过在此公开的方法获得的终末分化的(成熟的)RPE细胞。如在此将显示的,这样的RPE细胞展现了几种特征性性状,其不同于当hSC自发地分化成RPE细胞时所获得的性状。优选的,所述RPE细胞能够在它们的分化期间响应于TGFβ信号传导。

[0026] 根据第四个方面,提供了将hSC衍生的RPE细胞移植到受试者的眼睛中的方法,所述RPE细胞通过所述hSC的定向分化获得,所述方法包括

[0027] (a)提供包含hSC的细胞培养物；

[0028] (b)在培养系统中培养所述细胞培养物，所述培养系统包含补充有TGFβ超家族的一种或更多种成员的基础培养基，从而所述hSC被诱导分化成RPE细胞；

[0029] (c)从所述细胞培养物收获RPE细胞；和

[0030] (d)将所述RPE细胞移植到所述受试者的眼睛中。

[0031] 根据第五个方面，提供了细胞培养系统，其包含通过所述hSC的定向分化所获得的可移植的hSC衍生的RPE细胞。所述移植的RPE细胞展现了一种或更多种参数，所述参数表明所述移植的细胞在所述受试者眼睛内是功能性的。所述移植的RPE细胞的功能性通过它们摄取光受体的脱落的外部片段同时改善视网膜功能的能力来展现。

[0032] 在此公开的方法的培养系统中的hSC是分化中的hSC，即，基本上处于未分化的状态的hSC的群体，或者其中至少部分所述细胞已经被诱导经历了定向分化的初始阶段，以及有的时候，大部分所述细胞已经被诱导经历了定向分化的初始阶段。根据一个实施方式，分化的初始阶段通过先期将细胞暴露于NA来实现，而当未分化的细胞共同暴露于NA和TGFβ超家族的一种或更多种成员时分化的初始阶段也将发生。不受理论的限制，假定的是，对NA的先期暴露(在与TGFβ超家族的一种或更多种成员孵育之前)引起细胞趋向定向分化(与自发的分化相对)成为具有特定RPE形态的RPE细胞，这将在下文进一步讨论。

[0033] 根据优选的实施方式，hSC是人类胚胎干细胞(hESC)。

[0034] 根据一个实施方式，在包含TGFβ超家族的一种或更多种成员的培养基中培养细胞是在hSC具有初始的分化、定向分化，优选的由NA导致定向分化之后至少两天。

[0035] 根据第五个方面，提供了在受试者中治疗或预防视网膜疾病或病症(其包括视网膜色素上皮的功能障碍、损伤和/或丧失)的方法，所述方法包括向所述受试者眼内移植hSC衍生的RPE细胞，所述RPE细胞通过诱导hSC趋向定向分化来获得。可移植的RPE细胞优选的通过在此公开的方法获得。

[0036] 附图的简要描述

[0037] 为了理解本发明和显示它如何实际上进行，现在将参考附图通过仅非限制性的实例来描述优选的实施方式，在附图中：

[0038] 附图1A-1E：实时PCR，分析存在NA的情况下RPE标志物的表达。hESC的分化通过将它们作为自由浮动的群集(cluster)来培养来诱导。在6周的分化时，RPE标志物MiTF-A(附图1A)和RPE65(附图1B)的表达水平在存在NA的情况下显著增加。在连续时点的实时PCR分析展现了，在存在NA的情况下MiTF-A(附图1C)和RPE65(附图1D)的表达水平随着时间逐渐提高。包括斑萎蛋白(Bestrophin)、CRALBP和Mertk的RPE标志物的其他转录产物的表达通过平板接种的色素化的群集的RT-PCR分析来展现(附图1E)。+/-分别表示逆转录酶的存在或缺乏。

[0039] 附图2A-2F：NA的RPE分化诱导效应不取决于特定的培养基组成。在KO培养基中(附图2A)，或在补充有N2的Neurobasal培养基中、其1周后用补充有B27的DMEM/F12(NN培养基)替换(附图2C)，分化12周的hESC群集的暗视野显微照片。在两种培养基中，NA增加了朝向色素化细胞的分化(附图2B,D)，而已分化的hESC群集的大小和它们的总数在用NN培养基时较小(白色箭头标出分化中的群集内的色素化区域)。在RNA水平上，在两种培养基中，NA增添提高了MiTF-A和RPE65的表达水平(分别附图2E和F)。

[0040] 附图3A-3L:hESC的自由浮动群集内的黑色素表达细胞是推定的RPE细胞。具有高度富集色素化细胞的限定区域的分化中的hESC的自由浮动群集的暗视野显微照片(附图3A)。在解离和平板接种之后与抗Otx2和MiTF免疫反应性的色素化细胞的荧光(附图3B)和相差(附图3C)图像。显示了在表明限制的色素化区域的平板接种之后分化中的群集的暗视野显微照片(附图3D)。在色素化区域内具有RPE细胞典型的形态学特征的细胞的相差图像(附图3E)。间接的免疫荧光染色显示了,这些细胞表达RPE细胞的标志物,包括MiTF(附图3F)、ZO-1(附图3G)、斑萎蛋白(附图3H)、RPE65(附图3I)和CRALBP(附图3J)。在解离之后,低密度平板接种并培养,色素化细胞失去了色素沉着并获得了纤维样的形态学(相差图像)(附图3K)。在进一步延长培养和增殖成高密度培养物之后,细胞再次获得了表示RPE细胞特征的形态和色素沉着(附图3L)。

[0041] 附图4A-4E:激活蛋白A诱导RPE分化。人类ESC被容许作为自由浮动群集在存在或不存在激活蛋白A的情况下分化6周,激活蛋白A在分化第一周之后添加。群集的暗视野显微照片显示了,激活蛋白A显著地提高包括色素化细胞的群集的百分比(附图4A、B)(白色箭头标出分化中的群集内的色素化区域,某些群集内色素化区域的边界由虚线标出)。在存在激活蛋白A的情况下,色素化的区域的边界更为清晰地与群集内围绕的非色素化区域分开。此外,色素化的细胞在存在激活蛋白A的情况下是更暗色的(附图4B)。在RNA水平上,实时PCR分析显示了,RPE65(附图4D)和斑萎蛋白(附图4E)的表达在存在激活蛋白A的情况下显著提高。MiTF-A的表达不被激活蛋白A处理改变(附图4C)。

[0042] 附图5A-5G:BMPs和TGFβ3在RPE分化中起作用。人类ESC作为自由浮动群集被诱导分化6周。偶尔观察到自发分化成色素化细胞(附图5A),但是当培养基补充NA时显著提高(附图5B,最左侧和左侧暗视野图像;白色箭头标出分化中的群集内色素化的区域)。在不存在(附图5D)和存在(附图5C)NA的情况下,培养基补充头发生素(noggin)阻断了分化成为色素化细胞。在RNA水平上,实时PCR分析显示了,在存在和不存在NA的情况下,头发生素都降低了MiTF-A的表达水平(附图5E)。当在存在NA的情况下在hESC群集的分化期间将TGFβ3添加给培养基时,它显著地增加了MiTF-A(附图5F)而非RPE65(附图5G)的表达水平。

[0043] 附图6A-6J:在大鼠眼中移植的hESC衍生的RPE细胞的存活和整合。在hESC衍生的RPE细胞的眼内移植之后,色素化的细胞可以在白化大鼠的眼睛中容易地体内鉴定(附图6A,6B)。在剜出眼睛(附图6B)和除去角膜和晶状体之后,可以看见主要的移植物和其他分散的色素化斑点(附图6C)。在组织切片中,包括也共表达GFP的暗色色素化细胞的移植物可以被鉴定(附图6D-6G),证明了细胞是hESC衍生的的事实。移植的细胞可以在玻璃体内区域中、视网膜和晶状体之间(附图6H)、视网膜中(偶尔地沿着注射的管道伸入玻璃体内)(附图6I)以及在视网膜下间隙(附图6I、6O,6P)中找到。移植的hESC衍生的RPE细胞(用箭头标出的色素化的细胞)整合到白化大鼠的RPE层中(附图6J)。在对照的非移植的眼的RPE层中没有观察到色素化细胞。在移植物内,用ZO-1(附图6K-6N)的免疫染色显示了在移植的GFP+hESC衍生的细胞之间存在紧密连接。这种连接是RPE细胞的特征。在移植到患有RPE功能障碍和视网膜退化的RCS大鼠的视网膜下间隙中之后,与远离移植物的区域相比(由箭头标出),光受体层的相对保存可以在靠近移植物处见到(附图6O;矩形内的区域由星号标记,在附图6P中扩大)。注意到大量移植的hESC衍生的RPE细胞具有多边形的形状和鹅卵石样外观(附图6P)(星号)。在此处显示的所有情况中,RPE细胞来源于不存在激活蛋白A的情况下的

hESC。

[0044] 附图7:电子视网膜成像记录显示了,hESC衍生的RPE细胞的移植提供了在营养不良的RCS大鼠的眼睛中视网膜功能的拯救。与同伴的非移植的对照眼相比,在来自hESC的RPE细胞的移植之后在RCS大鼠眼中全视野ERG反应更高(n=11只大鼠)。用于这些实验的RPE细胞是没有向培养基添加激活蛋白A来衍生的。显示了对不断提高强度的四次刺激的暗适应的混合的视锥-视杆反应的b-波幅。

[0045] 附图8A-8I:显示了在诱导来自hESC的色素化细胞发育中NA的效果的形态学和标志物表达的分析。暗视野显微照片显示了在存在(附图8A、8C和8E)或不存在(附图8B、8D或8F)NA(白色箭头标出分化中的群集内的色素化区域)的情况下,在hESC衍生的群集培养4周(附图8A、8B)、6周(附图8C、8D)和8周(附图8E、8F)期间色素化细胞的逐渐出现。在补充有NA的培养基中(粗线的柱)和在对照培养物(细线的柱)中在培养期间不同时点,含有色素化区域的群集的百分比的直方图表示(附图8G)。在具有NA补充的8周培养期间,色素化细胞(附图8H)和对早期RPE标志物抗MiTF免疫反应性的细胞(附图8I)的百分比的直方图表示。标尺柱:(A)200mm;*p<0.05;**p<0.001。

[0046] 附图9A-9S:显示了在hESC分化中的群集中随着时间的RPE发育进展的实时PCR、免疫染色和流式细胞术分析。(附图9A-9L)实时PCR,分析了在存在(粗线的柱)或不存在(细线的柱)NA的情况下培养的群集中RPE发育中关键基因的表达的时机。在hESC衍生的群集的8周分化期间在连续的时点分析了以下标志物的逐步表达:hESC特异性标志物Oct4(附图9A);早期神经标志物Otx2(附图9B)、Musashi(附图9C)和Pax6(附图9D);视网膜祖代标志物Six3(附图9E)、Rx1(附图9F)和Chx10(附图9G);RPE标志物MiTF-A(附图9H)、RPE65(附图9I)和斑萎蛋白(附图9J);光受体祖代标志物Crx(附图9K);黑色素细胞发育标志物Sox10(有横条的柱,附图9L)(M51黑素瘤细胞系被用作对照)。在具有(粗线)或缺乏(细线的柱)NA的情况下8周的群集分化中,展现了hESC特异性标志物TRA-1-60(附图9M)和神经祖代标志物PSA-NCAM(附图9O)的逐步表达的FACS分析。在存在NA的情况下分化2周和4周的群集内,表达早期神经标志物:PSA-NCAM(粗线的柱)、巢蛋白(有横条的柱)、Musashi(细线的柱)、Pax6(纵条纹的柱)的细胞的百分比的间接免疫荧光分析(附图9N)。免疫荧光图像,表现了表达这些标志物的细胞,PSA-NCAM(附图9P)、巢蛋白(附图9Q)、musashi(附图9R)、Pax6(附图9S)。

[0047] 附图10A-10J:形态学、标志物表达和功能的分析,显示了hESC的自由漂浮的群集内色素表达细胞是推定的RPE细胞。鬼笔环肽染色显示了表现RPE的特征的hESC衍生的色素化子代内F-肌动蛋白的分布(附图10A);在解离、低密度平板接种并培养之后,色素化细胞失去色素沉着并获得纤维样形态(相差图像,1周培养)(附图10B)。在进一步延长培养和增殖成高密度培养物之后,细胞再次获得了表示RPE细胞特征的形态和色素沉着(1.5个月的培养)(附图10C)。hESC衍生的RPE细胞的电子显微镜分析,显示了作为RPE的特性的特征:微绒毛(附图10D)、基膜(附图10E)、黑色素颗粒(附图10D)、紧密连接(附图10F)。相差(附图10G)和荧光图像(附图10H-J)显示了hESC衍生的色素细胞的绿色荧光胶乳珠子的吞噬作用(白色箭头);细胞膜用红色荧光染料PKH染色(灰色)。三幅共焦荧光图像表现了连续的Z轴切片(附图10H-J)。

[0048] 附图11A-11P:形态学和基因表达的分析,显示了来自TGFβ家族的因子促进朝向

RPE结局的分化。分化4周的hESC衍生的群集的暗视野显微照片显示了在存在激活蛋白的情况下在这个早期阶段色素化细胞的出现(附图11A),以及与仅有NA(附图11B)相反的,在存在激活蛋白A和NA的情况下(附图11C)色素化群集分化的数量的提高。与激活蛋白A类似,补充TGFβ1同样提高了色素化群集的出现(附图11D)。相比之下,激活蛋白信号传导途径的抑制物SB431542与激活蛋白A和NA一起的应用降低了激活蛋白A对色素化群集出现的效力(附图11E)。色素化群集的发育还通过在存在FGFβ与NA的情况下培养细胞而被消除(附图11F)。激活蛋白受体和激活蛋白A的转录产物的表达通过在存在或缺少NA的情况下培养的2周龄群集、以及未分化的hESCs作为对照的RT-PCR分析来展现(附图11G)。在存在NA、NA+ActA、NA+SB431542、NA+ActA+SB431542、NA+TGFβ1的情况下在培养4周后含有色素化区域的群集的百分比的直方图分析(附图11H)。在NA(粗线的柱)或激活蛋白A和NA(对角条纹的柱)添加的4周培养之后色素化细胞的百分比的直方图分析(附图11I)。在不同浓度的激活蛋白A下色素化细胞的百分比的直方图分析(附图11J),以及RPE标志物斑萎蛋白(附图11K)和RPE65(附图11L)的转录产物的表达水平,所述激活蛋白A浓度对于RPE诱导140ng/ml是最佳的。在有(对角条纹的柱)或没有(粗线的柱)激活蛋白A添加、存在NA的情况下的hESC分化中,激活蛋白A对视网膜和RPE基因,斑萎蛋白(附图11M)、MiTF-总(附图11N)、Rx1(附图11O)和Chx10(附图11P)的表达水平的作用的实时PCR时间-过程分析。**$p<0.005$.(白色箭头标出分化中的群集内的色素化区域)。

[0049] 附图12A-12E:来自用NA和激活蛋白A处理的hESC的RPE细胞在营养不良的RCS大鼠眼睛中的视网膜下移植之后存活。色素化细胞的群集可以使用眼底成像系统(附图12A-12C);眼底照像(附图12A)和无红光照像(附图12B)来容易地在RCS大鼠的眼睛中体内鉴定,其显示了移植物的视网膜下的位置(注意到视网膜血管经过色素化区域)。hESC衍生的GFP表达细胞可以在荧光激发和使用发射滤波器时被看见发射荧光(附图12C)。在荧光显微镜中离体(ex vivo)成像的眼杯制品中(附图12D-12E),可以看见视网膜下的GFP阳性细胞的大的群集(附图12D)以及多个分散的较小的群集(附图12E)。

[0050] 附图13A-13F:在RCS大鼠眼睛中视网膜下hESC衍生的激活蛋白A处理的RPE细胞移植物的组织学外观。苏木素和曙红(附图13A和1B)染色的组织切片显示了视网膜下的和偶尔地视网膜内位置的移植的hESC衍生的色素化细胞,其以群集或作为分离的细胞出现(箭头)。使用GFP的免疫染色(附图13C-13F)确认了这些细胞确实是hESC衍生的。移植物常常是十分大的和分散的(附图13C,13E),共同表达GFP的色素化细胞可以明显地看出(附图13D,13F)。注意到GFP阳性色素化细胞整合在宿主的RPE层之内(附图13D,箭头)。

[0051] 附图14A-14O:移植的hESC衍生的色素化细胞表达成熟RPE的标志物。免疫染色揭示了,移植物内大量的移植的细胞表达作为成熟RPE细胞的特征的蛋白质,包括RPE特异性标志物RPE65(附图14A-14E)和斑萎蛋白(附图14F-14J)以及紧密连接标志物ZO-1(附图14K-14O)。附图14A、14F和14K显示了共表达GFP和相关标志物的移植物的低放大率荧光图像。在每一排的高放大率共焦图像显示了在单个细胞水平下色素(通过Nomarski光学器件)以及GFP和不同标志物的共表达。这些系列确认了这些细胞确实是hESC衍生的,以及它们在体内表达成熟RPE的标志物。在附图14M中,注意到宿主RPE对ZO-1染色(虚线箭头),而它在附图14N、14O中是GFP阴性的(相应的区域是暗色的),与ZO-1阳性hESC衍生的细胞相反(附图14M中的完整箭头)其确实共表达GFP(附图14N,14O)。

[0052] 附图15A-15C:移植的hESC衍生的、激活蛋白A处理的RPE细胞提供了RCS大鼠视网膜退化模型中的功能拯救。与同类的非移植的对照眼相比,以及与单独进行培养基的视网膜下注射的眼睛相比,在8周龄记录的全视野ERG反应在来自hESC的、激活蛋白处理的RPE细胞的移植之后的RCS大鼠眼睛中是更高的。在移植的眼(附图15A)和它同类的对照眼(附图15B)中显示了在暗适应状态下对一系列提高强度的白色闪光的代表性的ERG反应。附图15C显示了在移植的眼和不同组的对照眼之间平均幅度方面的显著的区别(-◆-注射的眼(n=13);-■-未注射的眼(n=13);-●-培养基的未注射的眼(n=5);-▲-培养基注射的眼(n=5))。如所示,与在没有激活蛋白A而衍生的RPE细胞的移植之后实现的拯救效果(附图7)相比,在激活蛋白A处理的RPE细胞的移植之后(在此显示)视网膜功能倾向于更好的保存。

[0053] 附图16A-16D:移植的hESC衍生的、激活蛋白A处理的RPE细胞提供了RCS大鼠视网膜退化模型中的结构的拯救。利用苏木素和曙红染色的切片的高分辨率显微镜图像检查和定量移植的hESC衍生的激活蛋白处理的RPE细胞对退化的宿主视网膜的效果。与远离移植物的区域相比,在接近视网膜下RPE移植物处,观察到外核(光受体)层(ONL)以及内部和外部光受体片段(IS+OS)的相对保存(两个实例在附图16A、16B中显示)。附图16A中的插图展现了这种差异(在接近移植物的右侧插图中显示了拯救的视网膜具有相对厚的ONL;在远离移植物的左侧插图中可见ONL的严重的变薄)。与远离移植物的区域相比(灰色柱),总体视网膜厚度(附图16C)以及ONL和IS+OS厚度(附图16D)在接近hESC衍生的RPE移植物处显著地增加(黑色柱,平均±SEM,n=7)。这种类型的结构拯救仅在接近视网膜下和深部的视网膜内移植物处观察到,而当移植物仅仅处于玻璃体内时没有观察到(未显示)。对于定量技术的细节,请参见方法。

[0054] 附图17A-17E:移植的hESC衍生的激活蛋白A处理的RPE细胞体内摄取视紫红质。视网膜下移植的RPE细胞的共焦图像显示了色素、GFP、RPE65和视紫红质在同一单个细胞内的共同定位。RCS大鼠的天然的RPE细胞表达RPE65(附图17C,箭头),但是不表达GFP(附图17D,箭头)并含有最小数量的视紫红质(附图17B、17E)。

[0055] 发明的详细说明

[0056] 当前的公开提供了转化生长因子-β(TGFβ)超家族的一种或更多种成员用于制备培养系统的用途,所述培养系统用于促进人类干细胞(hSC)、优选的人类胚胎干细胞(hESC)分化成视网膜色素上皮(RPE)细胞。要注意的是,除了在此详细地讨论的特定用途之外,还包含在当前的公开之内的是通过在存在一种或更多种TGFβ超家族的情况下hSC的定向分化所获得的RPE细胞;以及促进hSC的定向分化为RPE结局的方法,以及生长和维持这种hSC衍生的RPE细胞的方法,以及利用这种hSC衍生的RPE细胞的方法。根据某些优选的实施方式,根据在此的教导获得的RPE细胞是成熟的(换句话说,终末分化的)和功能性的RPE细胞,以下将进一步讨论和说明。

[0057] 当前的公开广泛地涉及生长因子TGFβ超家族的一种或更多种成员在促进/诱导/增强hSC向RPE细胞、优选的成熟RPE细胞的定向分化方面的用途。

[0058] 在下面的说明书和权利要求书中,有时将使用各种术语,这些术语的含义应当根据在此的教导来解释,如下:

[0059] 词汇表

[0060] “转化生长因子-β(TGFβ)超家族生长因子”,如在此使用的,表示生长因子的TGFβ

超家族的任何成员，例如转化生长因子-β蛋白，包括TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3亚型，以及同源配体，包括激活蛋白(例如，激活蛋白A、激活蛋白B和激活蛋白AB)、nodal、抗mullerian激素(AMH)、某些骨骼形态发生蛋白(BMP)，例如BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6和BMP7，以及生长和分化因子(GDF)。

[0061] “人类干细胞”或“hSC”，如在此使用的，是指人类来源的细胞，其在适合的条件下能够分化成为具有特定的专门化功能的其他细胞类型，而在其他适合的条件下能够自我更新并保持在未分化的多能状态，如下文详述的。

[0062] 在此使用的“细胞”是指单细胞以及细胞的群体(即，超过一个细胞)。所述群体可以是包含一种细胞类型的纯的群体。做为选择，群体可以包含超过一种细胞类型。hSC细胞优选的是获自出生后任何年龄的个体的骨髓组织、或获自新生个体的脐带血或组织的造血或间质干细胞，获自出生后任何年龄的胎儿或尸体脑部的神经干细胞。术语细胞可以表示单细胞或细胞的群集。

