



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111511377 A

(43)申请公布日 2020.08.07

(21)申请号 201880063692.0

(22)申请日 2018.07.31

(30)优先权数据

62/539,542 2017.07.31 US

62/577,154 2017.10.25 US

62/593,228 2017.11.30 US

62/646,354 2018.03.21 US

62/665,483 2018.05.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/044720 2018.07.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/028088 EN 2019.02.07

(71)申请人 谱系细胞疗法公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 I·纳松基 R·辛格 O·库扎尼

M·奥诺拉托 F·比内特

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.

A61K 35/30(2015.01)

A61P 27/02(2006.01)

权利要求书4页 说明书41页 附图34页

(54)发明名称

用于恢复或预防疾病或外伤性损伤造成的视觉丧失的组合物和方法

(57)摘要

包含干细胞源的组织 and/或细胞的生物假体视网膜移植体(或装置)可用于在受试者中减缓视网膜退行性疾病的进展,减缓创伤性损伤后视网膜退行性疾病的进展,减缓年龄相关性黄斑变性(AMD)的进展,预防视网膜退行性疾病,预防创伤性损伤后的视网膜退行性疾病,预防AMD,恢复因疾病、损伤或遗传异常而丧失的视网膜色素上皮细胞(RPE)、感光细胞(PRC)和视网膜神经节细胞(RGC),增加RPE、PRC和RCG,治疗RPE、PRC和RCG缺陷,或者用于其他目的。生物假体视网膜移植体可包含适合于植入受试者眼睛的眼部空间的生物假载体或支架,以形成生物假体视网膜补片。在某些实施方式中,生物假体视网膜补片可包含在载体或支架上的多块干细胞源的组织或细胞,其可用于治疗大面积的视网膜变性或损伤或者用于其他目的。

1. 一种用于治疗视网膜损伤、减缓视网膜损伤的进展、预防视网膜损伤、更换视网膜组织和恢复受损的视网膜组织中的一种或多种的方法,所述方法包括:将hESC源的视网膜组织移植物施用于受试者。

2. 一种用于减缓视网膜退行性疾病的进展,减缓创伤性损伤后的视网膜退行性疾病的进展,减缓年龄相关性黄斑变性(AMD)的进展,减缓遗传性视网膜疾病的进展,稳定视网膜疾病,预防视网膜退行性疾病,预防外伤后的视网膜退行性疾病,改善视力或视觉感知,预防AMD,恢复因疾病、损伤或遗传异常而丧失的视网膜色素上皮(RPE)、感光细胞(PCR)和视网膜神经节细胞(RGC),增加RPE、PCR和RCG或治疗RPE、PCR和RCG缺陷中的一种或多种的方法,该方法包括:将hESC源的视网膜组织移植物施用于受试者。

3. 如权利要求1所述的方法,其中视网膜损伤是由冲击暴露、遗传障碍、视网膜疾病和视网膜损伤中的一种或多种引起的。

4. 如权利要求3所述的方法,其中视网膜疾病包含视网膜退行性疾病。

5. 如权利要求1所述的方法,其中视网膜损伤是由年龄相关性黄斑变性(AMD)、色素性视网膜炎(RP)和莱伯氏先天性黑蒙(LCA)中的一种或多种引起的。

6. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述hESC源的视网膜组织包含视网膜色素上皮(RPE)细胞、视网膜神经节细胞(RGC)和感光(PR)细胞。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述RPE、RGC和PR细胞经配置使得存在视网膜色素上皮(RPE)细胞的中央层,并且从所述RPE细胞层径向向外移动,存在视网膜神经节细胞(RGC)层、二级视网膜神经元层(对应于成熟视网膜的内核层)、感光(PR)细胞层和RPE细胞的外层。

8. 如权利要求7所述的方法,其中各个所述的层包含人视网膜组织的相应层内的细胞特征性的分化细胞。

9. 如权利要求7所述的方法,其中各个所述的层包含祖细胞,并且其中一些或全部的所述祖细胞在施用后分化成人视网膜组织的相应层的成熟细胞。

10. 如权利要求7所述的方法,其中所述层包含基本上完全分化的细胞。

11. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述hESC源的视网膜组织还包含生物相容性支架以形成生物假体视网膜补片。

12. 如权利要求7所述的方法,其中所述生物假体视网膜移植物包含约10,000至100,000个感光细胞。

13. 如权利要求11所述的方法,其中几块所述hESC源的视网膜组织固定到所述生物相容性支架上,从而形成大的生物假体补片。

14. 如权利要求6所述的方法,其中所述hESC源的视网膜组织移植物或所述hESC源的视网膜组织移植物的离解细胞能够将神经营养因子、神经营养性外泌体和有丝分裂原中的一种或多种递送给受试者。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述神经营养因子和有丝分裂原包含以下中的一种或多种:脑源性神经营养因子(BDNF)、神经胶质源性神经营养因子(GDNF)、神经营养蛋白-34(NT34)、神经营养蛋白4/5、神经生长因子- $\beta$ ( $\beta$ NGF)、proNGF、PEDF、CNTF、促生存有丝分裂原碱性成纤维细胞生长因子(bFGF=FGF-2)和WNT家族的促生存成员。

16. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述hESC源的视网膜组织移植物的施用导致在

施用时将视网膜层厚度保持约1至约3个月。

17. 如权利要求1或2所述的方法,还包括施用免疫抑制药物。

18. 如权利要求1或2所述的方法,还包括在施用所述视网膜移植物之前、期间和/或之后施用肾上腺素。

19. 如权利要求17所述的方法,其中在所述施用之前、期间和/或之后施用所述免疫抑制药物。

20. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括调节眼压。

21. 如权利要求20所述的方法,其中所述调节眼压是在所述视网膜组织的施用之前、期间和/或之后。

22. 如权利要求1所述的方法,其中所述组织用眼移植工具施用。

23. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述hESC源的视网膜组织视网膜下或视网膜前施用。

24. 如权利要求1或2所述的方法,其中施用所述hESC源的视网膜组织移植物导致所述hESC源的视网膜组织和所述受试者的视网膜组织的无肿瘤整合。

25. 如权利要求24所述的方法,其中视网膜移植物的整合在施用后约2至10周发生。

26. 如权利要求25所述的方法,其中整合包含结构整合。

27. 如权利要求24所述的方法,其中整合包含功能整合并且在施用后约1至6个月发生。

28. 如权利要求1所述的方法,其中施用不引起视网膜炎症。

29. 如权利要求26所述的视网膜组织移植物,其中在施用后,所述视网膜组织发生分层。

30. 如权利要求1所述的方法,其中在施用之后,所述视网膜组织神经元显示出 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 和/或 $\text{Ca}^{++}$ 电流的信号。

31. 如权利要求1所述的方法,进一步包括证明所述视网膜组织与现有组织之间的连接性。

32. 如权利要求31所述的方法,其中所述连接通过以下一种或多种证明:WGA-HRP跨突触示踪剂、组织学、IHC或电生理学。

33. 如权利要求1所述的方法,还包括测量功能恢复的水平。

34. 如权利要求33所述的方法,其中功能恢复的水平包含电生理反应的至少基线的10%的增加。

35. 一种用于移植到受试者的眼睛中的视网膜组织移植物,其包含:

视网膜色素上皮(RPE)细胞、视网膜神经节细胞(RGC)、二级视网膜神经元和感光(PR)细胞,其中所述RPE、RGC和PR细胞配置为形成中央核心。

36. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中存在约1,000至250,000个感光细胞。

37. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中所述二级视网膜神经元对应于所述成熟视网膜的内核层。

38. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中所述细胞被布置为使得从所述核心径向向外移动,所述视网膜组织包含视网膜神经节细胞(RGC)层、二级视网膜神经元层、感光(PR)细胞层和RPE细胞的外层。

39. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中所述移植物包含1,000至约250,000

个细胞。

40. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中所述移植物移植到视网膜下间隙或视网膜前间隙中。

41. 如权利要求40所述的视网膜组织移植物,其中所述移植物移植到黄斑附近的视网膜下间隙或视网膜前间隙中。

42. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中突触发生的增加与电活动的增加相一致。

43. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中在移植之后,神经元将所述移植物连接至现有组织。

44. 如权利要求43所述的视网膜组织移植物,其中所述神经元是CALB2阳性的。

45. 如权利要求43所述的视网膜组织,其中连接性通过WGA-HRP跨突触示踪剂证明。

46. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中在移植后,轴突将所述移植物连接至现有组织。

47. 如权利要求46所述的视网膜组织,其中所述轴突是CALB2阳性的。

48. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中在移植后,所述移植物的细胞朝向于RGC成熟。

49. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中在移植后,所述移植物形成与现有神经元的突触。

50. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中在移植后,所述移植物和现有组织形成连接。

51. 如权利要求50所述的视网膜组织,其中所述连接在移植后一天至约5周内形成。

52. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中在移植后,所述移植物形成穿越现有组织ONL的轴突。

53. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中所述移植物产生旁分泌因子。

54. 如权利要求53所述的视网膜组织移植物,其中所述旁分泌因子在施用之前和/或之后产生。

55. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中所述移植物产生神经营养因子。

56. 如权利要求55所述的视网膜组织移植物,其中所述移植物在施用之前或之后产生神经营养因子。

57. 如权利要求55所述的视网膜组织,其中所述神经营养因子包含BDNF、GDNF、bDNF、NT4、bFGF、NT34、NT4/5、CNTF、PEDF、丝氨酸蛋白酶抑制蛋白或WNT家族成员中的一种或多种。

58. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中在移植后,所述功能恢复的水平作为电生理反应的增加来测量。

59. 如权利要求58所述的视网膜组织移植物,其中所述功能恢复的水平测量为至少基线的10%的电生理反应的增加。

60. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中在移植后,所述移植物的轴突穿透并整合到现有组织中。

61. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中所述组织源自人多能干细胞。

62. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中所述移植物可用于在受试者中减缓视网膜退行性疾病的进展,减缓创伤性损伤后视网膜退行性疾病的进展,减缓年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的进展,减缓遗传性视网膜疾病的进展,稳定视网膜疾病,预防视网膜退行性疾病,预防外伤后的视网膜退行性疾病,改善视力或视觉感知,预防AMD,恢复因疾病、损伤或遗传异常而丧失的视网膜色素上皮细胞 (RPE)、感光细胞 (PRC) 和视网膜神经节细胞 (RGC),增加RPE、PRC和RCG或者治疗RPE、PRC和RCG缺陷。

63. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中所述移植物能够无肿瘤存活至少约6至24个月,伴随分层及PR和RPE层的发生,包括延长PR外段、突触发生、电生理活性以及植入接受者眼部空间中之后与接受者视网膜细胞的连接性。

64. 如权利要求35所述的视网膜组织移植物,其中在所述移植物植入所述接受者眼睛的眼部空间中5周之后,所述移植物能够将轴突延伸和整合到接受者的外核层 (ONL) 中、内核层 (INL) 中和神经节细胞层 (GCL) 中。

## 用于恢复或预防疾病或外伤性损伤造成的视觉丧失的组合物 和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年7月31日提交的美国临时专利申请序列号62/539,542,2017年10月25日提交的美国临时专利申请序列号62/577,154,2017年11月30日提交的美国临时专利申请序列号62/593,228,2018年3月21日提交的美国临时专利申请序列号62/646,354,以及2018年5月1日提交的美国临时专利申请序列号62/665,483的优先权和利益,这些文件中每一个的全部内容通过引用全文并入本文。

### 背景技术

[0003] 最终导致感光细胞 (PR) 变性的视网膜退行性 (RD) 疾病是全世界失明的第三大主要原因。遗传状况、年龄和创伤 (军人和平民) 是与视网膜变性相关的视力丧失的主要原因。一旦感光细胞退化,目前没有恢复视网膜并使视力恢复的技术。

[0004] 年龄相关性黄斑变性 (AMD) 是发达国家中55岁以上人群的RD的主要原因。目前,美国约有1500万人受到AMD的影响,AMD占美国和加拿大全部视力丧失的约50%。色素性视网膜炎 (RP) 是遗传性视力障碍的最常见原因,患病率为1:4000,且据估计影响美国的50,000至100,000人和全世界的约150万人。导致严重视力丧失的其他视网膜疾病包括莱伯氏先天性黑蒙 (Leber's Congenital Amaurosis, LCA), 这是一种罕见的遗传障碍,其中视网膜功能障碍导致视力丧失,通常是从出生开始。视力丧失的程度因患者而异,但可能非常严重 (很少或没有光感)。

[0005] 由于头部和躯干的个人冲击保护提供了增强的战斗保护,越来越多的士兵从面部和眼睛等受保护程度较低的身体部位的损伤中存活下来。冲击暴露引起的眼部损伤是军事战斗中持续的第四常见的伤害。眼部损伤常常导致失明,从而引起生活质量和自立性的严重丧失。尽管穿透性损伤通常会导致严重的组织损伤或组织损失,但非穿透性或闭合性眼球损伤可类似地导致眼内高度有序的组织结构的破坏,从而导致视网膜脱离、感光细胞死亡和视神经损伤,因而导致不可逆的视力丧失。闭合性眼球损伤通常表现为其中眼部结构保持基本完整的损伤模式,但仍需要干预以预防视网膜和视神经的变性,从而导致严重的视力丧失。

[0006] 最近开发的恢复RD患者视力的策略是植入电子神经假体芯片,其将光捕获传感器引入视网膜下间隙中以将视觉信号电传输到患者视网膜中的其余神经元。这种方法的一个问题是由于正在进行的视网膜变性和重塑、视网膜变薄和神经胶质增生导致电子和生物部分的逐渐分离,从而进一步减少了芯片-视网膜相互作用,这对于传导电信号至关重要。电子装置在生物组织中的有限稳定性引起其他问题,其中芯片中使用的金属和布线发生由生物流体引起的氧化。

[0007] 使用人类胎儿视网膜的视网膜组织移植也已被证明恢复失明的动物的视觉感知,并且也改善视网膜变性患者的视力。尽管这种方法是有希望的,并且可以在患者的视网膜下间隙中产生新的健康人类视网膜的层,但是出于道德考虑以及胎儿组织的稀缺和供应的

不可预测,胎儿组织作为一种治疗选择受到了阻碍。此外,视力恢复程序的成功取决于选择特定发育年龄(8-17周)的人类胎儿视网膜和将其精确地放入患者的视网膜下间隙中。成年人的视网膜本身通常不适合这种应用,因为它在移植后迅速死亡。

[0008] 在所有干细胞替代疗法中,视网膜干细胞疗法脱颖而出,因为它是最紧急的未满足需求之一。眼睛是小的、包封的器官,具有免疫豁免。眼部空间可用于移植,并且视网膜可以使用非侵入性方法可视化。但是,通过功能性细胞置换修复神经视网膜是一项复杂的任务。为了获得最佳结果,新细胞必须迁移到视网膜层中的特定位置,并与宿主重新建立特异性突触连接。晚期RD期间神经回路的突触重塑进一步使这项任务复杂化。

[0009] 因此,需要用于聚焦于视网膜损伤或疾病后结构和功能的恢复和保护的视力恢复技术的稳健和可行的治疗方法,由此视网膜损伤可能是严重的,影响大部分的视网膜或随着时间的流逝引起持续进行的退化。

[0010] 本公开解决了再生医学和细胞疗法领域中的这些和其他缺点。

## 发明内容

[0011] 在一个方面,提供了用于以下的一种或多种的方法:治疗视网膜损伤、减缓视网膜损伤的进展、预防视网膜损伤、更换视网膜组织和恢复受损的视网膜组织,该方法包括:向受试者施用hESC源的视网膜组织移植物。

[0012] 在另一方面,提供了用于以下的一种或多种的方法:减缓视网膜退行性疾病的进展,减缓创伤性损伤后视网膜退行性疾病的进展,减缓年龄相关性黄斑变性(AMD)的进展,减缓遗传性视网膜疾病的进展,稳定视网膜疾病,预防视网膜退行性疾病,预防创伤性损伤后的视网膜退行性疾病,改善视力或视觉感知,预防AMD,恢复因疾病、损伤或遗传异常而丧失的视网膜色素上皮细胞(RPE)、感光细胞(RGC)和视网膜神经节细胞(RGC),增加RPE、PRC和RCG或治疗RPE、PRC和RCG缺陷,该方法包括:向受试者施用hESC源的视网膜组织移植物。

[0013] 在另一方面,视网膜损伤由冲击暴露、遗传障碍、视网膜疾病和视网膜损伤中的一种或多种引起。在另一方面,视网膜疾病包括视网膜退行性疾病。在另一方面,视网膜损伤是由年龄相关性黄斑变性(AMD)、色素性视网膜炎(RP)和莱伯氏先天性黑蒙(LCA)中的一种或多种引起的。

[0014] 在一个实施方式中,所描述的方法使用hESC源的视网膜组织,其包含视网膜色素上皮(RPE)细胞、视网膜神经节细胞(RGC)和感光细胞(PR)。在另一个实施方式中,RPE、RGC和PR细胞配置为使得存在视网膜色素上皮(RPE)细胞的中央层,并且从所述RPE细胞层径向向外移动,存在视网膜神经节细胞(RGC)层、二级视网膜神经元层(对应于成熟视网膜的内核层)、感光(PR)细胞层和RPE细胞的外层。在另一个实施方式中,各个层包含人视网膜组织的相应层内的细胞特征性的分化细胞。在另一个实施方式中,各个层包含祖细胞,并且其中一些或全部的祖细胞在施用后分化成人视网膜组织的相应层的成熟细胞。

[0015] 在另一个实施方式中,这些层包含基本上完全分化的细胞。在又一个实施方式中,hESC源的视网膜组织还包含生物相容性支架以形成生物假体视网膜补片(patch)。在其他实施方式中,所述生物假体视网膜移植物包含约10,000至100,000个感光细胞。在其他实施方式中,将几块hESC源的视网膜组织固定至生物相容性支架上,使得形成大的生物假体补片。在其他实施方式中,hESC源的视网膜组织移植物或hESC源的视网膜组织移植物的离解

细胞能够将神经营养因子、神经营养性外泌体和有丝分裂原中的一种或多种递送给受试者。而在其他实施方式中,神经营养因子和有丝分裂原包含以下一种或多种:脑源性神经营养因子(BDNF)、神经胶质源性神经营养因子(GDNF)、神经营养蛋白-34(NT34)、神经营养蛋白4/5、神经生长因子- $\beta$ (BNGF)、proNGF、PEDF、CNTF、促生存有丝分裂原碱性成纤维细胞生长因子(bFGF=FGF-2)和WNT家族的促生存成员。

[0016] 在其他方面,施用hESC源的视网膜组织移植物导致在施用时视网膜层厚度保持约1至约3个月。在再其他的方面,施用还包括施用免疫抑制药物。在其他方面,施用包括在施用视网膜移植物之前、期间和/或之后使用肾上腺素。

[0017] 在再其他的方面,在施用之前、期间和/或之后施用免疫抑制药物。

[0018] 在其他实施方式中,该方法还包括调节眼压。在其他方面,调节眼压是在施用视网膜组织之前、期间和/或之后。

[0019] 在某些实施方式中,组织用眼移植工具施用。

[0020] 在其他实施方式中,hESC源的视网膜组织视网膜下或视网膜前施用。

[0021] 在其他实施方式中,施用hESC源的视网膜组织移植物导致hESC源的视网膜组织和受试者的视网膜组织的无肿瘤整合。

[0022] 在其他实施方式中,视网膜移植物的整合发生在施用后约2至10周。在其他实施方式中,整合包括结构整合。在其他实施方式中,整合包括功能整合并且发生在施用后约1至6个月。在其他实施方式中,施用不引起视网膜炎症。

[0023] 在其他实施方式中,在施用后,视网膜组织发生分层(lamination)。

[0024] 在其他实施方式中,在施用后,视网膜组织神经元显示出 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 和/或 $\text{Ca}^{++}$ 电流的信号。

[0025] 在其他实施方式中,方法还包括证明视网膜组织与现有组织的连接性。在其他实施方式中,连接通过以下一项或多项证明:WGA-HRP跨突触示踪剂、组织学、IHC或电生理学。

[0026] 在其他实施方式中,方法还包括测量功能恢复的水平。

[0027] 在其他实施方式中,功能恢复的水平包括电生理反应的基线的至少10%的增加。

[0028] 在其他实施方式中,提供了用于移植到受试者的眼睛中的视网膜组织移植物,其包含:视网膜色素上皮(RPE)细胞、视网膜神经节细胞(RGC)、二级视网膜神经元和感光(PR)细胞,其中RPE、RGC和PR细胞配置为形成中央核心。

[0029] 在其他实施方式中,存在约1,000至250,000个感光细胞。

[0030] 在其他实施方式中,二级视网膜神经元对应于成熟视网膜的内核层。

[0031] 在其他实施方式中,细胞布置为使得从核心径向向外移动,视网膜组织包含视网膜神经节细胞(RGC)层、二级视网膜神经元层、感光(PR)细胞层和RPE细胞的外层。在其他实施方式中,移植物包含1,000至约250,000个细胞。

[0032] 在其他实施方式中,移植物被移植到视网膜下间隙或视网膜前间隙中。

[0033] 在其他实施方式中,移植物移植到黄斑附近的视网膜下间隙或视网膜前间隙中。在其他实施方式中,突触发生的增加与电活动的增加相一致。

[0034] 在其他实施方式中,在移植后,神经元将移植物连接至现有组织。

[0035] 在其他实施方式中,神经元是CALB2阳性的。在其他实施方式中,连接性通过WGA-HRP跨突触示踪剂证明。在其他实施方式中,在移植后,轴突将移植物连接至现有组织。在其

他实施方式中,轴突是CALB2阳性的。

[0036] 在其他实施方式中,移植后,移植物的细胞朝向RGC成熟。

[0037] 在其他实施方式中,移植后,移植物与现有的神经元形成突触。

[0038] 在其他实施方式中,移植后,移植物与现有组织形成连接。

[0039] 在其他实施方式中,所述连接在移植后的一天至约5周内形成。

[0040] 在其他实施方式中,在移植后,所述移植物形成穿越现有组织ONL的轴突。

[0041] 在其他实施方式中,移植物产生旁分泌因子。

[0042] 在其他实施方式中,旁分泌因子在施用之前和/或之后产生。

[0043] 在其他实施方式中,移植物产生神经营养因子。

[0044] 在其他实施方式中,移植物在施用之前或之后产生神经营养因子。

[0045] 在其他实施方式中,神经营养因子包括BDNF、GDNF、bDNF、NT4、bFGF、NT3、NT4/5、CNTF、PEDF、丝氨酸蛋白酶抑制蛋白或WNT家族成员中的一种或多种。

[0046] 在其他实施方式中,在移植后,功能恢复的水平测量为电生理反应的增加。

[0047] 在其他实施方式中,功能恢复的水平测量为至少基线的10%的电生理反应的增加。

[0048] 在其他实施方式中,在移植后,移植物的轴突穿透并整合到现有组织中。

[0049] 在其他实施方式中,该组织源于人多能干细胞。

[0050] 在其他实施方式中,所述移植物可用于在受试者中减缓视网膜退行性疾病的进展,减缓创伤性损伤后视网膜退行性疾病的进展,减缓年龄相关性黄斑变性(AMD)的进展,减缓遗传性视网膜疾病的进展,稳定视网膜疾病,预防视网膜退行性疾病,预防创伤性损伤后的视网膜退行性疾病,改善视力或视觉感知,预防AMD,恢复因疾病、损伤或遗传异常而丧失的视网膜色素上皮细胞(RPE)、感光细胞(PCR)和视网膜神经节细胞(RGC),增加RPE、PCR和RCG或者治疗RPE、PCR和RCG缺陷。

[0051] 在其他实施方式中,移植物能够无肿瘤存活至少约6至24个月,具有PR和RPE层的分层和发生,包括延长PR外段、突触发生、电生理活性以及植入接受者眼部空间后与接受者视网膜细胞的连接性。

[0052] 在其他实施方式中,在移植物植入接受者眼睛的眼部空间后5周,移植物能够将轴突延伸并整合到接受者的外核层(ONL)中、内核层(INL)中和神经节细胞层(GCL)中。

[0053] 本文提供了用于通过施用视网膜补片来恢复视力丧失或减缓视力丧失进程的方法。在一个方面,提供了一种视力修复或改善产品,其可以被注射或引入到患者眼睛的视网膜前或视网膜下间隙中。

[0054] 在另一方面,提供了一种在视网膜受损的受试者中校正视力丧失的方法,该方法包括将视网膜组织恢复到受损区域。而在另一方面,提供了一种校正受试者的视力丧失的方法,其中受损的视网膜组织通过将生物视网膜补片施用至受损区域来恢复。在另一方面,提供了一种通过施用生物视网膜补片来纠正视网膜受损的受试者的视力丧失的方法,其中所述生物视网膜补片包含:工程化的视网膜组织;电纺生物聚合物支架;和粘合剂;其中该视网膜组织通过粘合剂固定在生物聚合物上。

[0055] 下文描述了其他的方面和实施方式。

## 附图说明

[0056] 通过参考以下仅用于说明目的的附图将更充分地理解本文所述的技术：

[0057] 图1A示出了根据本公开的某些实施方式的视网膜下移植物的图示。

[0058] 图1B示出了根据某些实施方式包含hPSC源的视网膜组织(类器官)和生物假体支架支持物的生物假体视网膜补片的图示。

[0059] 图1C示出了根据某些实施方式包含多个hPSC源的视网膜组织块和生物假体支架支持物的生物假体视网膜补片的图示。

[0060] 图1D显示了根据某些实施方式包含hPSC源的视网膜组织(类器官)、生物假体支架支持物和RPE组分的生物假体视网膜补片的图示。

[0061] 图1E示出了根据某些实施方式包含hPSC源的视网膜组织、生物假体支架支持物和光敏二极管(光电二极管)组件的生物假体视网膜补片的图示。

[0062] 图2示出了描述伯明翰眼外伤术语系统(Birmingham Eye Trauma Terminology System, BETTS)的图表。

[0063] 图3A示出了hPSC源的视网膜组织的图像,该组织用对于在神经元(包括视网膜)中表达的钙网膜蛋白标志物CALB2特异性的抗体染色。

[0064] 图3B示出了hPSC源的视网膜组织的图像,该组织用对视网膜细胞质标志物Recoverin (RCVRN)特异性的抗体染色。

[0065] 图3C示出了与人胎儿视网膜相比,来自视网膜类器官(视网膜组织生物假体移植物的)的FACS分选的PR细胞的移植体。

[0066] 图4A示出了移植到小鼠模型的视网膜前间隙中的hESC源的视网膜祖细胞(hESC-RPC)的视网膜整合和成熟的ICH图像。如所示的,大多数人类祖细胞对早期神经元标志物Tu j1是阴性的,并且可以观察到迁移并整合到宿主的视网膜神经节细胞(RGC)层或内核层(INL)中。

[0067] 图4B示出了在宿主视网膜下区域的大面积上迁移的植入hESC源的视网膜祖细胞的ICH图像。

[0068] 图4C示出了来自整合到宿主视网膜神经节细胞(RGC)层、内网层和内核层(INL)中的植入视网膜前hESC-RPC的细胞的ICH图像。

[0069] 图5A示出了视网膜组织生物假体移植体移植的图像。

[0070] 图5B示出了兔眼中hESC-RPC的染色的视网膜前移植体的ICH图像。人类视网膜类器官的部分用人类核标志物HNu染色,并显示了来自移植到兔眼的视网膜前间隙中的人视网膜类器官的人视网膜祖细胞。样品也用DAPI复染。

[0071] 图5C示出了兔眼中染色的hESC-RPCs的视网膜前移植体的ICH图像。人类视网膜类器官的部分用人类核标志物HNu染色,并显示了来自移植到兔眼的视网膜前间隙中的人视网膜类器官的人类视网膜祖细胞。

[0072] 图5D示出了在大型动物模型(兔)中人视网膜类器官的ICH图像,并证明本文所述的视网膜类器官可使用玻璃插管通过在睫状体扁平部上的切口递送到兔(大型眼动物模型)的眼部空间中而不会对眼睛造成伤害。眼睛被成功保存并染色,从而显示出人类视网膜细胞的位置。

[0073] 图6示出了根据某些实施方式的激波管的示意图和相应的图像。

[0074] 图7A示出了视网膜的风险曲线。该曲线显示了以特定冲击强度(表示为以kPa-ms计的比冲量)造成具有给定CIS(红色=CIS 1;绿色=CIS 2;CIS 3;黑色=CIS 4)的损伤的概率。

[0075] 图7B示出了视神经的风险曲线。该曲线显示了以特定冲击强度(表示为以kPa-ms计的比冲量)造成具有给定CIS(红色=CIS 1;绿色=CIS 2;CIS 3;黑色=CIS 4)的损伤的概率。

[0076] 图8是移植后在大型眼动物模型(野生型猫)的视网膜下间隙中hESC源的视网膜组织移植物的OCT图像。

[0077] 图9是移植后在猫眼中用HNU抗体对hESC源的视网膜进行免疫染色的图像,其显示了视网膜移植植物在正确位置存在。

[0078] 图10A示出了在移植前从培养皿上切割的hESC-3D源的视网膜组织(视网膜类器官)的图像。

[0079] 图10B示出了移植前在培养皿上生长的切割的hESC-3D源的视网膜类器官的图像。

[0080] 图10C示出了在培养皿上生长的hESC-3D源的视网膜类器官的其他图像。

[0081] 图10D示出了在盲的免疫缺陷大鼠眼中hESC-3D源的视网膜组织生物假体移植物的IHC图像,证明了施用后移植物的成层和分层。

[0082] 图10E示出了hESC-3D源的视网膜组织生物假体移植物的IHC图像,其证明了移植物的成层和分层。

[0083] 图10F示出了被植入盲的免疫缺陷大鼠眼中的hESC-3D源的视网膜组织生物假体移植物的IHC图像,其中在外层中具有紧靠大鼠RPE的外段样突起。

[0084] 图11示出了IHC图像,其证明了在4°C下在Hib-E中过夜装运后保持的视网膜组织活力。箭头突出显示了存活的人类植入细胞。

[0085] 图12A至图12C示出了在野生型猫的视网膜下间隙中移植hESC-3D视网膜组织的外科手术团队的图像。

[0086] 图12D示出了用于调节眼压的设备以及用于对移植植物进行成像的RetCam设备的图像。

[0087] 图12E示出了插入猫眼中用于眼内手术的两个端口。

[0088] 图12F示出了视网膜脱离(起泡),用于将hESC-3D视网膜组织生物假体移植植物移植到视网膜下间隙中。

[0089] 图12G示出了用于注射hESC-3D视网膜组织的套管。

[0090] 图12H示出了用RetCam成像的野生型猫的视网膜下间隙中的hESC-3D视网膜组织。

[0091] 图12I示出了在移植后5周,放置在野生型猫的视网膜下间隙中的hESC-3D视网膜组织的OCT图像的位置。

[0092] 图12J示出了在移植后5周,放置在野生型猫的视网膜下间隙中的hESC-3D视网膜组织的截面OCT图像。

[0093] 图12K示出了OCT图像的3D重建以估计移植植物的总尺寸。

[0094] 图13A示出了制备用于切片的PFA固定的、冷冻保护的、OCT饱和的具有视网膜下移植植物的猫眼。

[0095] 图13B示出了在OCT中冷冻的猫眼的横截面。

[0096] 图13C示出了OCT中16 $\mu$ m厚的猫眼切片,其示出了在中央视网膜中作为凸起的移植物。

[0097] 图13D示出了冷冻切片区域的放大图像,其显示了hESC-3D视网膜组织移植物的保存。

[0098] 图13E示出了在移植到视网膜下间隙中5周后具有hESC-3D视网膜组织移植物的猫视网膜切片的IHC图像。移植物显示出许多CALB2(钙网膜蛋白)阳性神经元的存在,且箭头指向连接人移植物和猫的ONL的CALB2[+]轴突。

[0099] 图13E至图13G示出了在猫的视网膜下间隙中hESC-3D视网膜组织移植物的图像,其分别用HNU、Ku80和SC121人(而不是猫)特异性抗体染色。这些结果表明,实际上人体组织移植到猫的视网膜下间隙的正确位置中。

[0100] 图13H示出了用BRN3A(RGC的标志物)和人类核标志物染色的图像。星号显示主图像中具有标志物的区域,其在插图中被放大。这些结果表明,移植物中的一些细胞正发生向RGC的成熟。

[0101] 图13I至图13M示出了用对人(而非猫)-突触素(hSYP)和轴突标志物NFL(对于猫和人神经元两者特异性的)具有特异性的抗体染色的图像,并显示了点状染色(箭头)的存在,其表明通过整合到猫神经元中的人类神经元形成的潜在突触。

[0102] 图14A和图14B示出人(而非猫)特异性突触素抗体hSYP(红色)和钙网膜蛋白(绿色)(其对猫和人神经元均染色)的图像。

[0103] 图14C和图14D示出了较低放大率图像的图像,其提供了具有hESC-3D视网膜组织移植物的猫视网膜的大块概况。

[0104] 图15A至图15C示出了在移植物中连接猫INL和钙网膜蛋白[+]人细胞的钙网膜蛋白[+]轴突(箭头)的图像。

[0105] 图15D和图15E示出了看起来成熟的移植物中的钙网膜蛋白[+]神经元和在整个移植物中发现的钙网膜蛋白[+]轴突的图像。

[0106] 图16A至图16C示出了在猫视网膜下间隙中hESC-3D视网膜组织移植物的边缘的染色图像。SC121人胞质特异性抗体(红色)和Ku80人细胞核特异性抗体(绿色)染色人类视网膜移植物,但不染色猫视网膜。从这些图像可以看出,存在移植物与宿主的连接性。

[0107] 图16D和图16E示出了来自包裹(箭头)在紧邻移植物的层中的猫PR周围的hESC-3D视网膜组织移植物的轴突,而可以看到穿过猫ONL(箭头)的一些SC121+人轴突的图像。

[0108] 图17示出了猫中植入的视网膜类器官的RetCam图像-在移植到视网膜下间隙中后立即成像的。

[0109] 图18A和图18B示出了比较人和猫眼结构的图示。

[0110] 图19示出了根据某些实施方式用于区分视网膜类器官的时间线的实例。

[0111] 图20A至图20I示出了hESC源的视网膜组织中视网膜祖细胞标志物和早期感光细胞标志物的图像。

[0112] 图21示出了在睫状体平坦部玻璃体切除术之后,使用玻璃套管将hESC源的视网膜组织生物假体移植物移植到野生型猫眼的视网膜下间隙中的移植的图像。

[0113] 图22示出了将hESC源的视网膜组织生物假体移植物移植到其中的视网膜下小泡的图像。

[0114] 图23示出了在hESC源的视网膜组织生物假体移植物移植后三周拍摄的彩色眼底和OCT图像。

[0115] 图24示出了从组1(+泼尼松,-环孢菌素A)的猫视网膜拍摄的视网膜切片的图像,其使用对小胶质细胞和巨噬细胞特异性的抗体染色。

[0116] 图25示出了从组2(+泼尼松,+环孢菌素A)的猫视网膜拍摄的视网膜切片的图像,其也使用对小胶质细胞和巨噬细胞特异性的抗体染色。

[0117] 图26示出了对于组1(+泼尼松,-环孢菌素A)和组2(+泼尼松,+环孢菌素A),比较猫视网膜切片中对小胶质细胞和巨噬细胞标志物阳性的细胞数量的图。

[0118] 图27A示出了来自组2(+泼尼松,+环孢菌素A)的猫视网膜切片的图像,其使用对感光标志物CRX特异性的抗体染色。

[0119] 图27B示出了来自组2(+泼尼松,+环孢菌素A)的猫视网膜切片的图像,其使用人特异性抗体HNu染色。

[0120] 图27C示出了来自组2(+泼尼松,+环孢菌素A)的猫视网膜切片的图像,其使用针对CRX和HNu两者的抗体染色。

[0121] 图28A示出了来自组2(+泼尼松,+环孢菌素A)的猫视网膜的切片的图像,其使用对视网膜神经节细胞(RGC)标志物BRN3A特异性的抗体染色。

[0122] 图28B示出了来自组2的猫视网膜的切片的图像,其用BRN3A和人特异性标志物KU80两者染色。

[0123] 图28C示出了来自组2的猫视网膜的切片的图像,其用BRN3A、人特异性标志物KU80和DAPI染色。

[0124] 图29A示出了使用对钙网膜蛋白标志物CALB2特异性的抗体染色的猫视网膜切片的图像,该标志物在神经元包括视网膜中表达。

[0125] 图29B示出了标志物SC121的IHC染色的图像。针对SC121的抗体对人细胞的细胞质是特异性的。

[0126] 图29C示出了用对标志物CALB2、SC121和DAPI特异性的抗体染色的猫视网膜切片的图像。

[0127] 图30A示出了向猫视网膜延伸的视网膜移植物的轴突(使用对CALB2标志物特异性的抗体染色)的ICH图像。

[0128] 图30B示出了视网膜移植物的ICH图像,其用对人细胞标志物HNu和CALB2特异性的抗体染色,从而描画了来自猫视网膜的移植物。

[0129] 图30C示出了移植物轴突的GABA阳性染色的ICH图像,表明来自整合到接受者视网膜中的植入组织的轴突正朝向神经元命运分化。

[0130] 图31A至图31G示出了在患有视网膜变性(RD)的CRX突变猫的视网膜下和视网膜前间隙中人ESC源的视网膜类器官的OCT图像。

[0131] 图32示出了将移植物施用至野生型猫眼的视网膜下间隙中5周后包含对BDNF的表达呈阳性的hESC源的视网膜组织的生物假体视网膜移植物的ICH图像。

## 具体实施方式

[0132] 本文所述的生物假体视网膜移植物(或装置)可用于治疗视网膜退行性疾病和病

症。例如,生物假体视网膜移植物可以包含干细胞源的组织或细胞。在一些实施方式中,生物假体视网膜移植物还可包含适于植入受试者眼睛的眼部空间中的载体或支架,以形成生物假体视网膜补片。在某些实施方式中,生物假体视网膜补片可包含在载体或支架上的多块干细胞源的组织或细胞,其可用于治疗大面积的视网膜变性或损伤。

[0133] 本公开涉及细胞和/或组织组合物以及配制细胞和/或组织组合物的方法,所述细胞和/或组织组合物适合用于在受试者中减缓视网膜退行性疾病的进展,减缓创伤性损伤后视网膜退行性疾病的进展,减缓年龄相关性黄斑变性(AMD)的进展,预防视网膜退行性疾病,预防创伤性损伤后的视网膜退行性疾病,预防AMD,恢复因疾病、损伤或遗传异常而丧失的视网膜色素上皮细胞(RPE)、感光细胞(PCR)和视网膜神经节细胞(RGC),增加RPE、PCR和RCG,或者治疗RPE、PCR和RCG缺陷的治疗性用途。

[0134] 本文使用的术语“受试者”包括但不限于人类、非人类灵长动物和非人类脊椎动物,例如野生、家养和农场动物,包括任何哺乳动物,例如猫、狗、牛、绵羊、猪、马、兔、啮齿动物如小鼠和大鼠。在一些实施方式中,术语“受试者”是指雄性。在一些实施方式中,术语“受试者”是指雌性。

[0135] 如本文所用,术语“疗法”、“治疗”、“治疗的”或“处理”可以指治疗性处理或者预防的或预防性措施,其中目的是预防或减缓(减轻)不希望的生理状况、症状、失调或疾病,或者获得有益的或理想的临床效果。在一些实施方式中,该术语可以指治疗和预防。为了本公开的目的,有益的或期望的临床结果可以包括但不限于以下一种或多种:缓解症状;减轻病症、失调或疾病的程度;病症、失调或疾病状态的稳定(即不恶化);延迟病症、失调或疾病的发作或减慢其进展;改善病症、失调或疾病状态;和减轻(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的,或者改善或改进病症、失调或疾病。治疗包含引起临床上显著的反应。治疗还包含与未接受治疗的预期生存期相比延长生存期。

[0136] 视网膜植入物

[0137] 本公开的方面提供了通过恢复受损区域的视网膜组织来用于在受试者中治疗、恢复和/或改善由外伤性损伤或疾病引起的视力丧失的组合物和方法。在某些实施方式中,本公开提供了使用例如,生物相容的、可吸收的基质、支架和/或载体将工程化的视网膜组织递送至患病区域的用于恢复受试者的视力丧失的方法。对于其中存在大面积受损组织的视网膜组织工程和递送应用,有益的是产生一种生物相容性支架,其中将附着大量工程化的视网膜组织用于受控地放置在受试者的眼睛内。

[0138] 在一个方面,提供了用于在受试者中在广泛闭合性眼球和视网膜损伤后恢复视力,减缓视网膜退行性疾病的进展,减缓创伤性损伤后视网膜退行性疾病的进展,减缓年龄相关性黄斑变性(AMD)的进展,预防视网膜退行性疾病,预防创伤性损伤后的视网膜退行性疾病,预防AMD,恢复因疾病、损伤或遗传异常而丢失的视网膜色素上皮细胞(RPE)、感光细胞(PCR)和视网膜神经节细胞(RGC),增加RPE、PCR和RCG或者治疗RPE、PCR和RCG缺陷的源自人多能干细胞(hPSC)、人胚胎干细胞(hESC)和/或组织和/或人胎儿视网膜组织或成人视网膜组织的可移植的生物视网膜补片或生物视网膜假体装置。

[0139] 图1A示出了根据本公开的某些实施方式,植入受试者眼睛的视网膜下间隙中的视网膜下移植物的图示。图1B示出了生物假体视网膜补片的图示,其包含hPSC源的组织(类器官)和生物假体支架支持物。

[0140] 一个方面,人多能(或胚胎)干细胞源的组织(hPSC源的视网膜组织或hPSC-3D视网膜组织)可用于移植到受试者的眼视网膜下或视网膜前的间隙中。hPSC-3D视网膜组织代表了视力恢复治疗的重大进步,因为从hESC产生的视网膜组织保持着在移植后完全分化和与接受者的视网膜重新建立突触连接的先天能力。一小片hESC-3D视网膜组织可以包含约1,000至2,000个感光细胞或2,000至3,000、或1,000至5,000、3,000至10,000或5,000至100,000,或50,000至500,000或100,000至1,000,000或更多个感光细胞,其是关键的光感应细胞。将许多单块hESC-3D视网膜组织放置在非常薄的生物材料的单个补片上可以产生用于改善视力的大而柔性的(也是可移植的)生物视网膜组织生物假体补片。该视网膜组织视力矫正产品可以减少手术失误,因为本文所述的移植物和补片允许对视网膜组织移植物进行精确和受控的放置。

[0141] 在某些实施方式中,近似扁平圆柱体(或圆盘)形状的三维体外工程化的视网膜组织包含视网膜色素上皮(RPE)细胞的中央核心,并且从RPE细胞核心径向向外移动,包含视网膜神经节细胞(RGC)层、二级视网膜神经元层(对应于成熟视网膜的内核层)、感光(PR)细胞层和RPE细胞的外层。这些层中的每一个可以具有该层特征性的完全分化的细胞,并且任选地还可以包含该层特征性的分化细胞的祖细胞。例如,RPE细胞层(或核心)可以包含RPE细胞和/或RPE祖细胞;PR细胞层可以包含PR细胞和/或PR祖细胞;内核层可包含二级视网膜神经元和/或二级视网膜神经元的祖细胞;并且RGC层可以包含RGC和/或RGC祖细胞。在一些实施方式中,本文所述的不同层内的祖细胞具有在移植后完全分化的能力。

[0142] 术语“hPSC源的3D视网膜组织”、“hPSC源的3D视网膜类器官”、“hPSC-3D视网膜组织”、“体外视网膜组织”、“hPSC源的视网膜组织”、“视网膜类器官”、“视网膜球体”和“hPSC-3D视网膜类器官”在本公开中可互换使用,并且是指包含视网膜组织的多能干细胞来源的三维聚集体。hPSC源的3D视网膜类器官形成了大部分或全部视网膜层(RPE、PR、视网膜内部神经元(即,内核层)和视网膜神经节细胞),并早至4-8周左右在某些类器官中出现突触发生和轴突发生和在hESC-3D视网膜发育的第3个月或第4个月左右变得更加明显。本文公开的3D视网膜类器官可以表达LGR5基因,该基因是成体干细胞标志物并且是WNT途径的重要成员。此外,可以对hPSC源的3D视网膜类器官进行遗传工程化以瞬时或稳定地表达感兴趣的转基因,从而增强分化和/或作为报告体和/或增强hPSC-3D源的组织构建体或来自这样的组织构建体的细胞的神经保护特性。

[0143] 尽管本公开涉及hESC源的3D视网膜组织,但是本领域技术人员将理解,任何多能细胞(ES细胞、iPS细胞、pPS细胞、源自单性动物的ES细胞等)以及胚胎的、胎儿的和/或成体的视网膜也可以用作根据本公开的方法的3D视网膜组织的来源。

[0144] 如本文所用,“胚胎干细胞”(ES)是指多能干细胞(胚胎的,诱导的或两者),其1)源自在细胞基本分化为三个胚层(ES)之前的胚囊;或2)替代地从已建立的细胞系(iPS)获得。除非另有明确要求,否则该术语包含具有ES细胞的表型特征的原代组织和已建立的细胞系,以及具有多能表型的此类细胞系的后代。ES细胞可以是人ES细胞(hES)。hES原型细胞由Thomson等(Science 282:1145(1998);以及6,200,806号美国专利)描述,并且可以从许多已建立的干细胞库(例如英国干细胞库(UK Stem Cell Bank,Hertfordshire,England)和国家干细胞库(National Stem Cell Bank, Madison, Wisconsin, United States)中的任何一个获得。

[0145] 如本文所用,“多能干细胞”(pPS)是指可以源自任何来源并且能够在适当条件下产生不同细胞类型的后代的细胞,所述不同细胞类型是所有三个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)的衍生物。pPS细胞可以具有在8-12周龄的SCID小鼠中形成畸胎瘤的能力和/或在组织培养物中形成所有三个胚层的可识别细胞的能力。多能干细胞的定义包括各种类型的胚胎细胞,包括人胚胎干(hES)细胞(参见,例如,Thomson等(1998) *Science* 282:1145)和人胚胎生殖(hEG)细胞(参见,例如,Shamblott等(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726);来自其他灵长类动物的胚胎干细胞,如恒河猴干细胞(参见,例如,Thomson等人,(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844)、狨猴干细胞(参见例如(1996) Thomson等, *Biol. Reprod.* 55:254)、通过核转移技术(美国专利申请公开号2002/0046410)产生的干细胞以及诱导多能干细胞(参见,例如Yu等,(2007) *Science* 318:5858;Takahashi等,(2007) *Cell* 131(5):861)。可以将pPS细胞建立为细胞系,从而提供pPS细胞的连续来源。

[0146] 如本文所用,“诱导多能干细胞”(iPS)是指通过成体体细胞的去分化而获得的胚胎样干细胞。iPS细胞是多能的(即,能够分化为在三个胚胎胚层的每一个中发现的至少一种细胞类型)。此类细胞可从分化的组织(例如,体细胞组织如皮肤)获得,并通过将细胞重新编程以获得胚胎干细胞特性的遗传操作发生去分化。例如,可以通过诱导体细胞干细胞中Oct-4、Sox2、Klf4和c-Myc的表达来获得诱导多能干细胞。因此,iPS细胞可通过体细胞(例如成纤维细胞、肝细胞、具有转录因子(例如Oct-3/4、Sox2、c-Myc和KLF4)的胃上皮细胞)的逆转录病毒转导而产生。Yamanaka S, *Cell Stem Cell*. 2007, 1(1):39-49; Aoi T等, *Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. Science*. 2008 Feb. 14. (Epub ahead of print); 111 Park, Zhao R, West J A等 *Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature* 2008; 451:141-146; K Takahashi, Tanabe K, Ohnuki M等 *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell* 2007; 131:861-872。如果将受体细胞停滞在有丝分裂中,则可以通过核转移到卵母细胞、与胚胎干细胞融合或核转移到合子中来生成其他胚胎样干细胞。

[0147] 应当理解,如下文所定义的胚胎干细胞(例如hES细胞)、胚胎样干细胞(例如iPS细胞)和pPS细胞都可以根据本公开的方法使用。具体地,将理解,hESC源的3D视网膜类器官/视网膜组织可以源自任何类型的多能细胞。

[0148] 在用于获得3-D视网膜类器官的示例性方法中,在noggin蛋白存在下(例如,终浓度50和500ng/ml之间的终浓度)将多能细胞(例如,hESC、iPS细胞)培养3至30天。然后将碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)与noggin蛋白一起添加至培养物中(例如,终浓度为5-50ng/ml),并继续培养另外的0.5-15天。那时,将形态发生素Dickkopf相关蛋白1(Dkk-1)和胰岛素样生长因子1(IGF-1)(各自浓度例如为5-50ng/ml)添加至培养物中,连同已经存在的noggin和bFGF,并且继续培养1至30天的另外的时间。此时,从培养物除去Dkk-1和IGF-1,并将成纤维细胞生长因子-9(FGF-9)与noggin和bFGF一起加入培养物中(例如,5-10ng/ml)。在noggin、bFGF和FGF-9存在下继续培养直到形成视网膜组织;例如1-52周。可以在2017年10月12日公布的国际专利申请公开号WO 2017/176810中找到用于得到3-D视网膜类器官/组织的方法的其他实例,其全部内容通过引用合并于此。

[0149] 在一些实施方式中,类器官(hPSC源的视网膜组织)可在施用前离解。类器官可以

在发育或培养的大约1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周时离解。在一些实施方式中,类器官可以在发育或培养10周后离解。可以通过悬浮在溶液中,或用例如玻璃棒、筛子、刀片、亲水性或疏水性表面机械地,或以任何其他合适的方式将类器官离解成它们的组成细胞类型。根据某些实施方式,通过用木瓜蛋白酶使hESC-3D视网膜组织离解从hESC-3D视网膜组织配制细胞组合物。

[0150] 本文所述的类器官或者发育或分化的类器官也可以在非粘附条件下或者粘附和非粘附组合的条件下培养和/或产生。在一些实施方式中,可将类器官或发育的类器官培养在基质上,操作,和然后在非粘附条件下培养。在一些实施方式中,可将类器官在基质上培养,操作,和然后在粘附条件下培养。在一些实施方式中,可将类器官在非粘附条件下培养,操作,和然后在粘附条件下培养。在一些实施方式中,可将类器官在非粘附条件下培养,操作,和然后在非粘附条件下培养。

[0151] 在某些实施方式中,生物假体视网膜移植物包含hPSC源的类器官,其尺寸在约0.5mm×0.5mm至约2mm×2mm之间。在其他实施方式中,生物假体视网膜移植物包含hPSC源的类器官,其直径在约0.5mm至约2mm之间。

[0152] 在某些实施方式中,可以使用提供在人眼细胞疗法试验中测试的干细胞的可补充来源的cGMP级hPSC的专有细胞系。

[0153] 在一些实施方式中,可以将适于治疗用途的细胞组合物配制成包含cGMP级人视网膜祖细胞的冷冻保存的原液的细胞治疗产品,其能够向退化的视网膜细胞传送营养支持。此外,来自盘中获得的类器官的视网膜组织与人类胎儿视网膜非常相似,如图3A-图3C中所示,其具有几乎相同百分比的感光细胞(图3C),并且是原代人类视网膜祖细胞的极好且可补充的来源。图3A显示了hPSC来源的视网膜组织的图像,其被对于在神经元(包括视网膜)中表达的钙网膜蛋白标志物CALB2特异性的抗体染色。图3B显示了hPSC源的视网膜组织的图像,其用对视网膜细胞质标志物Recoverin (RCVRN) 特异性的抗体染色。

[0154] 一个方面,可移植的生物视网膜假体装置包含人多能干细胞来源的组织(hPSC-3D视网膜组织或hPSC源的视网膜组织或类器官),人胚胎干细胞(hESC)和/或组织,和/或人胎儿视网膜组织或成体视网膜组织以及生物相容性载体或支架以形成生物假体视网膜补片。

[0155] 在一些方面,生物材料载体或支架或者基质或者递送媒介可以是诸如薄片、乳液、网状物、浆液或溶液的结构。在一些方面,生物材料载体可以电纺、印刷、沉积、涂覆、冻干或交联。生物材料载体或支架或者基质可包含多种结构或特性,例如纤维、脊、微针和/或其他结构特征。生物材料载体可以由生物相容性材料组成,例如聚磷腈、聚酸酐、聚缩醛、聚原酸酯、聚磷酸酯、聚己内酯、聚氨酯、多肽、聚碳酸酯、聚酰胺、多糖、聚氨基酸、其他聚合物、蛋白质、金属或陶瓷。在一些方面,生物材料载体可以全部或部分地由透明质烷基的水凝胶(例如,HYSTEM®水凝胶,BioTime, Inc.)的衍生组成。在一些实施方式中,生物材料载体或支架可以包含上述特性和材料的组合。在一些实施方式中,载体或支架可以包含热可逆材料和/或形状记忆金属。支架(和生物假体视网膜补片)可以是适合于递送hPSC组织和/或细胞和/或其他成分(例如,外泌体或营养因子)的任何形状。

[0156] 生物支架或支持物可包含例如电纺聚合物。在一个实施方式中,电纺聚合物支架与布氏膜(Brunch's membrane)共有的特征。在一些方面,生物材料的电纺丝纳米纤维包含HYSTEM®水凝胶(BioTime, Inc.)的衍生物。

[0157] 在一些实施方式中,可以使用具有复合物、易碎细胞和大分子的成功递送和/或原位固定所需的所有特征的生物材料载体或支架。

[0158] 最近,已经开发出了一系列模拟天然细胞外基质环境(ECM)的基于透明质烷的水凝胶(商品名HYSTEM<sup>®</sup>和RENEVIA<sup>®</sup>),它们,其用于3D细胞培养、干细胞繁殖和分化、组织工程化、再生医学以及基于细胞的治疗的应用。HYSTEM水凝胶设计为重演获得功能性细胞外基质所需的最低组合物。水凝胶的单个组分可原位交联,并且可以在体内注射之前用细胞接种,而不会损害细胞或受体组织。

[0159] HYSTEM<sup>®</sup>水凝胶基础的技术是基于独特的硫醇交联策略以从硫醇修饰的透明质烷和其他ECM成分制备透明质烷基的水凝胶。在此平台的基础上,开发了一系列独特的、生物相容性可吸收的水凝胶。HYSTEM<sup>®</sup>水凝胶的结构单元是透明质烷和明胶,它们各自通过碳二亚胺介导的酰肼化学方法进行硫醇修饰。通过使这些硫醇化的大分子的混合物用聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)交联来形成水凝胶(参见美国专利号7,928,069和7,981,871,其全部内容通过引用并入本文)。可以通过改变交联剂的量来控制胶凝速率和水凝胶刚度。这些水凝胶的一个特性是其大水分含量,>98%,导致对氧气、营养物质和其他水溶性代谢产物的高渗透性。

[0160] 已显示水凝胶,例如HYSTEM<sup>®</sup>,支持2-D和3-D培养中广泛的细胞类型和组织的附着和增殖,并且在体内植入时在动物研究中表现出高度的生物相容性。这些水凝胶很容易在体外降解,并通过胶原酶和透明质酸酶水解而在体内吸收。当植入这些水凝胶中时,细胞保持附着并定位在水凝胶中,并缓慢降解植入的基质,从而用其天然ECM取代。