[0063] 如在此使用的，“胚胎干细胞”和“多能胚胎干细胞”是指可以产生胚胎或成年人中任何已分化的细胞类型包括生殖细胞(精子和卵子)的细胞。

[0064] 如在此使用的，“细胞培养物”或“培养的细胞”是指在人工的体外环境中被培养、培育或生长的细胞或组织。

[0065] 如在此使用的，“未分化的多能hSC”、“多能hSC”是指具有形成任何成年人细胞的能力的、人类来源的前体细胞。这样的细胞是真实的细胞系，因为它们：(i)能够以未分化的状态在体外大范围的增殖；和(ii)甚至在延长的培养之后能够分化成所有三种胚胎胚层(内胚层、中胚层和外胚层)的衍生物。其他多能hSC包括，多能成年人祖细胞(MAP)、诱导的多能干细胞(iPS细胞)和羊水干细胞，但不限于此。

[0066] 如在此使用的，“未分化的”是指当群体中相当大比例(至少20％和可能超过50％或80％)的细胞和它们的衍生物显示了未分化细胞的特征性标志物和形态学特征、将它们从胚胎或成年人来源的已分化的细胞区分开时所培养的细胞。当细胞在至少3周的培养时间期间经历至少1次群体倍增，而在所述培养时间之后保持至少约50％，或相同比例的细胞带有未分化细胞的特征性标志物或形态学特征，细胞被认为在未分化的状态中增殖。

[0067] 如在此使用的，“细胞悬浮液”或“自由漂浮的细胞”是指细胞的培养物，其中大部分的细胞在基质中、一般在培养基(系统)中自由地漂浮，所述细胞作为单细胞、或作为细胞群集和/或作为细胞聚集体漂浮。换句话说，所述细胞不附着于基底地在培养基中存活并增殖。

[0068] 如在此使用的，“培养系统”是指适合于SC的增殖的培养系统。该术语表示了成分的组合，最少包括基础培养基(通常包含规定的基础溶液的细胞培养基，其包括盐、糖类和氨基酸)以及生长因子的转化生长因子-β(TGFβ)超家族的一种或更多种成员。根据本发明的培养系统可以进一步包含其他成分，例如而不限于此，血清或血清替代物，培养(营养物)基质和其他外源添加的因子，它们一起提供了支持SC生长的适合的条件，以及一般用于细胞培养系统的其他成分。上述成分可以被共同地分类为可溶的成分。然而，在本发明的情境中，所述成分还可以与载体，即，不溶的成分缔合。所述缔合可以是通过化学的或物理的附着/结合。例如，所述成分可以固定在基质(例如，细胞外基质)上，通过添加到系统中或结合在生物可降解的材料上的细胞来呈递。进一步，所述成分可以从载体上释放，所述载体可以

是细胞或者封装或包埋了所述成分的泡囊。因而，在以下的文字中，补充基础培养基来形成培养系统的成分包括可溶的和不溶的成分。

[0069] 如在此使用的，“分化”是指从一种细胞类型到另一种细胞类型的细胞状态的切换过程，更具体的在当前公开的上下文中是指人类干细胞获得视网膜色素上皮(RPE)细胞的细胞类型的过程，所述细胞类型具有表明所述RPE细胞是成熟的(终末分化的)细胞的至少一种特征性特征。如在此使用的，术语“细胞类型”是指细胞的独特形态学或功能形式。

[0070] 如在此使用的，“分化中的hSC”是指未分化的hSC，其在适合的条件下能够以增加的、定向的方式分化为预定的结局；该术语还指hSC的群体，其中其至少部分已经被诱导经历了至少初始的分化，即，定向分化或其组合。

[0071] “引起”、“增加”、“促进”或“使.....定向”在此可互换地使用，除非上下文另外地指示了，是指启动干细胞非自发的分化成为RPE细胞。

[0072] “分化诱导物”或“分化启动子”、“分化引发试剂”或“分化促进因子”在此可互换地使用，表示能够引发、增加、促进多能SC分化为体细胞或使多能SC定向分化为体细胞、优选的成为RPE细胞的任何试剂。

[0073] “视网膜色素上皮细胞”、“RPE细胞”、“RPE”在上下文容许时可以可互换地使用，是指功能上类似于形成视网膜的色素化细胞层的天然RPE细胞的细胞类型的细胞(例如，在移植到眼睛内时，它们展现了类似于天然RPE细胞的功能活性)。因而，术语“视网膜色素上皮细胞”、“RPE细胞”或“RPE”可以用于指代视网膜的色素化层的天然RPE细胞和根据当前的公开直接分化自hSC的RPE细胞。

[0074] 术语“hSC衍生的RPE细胞”在此使用是表示通过从hSC的定向分化所获得的RPE细胞。根据优选的实施方式，hSC衍生的RPE细胞是成熟的(终末分化的)和功能性的RPE细胞，如下文定义的参数所展现的。术语“定向分化”与术语“RPE诱导的分化”可互换地使用，被理解为是指在诱导/促进仅分化成RPE细胞类型的培养条件下操作hSC的过程。

[0075] “功能性RPE细胞”在此使用是表示通过在存在TGFβ超家族的一种或更多种成员的情况下hSC的定向分化所获得的细胞，所述RPE细胞展现了至少一种以下的特征：

[0076] -在分化期间，培养的细胞响应TGFβ信号传导；

[0077] -所述RPE细胞是成熟的、终末分化的细胞，如通过指示终末分化的标志物例如斑萎蛋白或RPE65的表达所展现的，同时地或作为选择地，通过它们缺乏在体内增殖的潜力所展现的。

[0078] -在移植之后(即，原位)，RPE细胞展现了支持邻近于RPE细胞的光受体的营养效力；

[0079] -进一步的，在原位，所述RPE细胞能够具有作为这些光受体的正常更新过程的一部分的脱落的光受体外部片段的吞噬作用的功能。

[0080] 因而，根据本发明的RPE细胞特别适合于宿主RPE的再生，从而在将其移植到受试者的眼睛内之后提供改善的视力。

[0081] “类似的”，当在分化中的RPE细胞的上下文中使用时，是指已分化的RPE细胞与天然RPE细胞共有一种或更多种独特的形态学或功能特征。例如，足够的相似性可以通过，例如确定所述已分化的细胞表达天然存在的RPE细胞的一种或更多种标志物，例如MiTF、ZO-1、斑萎蛋白、RPE65、Otx2、Mertk和CRALBP；或细胞显示RPE细胞的一种或更多种物理的形态

特征，例如细胞内典型的F-肌动蛋白分布、色素化微粒的色素沉着、多边形的(例如，六角形的)形状、鹅卵石样外观和由电子显微镜检查所展现的RPE的超微结构特征来指示。此外，可以包括任何一种上文列出的功能，例如，支持邻近于RPE细胞的光受体的营养效果；具有携带视紫红质或缺乏体内增殖的潜力的脱落的光受体外部片段的吞噬作用的功能性。

[0082] 如在此使用的“大规模”对于细胞培养和扩增来说，是指RPE细胞在一定条件下的生产，所述条件允许在4周后在细胞培养物中细胞至少加倍，在4周后的细胞群体基本上由RPE细胞组成。

[0083] 如在此使用的，“细胞标志物”是指细胞的任何表型特征，其可以用于表征细胞或用于将细胞与其他细胞类型区分。标志物可以是蛋白质(包括分泌的、细胞表面的或内部的蛋白质；被细胞合成的或摄取的)；核酸(例如mRNA，或酶活性核酸分子)或多糖。包括的是任何这些细胞成分的决定簇，其可以通过对感兴趣的细胞类型的标志物特异的抗体、凝集素、探针或核酸扩增反应来检测。所述标志物还可以取决于基因产物的功能通过生物化学的或酶学的分析或生物反应来鉴定。与每种标志物相关的是编码转录产物的基因，以及导致标志物表达的事件。如果标志物的表达处于比可接受的对照物例如肌动蛋白或甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)至少高50％(对于在抗体或PCR分析中测量的总基因产物)或更频繁30％(对于群体中的阳性细胞而言)的水平，标志物被称为在未分化的或已分化的细胞群体中优先地表达。表达更高或更频繁2、10、100或10,000倍的标志物是递增地更为优选的。

[0084] 当前的公开利用了衍生RPE的hSC，是由于在存在着被应用于悬浮的hSC的独特的培养系统的情况下hSC的诱导的和定向分化。

[0085] hSC的非限制性的实例是获自胎儿或出生后任何年龄或获自尸体的神经干细胞，获自出生后任何年龄的人类个体的骨髓组织或获自新生个体的脐带血的造血干细胞，间质干细胞，羊水干细胞，诱导的多能干细胞，或获自出生后任何年龄的人类个体的生殖腺的干细胞。根据本发明的优选的人类干细胞是人类胚胎干细胞(hESC)。

[0086] hSC可以使用公知的细胞培养方法获得。

[0087] 商业上可获得的hSC也可以根据本发明使用。HSC可以购自NIH人类胚胎干细胞登记所。商业上可获得的胚胎干细胞系的非限制性实施例有BG01、BG02、BG03、BG04、CY12、CY30、CY92、CY10、TE03和TE32。

[0088] hESC和衍生自它们的细胞的潜在的应用是广泛的，包括药物开发和测试，用于移植的细胞、组织和器官的产生，生物分子的生产，测试化合物的毒性和/或致畸性，高通量筛选分子的有毒，再生、保护或其他效力，以及促进发育和其他生物过程的研究。举例来说，当前预期可通过hESC或hESC衍生的细胞的治疗性移植来治疗的疾病包括帕金森氏病、心脏梗塞、幼年发作型糖尿病和白血病[Gearhart J.Science 282:1061-1062,1998;Rossant and Nagy,Nature Biotech.17:23-24,1999]。

[0089] 然而，对于hESC的实际开发存在着显著的障碍。这样的两种障碍包括：将hESC维持在未分化的、多能状态而没有自发的分化；以及使hESC定向分化成为特定类型的体细胞。对于维持和增殖干细胞，特别是hESC在未分化的状态已经描述几种培养系统[8]。

[0090] 由于衍生自干细胞的已分化细胞在无数的治疗应用中的潜力，使培养物中干细胞定向分化或促使培养物中干细胞的分化朝向特定的体细胞结局是很令人感兴趣的。

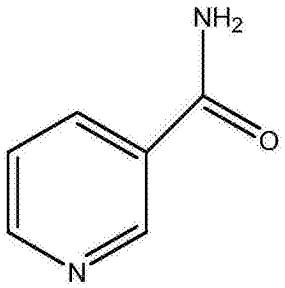
[0091] 在某些眼部疾病和病症中，例如视网膜和斑(macula)的疾病和病症，RPE细胞的衰

竭最终导致视觉丧失和甚至失明。RPE细胞的移植来替换和支持衰竭的宿主RPE已经被暗示作为可能的治疗性介入，但是从人类供体或胚胎获得这样的细胞是困难的。如果可以阐明使hSC细胞定向分化成为功能性RPE细胞的方式，hSC因此可以充当RPE细胞潜在无限的供体来源。

[0092] 现在已经令人惊讶地发现，用大量生长因子的TGFβ超家族的成员接触hSC强烈地促进hSC朝向RPE结局的分化。换句话说，这些生长因子具有对hSC的诱导效果。因而，设想了转化生长因子-β(TGF-β)超家族的成员用于制备培养系统的用途，所述培养系统用于诱导人类干细胞(hSC)分化为视网膜色素上皮(RPE)细胞。

[0093] 虽然生长因子的TGFβ超家族的许多成员是已知的(上文列出了某些非限制性的实例)，根据优选的实施方式，TGF超家族的成员优选的是TGFβ1、TGFβ3生长因子或激活蛋白A或它们的组合。

[0094] 早先发现的是细胞培养物中的烟酰胺(NA)对干细胞分化为胚胎外细胞具有抑制效应，以及进一步的，NA促进朝向神经、和进一步朝向RPE细胞样结局的体细胞分化[8]。NA也称为“烟酰胺”，是维生素B3(烟酸)的酰胺衍生形式，其被认为保存和改善β细胞功能。NA具有化学式$C_6H_6N_2O$。NA对于生长和食物到能量的转化是必不可少的，它已经用于关节炎治疗和糖尿病治疗和预防。

[0095] 

烟酰胺（NA）

[0096] 在当前的公开的上下文中，术语NA还表示NA的衍生物。

[0097] 在此使用的术语“烟酰胺(NA)的衍生物”代表作为天然NA的化学上修饰的衍生物的化合物。化学修饰可以包括，例如，在基础的NA结构的吡啶环上的替换(通过环的碳或氮成员)，通过酰胺部分的氮或氧原子，以及基团的删除或替换，例如，来形成NA的硫代苯甲酰胺类似物，所有这些都是有机化学的熟练技术人员理解的。本发明的上下文中的衍生物还包括NA的核苷衍生物(例如，烟酰胺腺嘌呤)。描述了NA的多种衍生物，某些还涉及PDE4酶的抑制活性(WO03/068233;WO02/060875;GB2327675A)或作为VEGF受体酪氨酸激酶抑制物(WO01/55114)。例如，制备4-芳基-烟酰胺衍生物的过程(WO05/014549)。

[0098] 与上述相关，现在令人惊讶地发现，当hSC在存在NA的情况下分化时，它们的性质被改变，因而它们获得了响应TGFβ超家族的一种或更多种成员的诱导效应的能力，其使它们定向分化向RPE结局、优选的成熟和功能性RPE细胞。因此，当在之后将hSC暴露于生长因子的TGFβ超家族的一种或更多种成员时，结合在培养物中细胞对NA的预先暴露，NA的RPE分化诱导效应可以被显著地提高。

[0099] 因而，根据一个实施方式，所述方法包括用生长因子的TGFβ超家族的一种或更多种成员处理细胞，并与对NA的在先暴露组合使用。组合用于包含TGFβ和NA的培养系统的制

备;以及用于仅包含TGFβ超家族的一种或更多种成员的培养系统的制备,用于诱导/促进已经暴露于NA的hSC的分化和/或进一步分化。不受理论的限制,相信的是NA充当了分化诱导物/启动物,以及类似地,TGFβ超家族的一种或更多种成员充当了RPE分化促进因子。此外,不受到理论的限制,相信的是,hSC对NA的在先暴露为细胞提供了性质,所述性质允许它们对TGFβ超家族的一种或更多种成员的RPE分化促进效应的响应。

[0100] 因而,根据本发明的实施方式,hSC首先在包含补充有NA的基础培养基的培养系统中培养至少几个小时,优选的至少一天,更优选的至少2天,在将该细胞培养物中的细胞在补充有TGFβ超家族的一种或更多种成员的基础培养基(相同的或不同的)中培养之前。

[0101] 根据另一个实施方式,未分化的hSC在包含补充有NA和TGFβ超家族的一种或更多种成员的基础培养基的培养系统中培养。

[0102] 注意的是,各种基础培养基是本领域已知的,用于细胞培养物和优选的用于SC培养物。可以根据当前的公开使用的基础培养基的非限制性列表包括Neurobasal™(CAT#21103-049,Gibco 1998/1999)、KO-DMEM(CAT#10829-018,Gibco 1998/1999)、DMEM(CAT#41965-039,Gibco 2004)、DMEM/F12(CAT#21331-020,Gibco 2004)、Cellgro™干细胞生长培养基(CAT#2001,CellGenix 2005)或X-Vivo™(CAT#04-380Q,LONZA 2007)。

[0103] 当前的公开还提供了诱导hSC定向分化为RPE结局的方法,所述方法包括:

[0104] (a)提供包含hSC的细胞培养物;

[0105] (b)在培养系统中培养所述细胞培养物中的细胞,所述培养系统包含补充有TGFβ超家族的一种或更多种成员的基础培养基,从而促进hSC定向分化为RPE结局。

[0106] 分化可以在hSC的自由浮动的群集或附着的培养物内发生。描述了在附着的培养物中的体细胞分化[美国专利No.7,112,437]。这样的附着的培养物因而可以充当用于通过培养系统诱导RPE分化的基础,所述培养系统补充有生长因子的TGFβ超家族的至少一种或更多种成员。

[0107] 细胞培养物中的细胞可以是未分化的hSC的群体,或是其中至少部分hSC已经开始分化的细胞的群体。所述起始的分化是定向分化。因而,在本公开的上下文中,所述方法中提供的细胞有时被称为分化中的细胞。

[0108] 如上文已经指出的,基础培养基可以通过向其中导入可溶的成分和不溶成分来补充。对于具有生长因子的TGFβ超家族的一种或更多种成员的补充,所述成员可以以可溶的形式存在,或固定于或缔合于添加到培养系统的基质或细胞,或所述成分可以结合或复合于其他物质。所述成员还可以从后者中存在的细胞分泌到培养系统中。

[0109] hSC可以以未分化的状态、以及在暴露于分化促进因子(分化引发试剂)例如NA之后提供。未分化的hSC可以从各种培养系统获得,在所述培养系统中hSC可以被维持在未分化的多能状态。例如,细胞可以被培养在无饲养物(feeder-free)的附着或悬浮系统(WO06/070370)中或饲养细胞上。通常使用的饲养细胞包括原代小鼠胚胎成纤维细胞(PMEF)、小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)、鼠胎儿成纤维细胞(MFF)、人类胚胎成纤维细胞(HEF)、获自人类胚胎干细胞的分化的人类成纤维细胞、人类胎儿肌细胞(HFM)、人类胎儿皮肤细胞(HFS)、人类成年人皮肤细胞、人类包皮成纤维细胞(HFF)、获自脐带或胎盘的人类细胞、人类成年人输卵管上皮细胞(HAFT)和人类骨髓基质细胞(hMSC)。hSC的群集可以通过从饲养层或细胞外基质解离细胞来从附着细胞培养物获得来形成细胞的悬浮液。细胞的悬浮液可以包含自由

浮动的群集或基本上单细胞的悬浮液，从其中细胞的群集可以生长形成细胞群集。

[0110] 根据优选的实施方式，所述细胞培养物包含细胞悬浮液，优选的处于悬浮培养物中的自由浮动的群集，即，来自人类胚胎干细胞(hESC)的细胞的聚集物。自由浮动的干细胞的来源早先在WO06/070370中描述了，通过引用将其全部合并在此。

[0111] 根据当前的公开的培养步骤可以包括用一种或更多种不同的培养系统培养细胞培养物中的细胞，至少一种所述培养系统包含TGFβ超家族的一种或更多种成员。

[0112] 根据当前的公开的一个实施方式，培养物中的细胞在培养系统中培养，所述培养系统包含除了所述生长因子的TGFβ超家族的一种或更多种成员之外补充有NA的基础培养基。

[0113] 根据另一个实施方式，细胞首先在包含基础培养基和NA的培养系统中培养，所述细胞是未分化的hSC，优选的在hSC分化被诱导之后(即，在预定的时间之后，或通过本领域可用的技术确认细胞分化之后)，细胞培养物中的细胞在包含生长因子的TGFβ超家族的一种或更多种成员的培养系统中培养。第二培养系统还可以包含NA，即，可以是与初始的培养系统相同的，向其中添加了TGFβ超家族的成员。结果，定向分化为RPE细胞被诱导。

[0114] 根据这个实施方式，初始细胞培养物中的hSC在包含NA的培养系统中至少培养启动hSCs分化所需的时间。根据一个特定的实施方式，所述细胞培养系统在包含NA的培养系统中培养几天，优选的至少两天，优选的至少一周，更优选的至少两周。

[0115] 不受到理论的限制，本发明人规定，NA诱导定向分化过程，与自发的分化(即，在没有NA暴露或暴露于NA与TGFβ成员时)相比其在它的发展中还被加速了。已经在此显示了，在定向分化中，未分化的干细胞更为快速地从培养系统中消除。因此，NA在分化中的hSC的培养系统中使用，作为促进和加速定向分化过程的手段，用于未分化的干细胞的完全消除，据此预防潜在的并发症，例如在移植后由于未分化细胞的存在的畸胎瘤肿瘤形成。

[0116] 在此已经显示的是，与自发地分化中的细胞(即，不存在这些因子)相比，hSC对NA的暴露，跟随着对TGFβ超家族的一种或更多种成员的暴露诱导了分化为具有不同表型的细胞。

[0117] 进一步的，不受到理论的限制，发明人假定的是，NA诱导了分化成为表达TGFβ超家族的一种或更多种成员的受体(其不被自发地分化中的干细胞表达)的细胞，从而容许定向分化成为成熟的和功能性的RPE细胞。这样的受体表达容许TGFβ超家族成员对培养物中的分化中的细胞趋向RPE结局的定向分化的诱导效应，即，趋向成熟的和功能性的RPE细胞。

[0118] 如上文指出的，存在着生长因子的TGFβ超家族的多种成员。例如，根据本发明的生长因子可以是一种或更多种以下的，TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、激活蛋白A、激活蛋白B、激活蛋白AB、nodal、抗mullerian激素(AMH)、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7或生长和分化因子(GDF)。然而，优选的，TGFβ超家族的生长因子是TGFβ3或TGFβ1或激活蛋白A或它们的组合。

[0119] 根据本发明的基础培养基是本领域已知用于支持体外细胞生长的任何已知的细胞培养基，一般地，是包含规定的基础溶液的培养基，其包含盐、糖类、氨基酸和维持培养物中的细胞处于存活状态所需的任何其他营养物。可以根据本发明使用的商业上可获得的基础培养基的非限制性实施例包括Neurobasal™、KO-DMEM、DMEM、DMEM/F12、Cellgro™干细胞生长培养基或X-Vivo™。基础培养基可以补充有本领域已知的处理细胞培养物的多种试剂。以下是可以包括在培养系统中根据当前的公开使用的各种添加物的非限制性参考的实例：

[0120] -含有血清或血清替代物的培养基，例如而不限于，knock out血清替代物(KOSR)、Nutridoma-CS、TCH™、N2、N2衍生物或B27或组合；