[0161] 交联剂可包含,例如,对硫醇具有反应性的双功能、三功能、多功能性分子(例如,马来酰亚胺基),引发交联的氧化剂(例如GSSG),戊二醛类和环境影响(例如,热量、 $\gamma$ /电子束辐射)。在一些实施方式中,不需要存在交联剂。

[0162] 尽管描述了与本公开的实施方式一起使用的适用于提供可吸收基质的水凝胶的具体实例,但是应理解,可以使用任何合适的生物相容性基质。例如,可以使用利用氧化型谷胱甘肽(GSSG)作为交联剂制备的凝胶(参见,美国专利申请公开号US 20140341842,其通过引用整体并入本文)。

[0163] 载体或支架可以由去细胞的组织(例如,视网膜组织)组成。去细胞的组织可以是完整的、破坏的或操纵的,或者可以是成熟的组织。生物假体视网膜植入物可以全部或部分地由人胚胎样视网膜的块或胎儿视网膜组织或成体视网膜组织组成。可能由类器官细胞或其他组成,或可能由生物材料组成。或这些的组合。

[0164] 因为本文所述的细胞、组织和生物相容性载体、基质和支架的组合物引起所施用组织的增殖,所以处理结果可以持续很长时间,例如,如大于18个月。在一些实施方式中,载体或支架对营养物质、营养因子和氧气是可渗透的。

[0165] 在一些实施方式中,生物假体载体或支架可以兼作细胞培养和递送基质。

[0166] 在一些实施方式中,生物假体视网膜补片具有的尺寸包含在约0.5mm $\times$ 1mm $\times$ 1 $\mu$ m和8mm $\times$ 12mm $\times$ 100 $\mu$ m之间的长度 $\times$ 宽度 $\times$ 厚度。在一些实施方式中,生物假体视网膜补片包含约2mm $\times$ 4mm $\times$ 50 $\mu$ m的长度 $\times$ 宽度 $\times$ 厚度。在其他实施方式中,生物假体视网膜补片包含约4mm $\times$ 6mm $\times$ 10 $\mu$ m的长度 $\times$ 宽度 $\times$ 厚度。在一些实施方式中,生物假体视网膜补片的面

积包含约3mm×6mm、约4mm×6mm、约4mm×5mm。

[0167] 在一些实施方式中,可以在植入之后使用任何合适的材料来锚定生物假体视网膜移植物或补片。

[0168] 一个方面,视网膜组织和生物相容性支架通过生物相容性粘合剂接合在一起。

[0169] 在另一方面,细胞疗法根据包含将类器官块嵌入生物相容性支架中的方法配制,其中该生物相容性支架最初被配制成液体形式和然后形成凝胶,并且其中在完全固化之前,类器官块放置在液体支架中,以使得当支架胶凝时,类器官块变得嵌入凝胶中。在一个实施方式中,移植物可以在支架完全胶凝化之前施用。在另一个实施方式中,移植物可以在生物材料的悬浮液中施用或者与生物材料或生物相容性粘合剂或其组合联合施用。

[0170] 在一些实施方式中,可以使用天然蛋白质或小分子交联剂(例如,整联蛋白或纤连蛋白)将类器官交联至生物相容性支架。在一些方面,将几块视网膜组织固定或粘附到大的生物材料支架上以产生大的视网膜植入物或生物视网膜假体装置。

[0171] 在一些实施方式中,类器官可以被修饰以增加它们对载体、基质或受体组织的粘附。

[0172] 在一些方面,如图1C所示,几块视网膜组织被固定或粘附到生物材料的薄膜上以产生植入物或生物视网膜假体装置。在一些方面,生物材料的薄膜可包含生物成分,例如RPE层、RPE薄片、RPE细胞、祖细胞或除构成类器官的那些细胞类型以外的细胞类型,如图1D所示。

[0173] 在一些方面,类器官或生物组分可以培养或粘附到酶促溶解的不可生物降解的载体或支架上,并且视网膜组织和/或其他生物组分附着于可生物降解的载体或支架上并被植入。

[0174] 在某些实施方式中,视网膜组织和生物支架可被描述为植入物。在某些实施方式中,视网膜组织和生物相容性载体或支架可以描述为医疗装置或生物视网膜假体装置。

[0175] 在一些方面,可以将各自携带约1,000至2,000或2,000至3,000,或1,000至5,000、3,000至10,000或5,000至100,000,或50,000至500,000或100,000至1,000,000个感光细胞的多个三维(3D)视网膜组织块安装在薄的或超薄的柔性生物材料上以捕获并通过突触方式(或通过其他方式)将视觉信息传输到受试者的RGC,其然后传导到受试者的视觉皮层。整个植入的组织块可产生补片或生物视网膜假体装置,具有大约1,000至2,000或2,000至3,000,或1,000至5,000、3,000至10,000或5,000至100,000或者50,000至500,000或100,000至1,000,000个或更多的个体光感受器,即感光细胞,其能够产生宽视角(取决于生物视网膜补片的尺寸,最大可达30°)以支持有用的功能性视觉。相比之下,Argus II神经修复装置只有60个传感器,其在准确地定位在视网膜下间隙中时允许接受者辨别物体的形状。

[0176] 在一些实施方式中,类器官可以与合成材料、传感器、芯片或电子器件结合。在一个实施方式中,描述了生物假体视网膜补片,其包含hPSC源的视网膜组织和膜或生物支架或基质,其中包含具有光敏二极管(光电二极管)的生物相容性材料以形成光敏组件或层。使用本文所述的任何材料和方法,hPSC源的视网膜组织或类器官与光敏层结合或粘附至光敏层。图1E显示了具有光电二极管的生物假体支架的图示。该光电二极管层可以通过宿主剩余的功能性光感受器和补片的视网膜组织成分增强对光的响应(捕获光、将光转换为电信号并传输信号),尤其是在视网膜移植物组织仍在发育或分化的区域中。

[0177] 在其他实施方式中,将包含多个hESC-3D视网膜组织和生物相容性支架的大移植植物植入到受试者的视网膜下间隙中,导致无肿瘤突触整合。在一些实施方式中,生物相容性支架是多孔的以允许更容易的突触连接和细胞与细胞层之间的分子转移。

[0178] 这种技术的治疗靶标是与PR死亡和失明相关的人类RD病症,例如但不限于,色素性视网膜炎(RP)和年龄相关性黄斑变性(AMD)。也可以从视网膜类器官获得仅锥形的hPSC-3D视网膜组织用于治疗障碍和疾病,例如AMD。仿生芯片(例如,SecondSight、ARGUS<sup>®</sup> II,60像素)以相似的方式工作,尽管由于电子器件的局限性和移植电子芯片的短暂寿命,生物设计的性能可能优于电子设计。生物视网膜补片与宿主的组织整合在一起,每片单片视网膜类器官带来数千个PR(即像素),并且可以定制(构造)以治疗单个疾病。

[0179] 在某些实施方式中,可以通过任何可接受的方法进行眼移植,包括例如在国际专利公开号W02016/108219中描述的方法,该文献通过引用整体并入本文。

[0180] 在其他实施方式中,可以根据制造商的说明,通过机械动力递送装置,例如具有Micro4 Controller的UMP3 UltraMicroPump III(World Precision Instruments)或其变体,进行眼移植。

[0181] 在某些实施例中,递送装置可包含套管。该套管可具有约0.5mm至约2.5mm或约1mm至约2mm之间或约1.12mm的内径。套管还可具有约0.5mm至约3mm、或约1mm至约2.5mm或约1.25mm至约1.5mm之间或约1.52mm的外径。

[0182] 在某些实施方式中,可以使用套管将生物假体视网膜移植物或补片递送至受试者的眼部空间,由此在生物假体视网膜移植物或斑片之前和/或之后将气泡引入套管中,如图1G所示,以防止生物假体视网膜移植物或补片在其就位之前离开套管。在某些实施方式中,可以在生物假体视网膜移植物或补片植入的同时将眼内压施加到受试者的眼睛,以在植入后帮助将生物假体视网膜移植物或补片保持在适当的位置。在另一个实施方式中,可以将肾上腺素注射到玻璃体腔中以抑制由于使用需要切口的手术例如视网膜切开术来施用生物假体视网膜移植物或斑片而可能发生的出血。

[0183] 在某些实施方式中,外科手术程序可包括但不限于玻璃体切除术、松弛玻璃体切除术、松弛视网膜切开术、视网膜钉的使用、视网膜脱离和黄斑移位。临床中已使用松弛性视网膜切开术,其允许将大块的患者视网膜剥离和然后再附着。这些手术技术可以重新用于将大的生物假体视网膜放置到受试者的视网膜下间隙中,从而使受试者眼睛的大区域能够恢复视觉感知。在某些实施方式中,可以使用粘合剂、钉书钉或适合于辅助本文所述的生物假体视网膜移植物和补片的施用或固定和/或手术伤口的愈合的任何其他材料。

[0184] 在某些方面,生物假体移植物或斑片可以被卷起或以其他方式压缩以适配到较小的切口(约3mm或更小)中。然后,移植物或补片可原位展开或扩展回其原始形状,如图1F所示。在一些实施方式中,移植物或补片一旦被植入受试者的眼睛内,就可以恢复到其原始形状而无需进一步的手术干预或操作。在一些实施方式中,移植物或补片可以在植入后约2至15秒内在没有进一步操作的情况下自行恢复至其原始形状。在某些实施方式中,可以在将移植物或补片递送到受试者的眼睛中之前预加载和/或存储在递送装置中一段时间。

[0185] 在某些实施方式中,例如,可以将数个生物假体视网膜移植物或补片加载到包含诸如导管的递送部件的递送装置中,并一个接一个地施用到眼部空间中以覆盖大的区域。

[0186] 本公开的方面为患者提供了有力的视力恢复疗法,尤其是视网膜太过受损以致不

能仅通过神经保护来维持的那些患者,其中单个感光细胞可以持久地突触连线到接受者的神经节细胞和/或其他视网膜或支持细胞上,和在移植后的12个月内产生大视角的视力恢复或改善。由于单个传感器(感光细胞)突触连线到受试者的RGCS上,因此这种视觉恢复方法是高效且永久的。相比之下,视网膜下植入的合成神经假体装置在视网膜损伤中逐渐失去与RGCS的接触,其中视网膜仍保持大体上完整,但在例如冲击伤或退行性疾病之后容易发生逐渐不可逆的变性。

[0187] 如本文所用,术语“突触活性”或“突触地”是指作为两个神经元之间的突触形成的特征的任何活性或现象。

[0188] 可以测量本文所述的生物假体移植物的治疗效果的评估和用于制备生物假体移植物的方法,例如,通过(例如,在冲击损伤后的选定时间点)视觉诱发电位(VPE)的增加,评估到达大脑的视觉信号强度的可靠方法。也可以使用视网膜电图描记术、多焦点ERG、多电极阵列(MEA)和/或RetiMap方法。

[0189] 在一些实施方式中,使用评估移植物(hPSC-3D视网膜组织和/或细胞等)和/或生物假体视网膜补片(hPSC-3D视网膜组织和/或细胞等以及生物相容性载体或支架)与接受者视网膜之间的突触连接性的先进方法,例如,提供了遗传跨突触示踪剂、WGA-HRP(由移植物而非接受者视网膜表达)、WGA-Cre、人SYP、SC121抗体或免疫电子显微镜以证明嵌合的(移植物:接受者)突触连接性。这种示踪不仅改善移植物/宿主连接的定位,而且还可以将细胞融合和神经保护与特定的突触整合区分开。

[0190] 在一些实施方式中,具有眼冲击损伤的大眼动物模型,例如Pde6a<sup>-/-</sup>狗、Aipl<sup>-/-</sup>猫、Cngb3-突变型狗和Crx-突变[+/-]猫、Aipl-1突变型猫或兔可用于证明hPSC-3D视网膜组织或hPSC-3D生物假体视网膜植入物/移植物的功效,其中每一个具有与患有遗传性视网膜变性病症、视网膜疾病或受伤的人类受试者相似的PR变性、视网膜变性和/或视神经变性。

[0191] 在一些实施方式中,可以使用体内读出方法来评估将hPSC-3D视网膜组织移植到受试者的视网膜下间隙中后的视力恢复的程度,包括但不限于全视野ERG、多焦点ERG微电极阵列(MEA)、瞳孔成像和视觉诱发电位(VEP)以及行为测试。

[0192] 在一些实施方式中,hPSC-3D视网膜组织的视网膜下移植物(视网膜类器官;生物假体视网膜植入物/补片)可以充当神经修复装置的生物类似物,其可以捕获视觉信息并将其突触地传递到视网膜神经节细胞和然后传递到视觉皮层。在另一个实施方式中,植入物支持受试者中视觉感知(光探测)的恢复。

[0193] 而在其他实施方式中,带有PR层和二级神经元的hPSC源的视网膜类器官生物假体植入物/补片或生物视网膜假体装置提供了可以将视觉信息突触传递至受试者的的光传感器,RGC甚至在所有PR变性的情况下保持。与电假体芯片不同,基于hPSC源的视网膜类器官的“生物假体”植入物可以实现持久的突触整合,并且可以进行调节以携带比视杆更多的视锥以修复和重建黄斑。在一些实施方式中,使用视网膜下移植的hPSC-3D视网膜组织在大多数受试者中可以看到光敏感性的长期恢复。

[0194] 在一些实施方式中,hPSC-3D视网膜组织移植物的突触连接性和功能整合到受试者的视网膜回路中可以使用预嵌入免疫EM、视网膜电图记录和多电极阵列记录来证明。

[0195] 在一些实施方式中,移植的hESC-3D视网膜组织在视网膜下间隙中的无肿瘤存活

发生至少约6至24个月,伴随PR和RPE层的分层和发育,包括延长的PR外部节段、突触发生、电生理活性和与接受者视网膜细胞的连接性,并发育成更成熟的视网膜免疫表型。在一些实施方式中,hESC-3D视网膜组织移植部分地由于逐渐成熟和突触整合而在移植后约5至10个月内改善受试者的视觉感知。在一些实施方式中,证明了在移植物和宿主之间的细胞质融合以及在移植物和宿主之间的特异性突触连接性。

[0196] 胎儿视网膜移植到视力受损患者的视网膜下间隙中已显示出在10例患者中的7例改善了视力。尽管可以合理地认为胎儿视网膜移植通过神经保护机制对患者退化的视网膜产生了积极影响,但也有证据表明移植物与受体视网膜之间建立了特异性的突触连接。在RD大鼠和RD患者两者中,发现人胎儿视网膜移植改善视觉反应(大鼠上丘神经激活,患者视力提高[ClinicalTrials.gov##NCT00345917,NCT00346060])。

[0197] 类似地,本公开的hPSC-3D视网膜组织已显示能够在无功能性PR的盲RD大鼠中诱发发光诱发的上丘反应,表明移植物中的PR将视觉信息传递到大脑。此外,有证据表明hPSC-3D视网膜类器官形成视网膜下移植物中PR的内节/外节和纤毛,即使此类移植物不保持连续的层状结构。hPSC-3D视网膜组织与人类胎儿视网膜非常相似,在发育约6至8周后表现出稳健的突触形成和电活动,并包含对花生凝集素(PNA)为免疫阳性的基本内节样突起,这共同表明一旦该组织被视网膜下移植,其准备进一步发育、成熟和突触整合。因此,本文提供了在免疫抑制的野生型猫的视网膜下间隙中移植的hPSC-3D视网膜组织中移植物/宿主连接性的证据。综上所述,这些数据表明,hPSC源的3-D组织和生物假体移植物至少在接受移植物的区域中可以恢复视网膜感光性。

[0198] 这种方法的一个优点是能够得到携带其自身的RPE层的人胎儿样视网膜组织。该RPE层可以帮助移植后hPSC-3D视网膜组织的存活。竞争技术可以从hPSC培养物产生神经视网膜层而非RPE。神经视网膜和RPE共同发育,相互诱导以促进发育中的结构和功能成熟,并且彼此依赖以执行视觉功能。移植没有RPE层的hPSC源的神经视网膜可以剥夺发育的PR的来自RPE的旁分泌和结构支持。受体视网膜的RPE层和移植物的PR之间的视网膜下间隙可能存在缺口。RPE的微绒毛和发育的PR之间缺乏物理相互作用可能干扰顶点RPE诱导PR外节延长的能力。可选地,通过本文描述的方法获得的hPSC-3D视网膜组织不依赖于与接受者RPE的紧密接近,并且在视网膜下移植物中具有高级的存活和分化(作为独立的补片)。这随之增加了hESC-3D视网膜组织补片恢复视觉功能的能力。有证据表明,一起移植的视网膜+RPE导致RD患者中更好的视力改善。但是,这些先导性试验使用人类胎儿视网膜组织,其由于伦理上的限制和组织的可获得性而不能用于常规治疗。人ES细胞为视网膜组织的获得提供了无限的细胞来源。因此,本公开的hPSC-3D视网膜组织移植克服了治疗视网膜退行性疾病和损伤的两个主要障碍:人类胎儿视网膜的可获得性和伦理限制。

[0199] 为了使具有退化的PR的视网膜能够恢复光感知,需要一组新的“传感器”,其能够电连接到受试者的剩余视网膜以实现电信号的传输。人ESC源的视网膜组织(视网膜类器官,尺寸0.3-0.5mm长)与人类胎儿视网膜相似(在组织学上,并基于标志物表达),并且当作为基质附着的聚集体生长时,在体外发育的第6-8周之间发育RPE、PR、二级视网膜神经元和RGC层。当以基质附着的聚集体生长时,hPSC-3D视网膜组织在发育6-8周时形成轴突(特别是RGC特异的长轴突)和多个突触结。同样,这一hPSC-3D视网膜组织可以在体外发育的第8周和第12周之间逐渐变为电活性的。移植到视网膜下间隙中的视网膜类器官块可以带来足

够数量的PR以使盲动物能够恢复光感知。

[0200] 神经营养因子是一组多种多样的可溶性蛋白(神经营养蛋白)和神经生成细胞因子,它们支持神经元的生长、存活和功能。它们在视网膜组织中可以激活神经元中的多种途径、改善神经变性、保持突触连接和抑制细胞死亡。如果神经保护以小分子、神经保护蛋白如脑源性神经营养因子(BDNF)或细胞的形式提供,并且有效地和足够早地递送以抑制细胞死亡和/或视网膜重塑和瘢痕形成的起始,则急性损伤的视网膜将存活。但是,如果不进行治疗而使退化持续进行,则由于感光细胞、RGC和其他视网膜神经元的丧失以及视网膜重塑和瘢痕形成,可以预期进行性的视力丧失。

[0201] 视网膜是非常精细的神经组织的薄层,其接受光刺激并将其转换为电脉冲,通过视神经传递到大脑(外侧膝状核),且最后传递到视觉皮层。视神经起源于视网膜,且由视网膜神经节细胞(RGC)的轴突形成,其是在视网膜组织中发现的七种细胞类型之一。当眼球最初受到冲击力压迫和然后反弹到正常形状但过冲并拉伸超出其正常形状时,造成挫伤损伤。因此,非穿透性眼球损伤在战场上很常见,并可能导致视网膜创伤,例如视网膜脱离、视神经损伤、视网膜重塑、轴突脱传入(神经细胞的传入连接破坏),这通常导致减缓(长达数月)细胞死亡和进行性视力丧失,即使最初可以保持视网膜结构。

[0202] 在一些实施方式中,hESC源的视网膜组织移植物能够在植入后递送神经营养因子和/或有丝分裂原。在一些实施方式中,包含hESC源的视网膜组织的解离细胞的hESC源的视网膜移植物或补片也能够在植入后递送神经营养因子和/或有丝分裂原。在一些实施方式中,hESC源的视网膜组织和/或细胞能够在植入后将神经营养性外泌体递送给受试者。其中本文所述的移植物能够向受试者递送的神经营养因子和有丝分裂原包括但不限于,脑源性神经营养因子(BDNF)、神经胶质源性神经营养因子(GDNF)、神经营养蛋白-34(NT34)、神经营养蛋白4/5、神经生长因子- $\beta$ (BNGF)、proNGF、PEDF、CNTF、促生存的有丝分裂原碱性成纤维细胞生长因子(bFGF=FGF-2)和WNT家族的促生存成员。

[0203] 当前针对由创伤或冲击超压损伤造成的眼损伤的军事护理标准是采用伯明翰眼创伤术语系统(Birmingham Eye Trauma Terminology System,BETTS)和眼创伤分类组(Ocular Trauma Classification Group)来确定适当的治疗(见图2)。冲击损伤通常归因于以下四种机制:初级冲击(超压脉冲);次级效应,例如由冲击力吹动弹片引起的穿透性伤口;三级损伤,例如由于将个人强行扔向刚性结构而造成的;以及四级损伤,由诸如毒烟、化学灼伤或甚至长期的心理影响的附属过程引起的(Morley等,2010)。闭合性眼球损伤可细分为多个区,各自具有独特的损伤模式:I区包含结膜和角膜表面;II区包含前房、晶状体和睫状冠。III区包含视网膜和视神经。在图3中示出了各个区域。

[0204] 有一些经过检验的指导原则,其可以控制视网膜/视神经对高压冲击损伤的反应。如果对III区的初级损害是视网膜脱离,则这将在受伤后数天至数周内引发感光层的快速凋亡,继而引起内核层(INL)变性、视网膜重塑、视觉失真和视力丧失。但是,只要在RGC神经纤维(形成视神经)和视觉皮层神经元之间保持轴突连通性,视网膜神经节细胞(RGC)层在损伤后存活数月至数年。

[0205] RGC的存活力取决于它们与视觉皮层神经元的连接性,且在RGC与视觉皮层神经元之间的这些传入携带支持性(营养性)因子。冲击暴露可导致脱传入,并因此破坏营养因子的流动,从而导致逐渐但稳定的视力丧失。营养支持的恢复(甚至部分恢复)导致RGC的保

存。一起施用的几种营养因子可以在轴突切开后产生针对RGC凋亡的有效神经保护防御。因此,在受伤后数天至数周内进行治疗对于连接性丧失后保留RGC是有帮助的。

[0206] 感光细胞的存活力可能部分地依赖于营养支持,例如,来自视网膜色素上皮(RPE),以及与内核层(INL)神经元的突触接触。感光细胞存活力和功能依赖于RPE-感光细胞的连接性。冲击损伤后的视网膜脱离导致感光细胞外节的变性。其中感光细胞功能在重新附接后可以恢复光感受器的时间范围通常在受伤后的几天到几周内。如本文中所示,将营养支撑恢复至感光细胞(甚至部分)导致了感光细胞的长期保持。

[0207] 有效治疗与眼部冲击性损伤相关的视力问题需要了解对视觉系统的冲击性损伤引起的损伤的神经病理学。虽然最初的损害可能不是即时显现,但冲击压力波导致细胞伸长和/或分裂,并沿波传播方向引起轴突剪切,从而导致视网膜和视神经的缓慢变性。战斗损伤的多创伤性质常常导致相互矛盾的护理优先项。尽管战场上的主要关注事项是失血和复苏,但在稳定后,注意力会转向确保所有损伤的最佳可能的结果。眼科护理的开始通常在损伤后数小时至数天发生。该治疗窗口很好地落在认为能够为闭合性眼球损伤提供有效的治疗选择的时间线内。保持视觉功能所需的原始视网膜神经结构和防止冲击损伤后的视网膜变性(通过神经保护)是缓解失明的可行治疗机制。

[0208] 因此,在一个实施方式中,获得了由适于治疗用途的hPSC-3D视网膜组织(hESC-3D视网膜类器官)配制的细胞组合物,并将其移植到受试者的眼部空间中,其中所述细胞能够分泌神经营养因子、有丝分裂原和/或细胞外组分,例如外泌体。在一些实施方式中,细胞组合物在适当的治疗窗口中连续递送(通过分泌或其他机制)营养因子。根据一些实施方式,细胞组合物同时递送(通过分泌或其他机制)几种营养因子有丝分裂原和/或细胞外组分(例如,外泌体)的组合。在另一个实施方式中,将营养因子有丝分裂原和/或细胞外组分,例如由移植到眼部空间(例如,视网膜下或视网膜前)中的生物假体视网膜移植物或补片产生的外泌体,可以提供针对视网膜细胞死亡的有效神经保护防御。治疗靶标可以包括受试者视网膜的一些或所有细胞类型(例如,感光细胞、RPE、二级神经元、RGC/视神经)。

[0209] 在一些实施方式中,通过移植包含RPE细胞、视网膜神经节细胞(RGC)、二级视网膜神经元(对应于成熟视网膜的内核层)和感光细胞(PR)的细胞组合物来增强治疗效果。通过来自移植细胞的神经保护的组合可以增强治疗效果。在其他实施方式中,可以对不同的细胞类型进行分选和分离,以产生更高浓度的特定细胞类型和从而产生更高浓度的特定营养因子,从而治疗特定的疾病、损伤或状况。

[0210] 本文所述的源自干细胞的移植物可以为退化的视网膜神经元提供持久的营养支持,且因此是眼部冲击性损伤的广泛适用的治疗方式。视网膜细胞移植物可以缓解对III区(视网膜-视神经-视觉皮层)的持续的冲击损伤后的视力丧失。

[0211] 在一个实施方式中,将干细胞来源的人视网膜祖细胞组合物的移植物配制为在被CIS 2-3冲击性损伤损害的兔神经视网膜和视神经上施加强大的神经保护支持,其可减轻视神经损伤。一些移植的神经元的功能整合可能进一步保护视网膜免于变性和积极地造成视力保持。

[0212] 在其他实施方式中,细胞组合物或干细胞来源的移植物可以为退化的视网膜神经元提供持久的营养支持,并因此提供可行且广泛适用的治疗干预以减轻由眼部冲击损伤引起的视力丧失。本文所述的细胞治疗组合物能够积极地影响感光细胞和视网膜神经节细胞

(RGC)的保持。

[0213] 根据某些实施方式,本文所述的治疗性细胞组合物提供了神经营养因子的混合物到受损的视网膜组织中的有效的、受控的和连续的旁分泌递送。本文所述的治疗性细胞组合物在视网膜基本上保持完整,但由于高度有序的组织结构的破坏而在冲击损伤后易于逐渐发生不可逆的变性的视网膜损伤中特别有效。

[0214] 图5B至图5D表明,从人类胚胎干细胞(hESC)分化的人类视网膜祖细胞的视网膜下移植物可以成功移植到大型眼动物模型(兔)的眼部空间中,可以将成年哺乳动物视网膜中的视网膜层厚度保持多达3个月,对受体视网膜无有害影响,且不引起肿瘤发生。来自这些移植物的细胞迁移并整合到受体视网膜层中,从而增强了受体视网膜。此类细胞与RGC和INL中的受体视网膜细胞混在一起,并可以对其周围的宿主细胞施加旁分泌支持。图4A示出了移植到小鼠模型的视网膜前间隙中的hESC来源的视网膜祖细胞(hESC-RPC)的视网膜整合和成熟的ICH图像。如所示的,大多数人类祖细胞对早期神经元标志物Tu j1呈阴性,并且可以看到其迁移并整合到宿主的视网膜神经节细胞(RGC)层或内核层(INL)中。图4B示出了在宿主的视网膜下区域的大面积上迁移的植入hESC源的视网膜祖细胞的ICH图像。图4C显示了来自植入的视网膜前hESC-RPC的细胞整合到宿主的视网膜神经节细胞(RGC)层、内网层和内核层(INL)中的ICH图像。沉积到视网膜下和视网膜前间隙中的细胞可以向外迁移到宿主视网膜中,而在RGC层顶部的视网膜下间隙或视网膜前间隙中不留任何凸起。

[0215] 在本公开的一个实施方式中,与对照视网膜的细胞存活力相比,移植的细胞对受冲击损伤影响的视网膜的神经保护使细胞存活力和/或细胞存活率提高了约10%至约250%。

[0216] 本文所述的细胞组合物适合于在因闭合的眼球伤口或疾病引起的视网膜脱离和视神经损伤后维持视网膜、视神经和视觉皮质的存活力和视觉功能的治疗用途。由于该技术不需要自体供体细胞来源,因此治疗细胞可以在需要治疗眼外伤、疾病和视力丧失时提供。

[0217] 在一些实施方式中,在移植3-6个月后,80%的受试者具有在视网膜下/视网膜前间隙中存活的视网膜细胞。在另一个实施方式中,通过OCT发现80%的具有视网膜移植物的受试者(总受试者的总共约64%) 在眼部移植生物假体视网膜移植物或补片后1个月、2个月、3个月、4个月、5个月或6个月具有改善的VEP和ERG结果,其至少部分是由于来自视网膜祖细胞的神经保护。

[0218] 在一个实施方式中,受试者中视网膜厚度的保持在移植后约1至约6个月之间发生。在另一个实施方式中,受试者在移植物处或移植物附近具有降低的细胞死亡,如通过例如,切割的半胱天冬酶-3、 $\gamma$  H2AX(早期凋亡标志物)和Tunnel染色(晚期标志物)评估的。

[0219] 在又一个实施方式中,至少约64%的受试者中视网膜厚度的保持(作为视网膜变性的关键读数)在移植后约1至约6个月之间发生,并且减少细胞的死亡,如通过例如切割的半胱天冬酶-3、 $\gamma$  H2AX(早期凋亡标志物)和Tunnel染色(晚期标志物)所评估的。

[0220] 视网膜下移植物可以对感光细胞和外网(突触)层提供神经保护,而视网膜前移植物可以对RGC/视神经、二级视网膜神经元和内网(突触)层提供神经保护。

[0221] 在一个实施方式中,受试者在生物假体移植物的移植后约6个月呈现约1%至约15%的视网膜厚度保持。

[0222] 在某些实施方式中,治疗性细胞组合物在有或没有免疫抑制的情况下施用。

[0223] 视网膜是复杂的结构,且细胞和突触网络的保持有助于维持视力。恢复视网膜的原始神经结构有助于缓解如色素性视网膜炎和AMD的疾病。

[0224] 实施例

[0225] 以下实施例无意限制发明人认为是其发明的范围,也无意表示以下实验是全部或唯一进行的实验。

[0226] 实施例1

[0227] 在具有眼冲击暴露和视网膜损伤的兔中证明视觉感知的恢复和改善。仅包含hESC-3D视网膜组织的视网膜下移植物(不含生物材料/支架)用于治疗兔的受损视网膜组织。处死后,使用活体动物中的光学相干断层扫描(OCT)以及组织学和免疫组织化学来证明组织和视觉的结构恢复。在活体动物中使用视觉诱发电位(VEP)证实功能恢复。

[0228] 人类视网膜组织使用临床级的hPSC(BIOTIME, INC.)产生。在兔中进行试验性移植实验以在大型眼动物模型中确定视网膜下移植过程。使用激波管在兔中产生眼部冲击损伤模型。然后将多块hESC-3D视网膜组织(长度在约0.1到约1mm之间)移植到每只动物的视网膜下间隙中。

[0229] 眼部冲击损伤模型可以包括被描述于,例如,Sub-lethal Ocular Trauma(SLOT): Establishing a standardized blast threshold to facilitate diagnostic, early treatment, and recovery studies for blast injuries to the eye and optic nerve。最终报告,准备用于:U.S.Army Medical Research and Material Command.Award Number:W81XWH-12-2-0055,2015中的那些。

[0230] 通过OCT评估视网膜组织的结构整合,并通过在术后1、2、3、4、5和6个月测量VEP评估功能整合/视觉感知的改善。每只动物的两只眼睛用于视网膜组织的移植,并且通过覆盖相对的眼睛来独立评估每只眼睛的VEP。

[0231] 可以使用以下对照:对照,一只眼(未治疗),对照2,相对的眼(假治疗,即仅用生物材料移植,没有类器官)。

[0232] 植入的hESC-3D视网膜组织移植物可在兔的RGC和/或二级视网膜神经元上发生突触,这可使动物能够在术后约4至6个月恢复视觉(以VEP信号测量)。在盲大鼠动物模型中观察到相似的动力学,该模型接受在视网膜下间隙中移植的hESC-3D视网膜组织。

[0233] 组群可包含8至15只兔。因此,可以进行统计学分析(单因素ANOVA)。

[0234] 实施例2

[0235] 在具有眼冲击暴露和视网膜损伤的兔中证明视力恢复和改善。包含hESC-3D视网膜组织和可生物降解和/或不可生物降解的载体或支架的视网膜下移植物用于治疗兔的受损视网膜组织。如本文所述,视网膜下移植物可包含hESC-3D视网膜组织块,其安装在生物材料支架的电纺纳米纤维薄层上以形成生物视网膜补片。处死后,使用活体动物中的光学相干断层扫描(OCT)以及组织学和免疫组织化学来证明组织和视觉的结构恢复。使用视觉诱发电位(VEP)在活体动物中证实功能恢复。

[0236] 人类视网膜组织使用临床级的hPSC(BIOTIME, INC.)生成。在兔中进行试验性移植实验以确定大型眼动物模型中的视网膜下移植过程。使用激波管在兔中产生眼部冲击损伤模型。然后将具有可生物降解的载体或支架的多块hESC-3D视网膜组织(长度在约0.1至约

1mm之间)移植到每只动物的视网膜下间隙中。

[0237] 例如,水凝胶(诸如衍生自透明质酸、藻酸盐等的那些)可以用作可生物降解的载体或支架。可以将水凝胶配制成在移植后约1分钟至约60分钟内于视网膜下间隙中原位胶凝,并可以将移植的视网膜块固定在视网膜下间隙内,从而改善手术和功能结果。这项研究将证明,将hPSC-3D视网膜组织块与可生物降解的生物材料一起移植可以改善该过程的手术和功能结果,从而导致更多的动物在手术后4-6个月内VEP信号的增加。

[0238] 用安装在非常薄的生物材料膜片(约3-5mm宽至5-8mm长)上的几块hPSC-3D视网膜组织构建生物视网膜补片或生物视网膜假体装置以支持移植到具有眼部冲击损伤的兔的视网膜下间隙中。

[0239] 在施用过程中,可以将生物视网膜补片放置在视网膜间隙中,使视网膜组织定位以用于最大程度的视力恢复。可以施用视网膜补片,使得该补片在施用视网膜移植或补片之前产生的视网膜小泡内稳定。植入物可以附有补充材料或过程。

[0240] 实施例3

[0241] 使用眼注射器将hPSC-视网膜祖细胞递送到兔的眼部间隙中(离体实验)。用抗人类核抗体HNu(红色)和全核DAPI染色(蓝色)对移植了人类视网膜祖细胞的兔眼冰冻切片进行染色。证明了借助眼注射器进行递送的,在兔眼部间隙(仅蓝色染色)中人类视网膜细胞(红色+蓝色染色)的存在。图5B至图5D证明,从人类胚胎干细胞(hESC)分化的人类视网膜祖细胞的视网膜下移植可以被成功移植到大眼动物模型(兔)的眼部空间中,可以将成年哺乳动物视网膜中的视网膜层厚度保持最多3个月,对受体视网膜无有害影响,且不引起肿瘤发生。来自这些移植物的细胞迁移并整合到受体视网膜层中,从而增强了受体视网膜。此类细胞与RGC和INL中的受体视网膜细胞混在一起,并可以对其周围的宿主细胞施加旁分泌支持。

[0242] 实施例4

[0243] hPSC-3D视网膜组织的细胞分泌神经营养因子

[0244] 分析了来自hPSC-3D视网膜组织培养物的条件培养基(以及来自未分化的hESC的条件培养基作为对照)中几种关键营养因子的存在,例如,脑源性神经营养因子(BDNF)、神经胶质源性神经营养因子(GDNF)、神经营养蛋白-4(NT4)、神经生长因子- $\beta$ (BNGF)和促存活的有丝分裂原碱性成纤维细胞生长因子(bFGF=FGF-2)。使用Luminex技术(RnD Systems)来读取这些神经营养因子的浓度,并且在条件培养基中,除了bFGF之外,还发现了高水平的BDNF和GDNF,比未分化的hESC的对照水平超出至少约100倍至1,000倍之间,从而导致皮克至纳克/毫升浓度的神经营养蛋白。

[0245] 实施例5

[0246] 兔冲击眼损伤模型

[0247] 设计了一种基于Jones,K.等人,Low-Level Primary Blast Causes Acute Ocular Trauma in Rabbits.J Neurotrauma,2016.33(13):p.1194-201的兔冲击眼损伤模型以评估本文所述的细胞制剂改善由冲击损伤引起的视网膜变性和视神经损伤以减轻或阻止视力丧失的潜能。两种细胞递送途径是(i)视网膜前和(ii)视网膜下以找到导致最大存活和移植细胞的最有效视网膜整合的途径,这些共同发挥最大的治疗作用而不会在宿主视网膜上引起有害的副作用。可以通过眼底成像和OCT(视网膜大体形态),通过视网膜电图

和视觉诱发电位(一种视觉功能的测量)以及通过在动物死亡后(预计:冲击伤后六个月)用动物中具有视网膜移植物的眼组织的组织病理学来评估细胞移植的治疗效果。兔眼的验尸分析包括组织学、荧光免疫组织化学和共焦显微镜以及视网膜组织的3-D重建。

[0248] 在该模型中,使用如图6所示的大框架激波管来产生可控的初级冲击波而没有增加二级或三级效应(Sherwood,D.等,Anatomical manifestations of primary blast ocular trauma observed in a postmortem porcine model. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*,2014.55(2):p.1124-1132.)。该激波管产生的“冲击波”导致约7到22帕斯卡每平方英寸(psi)(48-152千帕斯卡,kPa)的峰值静压范围,以Friedlander样波形递送,带有3.1毫秒的正压峰持续时间。我们的数据表明,可长存的分离的初级冲击波能够在兔中产生急性视网膜损伤(2-3级,基于表1所示的累积损伤量表(CIS))。

[0249] 表1. 累积损伤量表

CIS	损伤的严重程度
0	眼睛未损伤
1	眼睛有一些损伤,但应当完全自我复原
2	眼睛具有需要外科手术修复的损伤,遗留慢性病理
3	眼睛具有可能用外科手术修复的损伤,有严重的视力丧失
4	眼睛的损伤可能超出有意义的功能修复

[0251] 为了预测用于产生给定CIS的损伤的冲击强度,基于在使用的冲击强度范围内产生损伤的可能性开发了“风险模型”。如图7所示,对于给定冲击波水平,应用序数逻辑回归来估计对于眼睛的每个组织成分达到给定的CIS分数的概率,包括视网膜和视神经。为实现产生具有CIS 3的视网膜损伤的80%概率,需要约725kPa每1毫秒(ms)(约82psi)的比脉冲量的冲击。总体而言,这些数据可作为产生视网膜损伤严重程度相对一致的兔的群组(且无视神经破裂,总的来说,具有“可挽救的”视力问题的动物)以对细胞疗法和视网膜祖细胞移植对视力保持的影响进行统计学评估的指导。神经视网膜的短距离轴突损伤适应于通过旁分泌营养因子支持进行治疗,而破裂的视神经(例如,在激波管中较高水平的CIS 3损伤)将导致永久性视力丧失,目前的技术无法恢复这种视力丧失。

[0252] 该模型包括由RSI Robinson Services, Inc.提供的约96只特种的无病原体(SPF)级的新西兰(NZ)有色褐色兔,每只约5至5.9磅。在激波管中受到眼部冲击伤之前,兔使用例如,眼底成像、OCT和ERG、VEP记录进行初始的基线结构和功能评估,并在冲击伤后立即进行结构和功能评估。兔在ISR动物设施中休息1天,然后转移到UTHSCSA动物设施中。视网膜类器官离解成单细胞,且视网膜祖细胞被移植到兔眼中。每天可以处理大约4只兔以使工作质量最大化,每只动物大约用2个小时。

[0253] 评估了受冲击影响的兔视网膜中人类视网膜祖细胞的存活率。此外,还评估通过旁分泌稳健地传递神经保护而不引起宿主视网膜损害的能力。生物材料通常促进移植物中的细胞存活。视网膜前和视网膜下移植在哺乳动物视网膜中存活,但是与“大型眼”模型相比,啮齿动物的细胞整合动力学可能会有所不同。

[0254] 来自解离的hPSC-3D视网膜组织的细胞被移植到兔的视网膜前和/或视网膜下间隙中,这些兔已经历了受控的冲击诱导眼损伤而导致视网膜和/或视神经损害。然后通过视

网膜电图(用于检查眼睛的光敏感细胞(视网膜中的视杆和视锥细胞及其连接的神经节细胞)的功能评估)和视觉诱发电位(枕叶皮质响应于光结果的电刺激的功能评估)来测量神经保护作用。在冲击损伤后的选定时间点,还可以对眼组织进行组织病理学分析。

[0255] 在兔中评估了冲击损伤后视网膜下和视网膜前移植物在有或没有支持性生物材料的情况下hPSC源的视网膜祖细胞改善视网膜变性的作用。移植到眼部空间中的干细胞的临床前和临床测试显示了对变性视网膜的治疗作用。生物材料支持视网膜细胞的植入。视网膜下移植物可以神经保护感光细胞,而视网膜前移植物可以支持RGC。原代视网膜祖细胞可以在结构和功能上整合到宿主视网膜中。

[0256] 实验过程(方法)可能包括以下针对兔和先导性(P)实验的选择标准。对兔眼的离体先导性研究表明,移植物更容易定位在有色的眼中。大约5-5.9磅(2.5千克)、约3个月大的F1 NZ兔用于确认冲击强度(在类似大小的Dutch Belted兔身上发挥作用)以达到CIS 2-3视网膜损伤,从而引起ERG振幅和内隐时间和/或VEP振幅/延迟的50%降低。通过诸如眼底成像、OCT、ERG和VEP的测定在冲击前(排除眼部疾病)和之后(以确认预期的CIS)对兔进行进行预筛选。兔应具有CIS 2-3视网膜损伤。移植物包括在两只眼睛中以及在在没有损伤的3只NZ兔眼中施用约50,000个hPSC-视网膜祖细胞。然后通过例如OCT(在+1天、+1周、+1个月)分析眼睛以证明细胞被移植。可以观察到视网膜隆起。兔可以在移植后+1个月检查以确定(例如,通过IHC)细胞是否存活。如果需要的话,可以使用免疫抑制方案,包括例如,泼尼松(2mg/kg,局部使用)+环孢菌素(每12小时5.0mg/兔,口服),-3天至术后+8周。

[0257] 眼部冲击损伤:使用激波管(如上所述)在兔中产生CIS 2-3视网膜损伤(表1)。可以在冲击前1天和冲击后2天进行成像(眼底照相,OCT)和电生理学(ERG、VEP),如表2所示。

[0258] 眼移植设备:可以使用任何适当的移植设备来施用移植物。例如,可以使用连接到Micro-4控制器,100- $\mu$ l Hamilton注射器和微毛细管[外径1.0mm,具有拉制抛光开口]系统的World Precision's UMP-3泵用于眼部细胞递送。可在轻微固定的冰冻切片上进行眼组织学、荧光免疫组织化学分析,以及共聚焦免疫荧光显微镜检查。

[0259] 可以在移植物中使用约50,000个人类视网膜祖细胞,用例如木瓜蛋白酶从hPSC-源的视网膜组织(类器官)解离(Nasonkin, I.等, Long-term, stable differentiation of human embryonic stem cell-derived neural precursors grafted into the adult mammalian neostriatum. Stem Cells, 2009. 27 (10) : p. 2414-26), 体积为约40至50微升。当用载体或支架(例如水凝胶,如HYSTEM<sup>®</sup>生物材料(凝胶))移植细胞时,细胞可以在每次移植之前与载体或支架预混合。如表2所示,我们在“对照”(相对的)眼中移植热灭活(死)的视网膜祖细胞(有或没有载体或支架)。

[0260] 表2. 细胞和生物假体补片(细胞+生物假体材料)的研究设计

	OCT、ERG、VEP 等	视网膜下 ~50,000 个细胞	对照 ~50,000 个死细胞	视网膜前 ~50,000 个细胞	对照 ~50,000 个死细胞
	1 天	测量	测量	测量	测量
[0261]	1 周	测量	测量	测量	测量
	1 个月	测量	测量	测量	测量
	每月随访	测量	测量	测量	测量
	6 个月	测量/终止	测量/终止	测量/终止	测量/终止
组织学, IHC					

[0262] 冲击前1天和冲击后2天,通过对眼睛的体内评估(例如,OCT=视网膜厚度、移植物的存在、ERG、VEP功能性视力测试)进行初始分析。细胞然后移植,并进行定期测量(表2)。我们预计,在冲击发生后的第+1天,与动物的基线水平相比,动物的ERG和VEP振幅和/或潜伏期具有至少50%的减量。功能恢复的标准水平是达到基线的至少约25%、30%、40%、50%、60%、70%或75%的电生理反应的增加。当动物达到这一恢复水平时,或在冲击暴露后+6个月而无恢复时,对它们实施安乐死。分离眼睛,并获取视神经进行冷冻IHC分析以描述移植物对视网膜保持的影响。细胞存活、移植物保留、人类细胞整合到兔视网膜中、视网膜厚度的变化、神经胶质和纤维化疤痕水平、视网膜重塑、细胞死亡、视网膜结构在手术后6个月进行测量。实验是部分盲法的。兔被分配一个ID号。实验室技术人员不知道每只兔的左眼还是右眼接受了活细胞直到实验结束。这将最大程度地客观评估神经保护的功效。在进行组织学和IHC分析时,实验室技术人员不知道兔ID直到实验结束。

[0263] 功效分析、统计学评估、样本量和对照:Okuno等发现VEP振幅变异性(相对标准偏差[RSD]或变异系数)为~12%,而潜伏时间则是无变化的(RSD~3%)。这使得VEP成为视觉功能的可靠度量。使用Okuno公式作为功效计算的基础,我们估计需要7的最小样本大小获得足够的统计功效以以80%功效(1- $\beta$ ,其中 $\beta$ 是II型误差的概率)和0.05的p值检测均数差。样本大小可以为每群组10只眼,这足以通过ANOVA方法对视觉功能变化(VEP)进行统计评估,并且允许组中成员的损耗(例如,由于移植失败)。

[0264] 为了增加细胞存活率,可以使用免疫抑制。对视网膜厚度和VEP的影响很小。此外,可以使用带有营养因子(例如,嵌入凝胶中的BDNF,用于缓慢释放)的载体如水凝胶(例如,HYSTEM<sup>®</sup>生物材料)(BioTime,Inc.)来增加对视网膜厚度和VEP的影响。

[0265] 移植到成体CNC中的特定细胞剂量能够实现细胞的稳定整合。尽管基于药理学的治疗预期(剂量-反应关系)是重要的,但该研究的方面是寻找不会对受体视网膜产生不利影响的细胞剂量(例如,在视网膜下间隙留下非整合细胞的隆起或在视网膜前间隙中生长视网膜前膜)。

[0266] 实验过程(方法):测试10,000、100,000和250,000细胞的细胞剂量用于生成整合到兔视网膜中的移植物。在这种情况下,三种细胞剂量的选择可以集中在约50,000个细胞(例如,30,000;45,000;65,000细胞/移植物)。实验设计见表3;每个剂量水平可分配10只

兔。

[0267] 表3. 在有或没有载体/支架的情况下针对视网膜下vs视网膜前优化细胞剂量的研究设计。

	OCT、 ERG、VEP 等	~10,000 个 细胞	对照 死细胞	~100,000 个细胞	对照 ~10,000 个 死细胞	对照
	1 天	测量	测量	测量	测量	测量
[0268]	1 周	测量	测量	测量	测量	测量
	1 个月	测量	测量	测量	测量	测量
	每月随访	测量	测量	测量	测量	测量
	6 个月	测量/终止	测量/终止	测量/终止	测量/终止	测量/终止
组织学, IHC						

[0269] 每只动物的一只眼睛具有移植物, 和另一只眼睛移植死细胞。根据初步结果选择施用途径(视网膜下或视网膜前, 有或没有生物材料)。

[0270] 可以确定由移植物产生的旁分泌因子导致最佳神经保护作用, 和然后通过移植物过表达这些分子, 和/或将这些分子嵌入支持性生物材料中。

[0271] 本文提供了视网膜冲击损伤后用于递送视网膜细胞疗法以改善兔模型中的视力丧失的时间的评估。

[0272] 冲击损伤后不久, 视网膜细胞开始死亡。RGC和感光细胞对细胞死亡最敏感。但是, 在眼球冲击性损伤后的头几天, 初始视敏度的下降不保证视力丧失。相反, 这在大约3-4周内变得明确。视力下降由进行的细胞死亡, 逐渐引起。在这段时间内, 至少可以挽救一些视力。延迟分析(到冲击损伤后+2周)用于确定治疗性干预是否仍然能够保护视网膜。该结果与开发在分诊期间受伤士兵的视力保护方法有关。

[0273] 上面介绍了细胞制备、移植、随机化以减少偏差、群组大小、样品收集、处理和功效分析。除了表4中概述的研究设计和测量视网膜厚度和视网膜细胞保持(如上所述)外, 还分析在冲击后+3天vs+2周用移植物处理的兔视网膜中细胞死亡的比较和定量。可以使用切割的半胱天冬酶-3、 $\gamma$ H2AX(凋亡的早期标志物)和Tunnel染色(细胞死亡的晚期标志物)。作为第二读数, 可以对活化的小胶质细胞(Iba-1标志物)的存在进行定量以作为对照和实验群组中视网膜重塑和炎症的量度。而且, 可以确定内网层和外网层中突触节保持的差异。

[0274] 表4. 用于测试冲击后视网膜细胞移植2周延迟对视网膜和视力保持的影响的研究设计。

	OCT、ERG、VEP 等	冲击后第 3 天移植	对照第 3 天移植物死细胞	冲击后第 14 天移植	对照第 14 天移植物死细胞
[0275]	1 天	测量	测量	测量	测量
	1 周	测量	测量	测量	测量
	1 个月	测量	测量	测量	测量
	每月继续	测量	测量	测量	测量
	6 个月	测量/终止	测量/终止	测量/终止	测量/终止
	组织学，IHC				
20 只兔在冲击损伤后 3 天治疗；20 只在冲击损伤后 14 天治疗					

[0276] 可以配制细胞疗法用于在较早治疗的视网膜(冲击后第+3天)中改善视网膜厚度的保持,降低细胞凋亡、视网膜重塑水平以及更好地突触层保持。

[0277] 实施例6

[0278] 扁平区玻璃体切除术(n=3只眼)后,hPSC-3D视网膜组织移植到野生型猫眼的视网膜下间隙中。可以使用任何适用的方法来移植hPSC-3D视网膜组织,例如在Seiler,M.J.等Functional and structural assessment of retinal sheet allograft transplantation in feline hereditary retinal degeneration.Vet Ophthalmol, 2009.12(3):p.158-69中描述的,例如,通过引用整体并入本文。眼睛通过眼底检查和光谱域光学相干断层扫描(OCT)成像临床检查由于存在视网膜下移植植物而引起的不良反应。移植后五周,对猫实施安乐死,并使用人类特异性抗体(HNu、Ku80和SC121)对视网膜切片进行免疫组织化学分析以评估移植植物在视网膜下间隙中的位置、分化和分层。在研究的持续期间给予抗炎剂量的口服泼尼松。

[0279] 眼底检查时未观察到严重视网膜炎症。移植后3周的OCT成像显示,在视网膜下间隙的正确位置存在移植植物,如图8所示。用HNu和Ku80抗体对视网膜冷冻切片进行免疫染色也揭示了在猫视网膜下间隙中存在人源的视网膜组织移植植物,如图9所示。移植植物中的大多数细胞具有细胞质染色而不是核染色。这些结果表明,hESC源的视网膜组织可以成功移植到猫的视网膜下间隙中而没有严重的炎症反应。

[0280] 实施例7

[0281] 为了证明植入的人类胚胎干细胞来源的3D视网膜组织(hESC-3D视网膜组织)具有在移植植物中形成分层的能力,对盲的免疫缺陷大鼠SD-Foxn1 Tg(S334ter)3Lav(RDnude)大鼠用视网膜下递送的hESC-3D视网膜组织进行处理。图10A显示了在移植前从培养皿切下的hESC-3D视网膜组织(视网膜类器官)的图像。图10B示出了在移植之前在培养皿上生长的切割视网膜类器官的图像。图10C是在培养皿上生长的视网膜类器官的另外的图像。植入和处死大鼠后,在植入后10周对视网膜下间隙进行组织学分析。移植植物的分层可以在图10D和图10E中看到。在图10F中,可以在紧邻大鼠RPE的外层中看到外节样突起。

[0282] 实施例8

[0283] 证明了在两种不同条件(冷,在Hibernate-E培养基中,以及在37°C下有或没有BDNF的原始培养基中)下过夜运输hESC-3D视网膜组织而不影响视网膜组织的活力。组织在到达时固定并且使用切割的半胱天冬酶(凋亡标志物)的IHC显示阳性细胞(图11,箭头),表明视网膜组织在4°C下在Hib-E中过夜运输后保持了存活力。

[0284] 已经证明了从hESC衍生携带所有视网膜层(PR、二级神经元、视网膜神经节细胞)和RPE的3D人视网膜组织的可行性(参见例如国际专利申请公开号WO 2017/176810,其通过引用整体并入本文)。此外,电生理学已被用来证明突触发生的增加与hESC-3D视网膜组织内电活动的增加相一致。

[0285] 虽然只有一些神经元在6-8周龄的hESC-3D视网膜组织中显示Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>电流,但几乎所有12-15周龄hESC-3D视网膜组织聚集物中测试的视网膜神经元是可电激动的,并显示出稳定的Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>电流。

[0286] 实施例9

[0287] 可以使用外径(OD)1.52毫米和内径(ID)1.12毫米的World Precision Instrument的微毛细管。全身性环孢菌素的免疫抑制方案(从移植前-7天开始并继续)、将hESC-3D视网膜组织递送到猫的视网膜下间隙中的技术和成像方法(例如,Spectral OCT, RetCam,在几个不同的时间,包括在移植后立即以及在即将处死动物之前)也可用于将存活的hESC-3D视网膜组织递送到大型眼动物的视网膜下或视网膜前间隙中。

[0288] 图12A至图12C示出了将hESC-3D视网膜组织移植到野生型猫的视网膜下间隙中的外科手术团队。图12D示出了用于调节眼压的设备以及用于对移植物进行成像的RetCam设备。图12E示出了插入猫眼中用于眼内手术的两个端口。图12F示出了用于将hESC-3D视网膜组织移植到视网膜下间隙中的视网膜脱离(小泡)。图12G示出了用于注射hESC-3D视网膜组织的套管。图12H显示了用RetCam成像的野生型猫的视网膜下间隙中的hESC-3D视网膜组织。图12J显示了在移植后5周,放置在野生型猫的视网膜下间隙中的hESC-3D视网膜组织的截面OCT图像。图12K示出了OCT图像的3D重建以估计移植物的总尺寸。

[0289] 实施例10

[0290] 移植到视网膜下间隙中5周后,野生型猫眼中hESC-3D视网膜组织移植物的免疫组织化学分析表明hESC-3D视网膜组织无肿瘤结构和突触整合到大型眼动物的视网膜中。成功地进行带有移植物的猫眼杯的保存以用于冷冻的组织学/IHC,用视网膜特异性、人特异性、突触特异性抗体的共聚焦IHC。图13A示出了制备用于切片的PFA固定的、冷冻保护的、OCT饱和的具有视网膜下移植物的猫眼。图13B示出了在OCT中冷冻的猫眼的横截面。图13C示出了OCT中猫眼的16- $\mu$ -厚的切片,其显示了在中央视网膜中作为凸起的移植物。图13D显示了冷冻切片区域的放大图像,其显示了hESC-3D视网膜组织移植物的保存。