[0121] -细胞外基质(ECM)成分，例如而不限于，纤连蛋白、层粘连蛋白和明胶。ECM可以被用于携带生长因子的TGFβ超家族的一种或更多种成员；

[0122] -抗细菌试剂，例如但不限于，青霉素和链霉素；

[0123] -非必需氨基酸(NEAA)，

[0124] -已知在促进培养物中的SC的存活方面起作用的神经营养因子，例如而不限于BDNF、NT3、NT4。

[0125] 一旦细胞被促使进入RPE结局，RPE细胞可以通过已知的方法从培养物中收回/收获，用于各种应用。

[0126] 当前的公开还提供了通过在存在TGFβ超家族的一种或更多种成员的情况下hSC的定向分化所获得的RPE细胞。根据一个实施方式，RPE细胞通过本发明的方法获得。

[0127] 上文的进一步的，通过根据当前的公开的定向分化所产生的RPE细胞具有与在自发的分化期间发育的RPE细胞相比的特定性质。

[0128] -分化中的细胞在它们的发育和分化中具有响应TGFβ信号传导的潜力。

[0129] -产生的RPE细胞是成熟的细胞(终末分化的)；

[0130] -与在自发的分化期间形成的RPE细胞相比，成熟的RPE细胞显示了更暗的色素沉着。

[0131] -与通过自发分化产生的RPE细胞中它们的表达相比较，成熟的RPE细胞表达显著更高水平的成熟RPE细胞的标志物的转录产物，例如斑萎蛋白和RPE65。在这一点上，例如，参考附图9J、11M和11K，显示了与存在NA(附图9J)的情况下的分化相比在自发的分化(无NA)中斑萎蛋白的表达，以及激活蛋白A对定向分化的增加的效力(附图11K、11M和4E)。进一步参考附图1B和9I，显示了与存在NA的情况下的分化相比，进一步与附图4D中激活蛋白A的增加效力相比较，在自发的分化(无NA)中RPE65的表达。

[0132] -在电子显微镜(EM)分析中，RPE细胞展示了成熟的真正的RPE细胞的形态学特征，其在来自自发分化中的hSC的RPE样细胞中没有展现，例如顶端的绒毛、紧密连接和基膜。

[0133] 通过当前的公开的方法产生的RPE细胞可以用于这些细胞的大规模和/或长期培养。为此，本发明的方法在适合于细胞的大规模生产的生物反应器中进行，在其中未分化的hSC将根据本发明来培养。在生物反应器中培养细胞的一般需求是本领域技术人员公知的。

[0134] 做为选择，当前的公开的方法产生的RPE细胞可以在它们的衍生之后被扩增。对于扩增，它们被离解、以低密度平板接种在胞外基质，优选的聚-D-赖氨酸和层粘连蛋白上，并在具有NA的无血清KOM中培养。在这些培养条件下，色素化细胞释放色素沉着并获得纤维样形态。在进一步延长的培养和增殖为高密度培养物之后，细胞重新获得RPE细胞的特征性的多边形形状形态学和色素沉着。

[0135] RPE细胞可以在悬浮液中或以单层扩增。RPE细胞以单层培养的扩增可以通过本领域技术人员公知的方法被修饰为在生物反应器中的大规模扩增。

[0136] 本领域技术人员很好地理解的是，RPE细胞从hSC的衍生化具有很大效益。它们可以用作体外模型用于开发新的药物来促进它们的存活、再生和功能。hSC衍生的RPE细胞可以用于对RPE细胞具有毒性或再生效果的化合物的高通量筛选。它们可以用于揭示对于光

受体细胞的发育、分化、维持、存活和功能重要的的机制、新的基因、可溶的或膜结合的因子。

[0137] RPE细胞还可以充当RPE细胞的无限的来源，用于移植、补充和支持视网膜退化中功能失常或退化的RPE细胞。此外，遗传修饰的RPE细胞可以充当载体来在移植之后在眼睛和视网膜中携带并表达基因。

[0138] 因而，根据当前的公开的进一步的方面，提供了将RPE细胞移植到受试者的眼睛中的方法，所述方法包括：

[0139] (a)提供包含hSC的细胞培养物；

[0140] (b)在包含补充有TGFβ超家族的一种或更多种成员的基础培养基的培养系统中培养细胞，从而所述hSC被促使分化成RPE细胞；

[0141] (c)从所述细胞培养物收获RPE细胞；和

[0142] (c)将所述已分化的RPE细胞移植到所述受试者的眼睛中。

[0143] 细胞的收获可以通过本领域已知的各种方法来进行。非限制性的实施例包括机械解剖和用木瓜蛋白酶解离。还可以应用本领域已知的其他方法。

[0144] hSC衍生的RPE细胞可以移植到受试者的眼睛中的各种目标位置。根据一个实施方式，RPE细胞的移植将到眼睛的视网膜下间隙，其是RPE的正常的解剖学位置(在光受体外部片段和脉络膜之间)。此外，取决于细胞的迁移能力和/或主动旁泌效应，可以考虑移植到其他的眼睛区室，包括玻璃体间隙、外视网膜的内部、视网膜外周部和脉络膜之内。

[0145] 进一步的，移植可以通过本领域已知的各种技术进行。进行RPE移植的方法在例如美国专利NO.5,962,027、6,045,791和5,941,250中，以及在Eye Graefes Arch Clin Exp Opthalmol March 1997;235(3):149-58;Biochem Biophys Res Commun Feb.24,2000;268(3):842-6;Opthalmic Surg February 1991;22(2):102-8中描述了。进行角膜移植的方法在例如美国专利NO.5,755,785中和在Eye 1995;9(Pt 6Su):6-12;Curr Opin Opthalmol August 1992;3(4):473-81;Ophthalmic Surg Lasers April 1998;29(4):305-8;Ophthalmology April 2000;107(4):719-24;and Jpn J Ophthalmol November-December 1999;43(6):502-8中描述了。如果要主要利用旁泌效应，细胞还可以被递送并维持在用半渗透容器密封的眼中，其将降低细胞对宿主免疫系统的暴露(Neurotech USA CNTF delivery system;PNAS March 7,2006 vol.103(10)3896-3901)。

[0146] 根据一个实施方式，移植通过pars pana玻璃体切除手术，随后通过小的视网膜开口递送细胞入视网膜下间隙，或通过直接注射来进行。做为选择，细胞可以通过穿巩膜的、穿脉络膜的方法递送到视网膜下间隙。此外，可以进行直接穿巩膜注射到玻璃体间隙中，或递送到接近睫状体的前视网膜外周部。

[0147] RPE细胞可以以各种形式移植。例如，RPE细胞可以以细胞悬浮液的形式导入目标位点，或附着到基质、细胞外基质或基底如可生物降解的聚合物或其组合上。RPE细胞还可以与其他视网膜细胞，例如与光受体一起移植(共移植)。

[0148] 因而，本发明还涉及包含通过本发明的方法获得的hSC衍生的RPE细胞的组合物。所述组合物优选的适合于移植到眼睛内。

[0149] 通过将本发明的方法获得的RPE细胞导入受试者的眼睛内，可以治疗或预防各种眼睛状况。所述眼睛状况可以包括一般地与视网膜功能障碍、视网膜损伤和/或视网膜色素

上皮的丧失相关的视网膜疾病或病症。可以根据本发明治疗的状况的非限制性列表包括色素性视网膜炎;先天性利伯氏黑矇、遗传或获得性黄斑变性、年龄相关的黄斑变性(AMD)、Best病、视网膜剥离、回旋形萎缩、无脉络膜、模式营养不良(pattern dystrophy)以及RPE的其他营养不良、Stargardt病、由于光、激光、炎症、感染、放射、新血管或创伤性损伤的任一项所引起的损伤的RPE和视网膜损伤。

[0150] 不受到理论的限制,移植的RPE细胞可以通过多种机制发挥它们的治疗效果。一种机制是促进退化的光受体或视网膜内的其他细胞的存活的营养支持性效应。通过本公开的方法、以及在存在TGFβ超家族成员的情况下来自hSC的RPE细胞能够潜在地通过营养效应保护邻近于它们的光受体。

[0151] 移植的RPE细胞还可以通过补充功能失常和/或退化的宿主RPE细胞的再生机制来发挥它们的效果。通过本公开的方法和在存在TGFβ超家族成员的情况下衍生于hSC的RPE细胞可以补充功能失常的宿主RPE。移植的细胞是成熟的,并具有吞噬包括视紫红质的光受体的脱落的外部片段的功能能力。

[0152] 如上所述,通过本公开的方法和在存在TGFβ超家族的成员的情况下衍生于hSC的RPE细胞是成熟的,并因而它们在移植后不在体内增殖。因此,通过本公开的方法衍生于hSC的RPE细胞对于移植疗法是更安全的,带有发育成畸胎瘤肿瘤或增殖性前体细胞的肿瘤的降低的风险。

[0153] 如在此使用的,术语“治疗(treating),(treatment)”是指本发明的hSC衍生的RPE细胞对受试者的眼睛状况的治疗性以及预防性效果,所述效果一般包括,改善与所述状况相关的症状、降低状况的严重度或治愈状况,更具体地,所述效果可以包括逆转对治疗的受试者的视网膜和RPE的损伤、改善受试者的视网膜的功能、重建受试者的视网膜和RPE,其通过替换和/或支持衰竭的宿主视网膜和RPE细胞,直接地或通过旁泌效果,以及通过减弱、抑制或停止作为所述状况的结果对受试者的视网膜造成的损伤而展现的预防性效果。

[0154] 如在本说明书和权利要求中使用的,形式“一”和“该”包括单数和复数的指代物,除非上下文明确地相反指示。例如,术语“一种生长因子”包括一种或更多种生长因子,术语“生长因子”包括一种生长因子和超过一种生长因子。

[0155] 如在此使用的,术语“或”是指两种或更多种所列选择的一种或组合。此外,使用随后是由术语“和”分隔的一系列选项的用语“选自”包括两种或更多种所列选项的一种或组合。

[0156] 进一步,如在此使用的,术语“包含”意图指所述方法或组合物包括所述的元素,但不排除其他的。类似地,“基本上由……组成”被用于定义方法和系统,其包括所叙述的元素但是排除其他元素,所述其他元素可能对于本发明的培养系统的功能性具有本质的重要性。例如,基本上由基础培养基、培养基添加物和饲养细胞组成的培养系统将不包括、或将仅包括无关紧要的数量(该数量将对培养系统中的细胞增殖和分化具有无关紧要的影响)的、对培养物中的细胞有影响的其他物质。并且,基本上由在此定义的元素组成的组合物将不排除来自分离和纯化方法的痕量染污物。“由……组成”将是指排除超过痕量的其他元素。这些过渡术语的每一个所定义的实施方式处在本发明的范围之内。

[0157] 进一步的,所有的数值,例如浓度或剂量或其范围,是近似值,其从声明的值变化(+)或(-)最多达20%,有时最多达10%。要理解的是,即使不一定明确地声明,所有的数字

符号之前是术语“约”。还要理解的是，虽然不一定明确地声明，在此描述的试剂仅仅是示范性的，它们的等同物是本领域已知的。

[0158] 某些示范性的实施方式

[0159] 材料和方法

[0160] HES细胞培养物

[0161] 通过慢病毒载体来改造以持续表达eGFP的人类ESC(HES1细胞系)和hESC[Gropp M,Itsykson P,Singer O,Ben-Hur T,Reinhartz E,Galun E,and Reubinoff BE.Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors.Molecular Therapy7:281-7(2003)]在KO培养基(KOM)中在人类包皮成纤维细胞饲养层上培养，所述KO培养基由86％KO-DMEM(Gibco,Invitrogen,Gaithersburg,MD)、14％KOSR(Gibco)、1mM谷氨酰胺、1％非必需氨基酸、50单位/ml青霉素(Gibco)、50μg/ml链霉素、(Gibco)和4ng/ml bFGF(R&D Systems,Inc.,Minneapolis,MN)组成。hES细胞每周用IV型胶原酶(1mg/ml;Gibco)传代并平板接种在新鲜的饲养层上。分化的诱导前一周，通过用补充有0.05％EDTA(Biological Industries,Beit Haemek,Israel)的无Ca/Mg^{++}PBS解离成近乎单细胞悬浮液来传代细胞，并在饲养物上重新平板接种。

[0162] 悬浮培养物中的EB形成

[0163] 在如上述将分离成单细胞的hES细胞平板接种后六-八天；通过用IV型胶原酶处理将它们从饲养物上除下。在存在或缺少10mM烟酰胺(NA)(Sigma,St.Louis,MO,USA)的情况下，在用0.1％低熔点温度琼脂糖预先包被的细菌学平皿内，在KO培养基(KOM)中，团块被悬浮培养各个时间最多到12周，所述KO培养基由86％KO-DMEM、14％KOSR、1mM谷氨酰胺、1％非必需氨基酸、50单位/ml青霉素和50μg/ml链霉素组成。在某些实验中，使用的培养基是补充有N2添加物(1:100)(Gibco)的Neurobasal™培养基(Gibco)(NN培养基)，其在1周后用补充有B27(1:50)(Gibco)的DMEM/F12(Gibco)替换。

[0164] 在存在TGFβ生长因子或抑制物的情况下hESC分化成为RPE细胞

[0165] 人类ESC被容许在存在烟酰胺(NA)10mM的情况下在如上述的KOM中作为自由漂浮的群集来分化最多到六周。在第一周或2周的分化之后，培养物补充激活蛋白A 20-180ng/ml(PeproTech Inc,Rocky Hill,NJ)、TGFβ3(1ng/ml;R&D Systems Inc,Minneapolis,MN)、TGFβ1(1ng/ml-20ng/ml;R&D Systems Inc)或SB431542(5μM-50μM,Sigma)。对照培养基补充单独的NA。

[0166] 在KOM中悬浮的人类ESC还在一周后存在或不存在NA的情况下补充骨骼形态发生蛋白(BMP)拮抗剂头发生素(700ng/ml R&DSystems Inc,Minneapolis,MN)，或者在第3和第4周在存在NA的情况下补充FGFβ(20ng/ml PeproTech Inc)，并容许作为悬浮的自由漂浮群集分化最多到6周龄。

[0167] RPE细胞的扩增的描述

[0168] 为了扩增RPE细胞，色素化的群集被轻轻地机械解离为小块，在聚-D-赖氨酸(30-70kDa,10μg/ml)和层粘连蛋白(4μg/ml)上低密度平板接种，并在具有NA的KOM中培养。在这些培养条件下，色素化细胞失去色素沉着并获得纤维样形态。在进一步培养1.5个月并增殖为高密度培养物之后，细胞重新获得RPE细胞的特征性的多边形状形态和色素沉着。

[0169] 如下所述对所有培养物进行免疫染色和实时RT-PCR。

[0170] 群集内已分化的细胞的间接的免疫荧光染色

[0171] 为了表征聚集物内细胞的免疫表型，使用0.04％胰蛋白酶/0.04％EDTA，或用木瓜蛋白酶解离系统(Worthington Biochemical，Lakewood，NJ)将培养了2、4、6或8周的群集轻轻地离解，产生的小块和单细胞平板接种在单独补充有聚-D-赖氨酸(30－70kDa，10-20μg/ml)上的NA的KO培养基中，或补充有层粘连蛋白(4μg/ml)或纤连蛋白(10-20μg/mL；全部来自Sigma，St.Louis，http://www.sigmaaldrich.com)的KO培养基中。在2小时后细胞用4％多聚甲醛固定，并检查巢蛋白(1:200)、聚唾液酸NCAM(PSA-NCAM)(1:100)、Musashi(1:200；全部来自Chemicon，Temecula，来自CA)、Pax6(DSHB，1:100或Chemicon，1:250)、Otx2(Chemicon，1:200)、MiTF(Lab Vision Corporation，Fremont，CA；小鼠IgG_1，1:50)的表达。

[0172] 对于色素化细胞的富集制品的免疫染色，分化8-10周的漂浮块内的细胞的色素化(Brown)群集通过玻璃微量移液管或解剖刀片(No 15；Swann-Morton Sheffield，Eng)机械地解剖和分离。

[0173] 富集了色素化细胞的分离的群集通过有/没有胰蛋白酶(0.025％，PBS中3mM EDTA)消化或木瓜蛋白酶解离(木瓜蛋白酶解离系统；Worthington Biochemical Corporation，Lakewood，New Jersey)的辅助的研磨法来机械地解离成较小的块。细胞的小的群集平板接种在聚-D-赖氨酸包被的(30-70kDa，10μg/ml；Sigma)和层粘连蛋白包被的(4μg/ml；Sigma)玻璃盖玻片上，并在用于hESC群集的悬浮培养的培养基中培养另外3-5周。生长物内已分化的细胞用4％多聚甲醛在室温下固定30分钟。对于用抗细胞内标志物抗体的免疫染色，细胞膜用补充有用于阻断的正常山羊血清(5％，Biological Industries)的PBS中的0.2％Triton X100(Sigma)渗透化30分钟。细胞用以下初级抗体孵育：抗MiTF(Lab Vision Corporation，Fremont，CA；小鼠IgG_1，1:50)；抗RPE65(Novus Biologicals，Littleton，CO；小鼠IgG_1，1:300)；抗斑萎蛋白(Novus Biologicals；小鼠IgG_1，1:150)；抗ZO-1(Zymed Laboratories Inc.，San Francisco，CA；兔多克隆，1:10)；抗Ki67(Dako Denemark A/S；，1:50)和抗CRALBP(由John C.Saari，University of Washington，Seattle惠赠；兔多克隆，1:100)。细胞还用鬼笔环肽(1:200Sigma)孵育。

[0174] 初级抗体定位通过使用荧光素异硫氰酸(FITC)缀合的山羊抗小鼠免疫球蛋白(Dako Denmark A/S；1:20-1:50)、缀合到$Cy^{TH}3$的山羊抗小鼠IgG(1:500)(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc，West Grove，PA)、缀合到Cy2的兔抗山羊IgG(1:200；Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc)和缀合到荧光素异硫氰酸(FITC)的猪抗兔Ig(Dako；1:50)来进行。

[0175] 通过RT-PCR和实时PCR分析hESC群集

[0176] 从在无血清条件(传代后1周)下生长的、以及有或者没有补充TGFβ超家族生长因子或拮抗剂、在存在或缺少10mM烟酰胺的情况下培养hESC衍生的群集期间最多到8周的连续时点生长的hESC提取总RNA。使用TRIzol试剂(Invitrogen，http://www.invitrogen.com)或TRI-试剂(Sigma)分离RNA。根据厂家的说明书(Promega Corporation，Madison，WI，http://www.promega.com)使用Moloney鼠白血病毒逆转录酶(M-MLV RT)和随机引物进行cDNA合成。聚合酶链式反应(PCR)使用Taq DNA聚合酶(GIBCO-BRL)用标准方案进行。扩增条件如下：在94℃变性15秒，在55℃退火30秒，在72℃延伸45秒。取决于特定的mRNA丰度，循环数在18到40之间变动。用于鉴定人类基因转录产物(正向和反

向5'-3')的引物人类序列和扩增产物的长度如下(SEQ ID NO:1-12):

[0177] MiTF-A(GAGCCATGCAGTCCGAAT,GACATGGCAAGCTCAGGACT;486bp);

[0178] RPE65(GCTGCTGGAAAGGATTTGAG,CAGGCTCCAGCCAGATAGTC;231bp);

[0179] 斑萎蛋白(GAATTTGCAGGTGTCCCTGT,ATCCTCCTCGTCCTCCTGAT;214bp);

[0180] CRALBP(AGCTGCTGGAGAATGAGGAA,CAAGAAGGGCTTGACCACAT;218bp)

[0181] MERTK(AAGTGATGTGTGGGCATTTG,TCTAAGGGATCGGTTCTCCA,189bp);

[0182] ACTRIA(AATGTTGCCGTGAAGATCTTC,CTGAGAACCATCTGTTGGGTA;699bp);

[0183] ACTRIB(CACGTGTGAGACAGATGGG,GGCGGTTGTGATAGACACG;346bp);

[0184] ACTRIIA(AACCATGGCTAGAGGATTGGC,CTTTCACCTACACATCCAGCTG;551bp);

[0185] ACTRIIB(CACCATCGAGCTCGTGAAG,GAGCCCTTGTCATGGAAGG;611bp);

[0186] 激活蛋白A(CTTGAAGAAGAGACCCGAT;CTTCTGCACGCTCCACCAC;262bp);

[0187] β-肌动蛋白(TTCACCACCACGGCCGAGC,TCTCCTTCTGCATCCTGTCG;351bp);

[0188] GAPDH(AGCCACATCGCTCAGACACC;GTACTCAGCGCCAGCATCG;301bp).