[0291] 图13E显示了在移植到视网膜下间隙中5周后,带有hESC-3D视网膜组织移植物的猫视网膜切片上的IHC。移植物显示出存在许多CALB2(钙网膜蛋白)-阳性的神经元,且箭头指向连接人移植物和猫的ONL的CALB2[+]轴突。图13F至图13H显示了在猫的视网膜下间隙中的hESC-3D视网膜组织移植物,其分别用HNu、Ku80和SC121人(而不是猫)特异性抗体染色。这些结果表明,人体组织实际移植到猫的视网膜下间隙的正确位置。图13I显示了用BRN3A(RGC的标志物)和人核标志物的染色。星号显示主图像中具有标志物的区域,其在插图中被放大。这些结果表明,移植物中的细胞发生朝向RGC的成熟。图13J至图13K显示用对

人(而非猫)特异的抗体-突触素(hSYP)和轴突标志物NFL(对猫和人神经元两者特异性的)染色,并显示存在点状染色(箭头),其表明正整合到猫神经元中的人神经元形成的潜在突触。在猫ONL和hESC-3D视网膜组织移植物之间的边界处观察到人点状染色。这表明突触连接的潜在起始。点状染色(红色)的分布模式也表明与受体视网膜连接的发育的人突触。

[0292] 移植后5周显示了野生型猫的视网膜下间隙中hESC-3D视网膜组织移植物之间连接性的免疫组织化学(IHC)证据。图14A和图14B显示人(而非猫)特异性突触素抗体hSYP(红色)和钙网膜蛋白(绿色),其染色猫和人神经元两者的。hSYP在猫的ONL中染色人斑点(箭头)。图14C和图14D显示了较低放大率的图像,其提供了带有hESC-3D视网膜组织移植物的猫视网膜的概况。hSYP染色源于移植物,并对移植物进行染色,ONL的部分面向移植物而非邻近移植物的猫视网膜。

[0293] 图15A至图15C显示连接猫INL和移植物中的钙网膜蛋白[+]人细胞的钙网膜蛋白[+]轴突(箭头)。在更高的放大倍数下,可以看到这些轴突从猫细胞伸展到人移植物中,并且从人钙网膜蛋白[+]细胞伸展到猫INL中。图15D和图15E显示了在移植物中表现为成熟的钙网膜蛋白[+]神经元和在整个移植物中发现的钙网膜蛋白[+]轴突。

[0294] 图16A至图16E显示了在猫视网膜下间隙中hESC-3D视网膜组织移植物的边缘的染色。SC121人细胞质特异性抗体(红色)和Ku80人细胞核特异性抗体(绿色)对人类视网膜移植物染色,但不猫视网膜染色。从该图像可以看出,存在移植物与宿主的连接。图16D显示了来自hESC-3D视网膜组织移植物的轴突围绕(箭头)在紧邻移植物的层中的猫PR,而一些SC121+人轴突可以看到穿过猫的ONL(图16B、图16E,箭头)。

[0295] 这些结果表明,染色的分布模式指示了由移植物产生的突触素染色的突触连接,以及移植物细胞的无肿瘤存活和成熟。在任何猫受试者中未发生肿瘤。

[0296] 实施例11

[0297] 基于组织学和IHC以及功能评估(基于至少两个大型眼遗传RD动物模型的退化视网膜中hESC-3D视网膜组织的电生理水平),突触连接性的机制将得到进一步证明。已经证明,在分化的某些发育时间点获取的hESC-3D视网膜组织能够结构和突触整合到退化的受体视网膜中,并充当“生物补片”以恢复患有视网膜变性、视网膜障碍和疾病(包括晚期视网膜变性)的受试者的视力。此外,在具有视网膜变性的大型眼动物模型中证明hESC-3D视网膜组织移植的积极治疗作用使得由生物假体材料上的多个hESC-3D视网膜组织块组成的生物假体视网膜能够得到进一步增强。可以使用2个大型眼动物模型(Pde6a<sup>-/-</sup>狗和Aip11<sup>-/-</sup>猫),且如果需要,可以另外的2个大型眼动物模型(Cngb1<sup>-/-</sup>狗和Crx<sup>+/-</sup>猫)。

[0298] 进行全视野ERG和mfERG以评估退化视网膜的功能,并比较具有移植物的受试者以及对照受试者中移植物(中央视网膜)周围区域和周边的视网膜功能的变化。使用已建立的MEA技术测定视网膜中具有PR变性的视网膜中单个RGC细胞的电活动,特别是在移植物上方的区域中。多电极阵列使得能够一次从多个单独RGC读数,从而消除了单个RGC上使用繁琐的膜片钳的需要,这提供较少的信息并且可能并不表明RGC具有与hESC-3D视网膜组织移植物的突触连接性。记录可以在充氧室中进行1-2小时,其保持视网膜的活力,因此能够实现准确的读数。这些测定使得能够分析单个视网膜细胞的结构(组织学/用人类突触素、人类SC121抗体和WGA-HRP跨突触示踪剂的IHC)和功能(电生理学)水平的突触连接性的相关性。mfERG允许准确查明移植物周围宿主视网膜(相对于单个细胞)的活性。多电极阵列能够

证明移植物是通过细胞置换而不是(或除了)通过神经保护机制/细胞融合而起作用。

[0299] 由于MEA记录大约需要1-2小时,并导致视网膜结构的逐渐恶化,因此可以将hESC-3D视网膜组织移植到Pde6a狗和Aip1-1猫的两只眼睛中(6只动物=12只眼/每个模型),其分配一只眼睛用于多电极阵列读数,而对应眼睛可用于组织学/IHC读数。

[0300] 检测表达跨突触示踪剂小麦胚芽凝集素-辣根过氧化物酶(WGA-HRP)的体外和体内hESC-3D视网膜组织,并分析在狗(Pde6a<sup>-/-</sup>)和猫(RD的Aip1-1<sup>-/-</sup>)模型,每个6只)中移植hESC-3D视网膜组织以评估这两个模型维持移植物和促进突触整合的能力。还可以使用组织学、IHC和异种移植物特异性抗体。体外电生理学(MEA)与高分辨率组织学、免疫组织化学、mfERG和VEP可用于评估移植的结果。

[0301] 本文提供了测定移植物与移植(在RD起始时,具有大约50%的ONL厚度保留的部分退化的视网膜中,和具有大部分/完全退化的PR的视网膜中)到3个动物群组中受体退化性视网膜之间的突触连接机制的方法。体外和体内电生理学以及视觉引导的行为测试可以用来描述视学受损受试者的视力恢复程度。

[0302] 也进行生物假体视网膜(大于单个hESC-3D视网膜组织构建体或类器官的大小的移植物)的移植。其中多块的hESC-3D视网膜组织块安装在生物假体材料或载体或支架(例如,基于水凝胶的,例如,HYSTEM®)上的生物假体视网膜携带数千个PR(=生物像素),并使得能够恢复视觉引导行为。这种生物假体视网膜也可以进行定制以治疗特定的视网膜疾病或病症,例如,黄斑变性,因为补片可以重新设计为主要携带视锥细胞以重建黄斑,其主要由视锥细胞组成。

[0303] 与辣根过氧化物酶缀合的小麦胚芽凝集素(WGA-HRP)可用作跨突触示踪剂。3D视网膜组织可源自示踪物[+]和示踪物[-]hESC,其共培养2-3个月,并测试了示踪剂[-]视网膜组织中的HRP(使用HRP底物DAB),这表明突触示踪剂从示踪剂[+]视网膜组织的迁移。包含示踪剂[+]人视网膜组织与狗和/或猫胎儿视网膜的2-3个月的共培养物可用于通过测试以下任一项来评估突触连接性:1) WGA-HRP迁移,或2) 嵌合人/非人类突触的形成。用人突触素(hSYP)和人胞质(SC121)特异性的抗体显示了后一种方法的可行性,尽管我们还尝试WGA-HRP,因为它以更高的灵敏度检测嵌合(人-非人)突触。然后将示踪剂[+]视网膜组织构建体移植到年轻(4-5周)Pde6a<sup>-/-</sup>狗和6只Aip1-1<sup>-/-</sup>猫的视网膜下间隙中(两只眼睛都接受移植物)。可以使用RetCam和光学相干断层扫描(OCT)对动物成像,动物在例如6个月时处死,样品对于DAB、hSYP和SC121染色以评估移植物/宿主突触连接性(一只眼睛/动物),而另一眼睛使用多电极阵列(MEA)通过离体电生理学测试。

[0304] 可以进一步显示,移植后6个月证明突触整合(通过跨突触示踪剂和IHC),移植物中PR外节的延长两者以及功能整合(在移植区域周围/上方通过MEA发现RGC活性)。还可以证明来自年幼hESC源的视网膜类器官移植物的神经保护作用。MEA信号的观察(与移植物外3-4mm的视网膜相比)可以表明,视网膜变性的再生或减缓其进展是由于特定的PR替代机制,而不是单独的神经保护。

[0305] 在一个实施方式中,将设计在延伸因子-1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )启动子控制下表达小麦胚芽凝集素-HRP遗传示踪剂的hESC,hESC-3D视网膜组织衍生扩大用于生产,确定hESC的身份(DNA指纹术),进行核型分型,将工程化的hESC-3D视网膜组织移植到6只Pde6a<sup>-/-</sup>狗和6只Aip1-1<sup>-/-</sup>猫(两只眼睛)中,OCT、全眼ERG、mfERG、MEA和VEP(使用对照Pde6a<sup>-/-</sup>狗和对照Aip1-

1-/-cat作为视网膜变性的对照读数),等待6个月,处死动物,分离眼睛和带有移植物的视网膜,描述移植物上方区域中RD视网膜功能的变化(在单个RGC上使用膜片钳,以及MEA),然后固定带有移植物的组织,并使用针对视网膜特异性免疫表型的抗体描绘移植物与受体之间的突触连接性和移植的hESC-3D视网膜组织的成熟。

[0306] cGMP级hESC可用于hESC-3D视网膜组织的衍生。例如,可以在来自诸如ES Cell International Pte.Ltd.的公司的cGMP-hESC的几种不同细胞系中测定分化的动力学。来自ES Cell International Pte.Ltd.的细胞具有正常的核型,并被充分表征。

[0307] hESC-3D视网膜组织内以及该组织与受体退化性视网膜之间的突触连接性可用于产生功能性的生物学“视网膜补片”以接受视觉信息并将其从移植物的PR传递至受体视网膜的RGC。受体视网膜的快速变性可通过使移植物和受体视网膜的RGC紧密靠近来促进移植物与宿主的连接性。总体证据表明,6-12周的hESC-3D视网膜组织在具有RD的狗和猫中存活、分化、分层并与受体视网膜突触连接。由于hESC-3D视网膜组织具有RPE层,因此PR非常适合在移植物中存活和成熟并形成外节。

[0308] WGA-HRP跨突触示踪剂可用于证明移植物与宿主之间的突触连接性。WGA-HRP从强的泛启动子EF1 $\alpha$ 表达,并且可以通过将定制的慢病毒载体(例如,Genecopoeia)中的EF1 $\alpha$ -WGA-HRP构建体转导到hESC(从中衍生出hESC-3D视网膜组织)中而进行工程化且如果在6个月内建立了突触连接,能够跨越人/狗或人/猫突触。hESC-3D视网膜组织已显示出(i)在发育的约8周时开始突触形成和轴突发生,和(ii)在移植后不到两个月内,在移植物与受体野猫视网膜之间出现突触点的迹象。用hSYN抗体(特异对于人的突触前部分而非猫/狗突触特异性的)和HNu(人核)抗体的高分辨率共聚焦免疫组织化学可用于证明受体视网膜神经元周围的人突触。我们可以在没有HNu[+]核的受体神经元上搜索hSYN[+]结,和单独地,搜索其上带有hSYN[+]结的SC121[-]轴突。

[0309] 作为另外的对照,我们可以有患有视网膜变性突变的动物,其未经手术处理,且分离和用MEA测试相同的视网膜区域。可以将结果与其中放置移植物处的结果进行比较,该位置距离作为我们的“界标”的视神经不远。

[0310] 作为离体电生理实验,可以在对应眼睛上进行多电极阵列(MEA)。MEA后,我们不能将视网膜组织用于组织学检查,因为它逐渐失去其完整性。因此,我们可以从来自约6只狗和6只猫的带有移植物的眼的样品进行MEA读数(在处死动物之前,尝试在体内完成mfERG和VEP之后),而组织学和IHC数据从对应眼睛产生(也是6只狗和6只猫的带有移植物的眼睛)。我们可以在动物被处死之前,在每只动物的两只眼睛上执行mfERG,并将来自移植物周围视网膜的信号与已经完全退化的视网膜和远离移植物的PR(作为阴性对照)进行比较。

[0311] 可以使用mTeSR1培养基,并在层粘连蛋白-521或生长因子降低的(GFR)MATRIGEL或玻连蛋白上培养hPSC。可以将慢病毒载体中定制的(由如Genecopoeia的公司)跨突触报告子转导至hESC中,在10 $\mu$ M Rho-激酶抑制剂(ROCK)中使用药物选择嘌呤霉素分离2周,并分析集落的WGA-HRP表达,扩展并在液氮中保存。可以根据本文所述的方法进行hESC-3D视网膜的衍生。可在处死动物后(MSU方案或其他方案)立即摘除眼球,将其浸入pH 7.6-8.0的冰冷的4%多聚甲醛/PBS中,移除前房,并在4 $^{\circ}$ C下将眼杯固定另外15分钟用于组织学、IHC和预嵌入。眼杯可以在20%-30%的蔗糖中冷冻保存,并在OCT/蔗糖中速冻。我们还可以保存每只动物的视神经和脑组织(用于追踪HRP[+]轴突),以评估WGA-HRP是否通过受

体的RGC从移植物输送并沿RGC轴突输送至上丘。可以用人特异性HNu和 $\alpha$ -突触素抗体染色含有hESC-3D视网膜组织移植物的选择的切片用于分析人移植物和人/大鼠、人/猫突触。可以使用如Singh, R.K.等, Characterization of Three-Dimensional Retinal Tissue Derived from Human Embryonic Stem Cells in Adherent Monolayer Cultures. Stem Cells Dev, 2015. 24 (23) :p.2778-95中所描述的抗体/方案或另一方案进行IHC。

[0312] 可以将hESC-3D视网膜组织移植物移植到三个群组的环孢菌素免疫抑制的动物中: (i) 视网膜变性发作之前, (ii) 在仍然存在1-2个感光层时, 以及 (iii) 晚期变性之后。我们可以从狗诱导的多能干细胞 (iPSC) 得到视网膜组织移植物, 并评估它们与狗受体的免疫相容性是否可以增强生物假体视网膜移植物的存活和功能整合。RetCam和OCT可用于监测移植物12个月。还可以用功能分析在3、6、9和12个月测试视网膜光敏性和视觉功能, 包括视网膜电图 (ERG)、多电极阵列 (MEA) 记录、视觉诱发电位 (VEP)、瞳孔光反射和视觉引导迷宫导航。移植后12个月可处死动物以测定突触整合。

[0313] 可以通过在RD发作时对动物进行本文所述的移植程序来测定移植物与受体退化视网膜之间的突触连接的机制, 至部分变性的视网膜中50%的ONL厚度保持和/或具有大部分/完全退化的PR的视网膜中。体外和体内电生理学以及视觉指导的行为测试可以用来描述视觉受损动物中视力恢复的程度。

[0314] 可在手术后2周, 然后3周通过高分辨率谱域 (SD)-OCT, 和接着通过另外的SD-OCT扫描 (在移植后2、3、6、9个月和12个月) 直到1年, 通过选择“良好”的移植物 (示例标准可包括: 在中央视网膜中大移植物的存活) 来进行谱域OCT和RetCam成像。具有过度手术创伤/眼出血的动物可在第一次RetCam和SD-OCT扫描时排除。从术后1-2个月开始, 每2个月对移植和假手术的猫进行光动测试。该测试评估猫是否可以看到特定厚度 (周期/度) 的运动条纹并确定其空间阈值。每个测试可以在同一天或下一天执行两次。可以由两名不知道动物状况的独立研究人员评估视频。由于测试的变异性, 可以使用至少6只的组大小。

[0315] 多焦点 (mf) ERG是可以对比动物视网膜不同区域之间的PR功能, 并精确确定移植区域与移植物周围具有退化的PR的宿主视网膜之间的细微电生理差异的方法。在手术后大约+2周, 然后+3周且然后在移植后大约2、3、6、9和12个月, 直到大约1年, 可以对所有动物和假手术进行瞳孔光反射用于瞳孔测量记录。可以在手术后+2个月, 然后在+4、6、9、12个月, 直到1年, 对所有动物和假手术进行VEP记录。

[0316] 对于组织学/IHC, 可将眼睛摘除 (在处死动物后立即摘除) 并在冰冷的4%多聚甲醛 (PFA) 中固定2小时, 然后在冰冷的PBS中清洗3次 (每次约30分钟), 用蔗糖冷冻保护 (在PBS中约30%的终浓度), 并在低温恒温器上切片以通过带有移植物的眼睛产生12 $\mu$ m的冷冻切片 (例如, 通过SD-OCT选择)。可以在每个第20切片上用苏木精-曙红 (H-E) 或高丽紫 (CV) 进行组织学检查以鉴定带有移植物的切片。可以使用对人 (但不是猫/狗) 组织 (SC-121、Ku-80或HNu、NF-70)、多样的猫/狗人特异性视网膜细胞类型 (视杆和视锥PR、双极细胞 (例如CaBP5、PKCa、SCGN)、无长突细胞 (例如钙网膜蛋白)、RGC标志物 (例如, BRN3A、BRN3B) 和突触 (SYP、SYT、BSN、PCL0、CTBP2、mGluR6、PSD-95等) 特异性的抗体进行IHC, 包括hSYP抗体, 其对于人而非猫/狗突触素是特异的。

[0317] MEA记录可通过在动物处死后立即摘除眼睛, 将摘除的眼睛运送到充氧腔室中进行, 其中带有移植物的视网膜片可以小心地分离, 并在整个记录过程中保存在充氧腔室中。

对于免疫EM,可以遵循以下程序:摘除后立即在约3%的戊二醛加约2%的PFA中固定眼睛,清洗、包埋入戊二醛硬化的明胶-白蛋白混合物中,产生振动切片机切片,使用非荧光方法进行hSYP抗体进行IHC(辣根过氧化物酶作为二抗),树脂中包埋并以超薄水平再切片。

[0318] 生物假体视网膜移植的形态学和功能评估

[0319] 为了评估移植程序的质量以及移植物是否在退化的视网膜中诱导光敏性,可以进行几种形态和功能评估。移植后可定期进行眼底成像和光学相干断层扫描以监测移植物的外观和视网膜状态。为了探测移植物诱导的光敏性,可以在移植前和移植后3、6、9和12个月进行各种行为和电生理学测试,例如:1)视觉引导的行为;2)瞳孔光反射的体内成像;3)体内视网膜电图以评估视网膜光反应;4)视觉诱发电位记录以评估视网膜光反应向视觉皮层的传递;和5)体外多电极阵列记录以评估移植的视网膜区域内神经节细胞的光反应。

[0320] 可以使用视频眼底照相机(例如,RetCam II,Clarity Medical)进行广角彩色眼底成像以在移植后立即记录移植物放置,并定期监测移植物外观和记录任何炎症反应。可在瞳孔扩张(托品酰胺)和应用局部麻醉药(丙美卡因)后,在有意识的动物中进行监测。

[0321] 谱域-光学相干断层扫描(OCT)。波谱仪(例如,Heidelberg Engineering)可用于记录移植物的扫描激光检眼镜(cSLO)和视网膜横截面图像(OCT)。这是在全身麻醉(例如,异丙酚诱导、插管和 $O_2$ 中递送吸入的异氟烷的维持)下进行的,将动物放在加热垫上并保持在 $37^{\circ}C$ 下。眼睑镜和结膜留缝可将眼球保持在主要注视方向。可以进行红外和自发荧光cSLO成像。高分辨率线和体积扫描可用于记录移植物和宿主视网膜的外观。可以根据需要使用增强深度成像(EDI)方案。可以进行重复成像并使用海德堡眼动追踪软件与之前的图像比对。这允许评估移植物和上层宿主视网膜的视网膜形态和视网膜层厚度。这将提供有关视网膜状态的形态学数据以及在移植程序后可能发生的任何相关异常,例如视网膜脱离、水肿或视网膜本身变薄。图17示出了在猫中植入的视网膜组织生物假体的RetCam图像,其在移植到视网膜下间隙中之后立即成像。

[0322] 功能评估方案

[0323] 可以使用先前在视网膜治疗实验中使用的四选择视力测试设备进行狗的视力测试。量度是正确的退出选择百分比和退出时间,其提供暗视、中视和光照明水平下视觉的客观评估。这可以鉴别视杆及视锥介导的视力。可以通过使用不透明的接触镜遮挡另一只眼睛依次测试每只眼睛。猫的视力测试可包括多种不同的技术。这些包括使用定制的视动设备评估视动反射(OKR)并确定平台。OKR测试是猫的视力评估的技术。也可以利用猫在跟踪运动物体时的行为-即跟踪激光指针。最后,可以使用用于评估猫的视敏度的技术,例如,跳转到由视觉刺激指示的平台的能力。在这种技术中,通过为猫确定指示的平台而奖励以及为选择不正确的平台提供负强化来训练猫。

[0324] 体内瞳孔光反射(PLR)成像可用于确定移植物是否增强视网膜光敏性。尽管PLR几乎完全由固有的光敏性视网膜神经节细胞(ipRGC)介导,但它不仅可用于评估ipRGC的功能,而且还可用于评估视杆/视锥回路的功能,因为ipRGC不仅直接通过其感光色素黑视蛋白对光作出反应,还通过来自视杆和视锥的突触输入间接地对光做出反应。如上所述,PLR可以在总共五个时间点测量。在每个时间点,可以在从同一动物获得体内ERG记录前一天进行PLR成像。所有PLR成像可以在一天的大约同一时间进行以最小化昼夜节律变异。

[0325] 每个PLR成像日的前一晚,动物可以暗适应过夜。在第二天早晨和暗红色的光下,

对动物进行麻醉。在关掉红灯并让动物暗适应10分钟后,可以使用RETImap系统(Roland Consult)在移植眼中定位移植物。该仪器是基于共聚焦激光扫描技术,红外激光通过其用于扫描视网膜而无需使其光适应或产生视觉反应;用cSLO获得眼底图像并确定移植区域。然后,可以使用该系统产生聚焦照明已移植眼睛中含移植物的区域的可见光波长的光,并且可以使用眼动仪(例如,SR Research EyeLink 1000Plus)在红外线照明下对未移植的眼睛成像以寻找任何同感的PLR。可以呈现跨越至少3个对数单位的四个不同强度。作为对照,可以将焦点照明传递到非移植眼中的等同区域,并从另一只眼中对任何同感的PLR成像。眼动仪捕获的瞳孔图像可以通过帧抓取器实时传输到另一台计算机用于离线分析瞳孔直径。该测量可以利用基于LabVIEW的图像处理规程。对于猫,可以测量中瞳孔水平直径。可以在每次记录中测量峰值瞳孔收缩。对于每种刺激强度,可以使用Mann-Whitney U检验来比较因移植的眼照射而引起的峰值收缩与照射非移植的眼睛而引起的峰值收缩。如果移植物确实能够实现或增强光敏性,我们预期移植的眼的光刺激以引起比非移植眼的光刺激更强的瞳孔收缩。

[0326] 体内电生理学可以评估移植的hESC源的视网膜组织生物假体植入物支持来自移植视网膜的光诱发活动的的能力。可以使用一系列体内电生理学评估。ERG技术可以显示移植物是否是功能性的并改善视网膜功能。VEP可以显示是否存在向视觉皮层的传输,并且连同视觉和PLR测试一起,可以评估移植技术改善视网膜功能的总体可行性。这些测量可以在完整的动物中进行,并且可以在长的随访期内重复进行。在遗传性或诱导性视网膜变性的动物模型中,可以通过全视野或焦点闪光诱发的ERG评估视网膜功能的的状态。移植干细胞源的悬液或片状植入物后,可以通过移植组织的聚焦而不是通过全视野刺激来更有效地测试移植物的光反应,尤其是如果宿主视网膜退化。也可以进行ffERG。可以使用RETImap系统进行焦点和多焦点ERG测试。可以使用RETImap进行移植区域的鉴定,如以上对于PLR成像所述,且该仪器还可用于将光刺激聚焦在该区域上以引起焦点ERG。可以刺激每个移植区域,和可以记录反应并与未移植的视网膜区域和与对照(未治疗)眼睛的相同区域进行比较。或者,可以进行多焦点ERG。

[0327] 当移植物成功形成光感受器并与宿主视网膜形成突触连接,从而提供光激活的神经活动时,视觉信息的传输可以在视束上中央实现。为了证明这一点,我们可以在视觉皮层区域(对应于人眼中的区域17)上记录。这可以通过将真皮或皮下电极应用于动物头部的枕骨区域与ERG记录同时进行。假设存在移植物的功能整合,则可用于产生ERG反应的相同刺激也可引发VEP。可以使用闪光(非模式)和模式的(棋盘或格栅)刺激,其可以由RETImap系统生成。

[0328] 动物可以暗适应过夜,并准备在暗红色光下进行记录。如本文针对OCT所述,可以使用麻醉、瞳孔扩张和眼球定位。最初,可以用低于正常视杆阈值的亮度开始和用增加的刺激强度执行暗视测试方案以最终记录混合的视杆/视锥响应。按照暗适应系列,可以使动物对视杆抑制背景光进行光适应,然后进行光照适应照度系列。如果要进行VEP记录,根据功能性ERG的存在预测的,则可以靠近枕外隆突,沿枕骨中线放置皮下针状电极或金杯电极(我们可以确定哪种电极形式在这些动物中产生最好的记录)。已经证明,将记录电极放置在枕外隆突附近最小化狗中VEP的ERG污染。如果要使用金杯电极,则可以动物的头皮可以在头骨的中线上和在任一侧上侧面至少1.5cm剃毛,用70%的酒精清洁并彻底风干。可以将

导电电极糊加到选定的记录位置,并将杯状电极牢固地应用在皮肤上和用手术胶带固定。可以在头皮清洁步骤后皮下插入针电极,而无需施加电极糊。

[0329] 可以定量方式分析电生理数据。对于ERG记录,可以记录a波和b波振幅以及内隐时间并将其存储在数据库中。对于VEP,可以使用两种类型的分析。对于闪光-VEP,可以测量响应波形中的N1和P1峰值的延迟,以及这些峰值相对于信号基线的幅度。这些参数可以存储在数据库中。如果我们能够记录模式反转VEP,则我们可以使用参考刺激模式的反相频率的快速傅立叶变换(FFT)来分析波形,并获得稳态VEP反应的幅度和相位分量。这些参数也可以存储在数据库中,使得可以容易地根据移植类型、移植后持续时间和任何其他相关治疗参数的变化来得到每只动物的所有电生理参数。分析的主要终点可能是:(1)视网膜移植后是否发生视觉恢复(定义为ERG或VEP中的光诱发活动);(2)向动物施用的干细胞治疗的类型(或其缺乏);和(3)首次观察到光诱发反应的时间。

[0330] 体外多电极阵列(MEA)记录:可以从移植的区域获得体外多电极阵列(MEA)记录以直接评估移植组织下游的视网膜神经节细胞的光反应。由于这些体外记录需要对动物实施安乐死,因此可以在移植后的12个月的时间点进行,在完成体内功能评估后。MEA记录日的前一晚,可以使动物暗适应过夜。第二天早晨且在暗红色光下,可以对动物实施安乐死,并通过对眼睛半切开、丢弃前半部分并使用镊子去除玻璃体而从双眼产生眼杯。可以将眼杯转移到两个带盖的装有Ames培养基的50mL管中,其使用便携式碳罐(carbogen tank)连续地用95%O<sub>2</sub>和5%CO<sub>2</sub>充气。带盖管在运输时可保持在避光的盒内。