[0189] 对于实时PCR,使用来自商业上可获得的TaqMan^{R}Assays-on-Demand基因表达产品(Applied Biosystems,Foster City,CA)的TaqMan引物和探针监视转录产物的水平:

[0190] Oct4,ID Hs01895061;Musashi,ID Hs01045894;Pax6,ID Hs00240871;Six3,ID Hs00193667;Rx1,ID Hs00429459;Chx10,ID Hs01584048;MiTF-A,ID Hs01115553;MiTF-total,ID Hs01115557;Bestrophin,ID Hs00188249;RPE65,ID Hs00165642;Sox10,ID Hs00366918;Crx,ID Hs00230899。使用ABI Prism 7000HT和ABI Prism 7900HT序列检测系统和TaqMan®通用PCR主混合物(Applied Biosystems)根据厂家的方案进行定量PCR分析。持家基因β-葡糖醛酸酶(GusB,分析ID Hs99999908)被选作实时RT-PCR定量分析中标准化的内部参考物,每种基因的相对表达水平显示为当0天(或未处理的细胞)的表达水平被设为1时的相对值。扩增反应根据厂家的方案(Applied Biosystems)一式两份或三份地进行。

[0191] 透射电子显微镜术和胶乳珠子的吞噬作用

[0192] 人类ESC衍生的群集在KOM中悬浮培养。然后机械地分离色素化区域,并加工用于透射电子显微镜术。细胞用2%戊二醛和4%甲醛在0.1M二甲胂酸盐缓冲液pH 7.4中固定。在0.1M二甲胂酸盐缓冲液中三次洗涤之后,组织用1%四氧化锇和1.5%铁氰化钾后固定,用提高浓度的乙醇脱水,包埋在Agar 100树脂中。通过LKB ultrotome 3切割的超薄切片用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色。用装备有Megaview II CCD摄像机和Analysis版本3.0软件(Soft Imaging System,http://www.soft-imaging.net)Tecnai 12电子显微镜(Phillips,Eindhoven the Netherlands http://www.philips.com)拍摄显微照片。

[0193] 为了检查吞噬能力,色素化群集与浓度1.0×10^{9}个珠子/ml的1μm胶乳珠子(Polysciences Inc.,Warrington,PA)在37℃孵育18小时。色素化群集然后用PBS+洗涤,使用木瓜蛋白酶解离系统解离成单细胞或小块并平板接种在聚-D-赖氨酸上。在固定之后,细胞膜用红色荧光染料PKH(Sigma)染色。使用共焦显微镜(Olympus Fluoview FV1000)分析吞噬作用。

[0194] 流式细胞术

[0195] 进行流式细胞计分析来测定有或者没有烟酰胺补充分化的hESC衍生的群集内不

同时点的PSA-NCAM和TRA-1-60阳性细胞的数目。群集用0.04%胰蛋白酶/0.04%EDTA离解。单细胞然后用抗-PAS-NCAM或抗-Tra-1-60抗体(都来自Chemicon;1:100)染色,用缀合到FITC的山羊抗小鼠免疫球蛋白(Dako;1:100)检测,然后用细胞生存力染料碘化丙锭(propidium iodide)(0.005mg/ml;Sigma)复染。对照细胞仅与第二抗体孵育。细胞相关的免疫反应性使用CellQuest软件用FACScalibur(Becton Dickinson Immunocytometry Systems)分析。

[0196] hESC衍生的已分化的RPE细胞的玻璃体内和视网膜下的移植

[0197] 对于眼内移植,被工程化来表达eGFP的hESC[如早先在Gropp et al.,Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors.Molecular Therapy 2003;7:281-7.中描述的]被用于产生如上所述的培养物中的RPE细胞。简要地,在存在单独的NA的情况下或存在补充有激活蛋白A的NA的情况下分化6-8周之后,富集了色素化细胞的群集通过解剖来机械地分离。为了容许通过小口径玻璃毛细管的注射,团块通过木瓜蛋白酶(Papain Dissociation System;Worthington Biochemical Corporation,Lakewood,New Jersey)在37℃消化30分钟随后研磨来进一步解离成细胞的较小的群集。

[0198] 十五只成年白化大鼠(体重230-250g)和超过100只1-3周远系杂交的营养不良的RCS大鼠被用于眼内的移植。在RCS大鼠中,Mertk基因中的突变引起RPE功能障碍,这导致在生命的前几个月中的视网膜退化。所有动物试验根据眼科和视觉研究中使用动物的ARVO声明来进行,由Hebrew大学Hadassah医科学校的动物研究机构委员会批准。

[0199] 对于移植(以及对于电视网膜图像记录),动物用氯胺酮HCl(Ketalar,Parke Davis,UK;100mg/kg)麻醉,与松弛试剂赛拉嗪(2.0mg/kg)一起腹腔内地注射。施用局部麻醉滴剂(奥布卡因HCl 0.4%;Fischer Pharmaceuticals,Israel)。瞳孔用托吡卡胺0.5%(Mydramide,Fisher Pharmaceuticals,Israel)和去氧肾上腺素HCl 2.5%(Fisher Pharmaceuticals,Israel)扩大。在解剖显微镜(Stemi SV 11,Zeiss,Germany)的可视化之下,4μL培养基中大约100,000个细胞通过穿巩膜的、或穿脉络膜的方法通过连接到气动Pico注射器(PLI-100;Medical System Corp.,Greenvale,NY,http://www.medicalsystems.com)的玻璃毛细管注射到玻璃体中或视网膜下间隙中,未注射的同类的眼睛充当一种类型的对照。作为另外的对照,眼睛用盐水(氯化钠注射液BP,0.9%,B.Braun Melsungen AG,Melsungen,Germany)注射。

[0200] 在注射期间和之后,没有观察到脉络膜的出血。使用加热灯在整个操作和操作之后使动物保持温暖。在移植之后,所有动物在它们的饮用水中以210mg/l的浓度接受免疫抑制试剂环孢霉素A(Sandimmune,Novartis Pharma AG,Basel,Switzerland)。

[0201] 移植的细胞的体内和离体成像

[0202] 为了监视在体内移植的细胞的存活和位置,麻醉的动物使用彩色眼底照相机(Zeiss,Germany)成像,使用扫描激光检眼镜(HeidelbergHRA,Germany)上的荧光素滤波器检测GFP表达细胞的荧光。在某些眼睛中,GFP阳性移植物的位置还使用荧光显微镜(Canon,Japan)在眼杯制品中离体测定。

[0203] 在hESC衍生的RPE细胞的眼内移植之后宿主视网膜功能的评定

[0204] 移植后四到六周,通过视网膜电描记术(ERG)在移植的和对照的RCS大鼠眼睛中评

定视网膜功能。在暗适应过夜之后记录全视野ERG。动物在暗淡红光中用氯胺酮和赛拉嗪麻痹，瞳孔用托吡卡胺和苯肾上腺素扩大。单极的大鼠ERG晶状体电极(lens electrode)(Medical Workshop,Amsterdam,Netherlands)在另外的局部麻醉之后置于每只眼上，参考电极和接地电极分别置于舌头和尾部。商售的计算机化ERG系统(LKC技术,UTAS 3000)被用于记录对使用置于Ganzfeld碗上氙光频闪器闪光(photostrobe flash)(Grass,PS-22)产生的全视野刺激的视网膜反应。在暗视条件下暗淡的蓝色闪光被用于引发主要视杆驱动的反应。在暗适应状态下蓝色的更强刺激强度和白色闪光下，记录混合的视锥-视杆反应。在灯光适应的(适应光的)条件下，使用对视杆抑制性34cd/m^2白色背景的白色闪光，产生1Hz和16Hz视锥反应。信号在0.3-500Hz之间过滤，使用信号平均。

[0205] 移植的眼睛的组织学和免疫组织化学的评估

[0206] 在移植后4-8周处死动物，剜出眼睛用于组织学和免疫组织化学的检验。在Davidson溶液中固定之后，眼睛包埋入石蜡中，以4μm连续切片来切片。每五个切片用苏木素和曙红染色用于组织形态学评估和定量。对于间接免疫荧光法研究，为了表征移植的细胞的分化的状态，样本在二甲苯中去石蜡，并在梯度酒精中脱水，用磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH 7.4)漂洗，在110℃用10mM柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)孵育4分钟。在用PBS洗涤之后，样本用含有1％牛血清白蛋白(BSA)、0.1％Triton X100(Sigma-Aldrich)和3％正常山羊或正常驴血清的PBS溶液在室温下阻断1小时。随后，切片在湿润的房间中与以下初级抗体的合适的组合孵育1小时：抗绿色荧光蛋白质(抗-GFP)、其与荧光素(FITC)或罗丹明(TRITC)缀合(Santa Cruz Biotechnology,Inc,Santa Cruz,CA;小鼠单克隆的,1:100);抗RPE65(Novus Biologicals,Littleton,CO;小鼠IgG_1,1:100);抗斑萎蛋白(Novus Biologicals;小鼠IgG_1,1:100);抗ZO-1(Zymed Laboratories Inc.,San Francisco,CA;兔多克隆的,1:100);和抗视紫红质(Santa Cruz Biotechnology,Inc,Santa Cruz,CA;兔多克隆的,1:100)。在PBS中洗涤之后，通过使用Cy™2缀合的山羊抗兔IgG(1:200)、Cy™2缀合的山羊抗小鼠IgG(1:200)、Cy™3缀合的山羊抗兔IgG(1:200)、Cy™2缀合的驴抗小鼠IgG(1:200)、Cy™5缀合的驴抗兔IgG(1:200;全部来自Jackson ImmunoResearch Laboratories,Inc,West Grove,PA)进行初级抗体定位。用含有4,6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)的封固剂(Vector Laboratories,Burlingame,CA)或用碘化丙锭1μg/ml(BioLegend,San Diego,CA)复染核。为了测定抗原抗体反应的特异性，进行具有不相关的同种型匹配的抗体的相应的阴性对照。装备有DP70数字照相机(Olympus,Japan)的Olympus BX41显微镜被用于荧光和光学显微成像。共焦图像在围绕IX70倒置显微镜构造的Olympus Fluoview 300(FV300)共焦显微镜(Olympus,Japan)上采集。488-nm Ar、543HeNe-绿色和633HeNe红色激光器与Nomarski光学器件组合使用。

[0207] 在接近RPE移植物处光受体层拯救的定量

[0208] 为了定量hESC衍生的RPE移植对于退化的宿主视网膜的效力，获得苏木素和曙红染色的切片的高分辨率显微镜图像，使用Photoshop软件(Adobe,USA)构建视网膜的全长的剪辑画面。总视网膜厚度、外核(光受体)层的厚度以及内部和外部片段层的厚度使用J-图像程序(NIH)在接近hESC衍生的RPE细胞的视网膜下移植物处测量。这些与远离移植物的视网膜相应的对侧中获得的测量值相比。由于在RCS大鼠中的退化过程是位置依赖性的，在与睫状体相等距离的区域中测量厚度。在每个区域中，至少三个等距离的测量值被平均。

[0209] 结果

[0210] 已分化的RPE的表征

[0211] hESC的分化通过将它们在补充有NA的KO培养基中作为自由漂浮的群集来培养来诱导。在这些培养条件下，高度浓缩色素化细胞的限定的区域在分化中的群集内发育，如附图3A中所示。这些色素化区域在4周的分化后出现，在8周后72.9±2.5％的群集具有色素化区域。在没有NA补充的情况下4周的分化后没有观察到色素化区域，在这些条件下，仅13.1±4.8％在8周后发育为色素化区域(附图8A和8B)。因而，与自发地分化中的hESC群集相比，NA处理增加/促进了hESC群集内向色素化细胞的分化。

[0212] 在存在NIC的情况下分化了8周的群集内，5.7±1.0％的细胞是色素化的，5.4±1.1％表达早期RPE标志物MiTF，大多数情况下MiTF的表达与色素沉着相关(附图8C)。已分化的hESC的部分离解和平板接种的群集，与其他类型的已分化的细胞一同，发育成为由色素化细胞的单层组成的菌落，如暗视野显微照片(附图3D)和相差图像(附图3E)所示。这些菌落内的细胞呈现了多边形的形状，形成了细胞的“鹅卵石”样片层，在它们之间具有紧密连接(附图3E)，具有天然RPE细胞的高度特征性的特征。细胞内的F-肌动蛋白分布接近它们的膜，与真正的RPE细胞相像，如通过用鬼笔环肽染色所展现的(附图10A)。色素化的RPE细胞共表达RPE标志物Otx2(附图3B)和MiTF-A(附图3B和附图3F)以及ZO-1(附图3G)、斑萎蛋白(附图3H)、RPE65(附图3I)和CRALBP(附图3J)。

[0213] 在解离、低密度平板接种并培养之后，色素化细胞失去了色素沉着并获得了纤维样的形态，如通过相差成像所示的(附图3K和10B)。在进一步延长的培养和增殖为高密度培养物之后，细胞重新获得RPE细胞的多边形形状形态和色素沉着(附图3L和10C)。

[0214] 电子显微镜检查(EM)分析展现了，hESC衍生的色素化细胞具有天然RPE细胞的形态学特征，包括它们的顶面上的微绒毛(附图10D)和它们的基面上的基膜(附图10E)。细胞含有黑色素微粒(附图10D)并且通过紧密连接来附着(附图10F)。

[0215] RPE细胞的最重要的功能之一是光受体脱落的外部片段的吞噬作用。为了检查hESC衍生的色素化细胞是否具有吞噬能力，它们与1μm荧光胶乳珠子孵育。三幅共焦荧光图像表现了连续的Z轴切片(附图10H-10J)。共焦显微镜分析显示了，推定的RPE细胞能够吞噬荧光珠子(附图10G-10J)。

[0216] 烟酰胺的分化诱导效应

[0217] hESC朝向RPE结局的分化通过将它们在有或者没有NA的KOM中作为自由漂浮的群集培养来检查(没有提供自发地分化中的群集作为对照)。在6周的分化之后，RPE细胞的标志物MiTF-A和RPE65的表达水平在存在NA的情况下显著提高，如通过实时RT-PCR所测定的(分别地，附图1A和1B)。MiTF-A的表达在存在NA的情况下几乎提高了两倍，而RPE65的表达提高了几乎30倍。由于大多数色素化细胞共表达MITF-A(附图8C)，看来在存在NA的情况下，在每个色素化细胞的RPE65表达水平方面存在显著的和突出的提高。因而，除了它朝向RPE结局的诱导效应之外，NA还促进RPE细胞的成熟，并对细胞的表型有影响。在2到6周之间连续的时点的Q-PCR分析显示了在存在NA的情况下MiTF-A和RPE65表达水平(分别地，附图1C和1D)方面的提高。标志物的表达在四周的分化之后被增量调节，在接下来的四周期间表达的水平继续提高(最后两周未显示)。通过在平板接种的、色素化群集中细胞的RT-PCR，显示了RPE标志物斑萎蛋白、CRALBP和Mertk的类似提高的表达(附图1E)。

[0218] 为了发现RPE细胞的体外发育是否重演RPE在体内的关键发育步骤，进行了时程实验，包括分析RPE发育期间hESC群集内关键标志物的表达。在存在或缺少NA的情况下的群集分化通过未分化的hESC的标志物的表达的实时PCR、早期神经分化、视网膜和RPE发育来分析(附图9A-9L)。首先展现了未分化的hESC的标志物Oct4的表达(附图9A)在存在NA的情况下的分化期间更快速地的下降。一致地，FACS分析展现了，未分化细胞的表面膜标志物TRA-1-60的表达在NA处理的样品中也更快速地降低(附图9M)。因而，在存在NA的情况下的分化可以用于从培养物中消除未分化的细胞，并且可以帮助避免移植后的畸胎瘤肿瘤形成。

[0219] 此外，NA处理增强了早期神经分化的过程。在存在NA的情况下，早期神经标志物Otx2(附图9B)、Pax6(附图9D)和Musashi(附图9C)的转录产物的表达分别在2、2-6和4-6周的分化后显著地提高。通过神经前体的标志物PSA-NCAM的表达的FACS分析，在蛋白水平上展现了类似的结果(附图9O)。在具有NA的4周分化之后，与对照群集中14.4±5.9％相比，81.4±6.3％的细胞表达PSA-NCAM，间接免疫荧光染色确认了，在4周，NA处理的群集内大部分细胞获得了神经表型并表达PSA-NCAM(74.2±4.1％)、巢蛋白(55.9±10.1％)和Musashi(71.4％;附图9N)。

[0220] 视网膜特定化和形态发生的关键调节基因Rx1和Six3(分别为附图9F和9E)的转录产物的表达在分化后2周展现。NA处理提高了这些基因的表达。

[0221] 在存在NA的情况下，早期RPE标志物MiTF A的转录产物的表达在4周的分化后被诱导(附图9H)。更为成熟的RPE的标志物斑萎蛋白和RPE65的表达分别在4周和8周之后被主要地增量调节(分别为附图9J和9I)。与作为对照的自发地分化中的hESC群集相比，在NA处理的培养物中，这些转录产物的表达也更高(附图9I和9J)。RPE65的表达增加超过100倍，进一步确认了除了诱导效应之外，NA还对细胞的表型有影响。为了排除所获得的色素化细胞不是神经脊衍生的黑色素细胞，展现了Sox10的表达，其是这些细胞的发育标志物，与M51黑素瘤细胞系的对照细胞相比是低的，并且不取决于NA补充。因而所述培养物不由黑色素细胞组成。因而，断定的是，NA促进了朝向RPE结局的分化的诱导。

[0222] NA处理还提高了Chx10的表达，其调节神经视网膜视网膜祖代和光受体祖代标志物Crx的增殖(附图9K)。

[0223] 总之，发明人断定的是，hESC群集内的RPE分化过程经历了与真正的体内RPE发育相似的步骤，并且被NA增加。此外，NA对所获得的RPE细胞的表型有影响。这些细胞不同于在自发的分化后获得的RPE细胞，并且以显著更高的水平表达成熟RPE细胞的标志物。NA显示了与培养基无关的诱导效应

[0224] 在KO培养基和NN/DMEM培养基中培养12周的已分化的细胞中，NA补充提高了色素沉着，如分化中的hESC的群集的暗视野显微照片所示(附图2A-2D)。在一周后进一步被DMEM/F12-B27(NN/DMEM)替换的NN培养基中，与KO相比，在存在NA的情况下，群集总数中色素化hESC群集的百分比是更高的，而相对于KO培养基中培养的群集它们的大小和总群体数量是较小的。RT-PCR分析显示了NA补充提高了MiTF-A的表达，在KOM中大约3倍，在NN/DMEM培养基中大约2.5倍(附图2E)。补充NA与没有NA相比，RPE65的表达在KOM中是近似加倍的，在NN/DMEM培养基中提高几乎6倍(附图2F)。因而，NA的分化诱导效应在已分化的RPE细胞中显示了，与在其中培养hESC并发生分化的培养基无关。

[0225] TGFβ超家族的成员对SC分化的效力

[0226] 首先分析的是在2周龄群集中激活蛋白受体以及激活蛋白A的表达。在这个时点进行分析，因为早期眼睛区域(eye field)标志物的表达在这个时间出现，因而分化中的细胞可能处于与早期视泡平行的发育阶段。展现的是，与细胞没有NA的情况下分化时缺乏或较少的表达相比，受体ACTRIB和ACTRIIB的表达在存在NA的情况下是高的(附图11G)。因而NA存在时对细胞分化的表型有影响。

[0227] 发现激活蛋白A增强朝向RPE结局的分化。分化4周的hESC衍生的群集的暗视野显微照片显示了在存在激活蛋白的情况下在这个早期阶段色素化细胞的出现(附图11A)。进一步显示了在存在NA的情况下，激活蛋白A显著地增强hESC朝向RPE细胞的分化(附图4A-4B和11B-11C)。包括色素化细胞的群集的百分比(50.7±6.5vs17.7±3.2)，以及来自细胞总数的色素化细胞的百分比(9.9±1.4vs 2.4±1.2)，与补充有NA而没有激活蛋白A的对照培养物相比，在存在激活蛋白A的情况下诱导分化时显著更高(附图11H和11I)。这个结果用RT-PCR确认了，其显示了激活蛋白A处理显著地提高(分别超过五倍和超过四倍)对于成熟RPE细胞特异的标志物RPE65(附图4D)和斑萎蛋白(附图4E)的表达。此外，在存在激活蛋白A的情况下发育的色素化细胞的群集的形态学特征是不同的。它们的色素沉着是更暗色的，它们显示了与围绕的非色素化的细胞的非常清楚的界限(附图4B)。在RPE发育期间较早出现的标志物MiTF-A的表达不受补充激活蛋白A的影响。因而，作为生长因子的TGFβ超家族的成员的激活蛋白A增强了hESC向RPE细胞的分化。激活蛋白抑制物SB431542的补充显著地降低在这些条件下色素化群集的出现(附图11E和11H)。在各种浓度下研究了激活蛋白A对RPE分化的影响。对于色素化细胞的百分比和RPE标志物斑萎蛋白(附图11K)和RPE65(附图11L)的表达，影响被发现是剂量依赖性的，最佳增强效果在140ng/ml。在大多数实验中，激活蛋白A在群集已经分化2周后添加持续两周(第3-4周)，因为我们发现在这个时间应用对于增强RPE分化是最佳的。考虑到观察结果，早期眼睛发育的标志物的表达也在分化的2周后开始(附图9A-9L)，看起来激活蛋白增强了眼睛和RPE发育的过程。此外，由于在存在激活蛋白A的情况下色素化细胞的百分比提高5-6倍，而成熟RPE细胞的标志物例如斑萎蛋白的表达提高约10倍，看起来激活蛋白A除了它的诱导效应之外对细胞的成熟和表型有影响。这得到在存在激活蛋白A的情况下获得的色素化细胞的形态学外观的支持，它们是更暗色的，具有与周围细胞的清晰的界线。

[0228] 2周激活蛋白A处理对于基因表达的影响的Q-PCR时程分析显示，激活蛋白A显著地提高视网膜祖代标志物Rx1和Chx10以及RPE标志物斑萎蛋白的表达。在分化的4周，激活蛋白A处理还提高了总MiTF同种型的表达水平(附图11M-11P)。

[0229] 激活蛋白A对视网膜和RPE分化的诱导效果还用TGFβ超家族的其他成员观察到。使用TGFβ3处理分化中的群集显著地增强MiTF-A的转录产物的表达水平，MiTF-A在RPE体内发育中起到关键作用(附图5F)。此外，用TGFβ超家族的另一个成员TGFβ1处理也显著地提高带有色素化细胞的群集的出现(附图11D和11H)。相比之下，在存在NA和基础的FGF(bFGF)、而非来自TGFβ超家族的因子的情况下的分化消除了色素化细胞的出现(附图11F)。

[0230] 此外，显示的是属于TGFβ超家族的第二亚族的骨骼形态发生蛋白(BMP)在hESC的RPE分化中起到作用。如在暗视野显微照片中所示，在存在BMP拮抗剂头发生素的情况下，hESC群集向色素化RPE细胞的分化被阻断(附图5D)。即使当培养基也补充有NA时，向色素化细胞的分化也被头发生素的添加所阻断(附图5C)。在RNA水平上，实时RT-PCR展现了，在培