[0331] 可以将狗/猫/兔眼杯转移到新鲜的Ames培养基中,并暗适应另一小时,在此期间,可以在红外观察器下目视检查移植的视网膜以定位移植的区域。发现移植后,可以使用刀片切出约2.5mm×2.5mm的眼杯块,其包括移植的组织。如前所述,可以将该片压平到60电极MEA上使神经节细胞侧朝下,并从神经节细胞细胞外记录动作电位。在这一制备方法中,视网膜与色素上皮、脉络膜和巩膜的附着不会受到干扰,使得移植的组织可以保持牢固附着,并且使负责再生可光激发的光色素的视觉循环得到很好的保护。可以呈现范围从8.6log-15.6log光子cm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>的1s持续时间的全视野光阶的强度系列。MEA记录可以从与移植区域相邻的视网膜区域进行,也可以从非移植视网膜中的等同区域进行。对于两组记录(即,包含移植物的视网膜和对照视网膜),可以使用例如Plexon Offline Sorter软件对尖峰进行分选。可选地,通过计算在1-s光刺激期间以及在刺激开始之前的1s期间的原始记录的方差,并且将这两个方差之间的差异用作光反应强度,可以容易地量化每个电极中的光反应强度。

[0332] 为了测定从移植区记录的神经节细胞光反应是否显著大于对照区的神经节细胞光反应,可以使用例如Mann-Whitney U检验比较两个区域之间光诱发的尖峰率或记录方差的变化。对于每种刺激强度,可以针对以下类别的光反应分别进行统计学比较:1)在光开始时的快速激发;2)在光开始时的快速抑制;3)在光偏移(light offset)时的快速激发;4)在光偏移时的快速抑制;和5)迟滞的激发,类似于ipRGC的基于黑素蛋白的光反应。如果移植的组织确实能够实现或增强视杆/视锥驱动的视网膜回路的光敏性,我们可以看到,在移植区中的快速光反应(即1-4类)明显强于对照区。另一方面,我们可能看不到基于黑素蛋白的光反应的任何差异,因为这些可能不会受到移植物的明显影响。

[0333] 例如,如果我们通过mfERF VEP和瞳孔测定法发现具有移植物的眼睛的视力改善,

则可以进行用于客观视力测试的行为方法(为狗和猫设计的障碍训练课程以及为猫设计的视动追踪)。

[0334] 可使用例如以下方法评估移植物-宿主的连接性:1)由移植物而非宿主细胞表达的WGA-HRP跨突触示踪剂;2)受体视网膜中人移植物以外的区域中,用人(但非猫/狗)细胞质特异性抗体SC121和/或人(但非猫/狗)特异性突触素抗体hSYP和/或突触后标志物的IHC/immunoEM;或/和3)用hSYP+HNU抗体和视网膜细胞质抗体(例如Recoverin、CALB2或/和BRN3A/B)的IHC,以显示人的结在接受者(非人)神经元周围。同样,可以使用注射到受体动物的上丘中的非病毒逆行示踪剂霍乱毒素B(CtB)以证明连接性。我们可以在处死动物前2周向上丘区域注射示踪剂,并使用IHC在人体移植物中定位CtB。

[0335] 可以将多块hESC源的视网膜组织安装在生物假载体或支架上,包括例如,水凝胶(例如,基于HYSTEM<sup>®</sup>的电纺生物材料片(~3x5mm),或电纺丝或如本文所述的其他适合植入眼中的生物相容性材料,以产生生物假体视网膜补片。该生物假体视网膜补片可以视网膜下移植到受试者中,并且可以使用上述成像以及全视野ERG或/和mfERG和VEP跟踪受试者1年。另外,可以使用行为视力测试(对猫和狗的障碍训练和对猫的视动追踪)。

[0336] 可以将生物假体视网膜块(例如,3x5 mm)移植到模型的视网膜下间隙中,且在移植后1周,然后2周,然后1、2、4、6、9、12个月通过SD-OCT(以及RetCam)通过横截面视网膜成像在体内评估移植物。在移植后2、4、6、9、12个月,可以通过mfERG(以及全视野ERG)对视网膜功能进行体内测试,而视力可以通过行为测试(对猫和狗的障碍训练和对猫的视动追踪)、VEP和瞳孔测定法进行测试。安乐死后,我们可以通过组织学和共聚焦IHC评估移植物整合和与宿主视网膜的连接性以显示突触发生和PR OS延长。也可以使用预嵌入immunoEM(移植物与宿主的突触连接)和EM(以显示移植物中的PR外节)。

[0337] 最初,可将生物假体视网膜移植到3只或更多动物的视网膜下间隙(中央视网膜)中。动物可以从手术前约-7天和在手术后约8周结束用泼尼松+环孢菌素免疫抑制。可以通过经玻璃体视网膜下移植方法将生物假体视网膜移植到每只动物的两只眼睛中(n=3个移植物,共6只眼)。我们可以具有至少一只具有RD而无移植物的动物作为未治疗对照。当前的方法能够将数块hESC源的视网膜组织精确地递送到猫的视网膜下间隙中而不引起大的视网膜脱离。

[0338] 可以执行SD-OCT和RetCam成像以评估在时间点=0(对于先导组群,在移植后立即),和然后在移植后+1周和+2周时是否存在移植的材料。这证明将生物假体移植物作为薄片递送至视网膜下间隙中以及移植物存活,并产生OCT和组织学结果。除了生物假体视网膜补片中hESC-3D视网膜组织成熟以及突触整合的组织学和IHC外,可以对移植物进行1年或更长时间的监测以生成有关PR功能和视力改善的功能数据(mfERG、障碍训练、VEP)。

[0339] OCT可用于监测移植物,而mfERG可用于监测在移植区域内与移植物外约3-4mm相比的电活动的变化。这可以用作对照集(例如,相同的视网膜,不同的区域)。到移植后6-12个月,大多数大型眼RD模型具有完全退化的PR层,而mfERG可检测到的信号源自移植物。

[0340] 表1:实验设计的实例。

	实验群组	对照类型 1a、1b	对照类型 2 (mfERG、OCT)	试验	
[0341]	先导 1	至少 3 只动物， 双眼中移植物	1 只动物： 1a :1 眼无移植物； 1b : 第二眼假移植	移植的眼-移植 物周围区域与 移植物外 3-4 mm 的区域	OCT、mfERG、 VEP 行为测试
	先导 2	至少 3 只动物， 双眼中移植物	1 只动物： 1a :1 眼无移植物； 1b : 第二眼假移植	移植的眼-移植 物周围区域与 移植物外 3-4 mm 的区域	OCT、mfERG、 VEP 行为测试
	主要 实验 平衡的 对照 设计	至少 3-4 只动 物，1 眼移植	对应眼作为对照- 平衡的对照设计	不需要使用相 同的眼作为对 照	OCT、mfERG、 VEP 行为测 试，通过单因 素 ANOVA、 Mann-Whitney U 检验评估

[0342] 可以通过组织学/IHC在具有移植物的动物中观察到(移植物至宿主)突触连接性(在移植后3-5个月之间,这可以在实验期间根据mfERG读数的变化间接评估,和然后在动物处死后直接评估)。可以使用跨突触追踪和体内方法(mfERG、瞳孔光反射、功能性视觉测试(如VEP)和视觉引导行为(如迷宫行走))。从人体移植物到受体视网膜神经元的追踪WGA-HRP或/和用SC121、hSYP、hNu和视网膜细胞类型特异性抗体的IHC或/和预嵌入immnoEM都是显示功能性移植物-宿主突触的方法。

[0343] 实施例12

[0344] 如本文所述,在分化的约第40天,使用具有1.52mm的外径和1.12mm的内径的硼硅酸盐玻璃(Borosilicate Glass)套管(来自World Precision)将包含hESC源的视网膜组织的视网膜类器官(也称为视网膜组织移植物或视网膜组织生物假体移植物或多个移植物)移植到扁平区玻璃体切除术后野生型猫眼(n=7眼睛)的视网膜下间隙中。在组1(n=3)中,在研究期间(5周)以抗炎剂量口服施用泼尼松。在组2(n=4)中,除泼尼松外,在移植前7天开始全身性施用环孢菌素A,和然后在研究期间连续施用。通过眼底镜检查 and 谱域光学相干断层扫描(OCT)成像检查眼睛由于视网膜下移植物的存在或手术程序产生的不良影响。

[0345] 如图18所示,结构上类似于人视网膜的猫视网膜提供了代表性的大型眼动物模型,其中为证明hESC源的视网膜组织的移植的功效。特别地,猫具有富视锥的区域,该区域称为中央区,其与人黄斑相似。

[0346] 如本文所述,视网膜组织构建体(类器官)使用不同的形态发生原衍生自人胚胎干细胞集落。视网膜类器官的视网膜分化的时间线的示例在图19中示出。在8至10周时,通过使用针对视网膜祖细胞标志物和早期感光细胞标志物的抗体免疫染色视网膜类器官来测

定视网膜类器官中视网膜祖细胞标志物和早期感光细胞标志物的表达,如图20A至图20I所示。

[0347] 图21示出了使用玻璃套管在扁平区玻璃体切除术后将视网膜组织移植物移植到野生型猫眼的视网膜下间隙中的图像。视网膜下小泡形成在其中移植了视网膜组织移植物处,如图22所示。图23显示了在移植后三周获得的彩色眼底和OCT图像。图像表明视网膜下间隙中移植物的存在和定位,并表明不存在由视网膜下移植物或手术过程引起的任何严重不良影响。

[0348] 移植物植入后5周,对猫实施安乐死。使用人特异性抗体(例如HNu、Ku80、SC121)、轴突、突触、视网膜细胞类型特异性标志物和淋巴细胞、小胶质细胞/巨噬细胞标志物对视网膜切片进行免疫组织化学(IHC)分析。

[0349] 图24显示了来自组1(+泼尼松,-环孢菌素A)的视网膜切片的图像,其使用对小胶质细胞和巨噬细胞特异性的抗体染色。图25显示了来自组2(+泼尼松,+环孢菌素A)的视网膜切片的图像,也使用对小胶质细胞和巨噬细胞特异性的抗体染色。如图24和图25所示,添加环孢菌素A导致小胶质细胞和巨噬细胞的积累减少(使用IBA1特异性染料显示的)。在图25中,HNu人特异性标志物染色在移植的移植物的细胞核中被明确定义,表明移植后移植物的细胞存活至少5周。

[0350] 图26显示了对比组1(+泼尼松,-环孢菌素A)和组2(+泼尼松,+环孢菌素A)的视网膜切片中小胶质细胞和巨噬细胞标志物阳性的细胞数的图。

[0351] 在图27A至图28C中也可以看到移植物在猫的视网膜下的定位。图27A显示了来自组2(+泼尼松,+环孢菌素A)的猫视网膜切片,其用对感光细胞标志物CRX特异性的抗体染色。图27B显示了用人特异性抗体HNu染色的来自组2(+泼尼松,+环孢菌素A)的猫视网膜切片。图27C显示了使用针对CRX和HNu两者的抗体染色的来自组2(+泼尼松,+环孢菌素A)的猫视网膜切片。如图所示,移植物位置紧邻猫的感光细胞。在图27C中放大插图中,猫感光细胞和人细胞一起显示。图28A示出了来自组2(+泼尼松,+环孢菌素A)的猫视网膜的切片,其使用对视网膜神经节细胞(RGC)标志物BRN3A特异性的抗体进行染色。图28B显示了用BRN3A和人特异性标志物KU80两者染色的来自组2的猫视网膜的切片。在图28C中细胞核也被染色。

[0352] 显示了在移植后约5周时,移植的hESC-视网膜组织的轴突生长连接至受体视网膜。图29A示出了用对钙网膜蛋白标志物CALB2特异性的抗体进行染色的猫视网膜切片,该标志物在神经元(包括视网膜)中表达。在图29A、图29B和图29中可以看到对CALB2表达阳性的细胞被染色。IHC分析表明,从移植的hESC源的视网膜组织移植物传出的数个轴突对钙网膜蛋白的表达呈阳性。图29B显示了标志物SC121的IHC染色。针对SC121的抗体对人类细胞质是特异性的。因此,可以看到移植物的轴突生长相对于用DAPI染色的接受者(猫)视网膜神经节细胞的位置。图29C所示的IHC分析表明移植物移植后至少5周,来自移植物的轴突扩增并整合到受体眼睛的外核层(ONL)、内核层(INL)和甚至神经节细胞层(GCL)中。

[0353] 此外,IHC分析用于证明,能够整合到受体视网膜中的移植的人类视网膜组织移植物(对钙网膜蛋白阳性的)也是GABA能的,如图30A至图30C中所示。图30A显示了向猫视网膜延伸的视网膜移植物(用对CALB2标志物特异性的抗体染色)的轴突。图30B显示了用对人细胞标志物HNu和CALB2特异性的抗体染色的视网膜移植物,从而从猫视网膜勾画出移植物。图30C中所示的移植物轴突的GABA阳性染色进一步表明,来自整合入受体视网膜中的植入

组织的轴突正朝着神经元命运分化。这些结果证明了植入的hESC组织和受体视网膜的结构和功能整合。

[0354] ICH分析还表明,移植的hESC源组织的体内无肿瘤存活至少5周。

[0355] 实施例13

[0356] 如本文所述,在扁平区玻璃体切除术后,使用具有外径1.52mm和内径1.12mm的Borosilicate Glass套管(来自World Precision),在分化后约第40天将包含hESC源的视网膜组织的视网膜类器官移植到患有视网膜变性的CRS突变猫眼的视网膜下或视网膜前间隙中。除以抗炎剂量口服施用的泼尼松外,在移植前7天开始全身性施用环孢菌素A,然后在研究持续期间连续施用。OCT图像是在移植物植入3个月后获取的。图31A至图31G显示了来自两名受试者的OCT图像,并证明了在具有视网膜变性的大型眼动物模型(CRX突变型猫)的视网膜下或视网膜前间隙中移植的hESC源的视网膜组织移植物能够在移植后存活至少3周。

[0357] 实施例14

[0358] 转到图32,在移植后5周,在移植到野生型猫的视网膜下间隙中的hESC源的视网膜类器官中观察到BDNF表达。如图所示,大多数细胞是BDNF<sup>+</sup>。BDNF是支持退化或受损神经元功能的关键神经营养蛋白之一。较高的BDNF水平可以保护视网膜免受疾病或损伤引起的视网膜变性。这些结果表明,hESC源的视网膜组织移植物在植入受检者眼睛的眼部空间后可以作为受损或退化的视网膜组织提供神经营养支持。

[0359] 根据本文的描述,应当理解本公开包含多个实施方式,其包括但不限于以下:

[0360] 治疗视网膜损伤、减缓视网膜损伤的进展、预防视网膜损伤、更换视网膜组织和恢复受损的视网膜组织中一种或多种的方法,该方法包括:将hESC源的视网膜组织施用于受试者。减缓视网膜退行性疾病的进展,减缓创伤性损伤后的视网膜退行性疾病的进展,减缓年龄相关性黄斑变性(AMD)的进展,稳定视网膜疾病,预防视网膜退行性疾病,预防创伤性损伤后的视网膜退行性疾病,预防AMD,恢复因疾病、损伤或遗传异常而丧失的视网膜色素上皮(RPE)、感光细胞(PCR)和视网膜神经节细胞(RGC),增加RPE、PCR和RCG或治疗RPE、PCR和RCG缺陷中的一种或多种的方法,该方法包括:将hESC源的视网膜组织施用于受试者。

[0361] 任何前述实施方式的方法,其中视网膜损伤由冲击暴露、遗传障碍、视网膜疾病和视网膜损伤中的一种或多种引起的。任何前述实施方式的方法,其中视网膜疾病包括视网膜退行性疾病。任何前述实施方式的方法,其中视网膜损害由年龄相关性黄斑变性(AMD)、色素性视网膜炎(RP)和勒伯氏先天性黑蒙(LCA)中的一种或多种引起的。

[0362] 任何前述实施方式的方法,其中所述hESC源的视网膜组织包含视网膜色素上皮(RPE)细胞、视网膜神经节细胞(RGC)和感光细胞(PR)。任何前述实施方式的方法,其中RPE、RGC和PR细胞配置为形成视网膜色素上皮(RPE)细胞的中央核心,并且从RPE细胞核心径向向外移动,形成视网膜神经节细胞(RGC)层、二级视网膜神经元层(对应于成熟视网膜的内核层)、感光细胞(PR)层和RPE细胞的外层。任何前述实施方式的方法,其中各个层包含人视网膜组织的相应层内的细胞特征性的分化细胞。任何前述实施方式的方法,其中所述层包含基本上完全分化的细胞。

[0363] 前述实施方式中任一项所述的方法,其中所述hESC源的视网膜组织还包含生物相容性支架以形成生物视网膜假体装置。任何前述实施方式的方法,其中所述生物视网膜假

体装置包含约10,000至100,000个感光细胞。任何前述实施方式的方法,其中hESC源的视网膜组织能够递送营养和神经营养因子以及有丝分裂原。任何前述实施方式的方法,其中所述营养和神经营养因子及有丝分裂原包含以下一种或多种:脑源性神经营养因子(BDNF)、神经胶质源性神经营养因子(GDNF)、神经营养蛋白4(NT4)、神经生长因子- $\beta$ (BNGF)和促存活的有丝分裂原碱性成纤维细胞生长因子(bFGF=FGF-2)。

[0364] 任何前述实施方式的方法,其中hESC源的视网膜组织的施用导致视网膜层厚度保持约1至约3个月。任何前述实施方式的方法,其还包括施用免疫抑制药物。任何前述实施方式的方法,其中所述免疫抑制药物在所述施用之前、期间和/或之后施用。

[0365] 任何前述实施方式的方法,其中所述方法还包括调节眼压。任何前述实施方式的方法,其中在施用视网膜组织之前、期间和/或之后调节眼压。

[0366] 任何前述实施方式的方法,其中用眼移植工具施用所述组织。任何前述实施方式的方法,其中所述hESC源的视网膜组织是视网膜下或视网膜前施用的。任何前述实施方式的方法,其中施用hESC源的视网膜组织导致hESC源的视网膜组织与受试者的视网膜组织无肿瘤整合。

[0367] 任何前述实施方式的方法,其中整合在施用后约4至5周发生。任何前述实施方式的方法,其中施用不引起视网膜炎。任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中在施用后,所述视网膜组织发生分层。

[0368] 任何前述实施方式的方法,其中在施用后,视网膜组织神经元显示 $\text{Na}^+$ 和/或 $\text{K}^+$ 电流的信号。任何前述实施方式的方法,进一步包括,证明视网膜组织与现有组织之间的连接性。任何前述实施方式的方法,其中所述连接通过以下的一种或多种证明:WGA-HRP跨突触示踪剂、组织学、IHC或电生理学。任何前述实施方式的方法,还包括测量功能恢复的水平。任何前述实施方式的方法,其中功能恢复水平包括基线的至少75%的电生理反应的增加。

[0369] 用于移植到受试者的眼睛中的视网膜组织移植,其包含:视网膜色素上皮(RPE)细胞、视网膜神经节细胞(RGC)、二级视网膜神经元和感光(PR)细胞,其中RPE、RGC和PR细胞配置为形成中央核心。任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中存在约10,000至100,000个感光细胞。任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中所述二级视网膜神经元对应于成熟视网膜的内核层。任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中所述细胞被布置成使得从所述核心径向向外移动,所述视网膜组织包含视网膜神经节细胞(RGC)层、二级视网膜神经元层、感光(PR)细胞层和RPE细胞的外层。任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中所述移植包含5,000至约250,000个细胞。任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中所述移植被移植到视网膜下间隙或视网膜前间隙中。

[0370] 任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中突触发生的增加与电活动的增加相一致。任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中在移植之后,神经元将移植连接至现有组织。任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中所述神经元是CALB2阳性的。任何前述实施方式的视网膜组织,其中连接性由WGA-HRP跨突触示踪剂证明。任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中在移植后,轴突将移植连接到现有组织。任何前述实施方式的视网膜组织,其中所述轴突是CALB2阳性的。任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中在移植之后,所述移植物的细胞朝向RGC成熟。

[0371] 任何前述实施方式的视网膜组织移植,其中在移植后,移植与现有神经元形

成突触。任何前述实施方式的视网膜组织移植物,其中在移植后,移植物与现有组织形成连接。任何前述实施方式的视网膜组织,其中所述连接在移植后一天至约5周内形成。任何前述实施方式的视网膜组织移植物,其中在移植后,移植物形成穿越现有组织ONL的轴突。

[0372] 任何前述实施方式的视网膜组织移植物,其中所述移植物产生旁分泌因子。任何前述实施方式的视网膜组织移植物,其中所述旁分泌因子在施用之前和/或之后产生。任何前述实施方式的视网膜组织移植物,其中所述移植物产生神经营养因子。任何前述实施方式的视网膜组织移植物,其中所述移植物在施用之前或之后产生神经营养因子。任何前述实施方式的视网膜组织,其中神经营养因子包含BDNF、GDNF、bDNF、NT4或bFGF中的一个或多个。

[0373] 任何前述实施方式的视网膜组织移植物,其中在移植之后,将功能恢复的水平测量为电生理反应的增加。任何前述实施方式的视网膜组织移植物,其中功能恢复的水平被测量为至少基线的10%的电生理反应的增加。任何前述实施方式的视网膜组织移植物,其中在移植后,移植物的轴突整合到现有组织中。

[0374] 在权利要求中,除非明确地如此说明,以单数形式提及元件并不意图表示“一个且仅一个”,而是“一个或多个”。本领域普通技术人员已知的所公开的实施方式的元件的所有结构、化学和功能等同物均通过引用明确地并入本文,并且意在被本权利要求所涵盖。此外,无论在权利要求中是否明确列举了该元件、成分或方法步骤,本公开中的任何元件、成分或方法步骤都不旨在专用于公众。除非使用短语“用于……的方法”明确叙述该要素,否则本文要求保护的要素均不应被解释为“方法加功能”要素。除非使用短语“用于…的步骤”明确叙述该要素,否则本文要求保护的要素都不应解释为“步骤加功能”要素。