养基中存在和不存在NA的情况下，头发生素都显著地降低了MiTF-A的表达(附图5E)。因而，BMP在诱导hESC向RPE细胞的分化中起到作用。

[0231] 衍生自hESC的已分化的RPE细胞可以用于眼内的移植

[0232] 被工程化来表达eGFP的hESC衍生的RPE细胞的富集群体首先移植到白化大鼠的玻璃体和视网膜下间隙中，来便于色素化细胞的定位。在眼内的移植之后，移植的色素化细胞可以在体内容易地鉴定(附图6A和6B)。在附图6B显示的眼睛剜出术、除去角膜和晶状体以及分离视网膜之后，视网膜显示了主移植物和其他分散的色素化细胞(附图6C)。在组织切片中，存在着包括也表达GFP的活的色素化的移植细胞的移植物(附图6D-6G)。移植的细胞可以在玻璃体间隙中、在视网膜中、沿着注射的通道、以及在视网膜下间隙中找到(附图6H、6I、6O和6P)。移植的RPE细胞还从视网膜下的移植物迁移，整合到宿主大鼠的RPE层内(附图6J)。在移植物中，形成了作为RPE细胞的特征的紧密连接，如在移植的eGFP阳性细胞中紧密连接标志物ZO-1的表达所显示的(附图6K-6N)。移植物内的细胞还维持了RPE65、斑萎蛋白和MiTF-A的表达。

[0233] 在移植到RCS大鼠的视网膜下间隙内之后hESC衍生的RPE细胞存活、整合并维持已分化的RPE的特征

[0234] 移植实验的主体在RCS大鼠中进行，其显现了由于mertk基因中的突变引起的RPE和视网膜退化，以检查hESC衍生的RPE细胞的递送是否调节疾病的进程。

[0235] 移植的色素化细胞可以使用标准的眼底成像系统在RCS大鼠的眼睛中容易地体内鉴定(附图12A-12C)。hESC衍生的GFP表达细胞可以在荧光激发和使用发射滤波器时被看见发射荧光(附图12C)。在荧光显微镜中离体成像的眼杯制品中(附图12D-12E)，可以看见视网膜下的GFP阳性细胞的大的群集(附图12D)以及多个分散的较小的群集(附图12E)。

[0236] 组织学和免疫组织化学的评估确认了体内和离体的宏观观察结果。移植的细胞存活并整合到视网膜下间隙中，维持了表征并对于成熟RPE常常是特异的蛋白质的表达(附图13和14)。重要的是注意到不存在显著的炎症或免疫反应，并且在超过100个移植眼中没有观察到肿瘤或畸胎瘤。苏木素和曙红(附图13A和13B)染色的切片显示了视网膜下的和偶尔地视网膜内位置的移植的hESC衍生的色素化细胞，其以群集或作为分离的细胞出现(箭头)。使用GFP的免疫染色(附图13C-13F)确认了这些细胞实际上是hESC衍生的。移植物常常是十分大的和分散的(附图13C和13E)，共同表达GFP的色素化细胞可以明显地看出(附图13D和13F)。

[0237] 免疫染色显示了移植物内大量的移植的细胞表达蛋白质，所述蛋白质表征了成熟的、已分化的RPE细胞(附图14)。这包括RPE特异性标志物RPE65(附图14A-14E)和斑萎蛋白(附图14F-14J)的表达。细胞还能够形成紧密连接(附图14K-14O)，其是RPE细胞的重要功能并且对于维持血液-视网膜屏障是关键的。每一行中最左侧栏显示了共表达GFP和相关标志物的移植物的低放大率荧光图像。在每一排的高放大率共焦图像显示了在单个细胞水平下色素(通过Nomarski光学器件)以及GFP和不同标志物的共表达。

[0238] hESC衍生的RPE细胞提供了营养不良的RCS大鼠中功能的和结构的视网膜拯救

[0239] 在视网膜退化的RCS大鼠模型中，视网膜功能到2-3月龄通常被严重损害。在结构上，发生视网膜外核层(ONL)的相应的丧失和变薄，它常常在这个年龄降低到低于1-2排光受体核。与对照的未处理的或培养基注射的眼睛相比，在用hESC衍生的RPE细胞移植的眼睛

中，电视网膜图像记录显示了视网膜功能的显著的相对保存(附图7和附图15)。

[0240] 在移植的眼(附图15A)和它同类的对照眼(附图15B)中显示了在暗适应(DA)状态下对一系列提高强度的白色闪光的代表性的ERG反应。附图15C显示了在移植的眼和不同组的对照眼之间平均幅度方面的显著的区别。在最高强度下，在RPE移植的眼睛中平均DAb波幅是283.3±37.5(平均值±SEM;n＝13)，对比同类的未处理的对照眼中的158.5±18.1(n＝13，$p<0.01$)和培养基注射的眼中89.9±14.4(n＝5，$p<0.01$)。重要的是注意到，与在没有激活蛋白A时衍生的RPE细胞的移植后实现的拯救效果(附图7)相比，在激活蛋白A处理的RPE细胞的移植之后存在着视网膜功能的更好的保存的倾向(附图15)。

[0241] 视网膜结构的定性的和定量的评估证实了功能性的发现(附图16)。与远离移植物的区域相比，在接近视网膜下RPE移植物处，观察到光受体(ONL)层以及内部和外部光受体片段(IS+OS)的相对保存(两个实施例在附图16A、16B中显示)。与远离移植物的区域相比(灰色柱)，在接近hESC衍生的RPE移植物处总体视网膜厚度(附图16C)以及ONL和IS+OS厚度(附图16D)显著地提高(黑色柱，平均±SEM，n＝7)。这种类型的结构拯救仅在接近视网膜下和深部的视网膜内移植物处观察到，而当移植物仅仅处于玻璃体内时没有观察到(未显示)。

[0242] 移植的hESC衍生的激活蛋白A处理的RPE细胞体内摄取视紫红质

[0243] 健康的RPE的一个关键功能是摄取和再循环脱落的光受体外部片段，作为光受体的更新过程的一部分。视网膜下移植的RPE细胞的共焦图像显示了色素、GFP、RPE65和视紫红质在同一单个细胞内的共同定位。这表明，移植的细胞具有成熟RPE的表型并且能够进行脱落的外部片段(其含有视紫红质)的摄取。注意到，RCS大鼠的天然的RPE细胞表达RPE65(附图17C，箭头)，但是不表达GFP(附图17D，箭头)并含有最小数量的视紫红质(附图17B、17E)。

[0244] 因而上述结果提供了证据，通过在包含TGFβ超家族的成员的培养系统中、和优选的在存在NA的情况下培养所获得的hSC衍生的RPE细胞可以在体内用于移植，来提供眼睛中基本上完全功能性的RPE细胞。

[0245] 本说明书中提及的所有“人类胚胎干细胞”均是指商业上可获得的人类胚胎干细胞。

序列表

<110> Hadasit Medical Research Services & Development Limited

<120> 已分化的视网膜色素上皮细胞培养系统

<130> 1827336

<150> US 60/907,818

<151> 2007-04-18

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 38

<212> DNA

<213> 智人

[0001]

<400> 1
gagccatgca gtccgaatga catggcaagc tcaggact 38

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2
gctgctggaa aggatttgag caggctccag ccagatagtc 40

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3
gaatttgcag gtgtccctgt atcctcctcg tcctcctgat 40

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> 智人

<400> 4
agctgctgga gaatgaggaa caagaagggc ttgaccacat 40

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5
aagtgatgtg tgggcatttg tctaagggat cggttctcca 40

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> 智人

<400> 6
aatgttgccg tgaagatctt cctgagaacc atctgttggg ta 42

[0002]