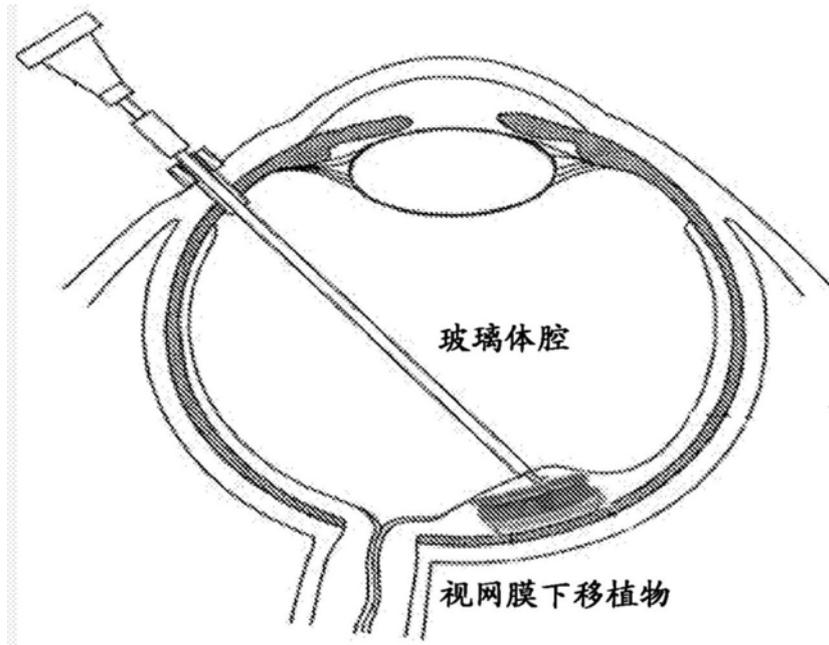


图1A

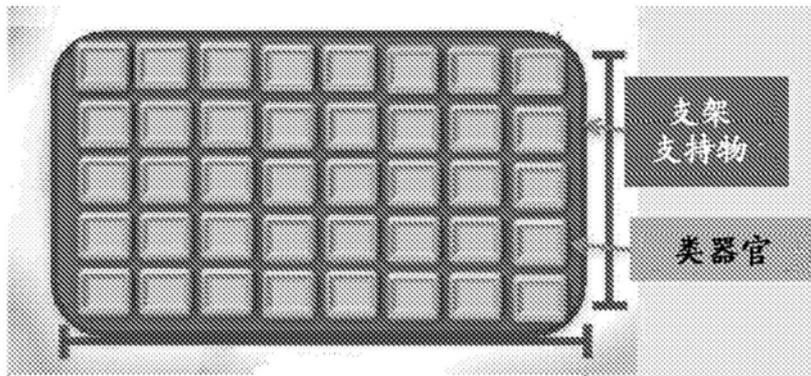


图1B

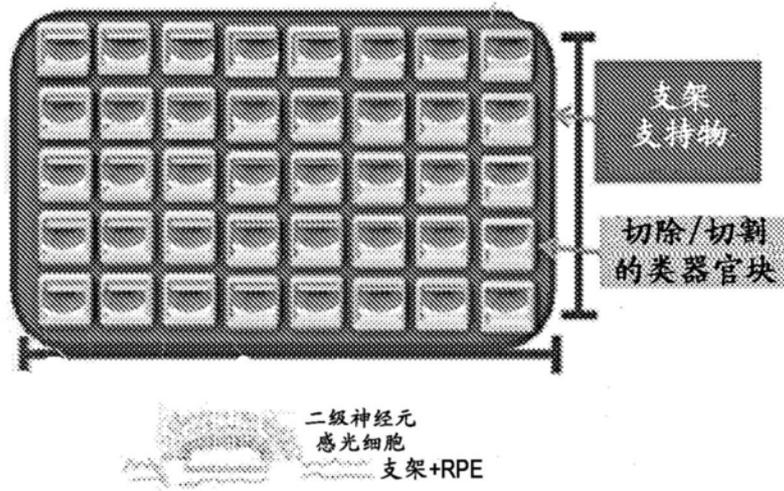


图1C

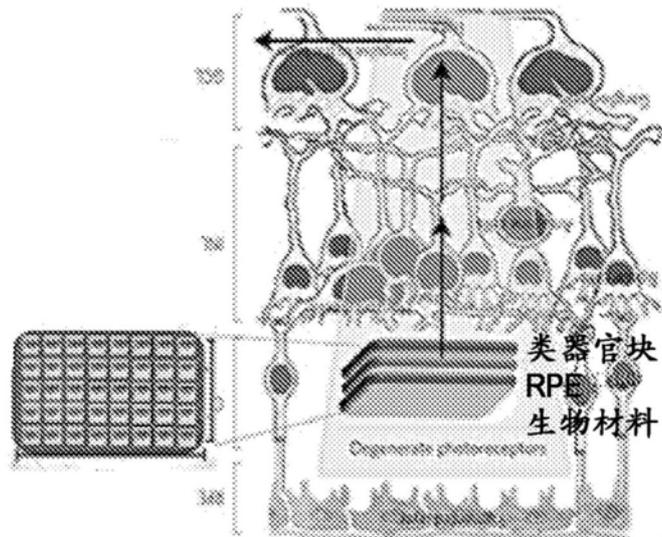


图1D

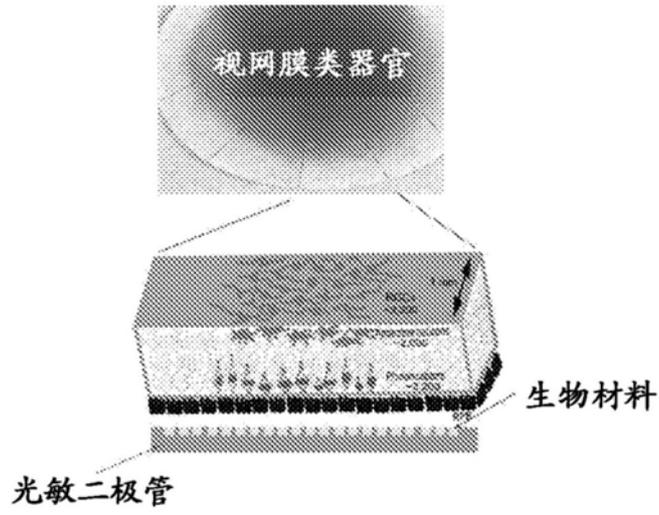


图1E

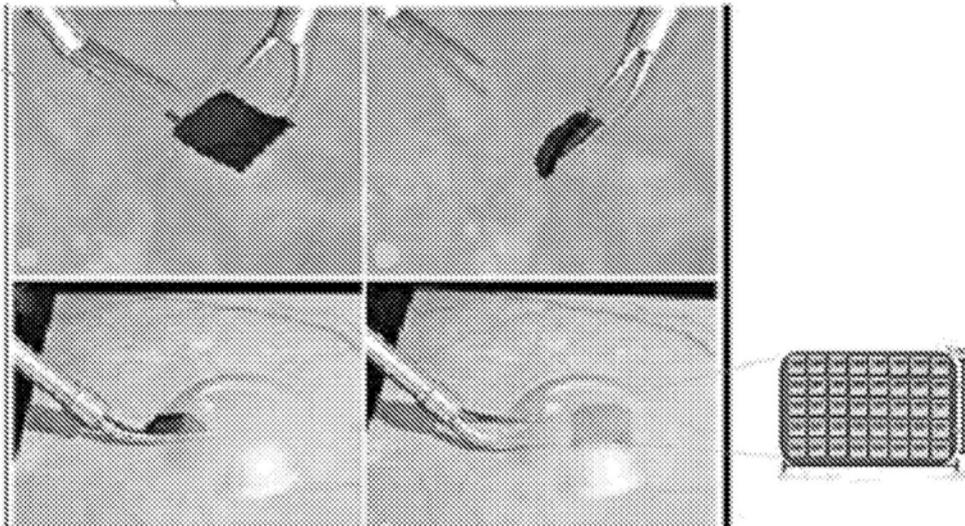


图1F

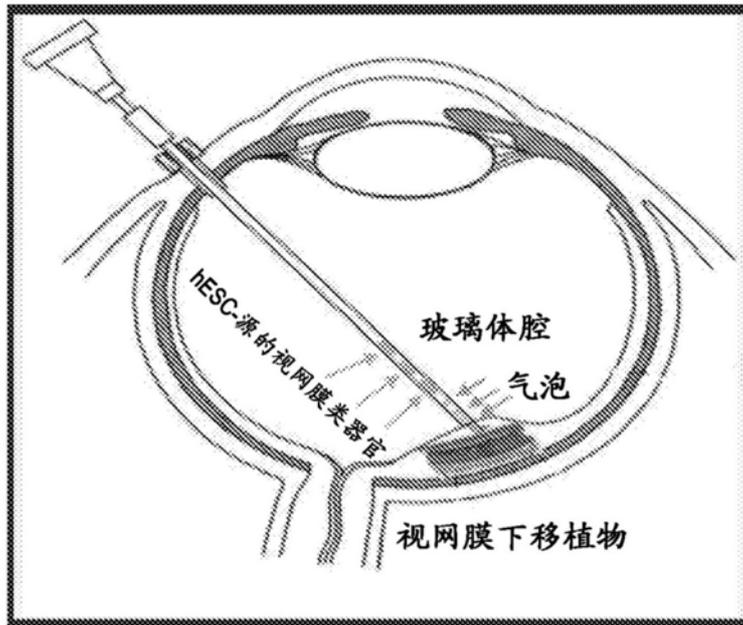


图1G

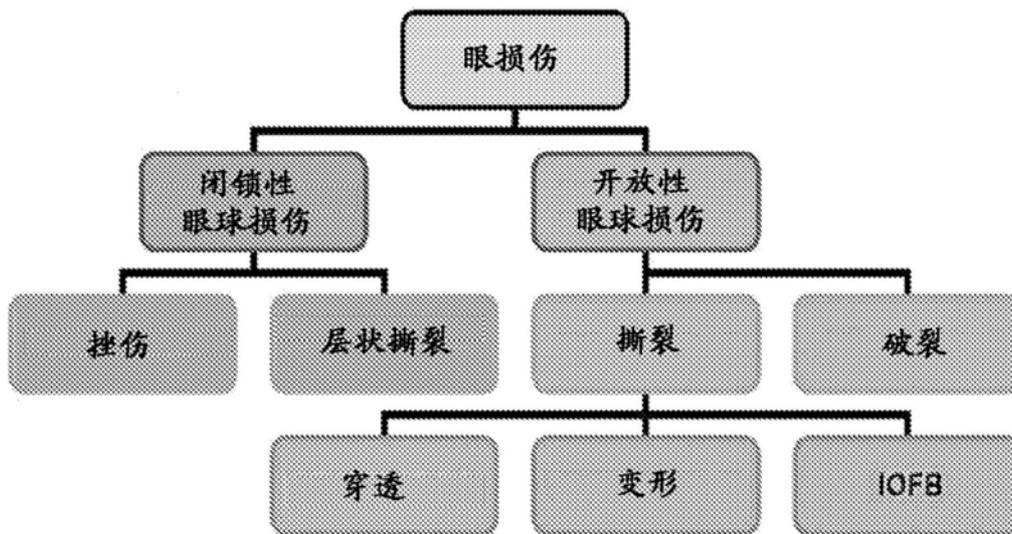


图2

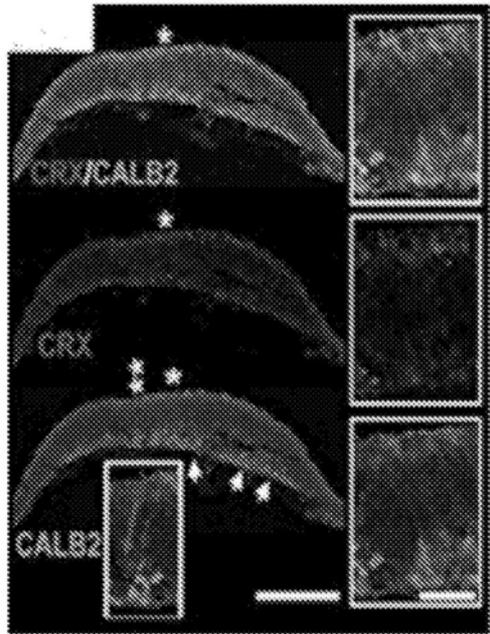


图3A

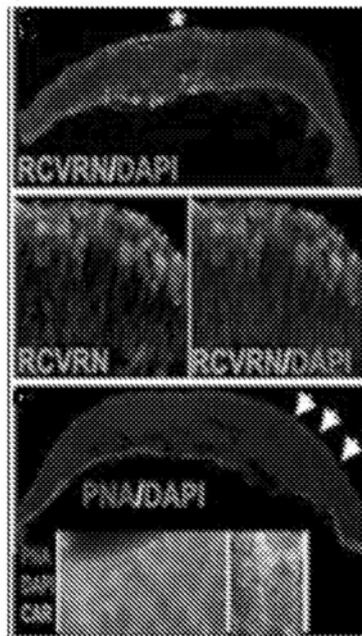


图3B

FACS分选的感光细胞

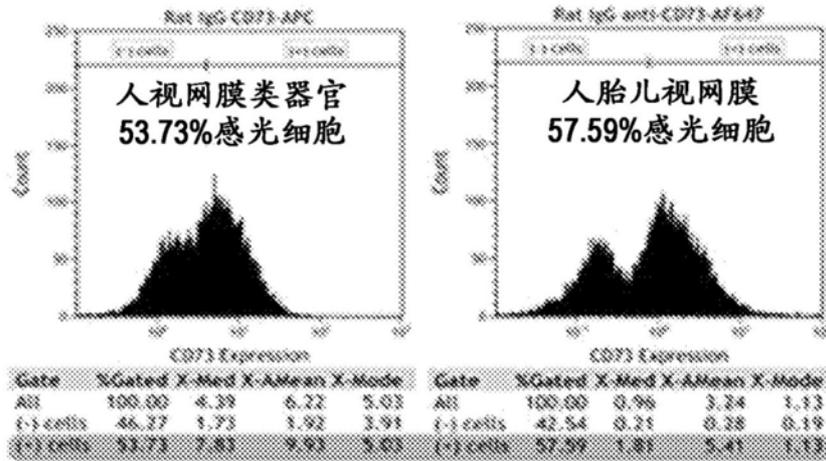


图3C

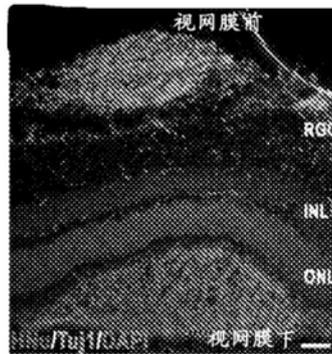


图4A

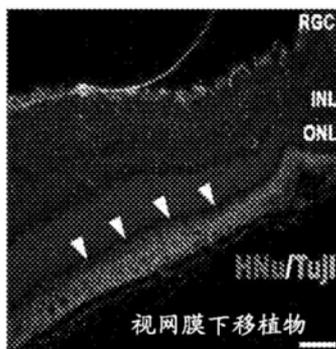


图4B

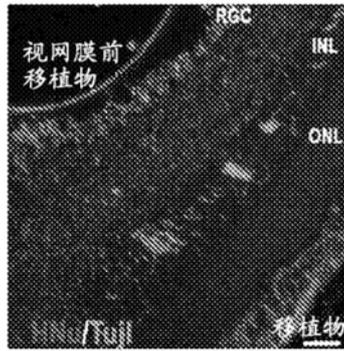


图4C



图5A

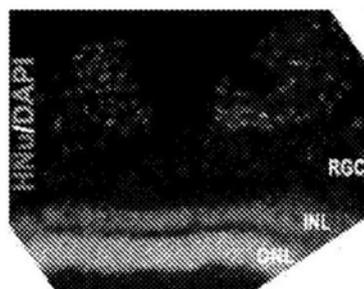


图5B

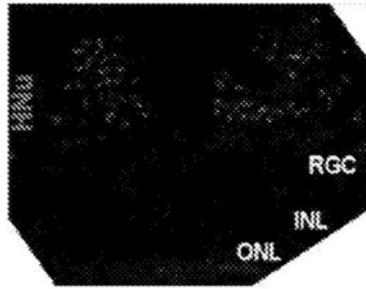


图5C

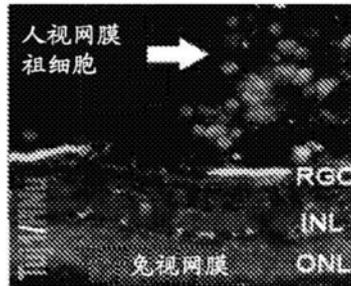


图5D

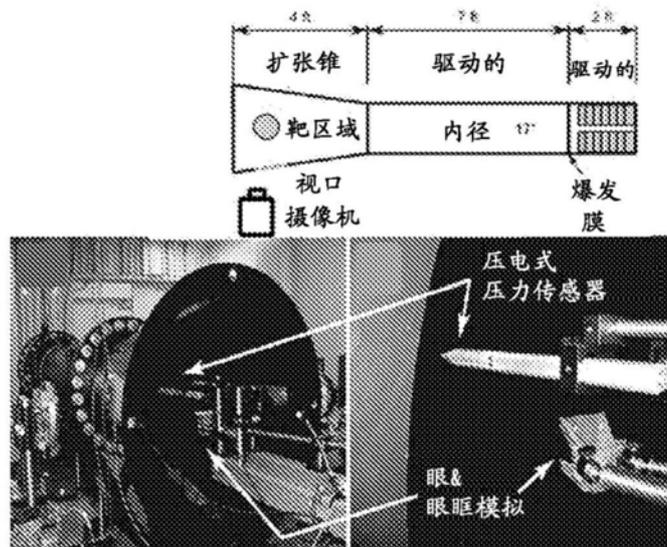


图6

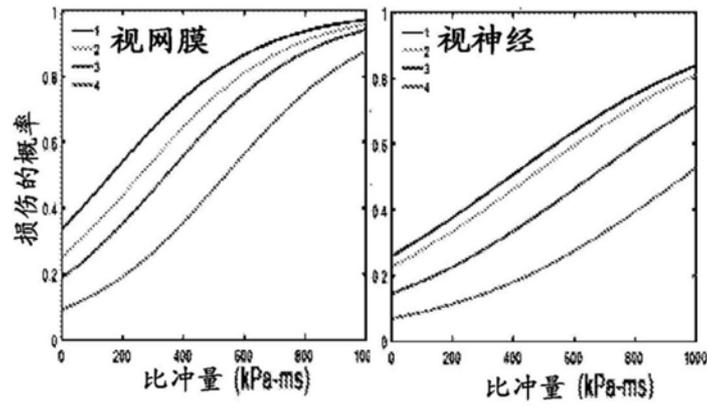


图 7A

图 7B

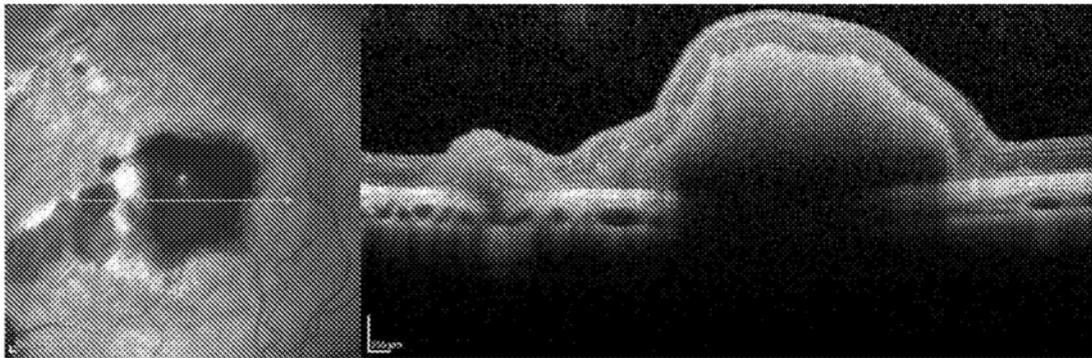


图8

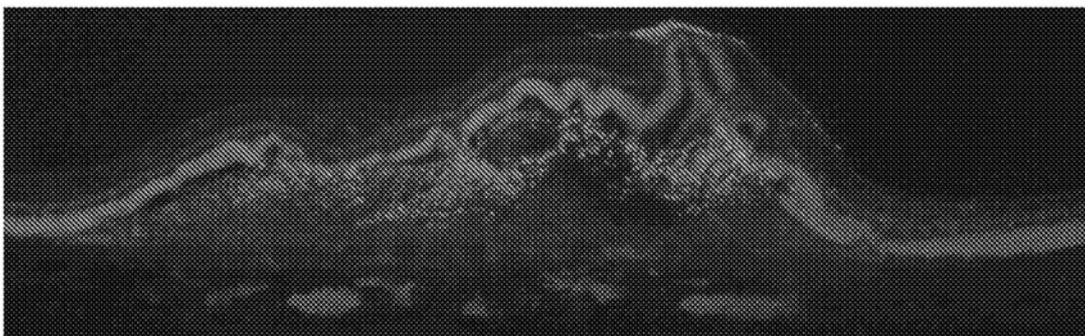
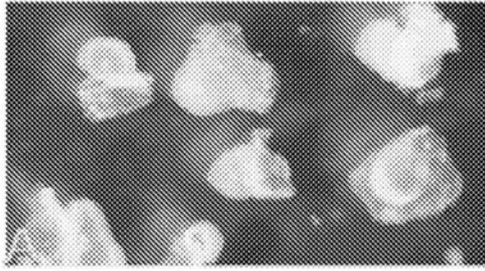
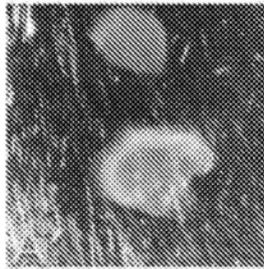