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> 智人

<400> 7
cacgtgtgag acagatgggg gcggttgtga tagacacg 38

<210> 8

<211> 43

<212> DNA

<213> 智人

<400> 8
aaccatggct agaggattgg cctttcacct acacatccag ctg 43

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> 智人

<400> 9

caccatcgag ctcgtgaagg agcccttgtc atggaagg 38

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> 智人

<400> 10
cttgaagaag agacccgatc ttctgcacgc tccaccac 38

<210> 11

<211> 39

[0003] <212> DNA

<213> 智人

<400> 11
ttcaccacca cggccgagct ctccttctgc atcctgtcg 39

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> 智人

<400> 12
agccacatcg ctcagacacc gtactcagcg ccagcatcg 39

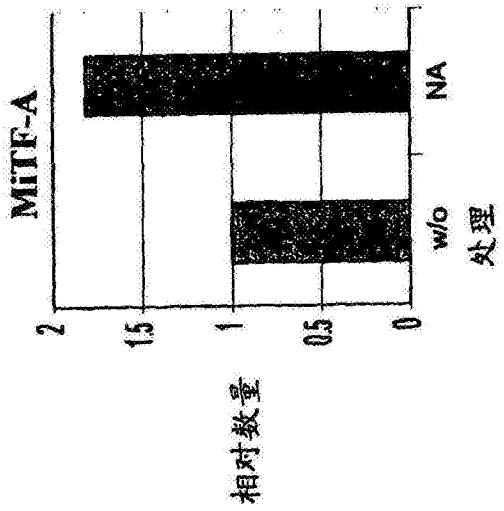


图1A

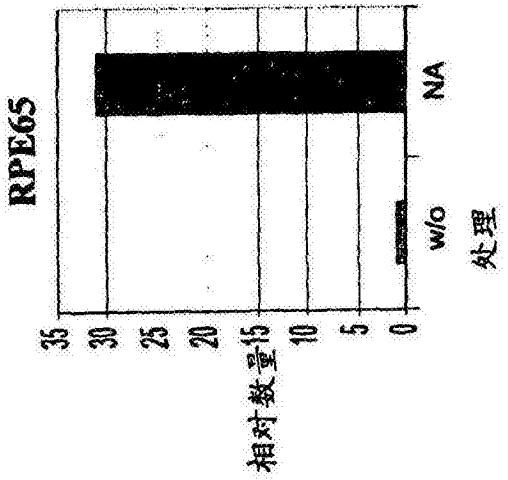


图1B

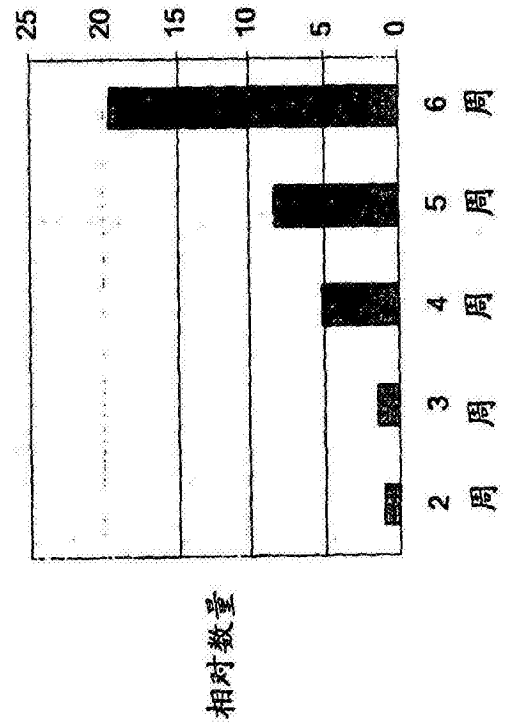


图1C

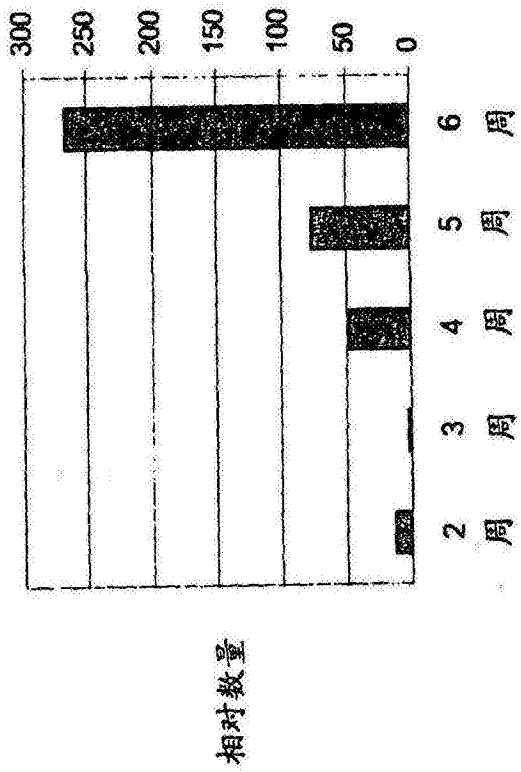


图1D

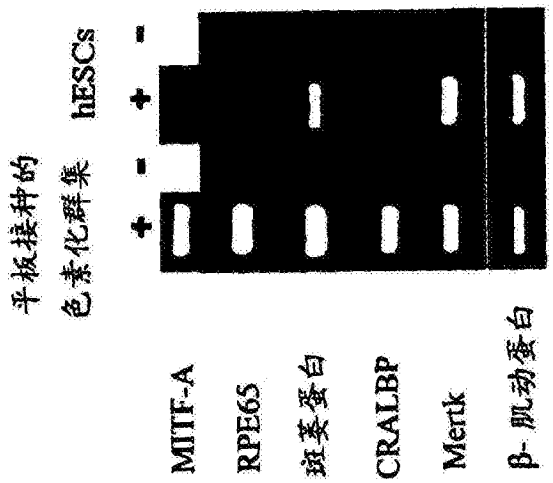


图1E

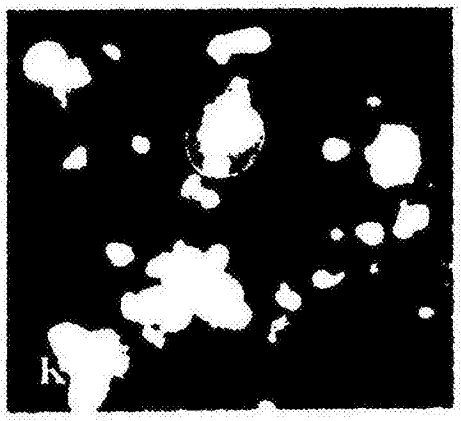


图2A

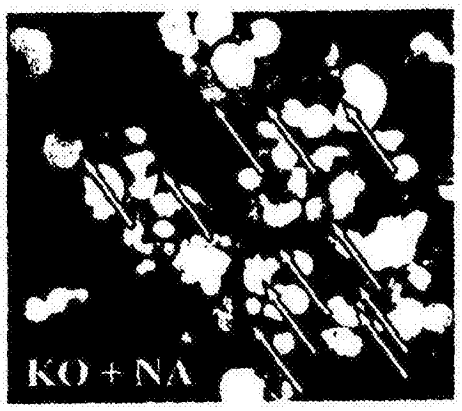


图2B

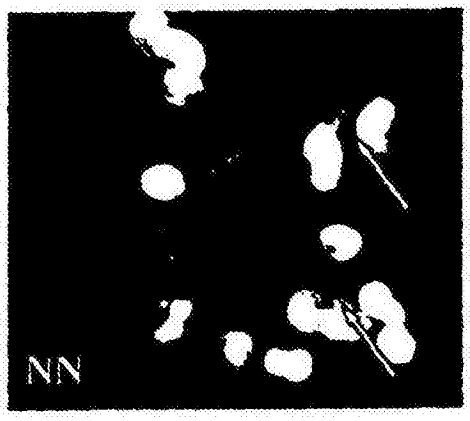


图2C

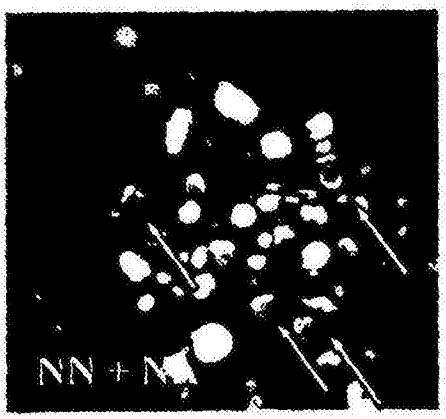


图2D

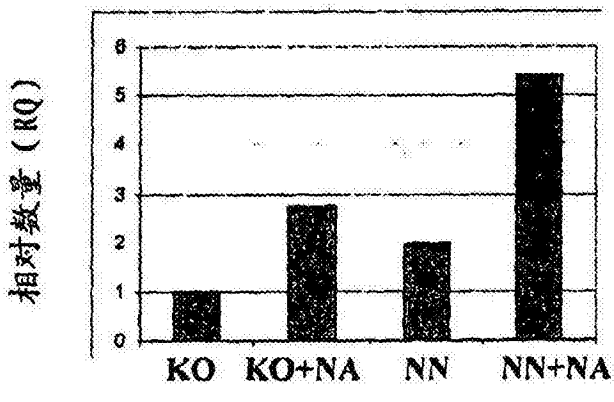


图2E

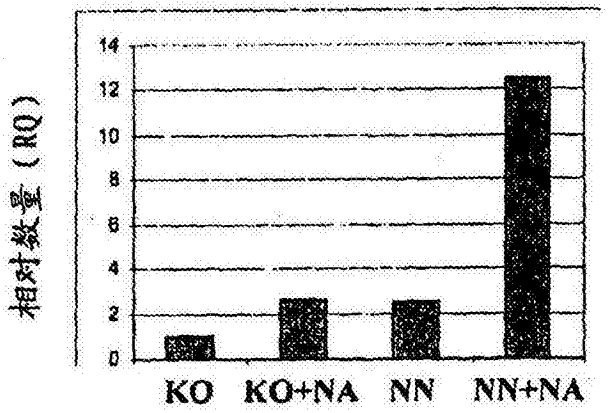


图2F

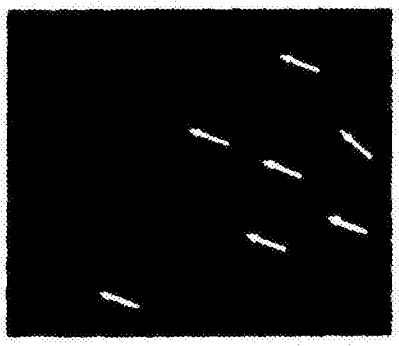


图3A

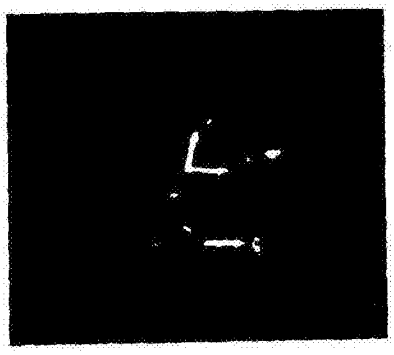


图3B

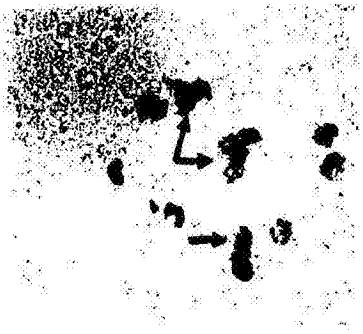


图3C



图3D

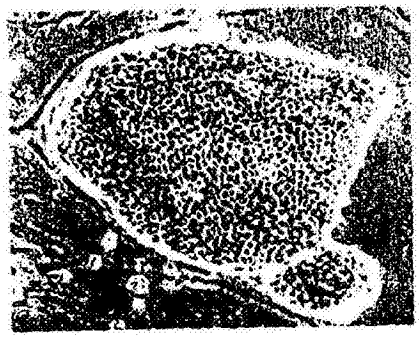


图3E

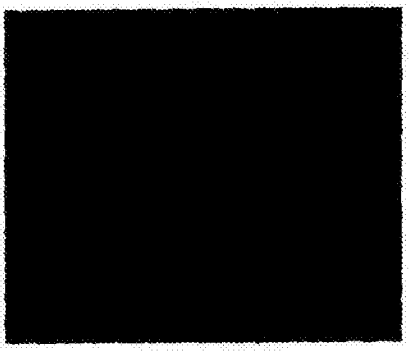


图3F



图3G

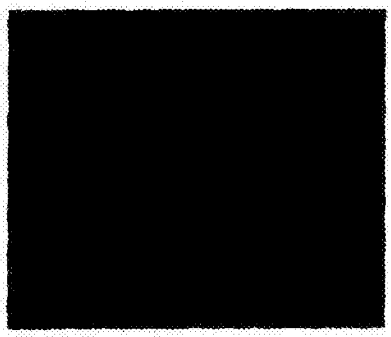


图3H

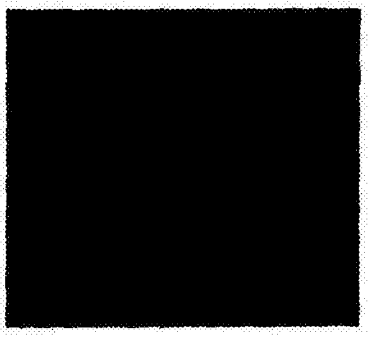


图3I

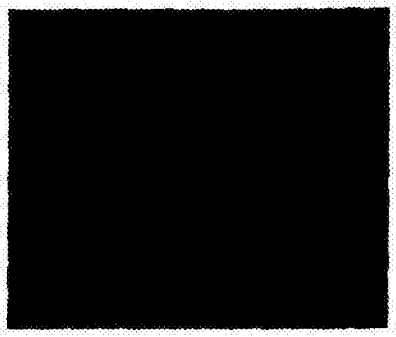


图3J

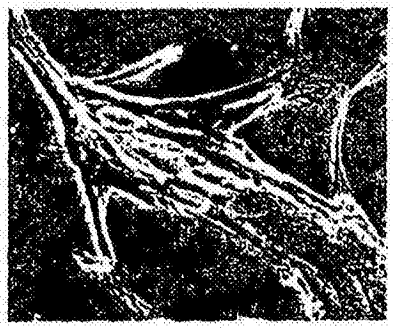


图3K

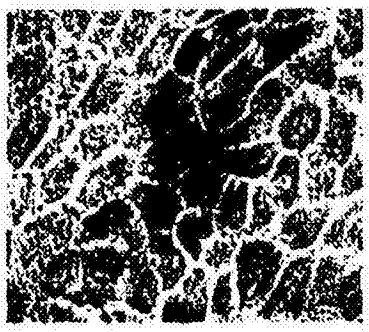


图3L



图4A



图4B

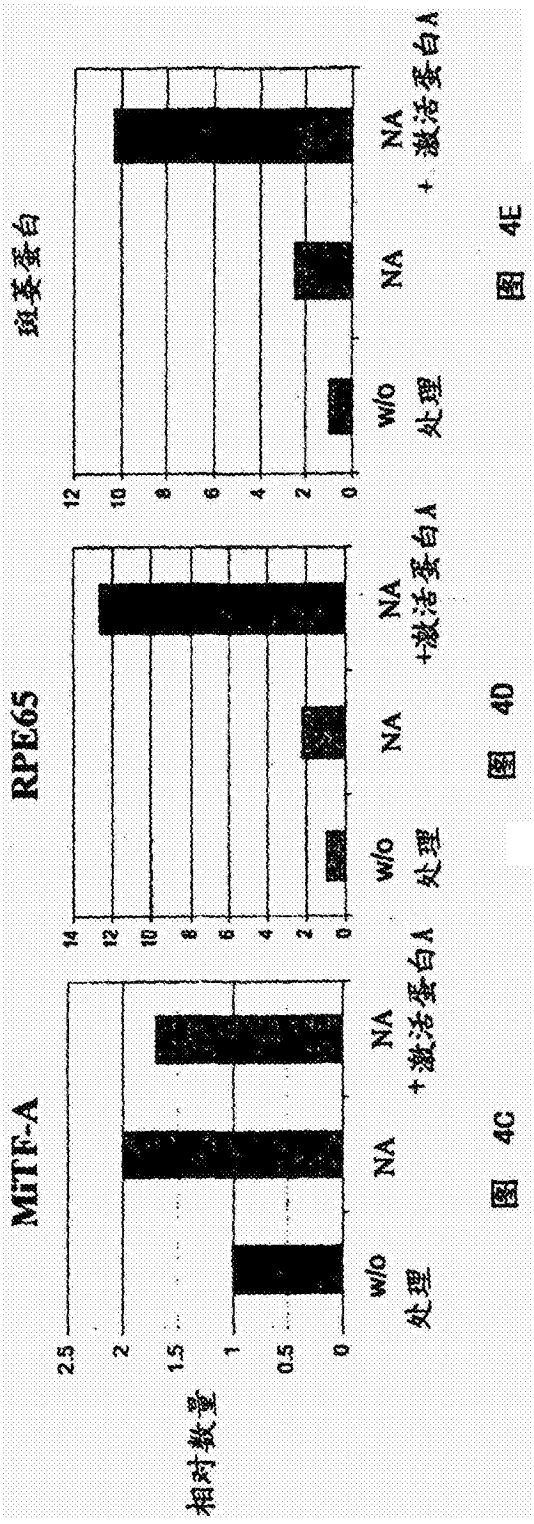


图 4C

图 4D

图 4E



图5A



图5B

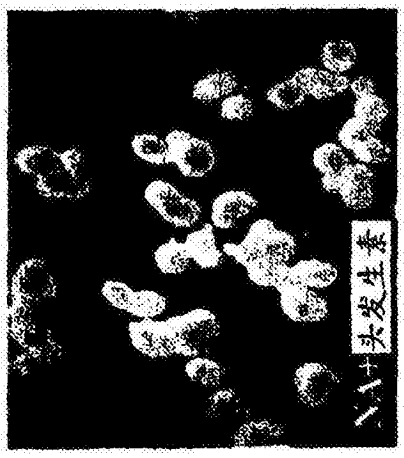


图5C

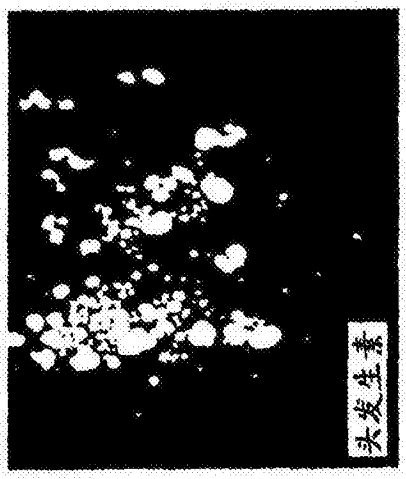


图5D

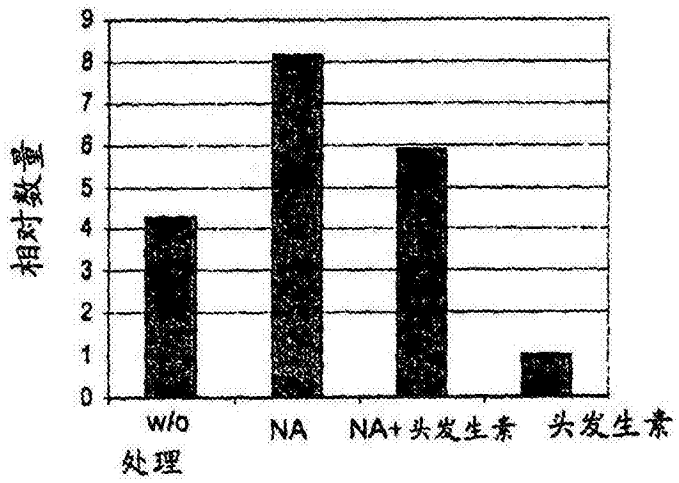


图5E

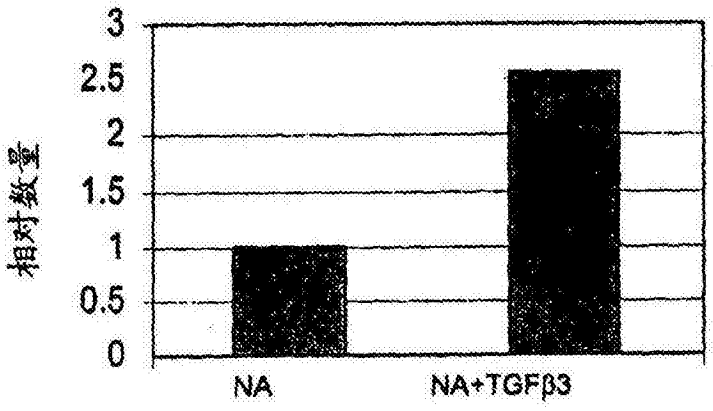


图5F

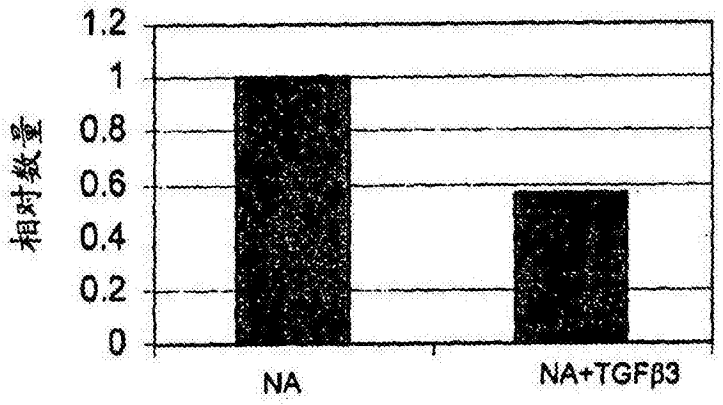

1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
相对数量
NA
NA+TGFβ3

图5G

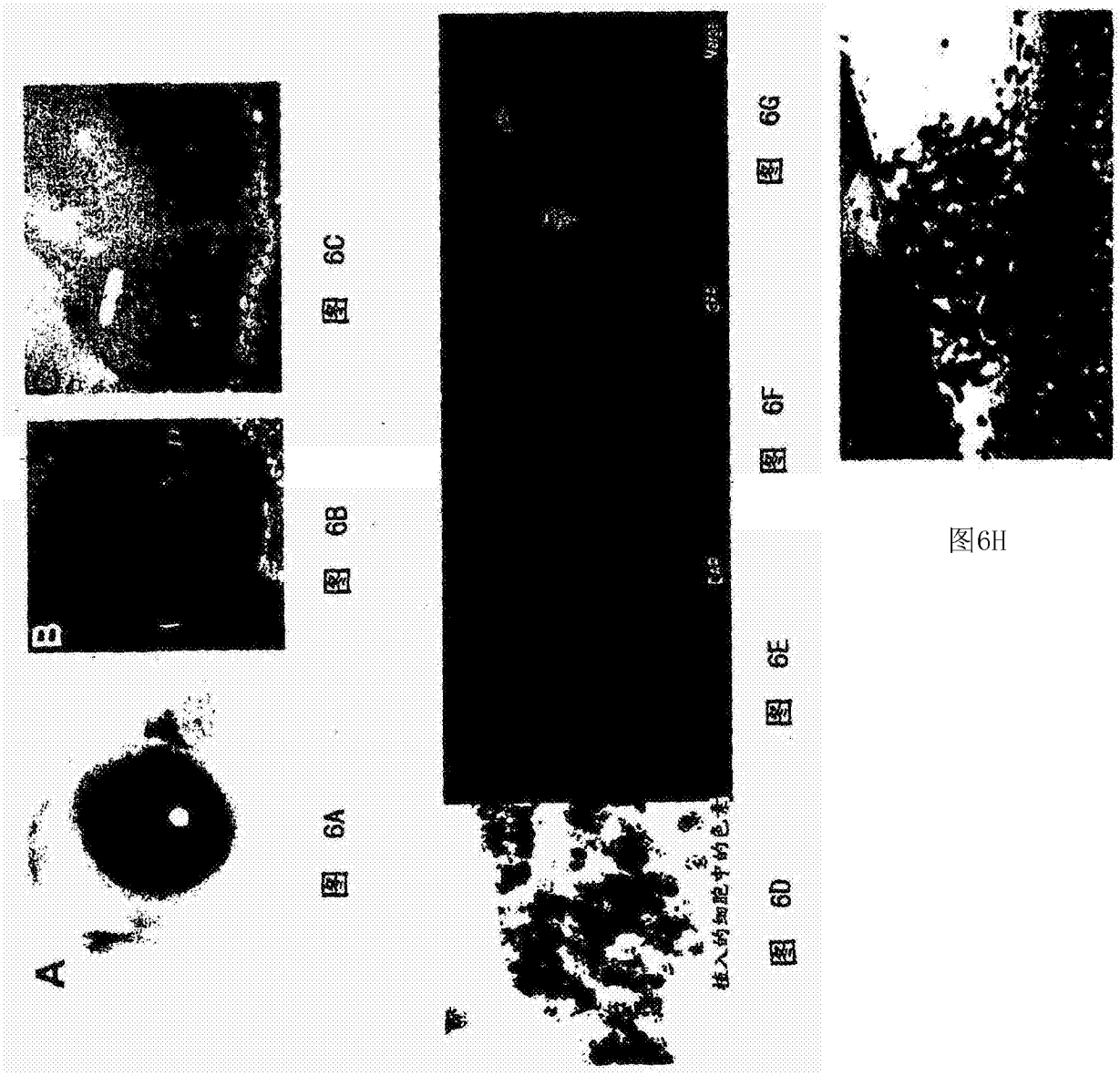

A
B
植入的细胞中的色素
图 6A
图 6B
图 6C
图 6D
图 6E
图 6F
图 6G

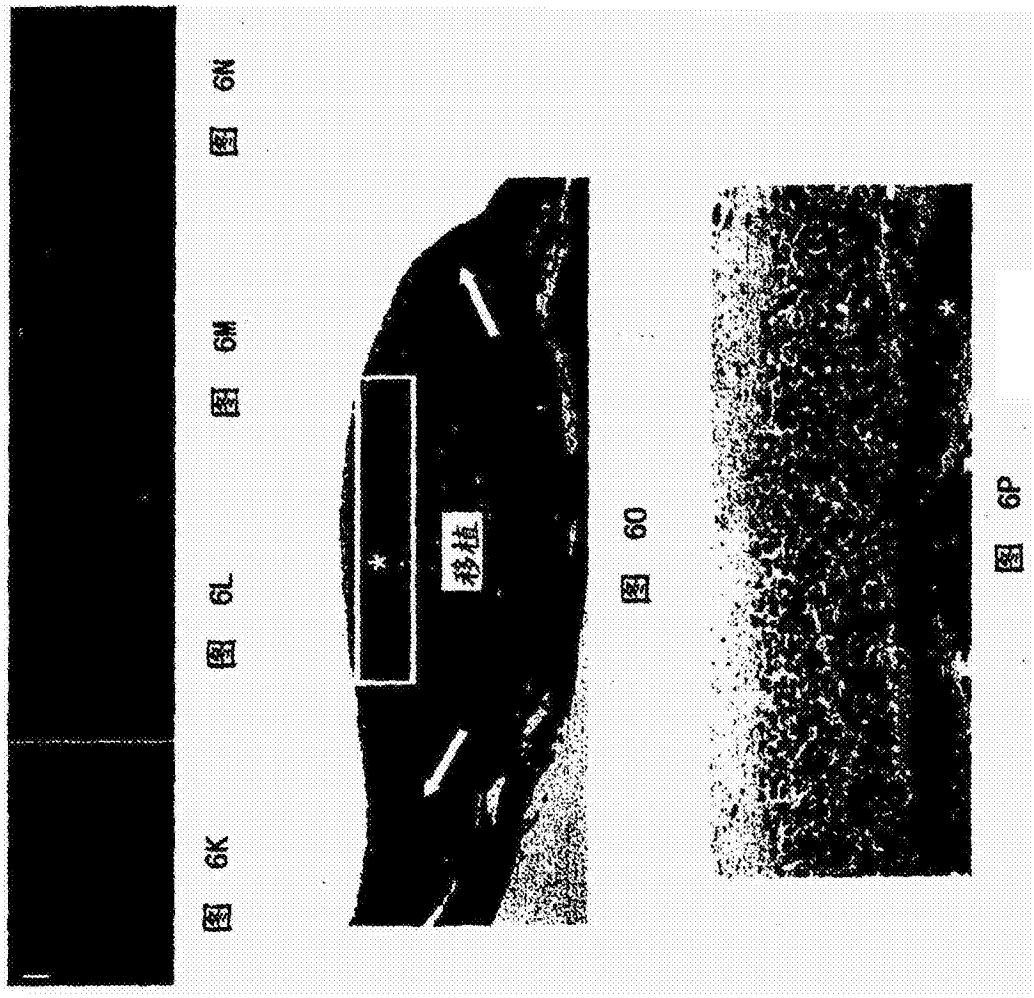
图6H



图61



图6J



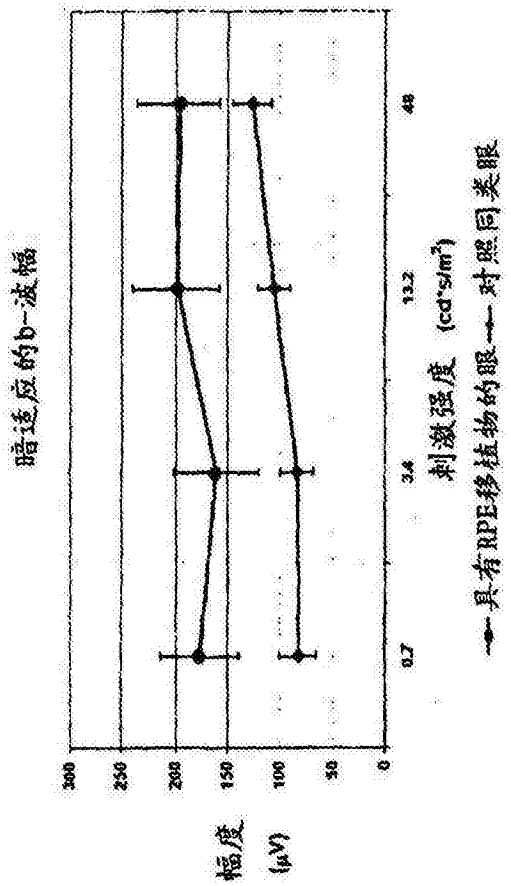


图7

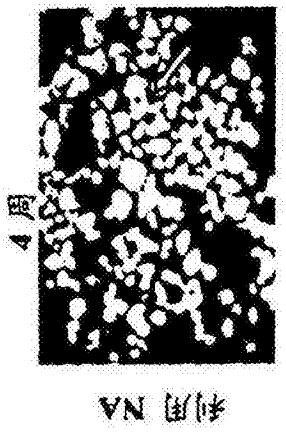


图8A



图8B



图8C

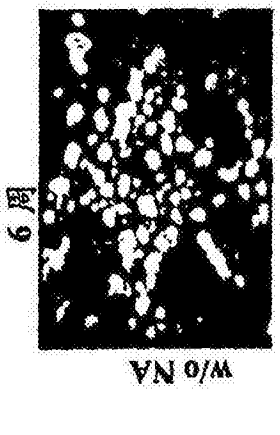


图8D



图8E



图8F

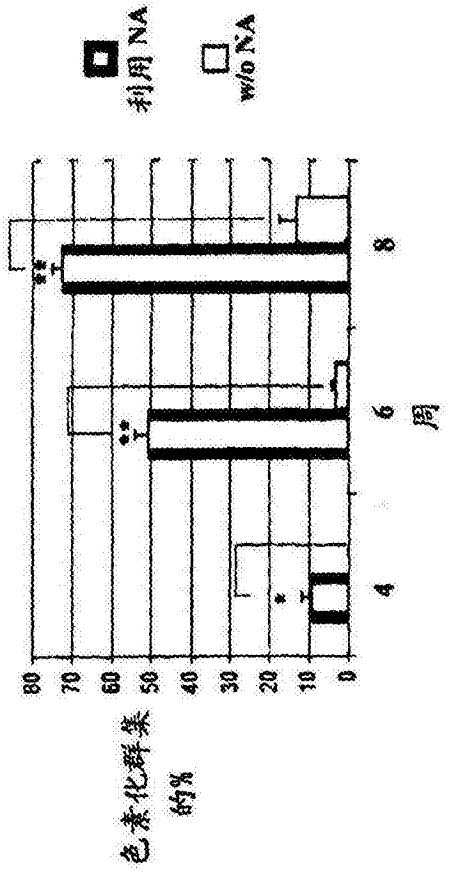


图8G

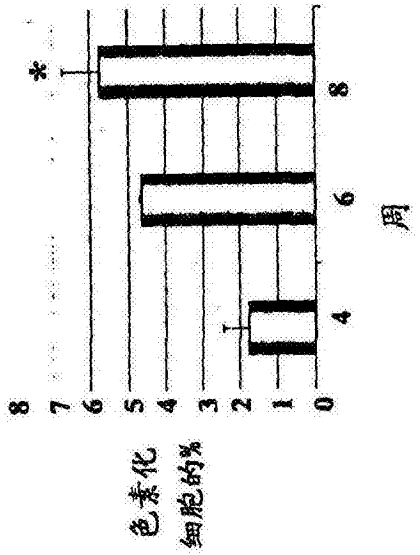


图8H

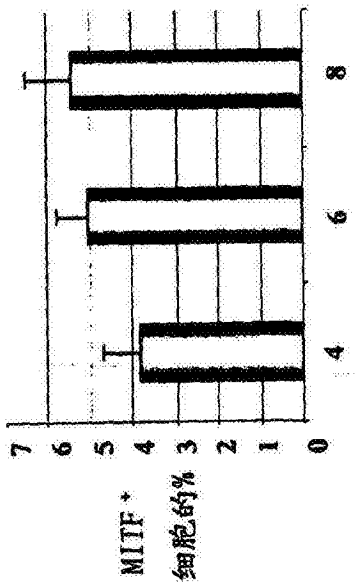


图8I

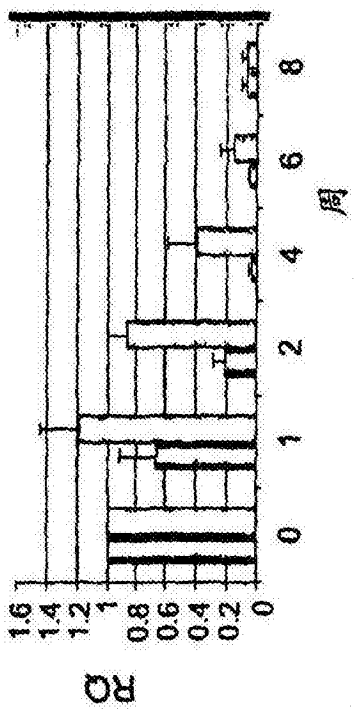


图9A

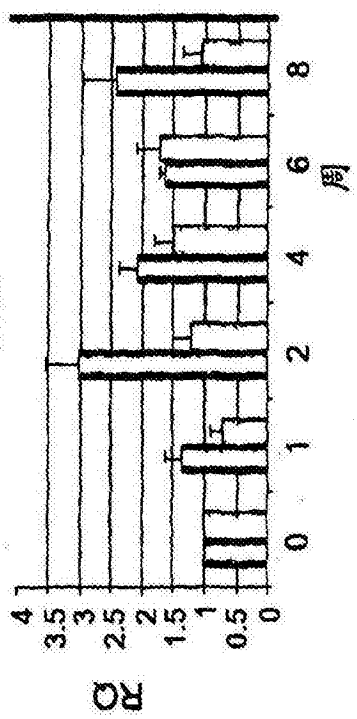


图9B

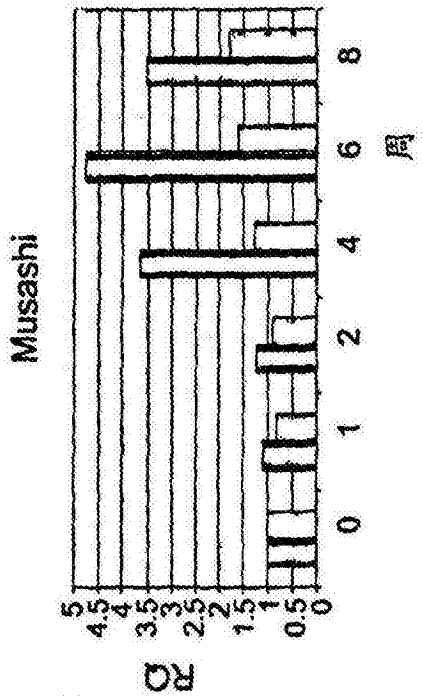


图9C

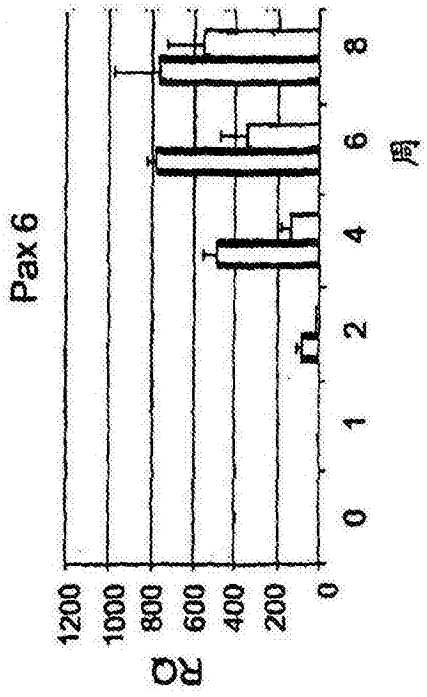


图9D

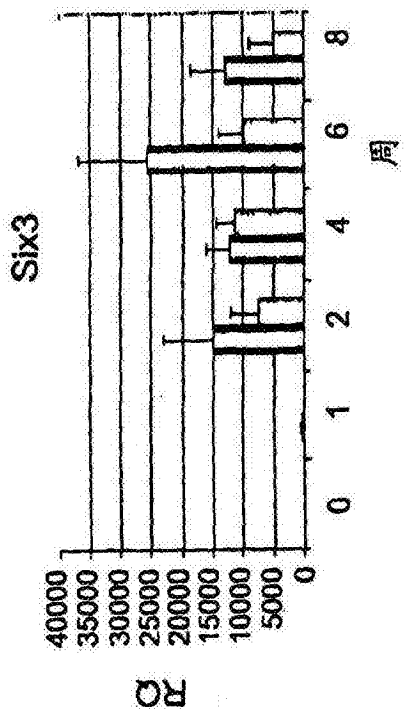


图9E

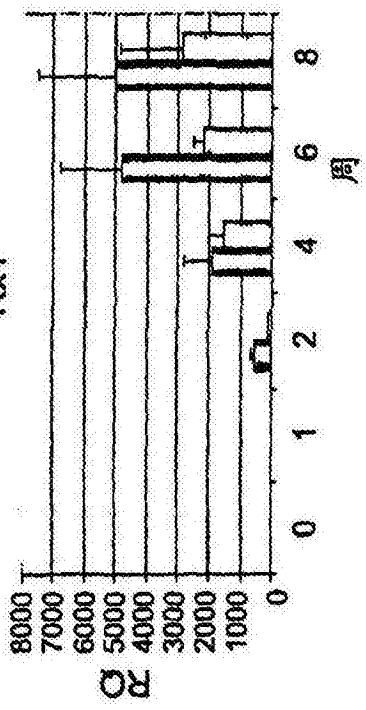


图9F

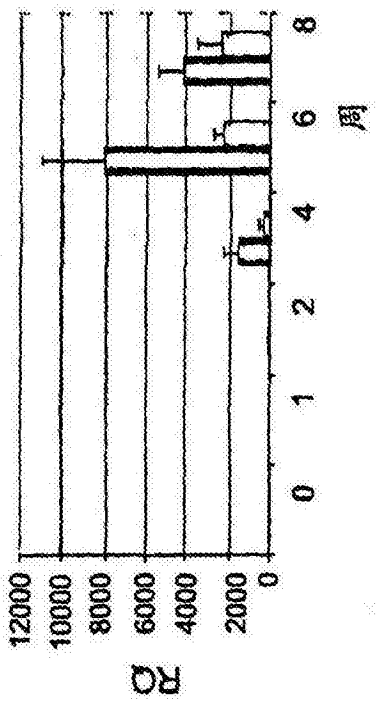


图9G

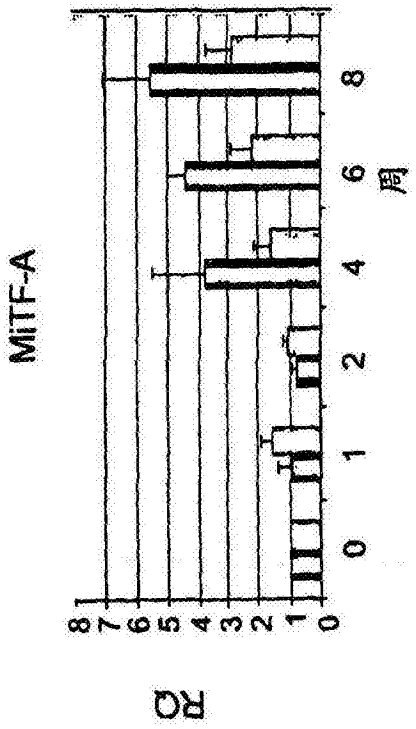


图9H

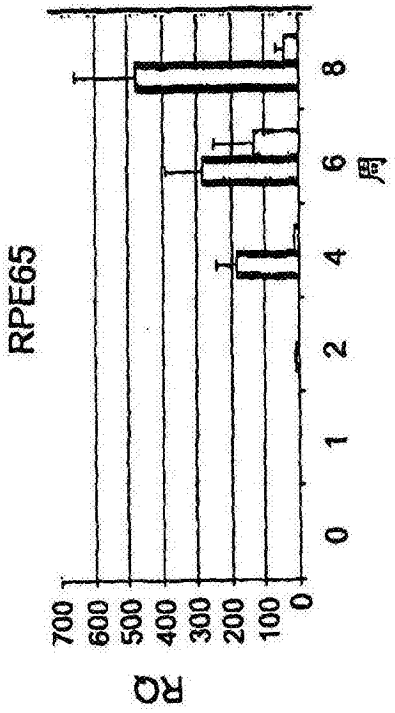


图9I

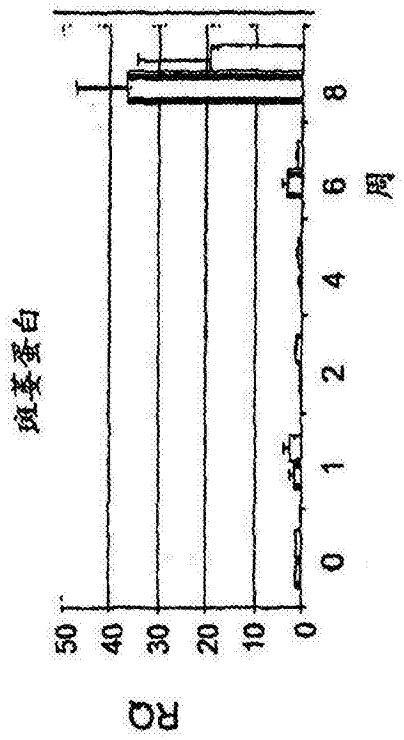


图9J

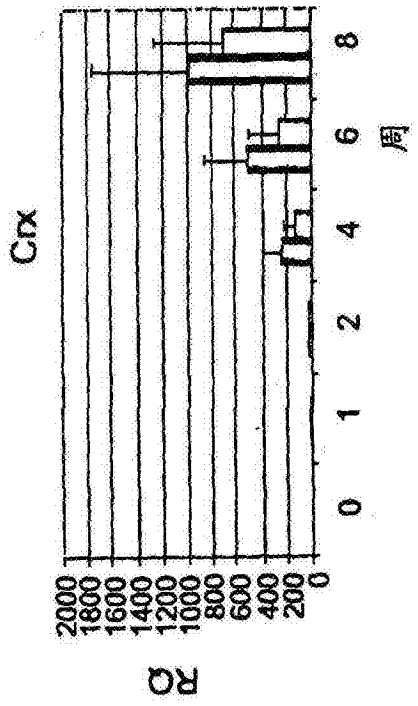


图9K

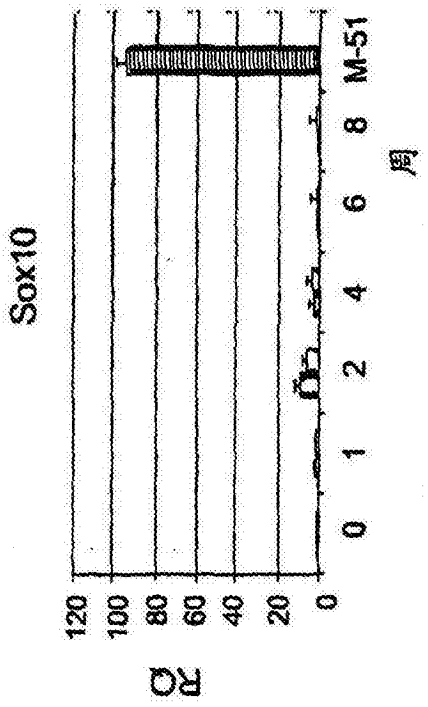


图9L

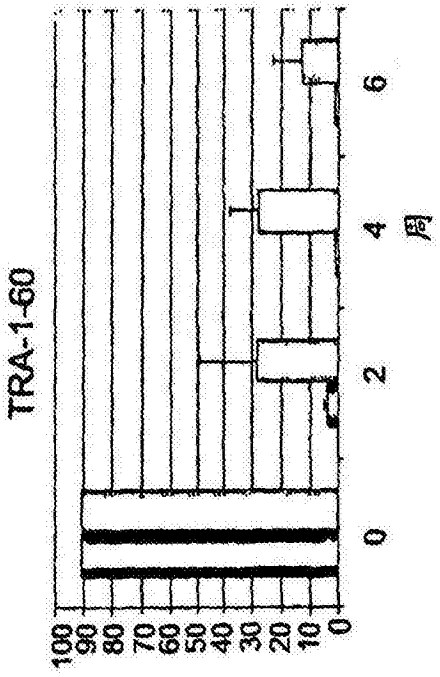


图9M

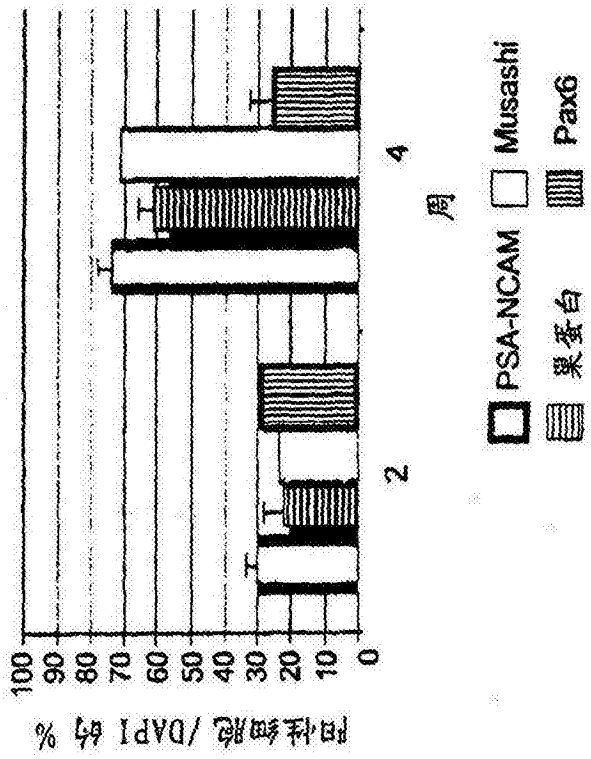


图9N

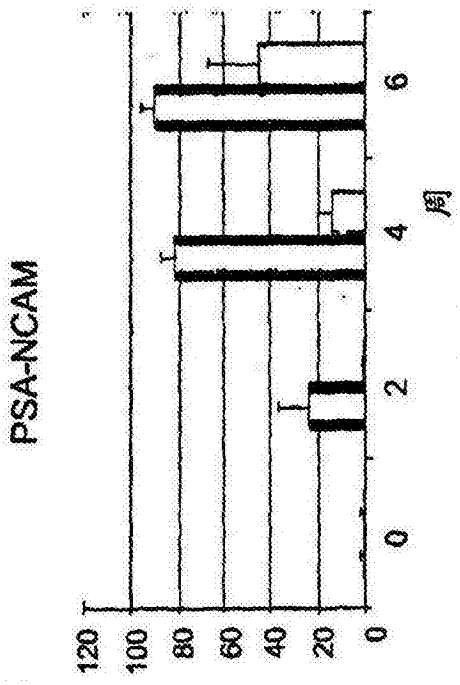


图9O

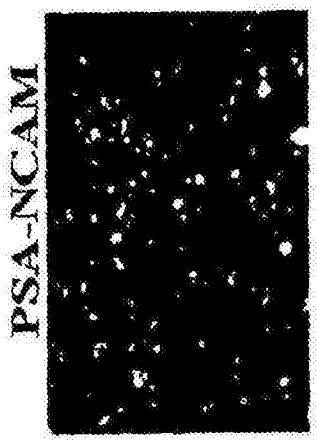


图9P



图9Q

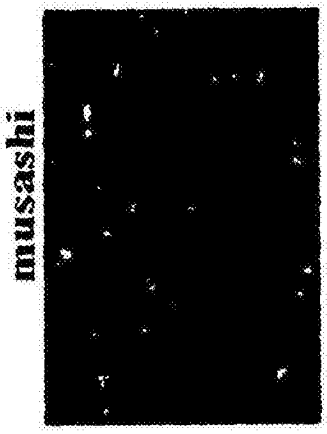


图9R

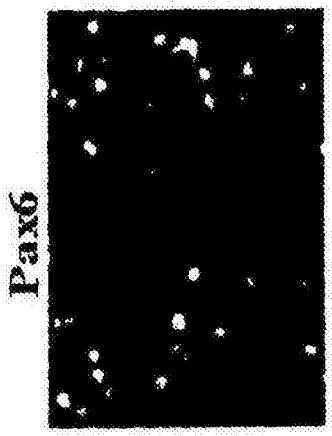


图9S



图10A



图10B

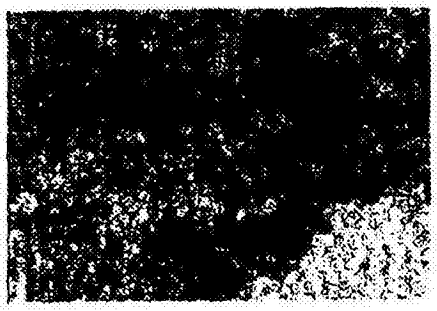


图10C



图10D



图10E



图10F

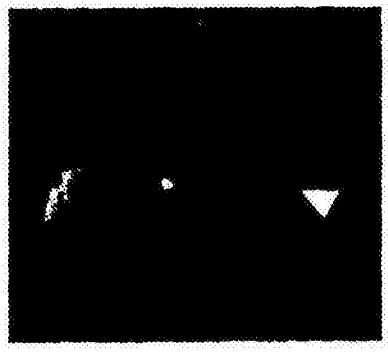


图10G

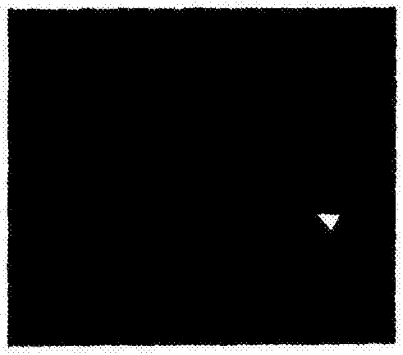


图10H

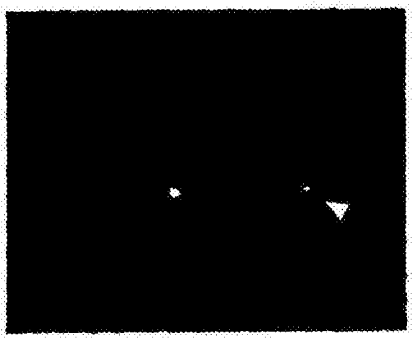


图10I

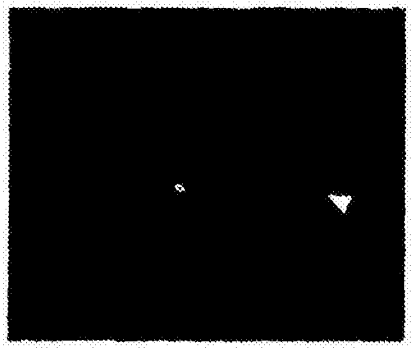


图10J

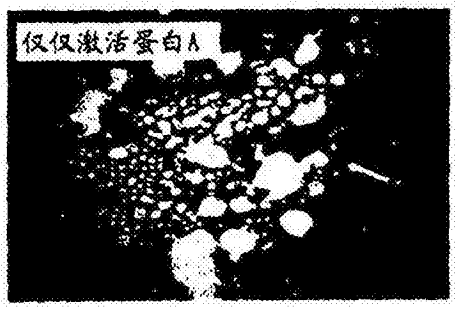


图11A



图11B



图11C



图11D



图11E

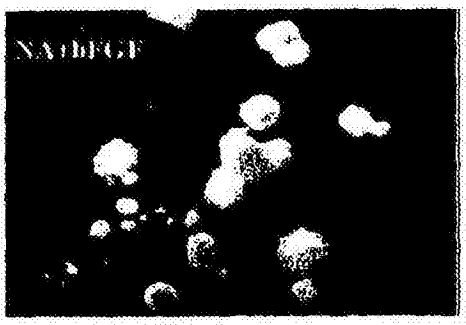


图11F

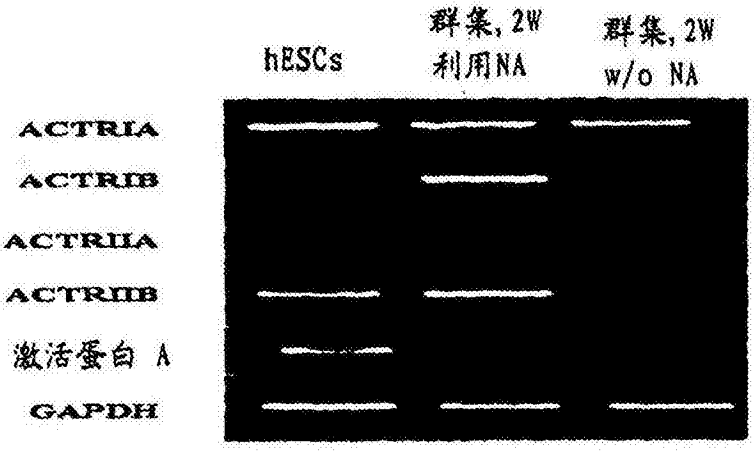


图11G

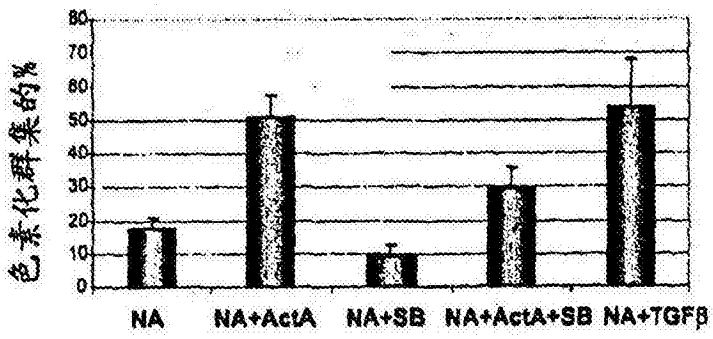


图11H

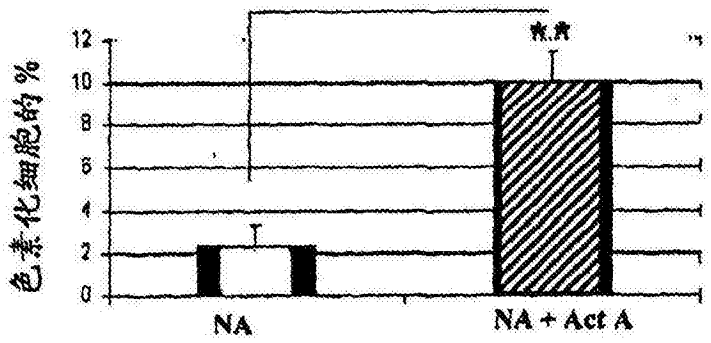


图11I

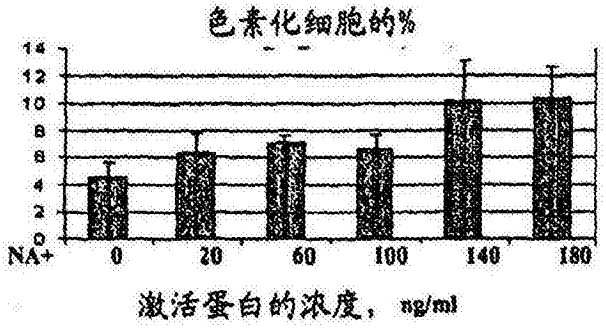


图11J

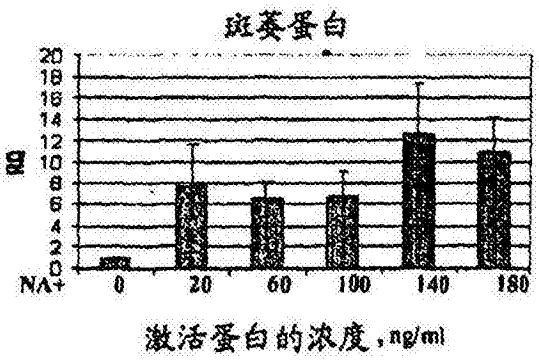


图11K

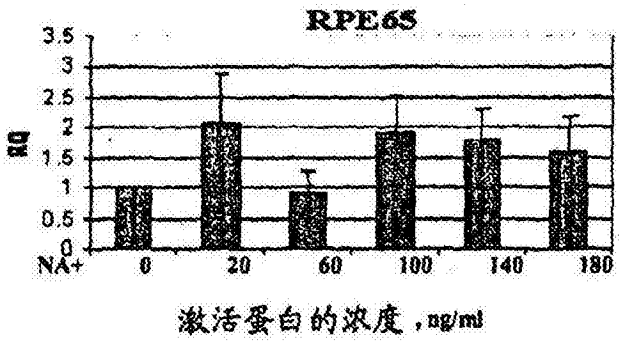


图11L

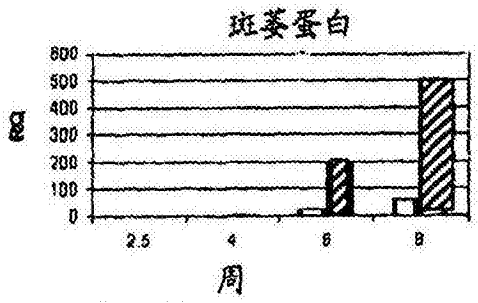


图11M

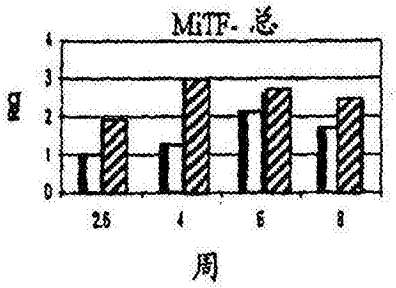


图11N

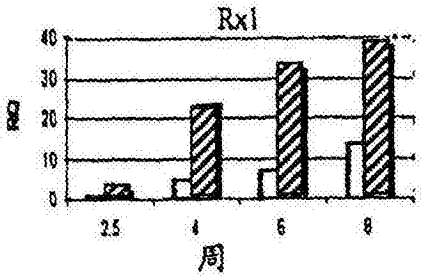


图11O

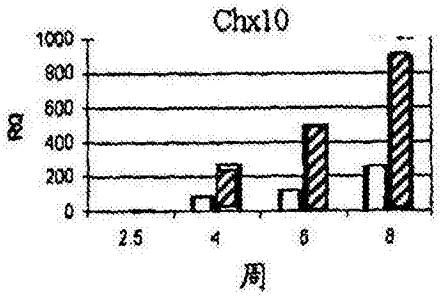


图11P

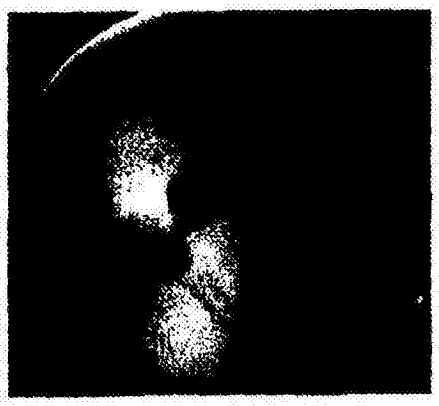


图12A

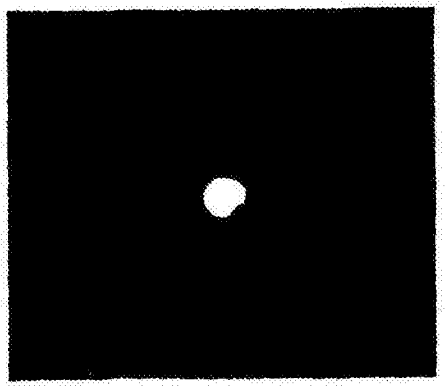


图12B

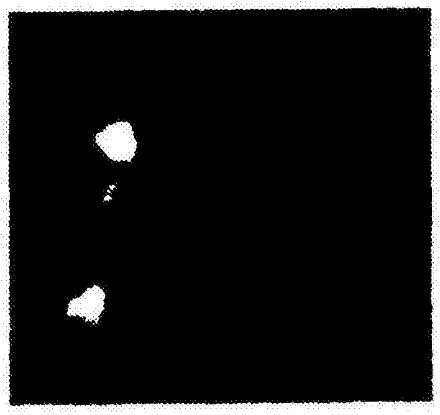


图12C

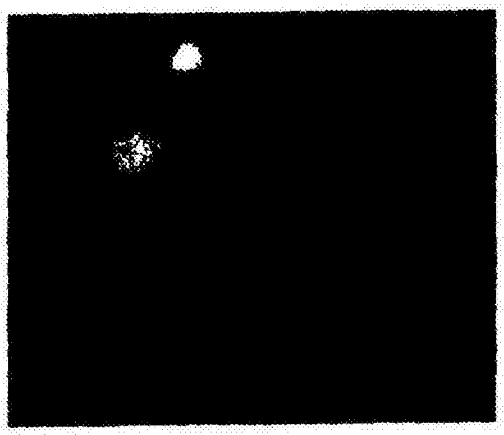


图12D

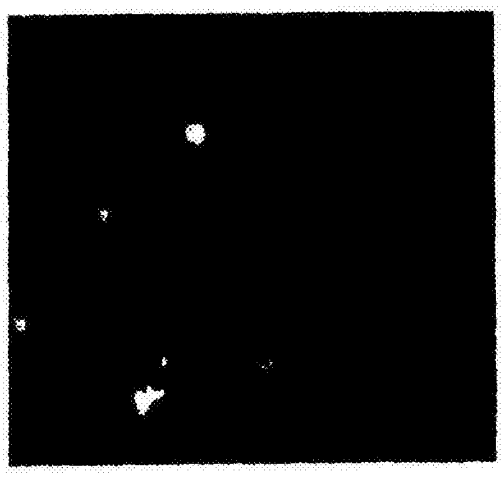


图12E



图13A

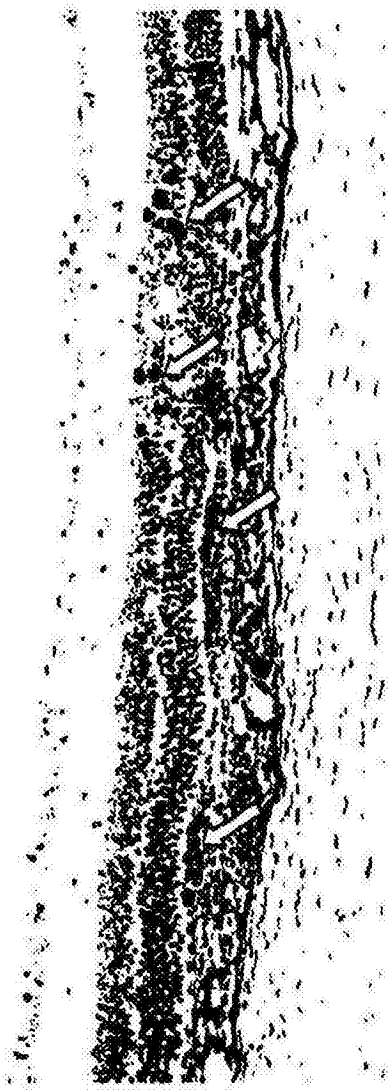


图13B

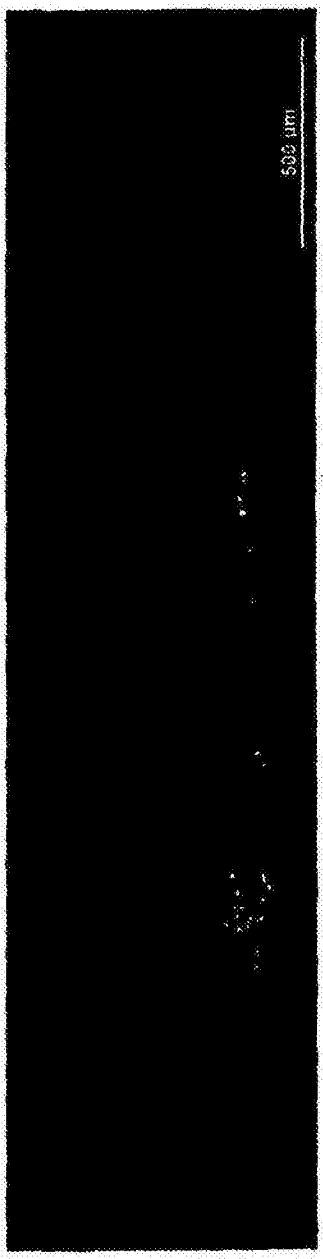


图13C

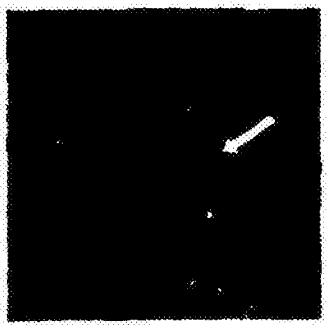


图13D



图13E



图13F



图14A



图14B

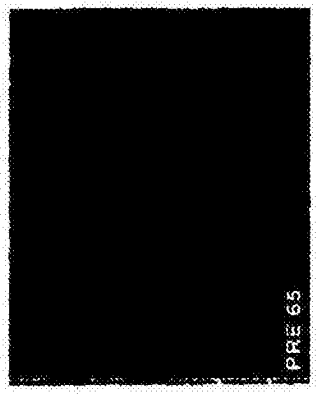


图14C

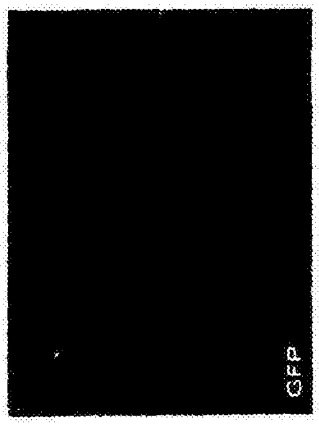


图14D



图14E

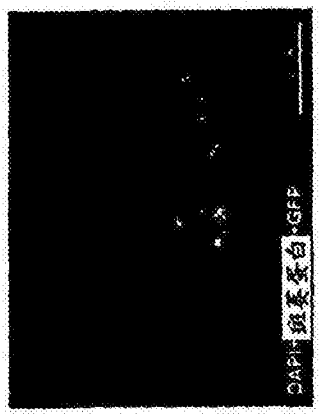


图14F



图14G

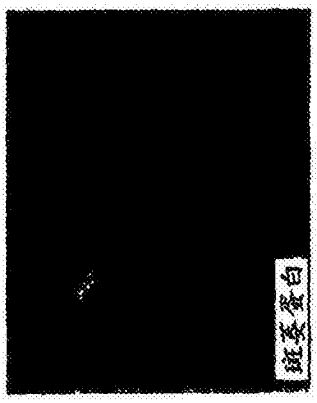


图14H

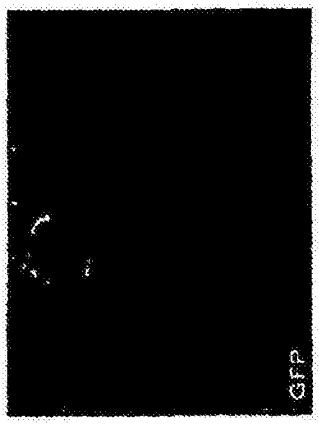


图14I

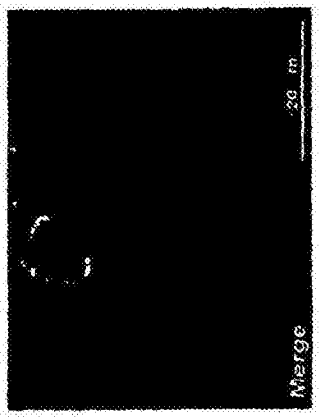


图14J

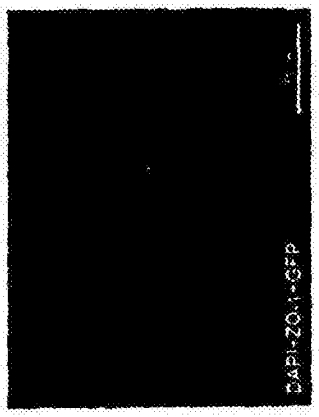


图14K

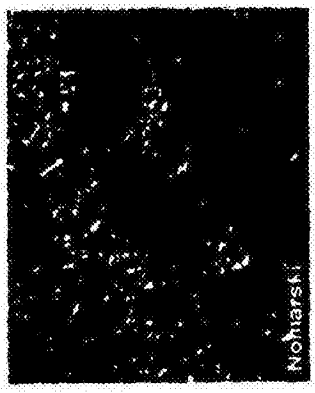


图14L

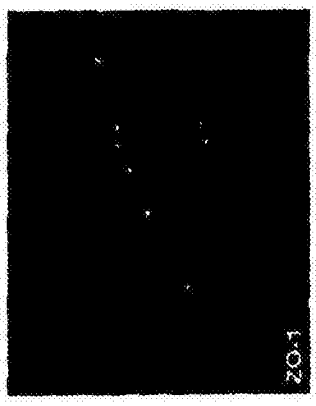


图14M

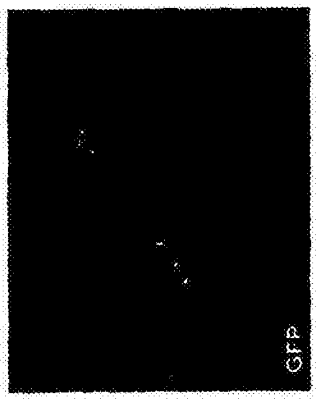


图14N

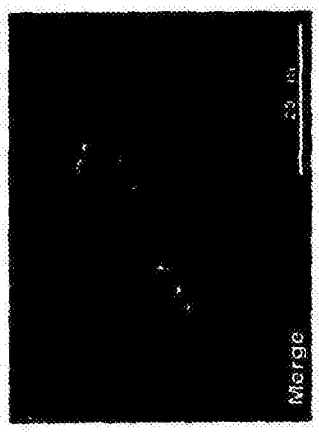


图14O

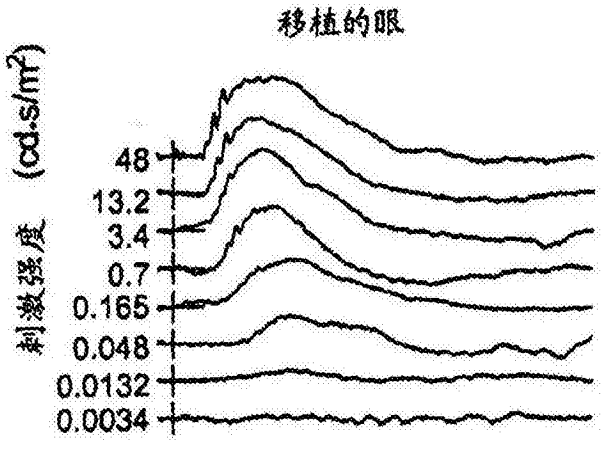


图15A

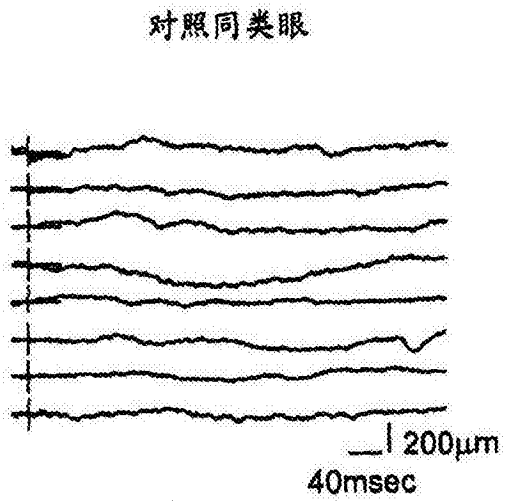


图15B

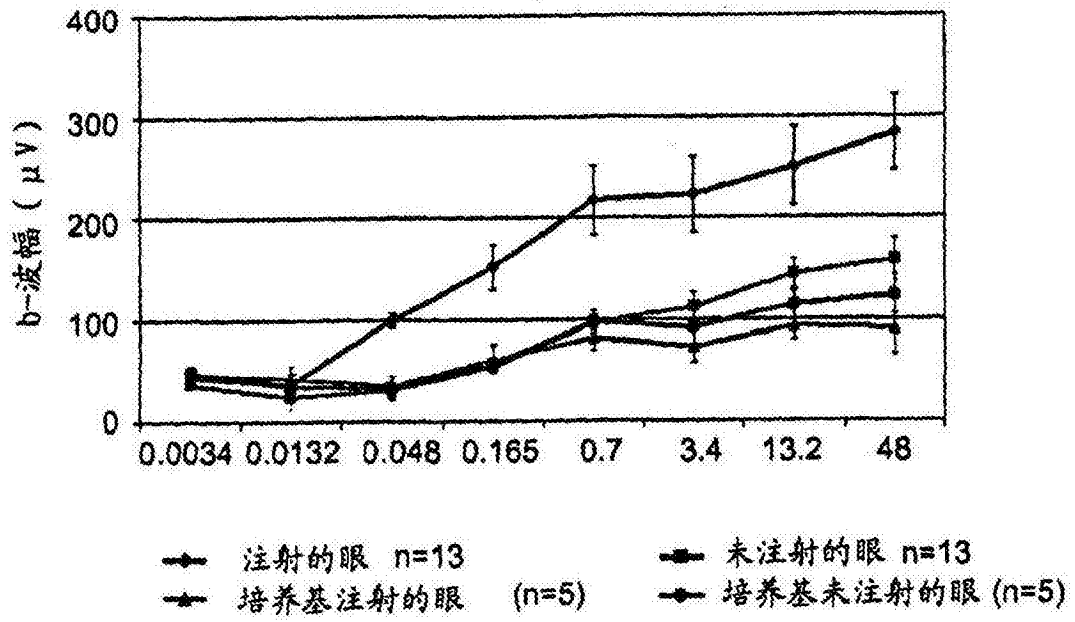


图15C

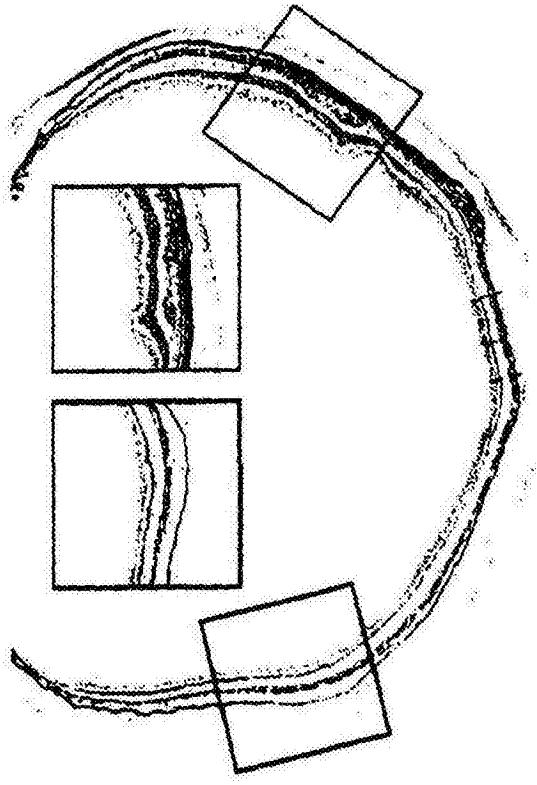


图16A



图16B

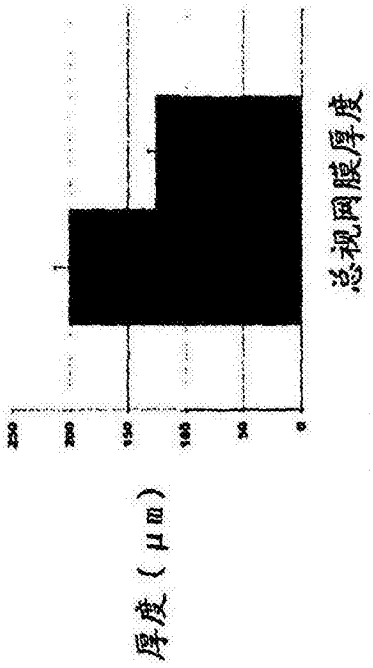


图16C

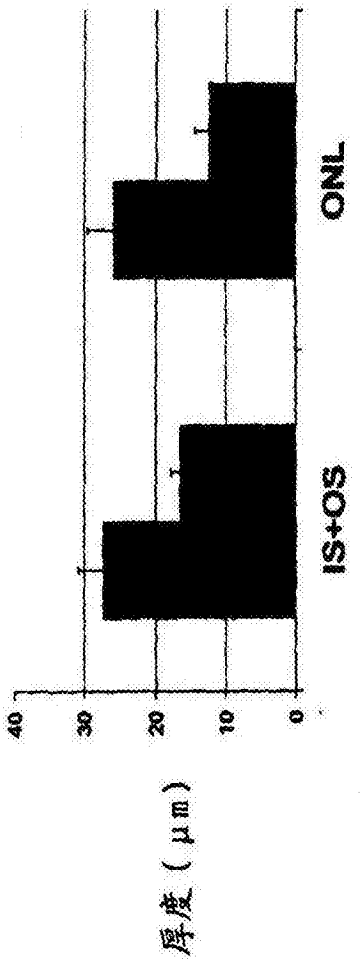


图16D



图17A

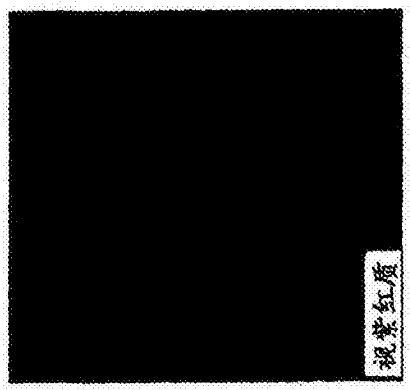


图17B

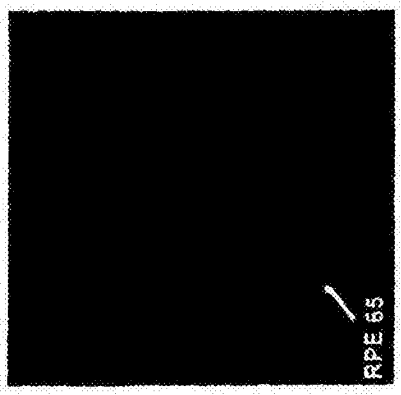


图17C



图17D

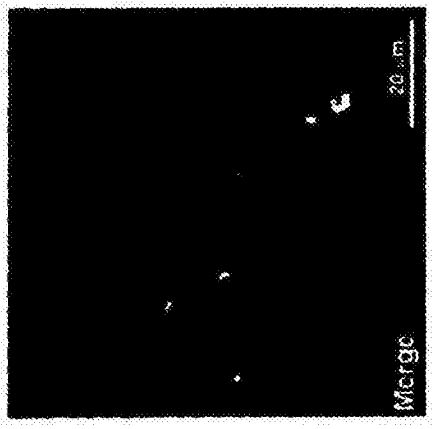


图17E