图9



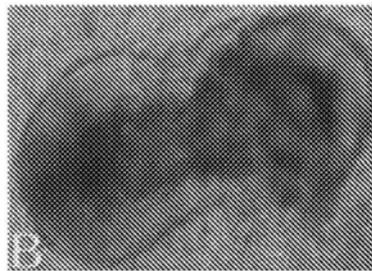
切割的类视网膜（原样的）

图10A



解剖的块

图10B



培养皿上的原始类器官

图10C



图10D



图10E

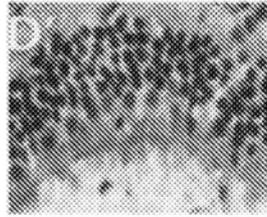


图10F

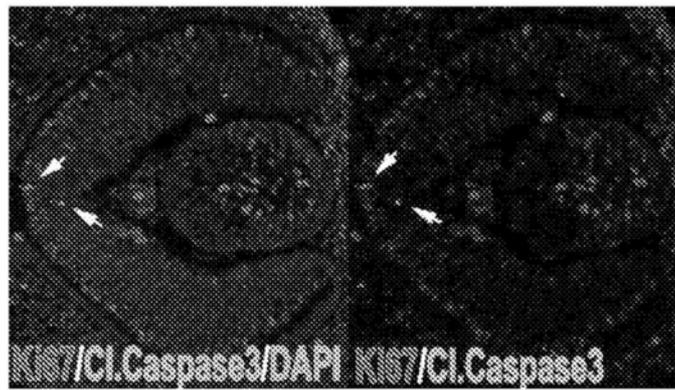


图11



图12A



图12B



图12C

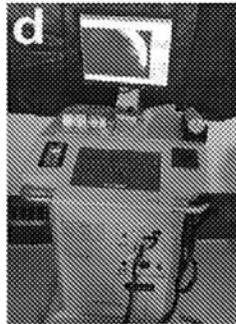


图12D

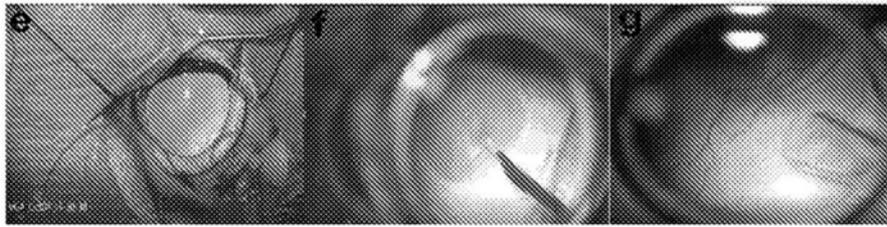


图 12E

图 12F

图 12G



图12H

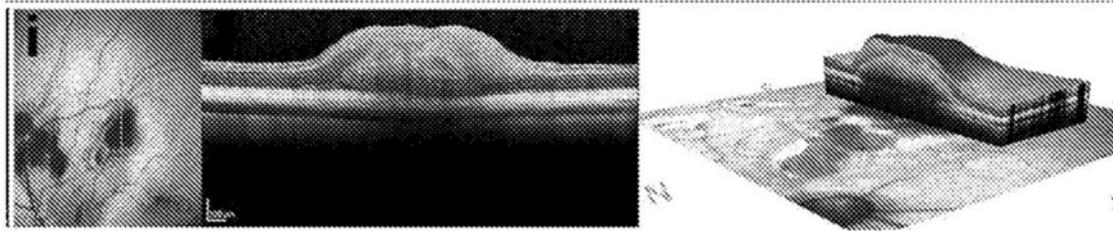


图 12I

图 12J

图 12K



图13A

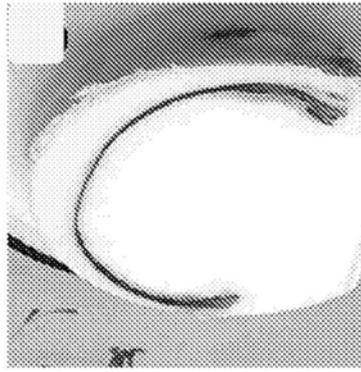


图13B

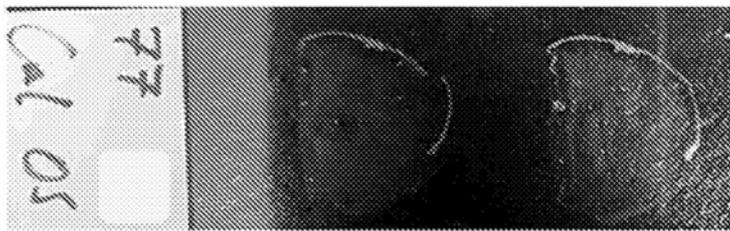


图13C

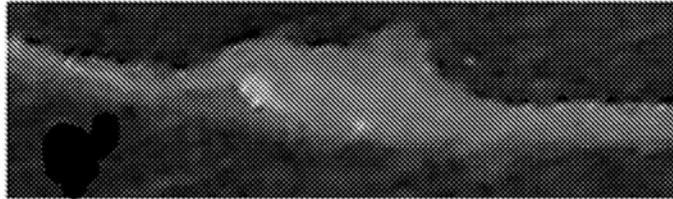


图13D

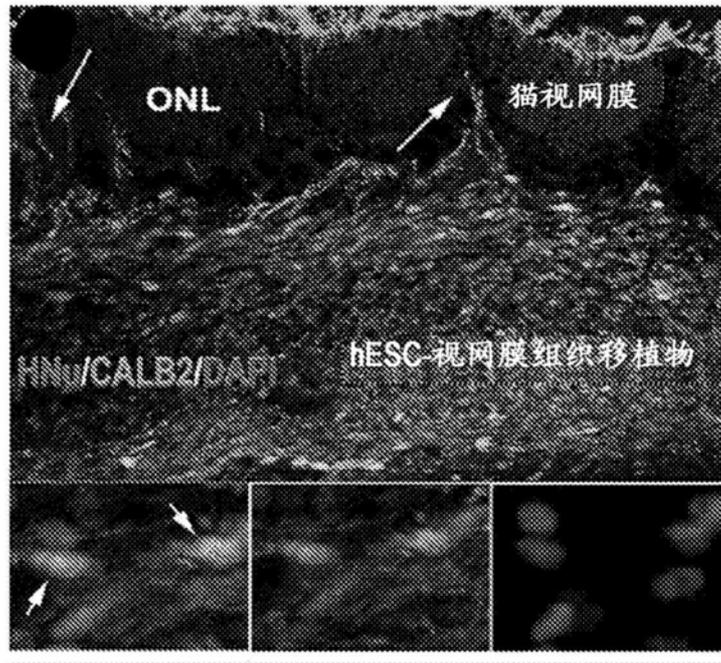


图13E



图13F



图13G

图13H

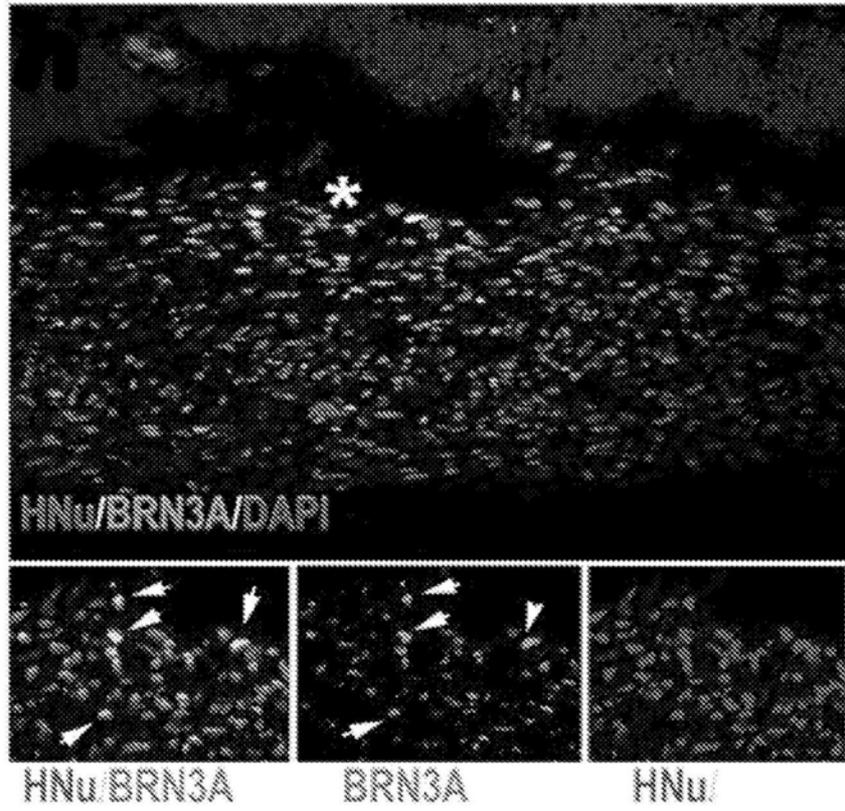


图13I

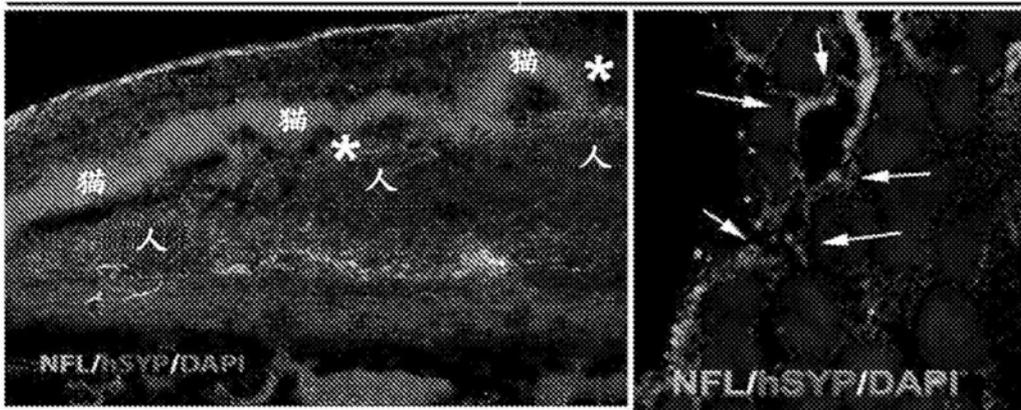


图13J

图13K

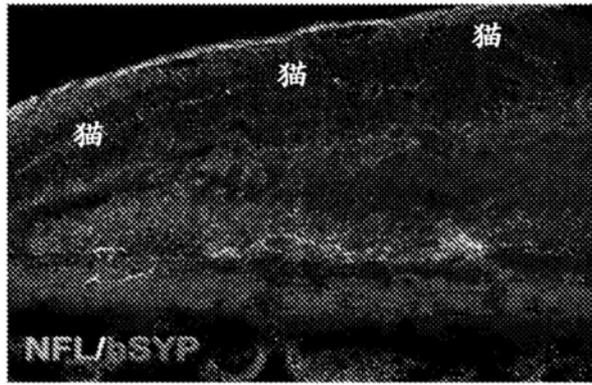


图13L



图13M

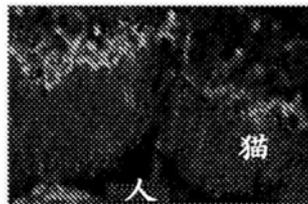


图14A



图14B



图14C

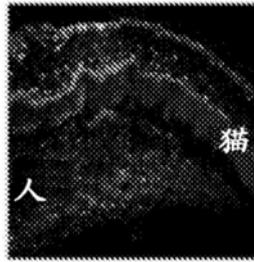


图14D

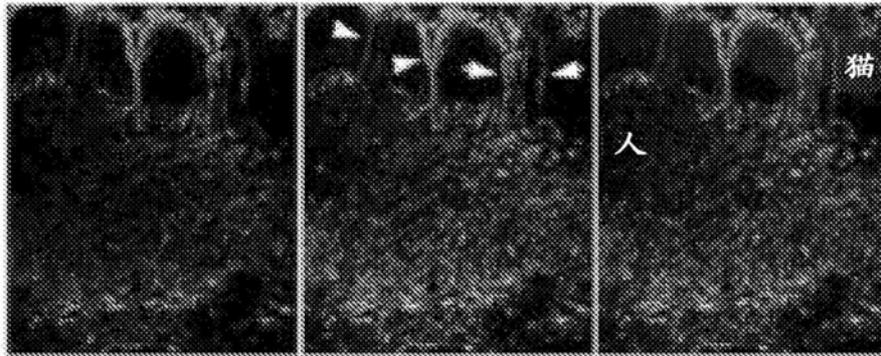


图15A

图15B

图15C

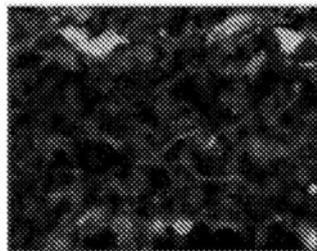


图15D

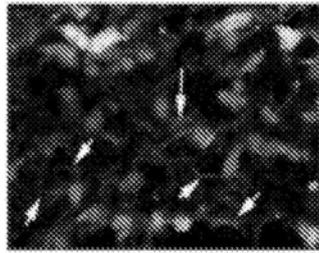


图15E



图16A

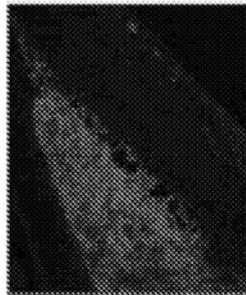


图16B



图16C

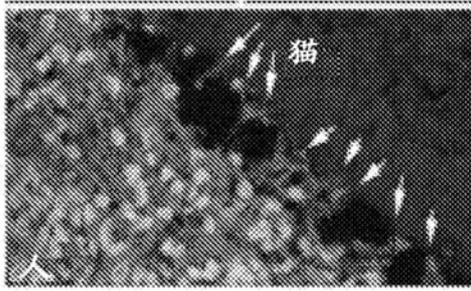


图16D



图16E

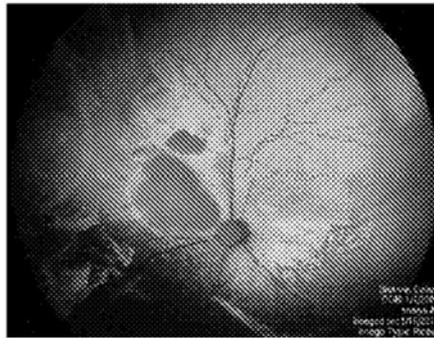
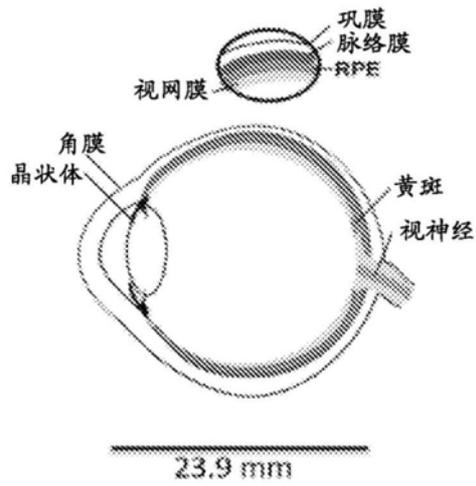
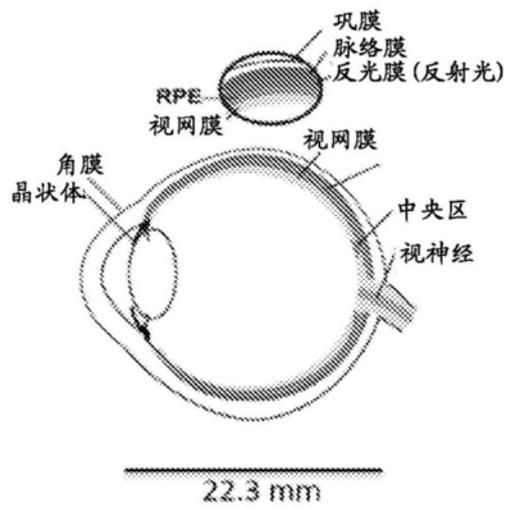


图17



人眼

图18A



猫眼

图18B

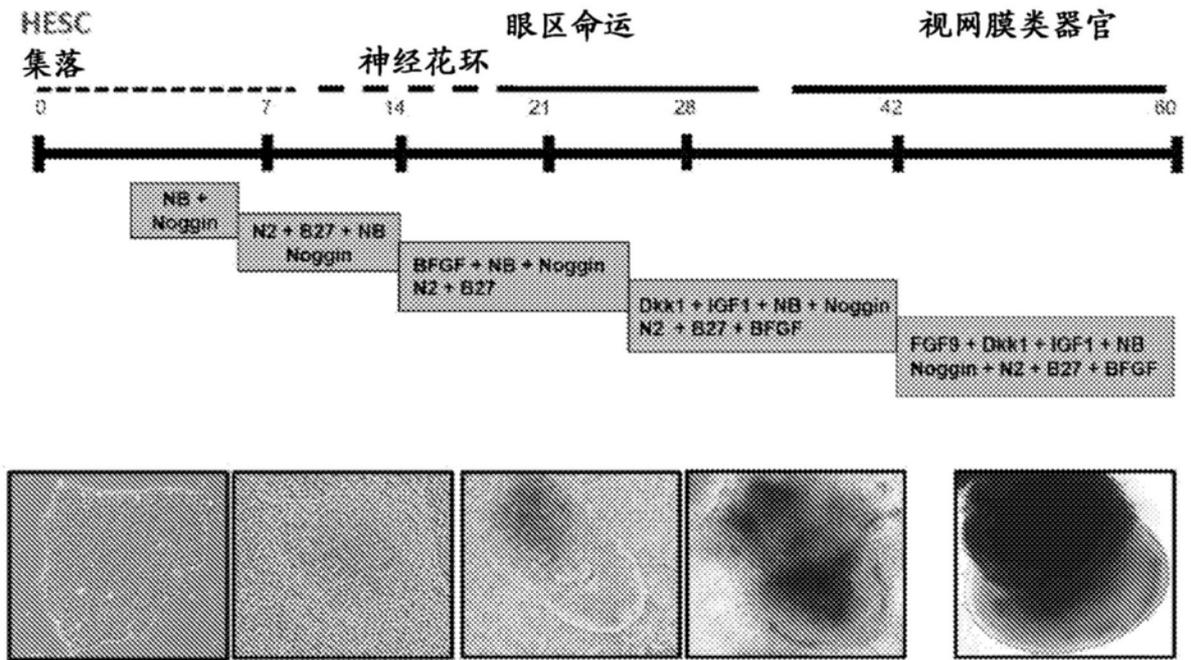


图19

感光细胞



图20A

视网膜祖细胞



图20B

感光细胞

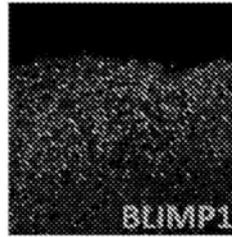


图20C

感光细胞

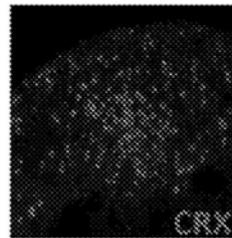


图20D

RPE



图20E

有丝分裂



图20F

感光细胞

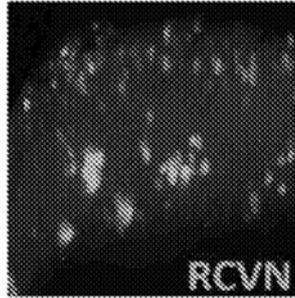


图20G

神经节

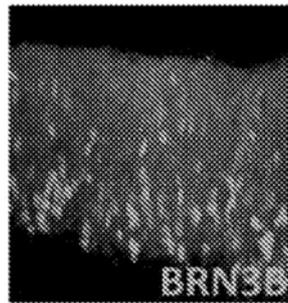


图20H

无长突神经细胞

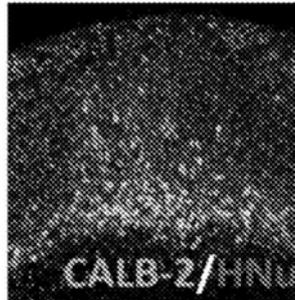


图20I

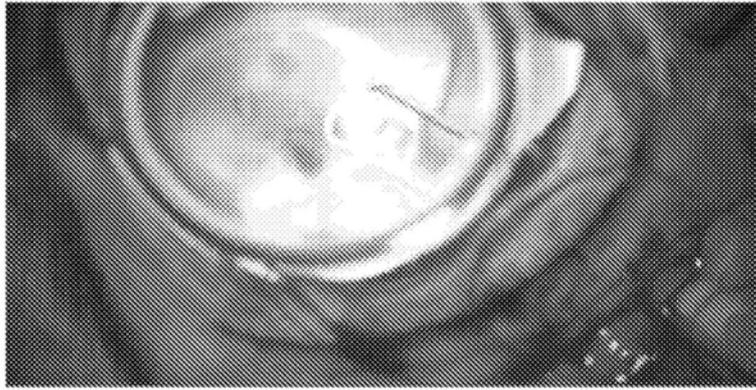


图21

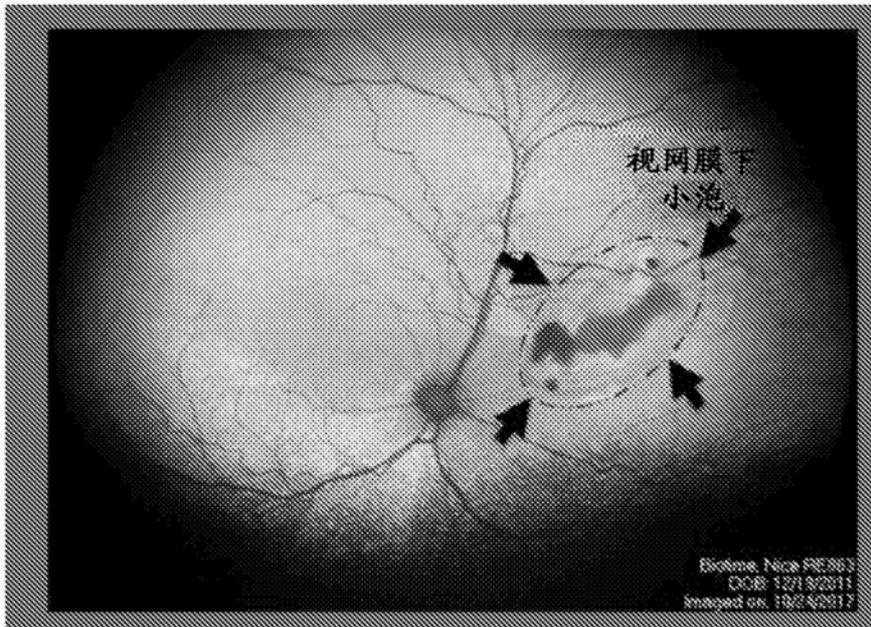


图22



图23

[+]泼尼松,[-]环孢菌素A

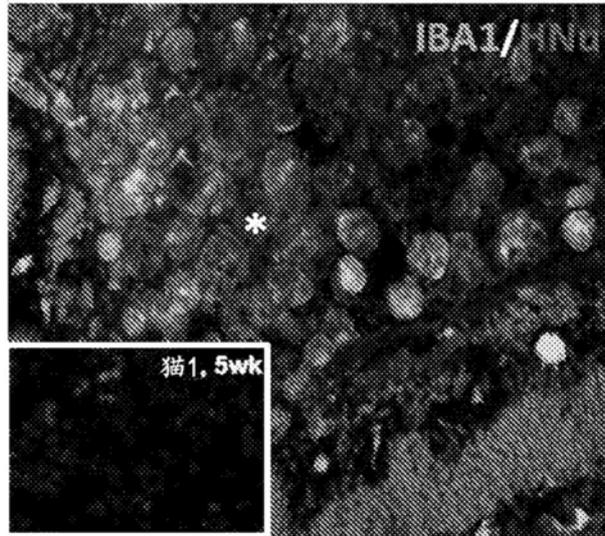


图24

[+]泼尼松,[-]环孢菌素A

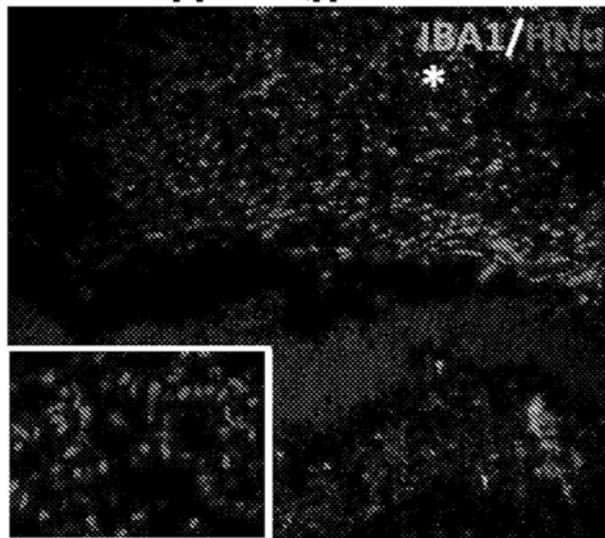


图25

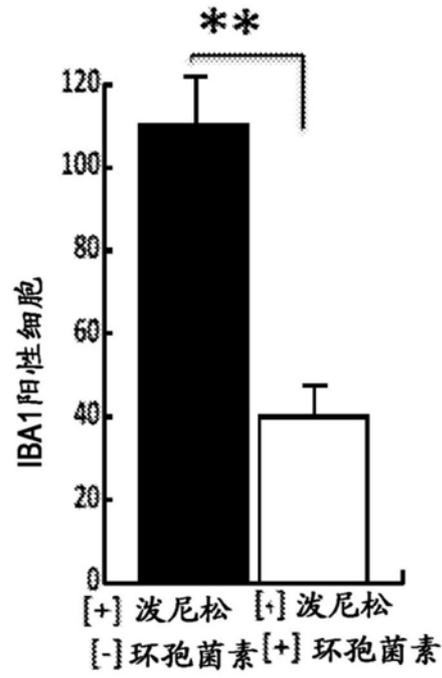


图26

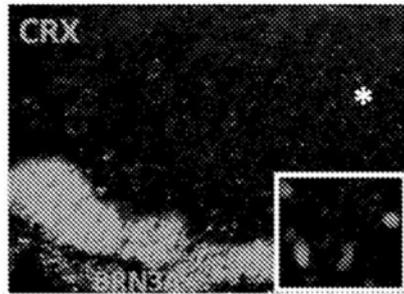


图27A

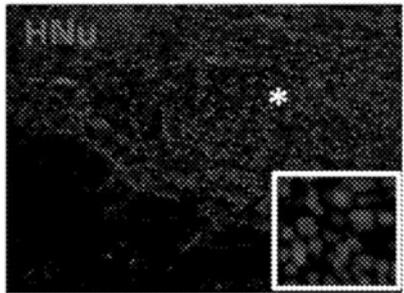


图27B

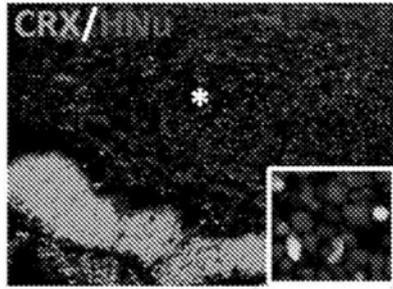


图27C

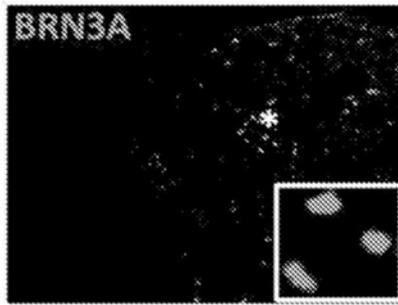


图28A

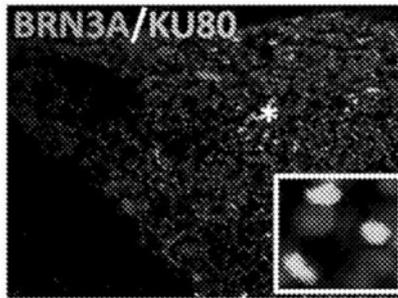


图28B

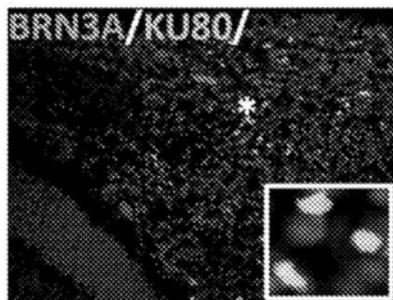


图28C

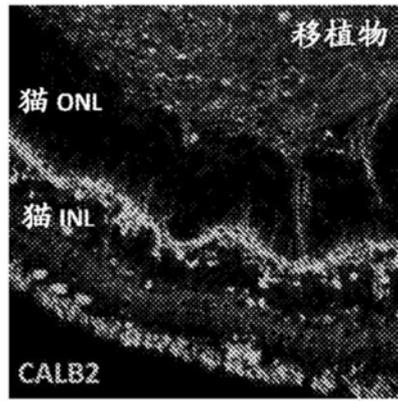


图29A

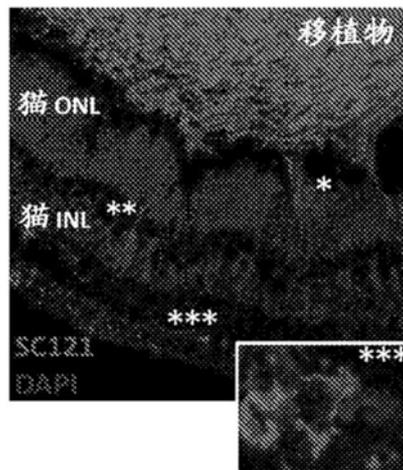


图29B

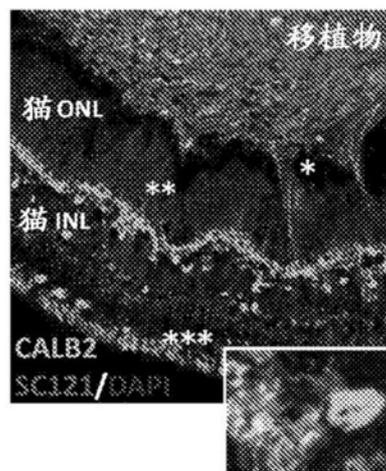


图29C

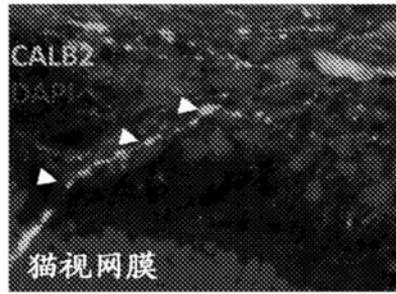


图30A



图30B

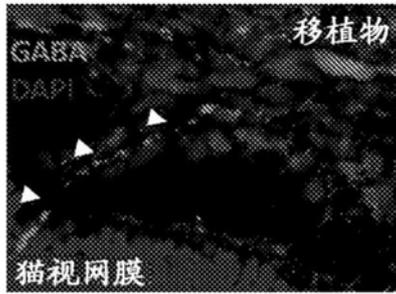


图30C

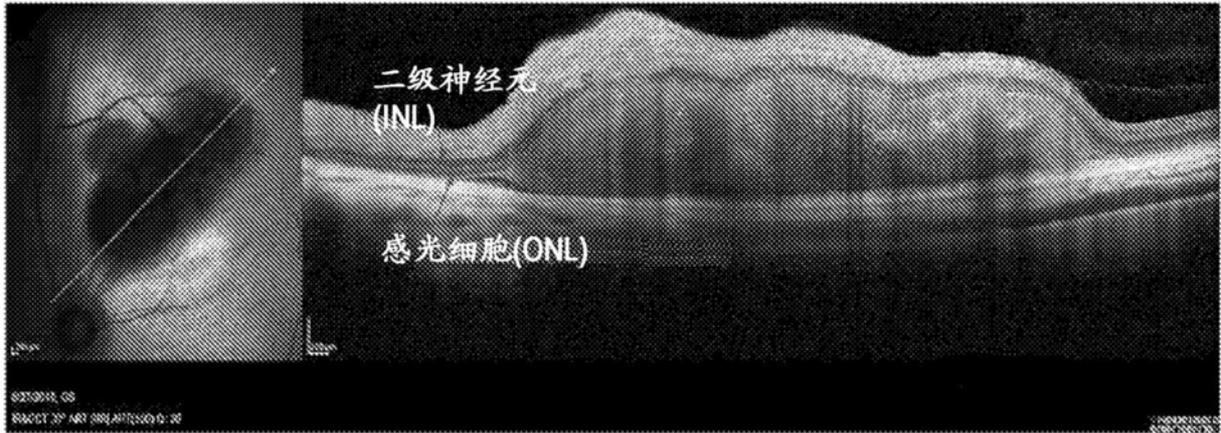


图31A

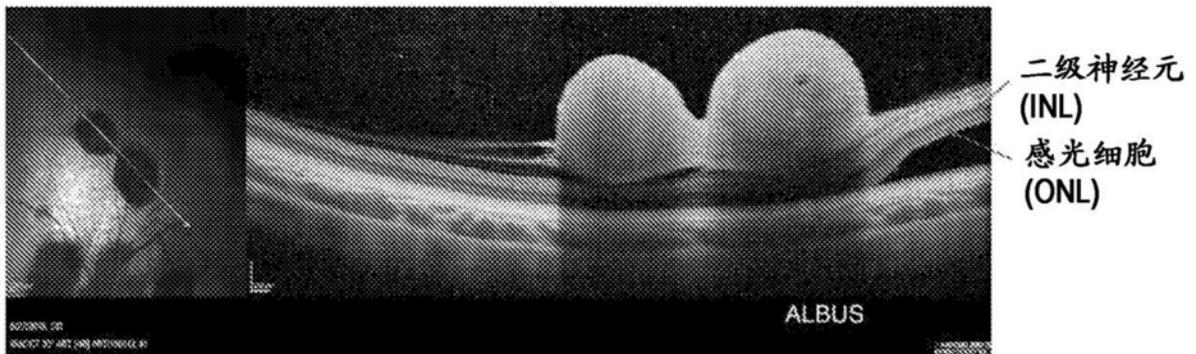


图31B

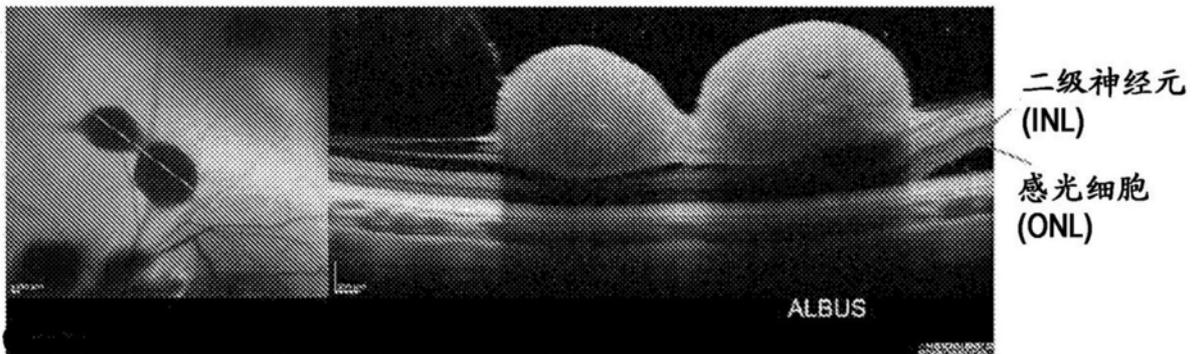


图31C

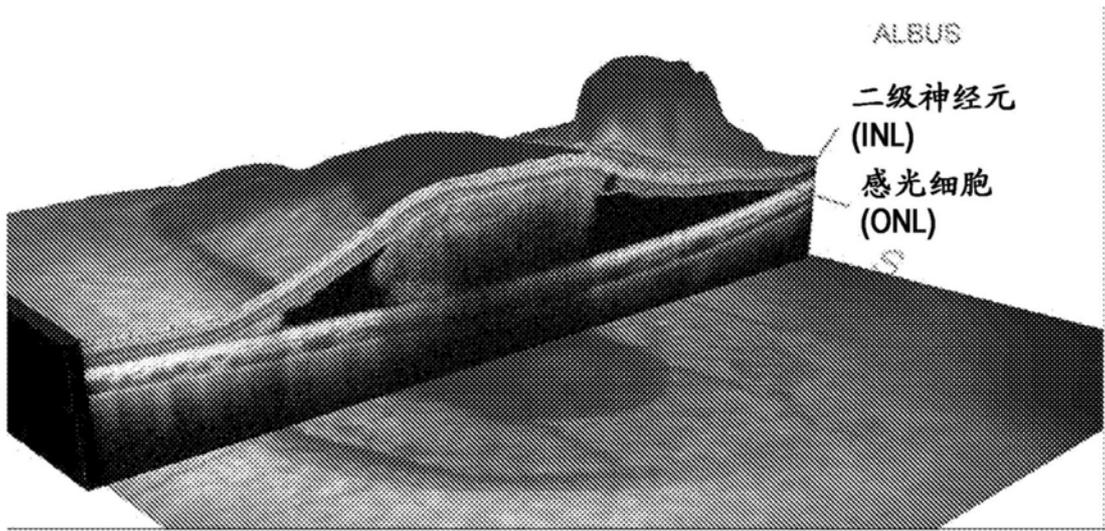


图31D

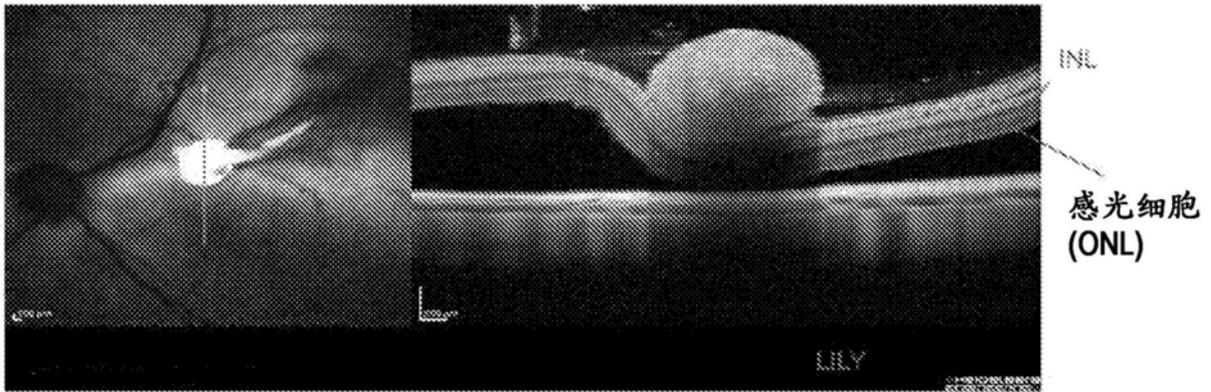


图31E



图31F

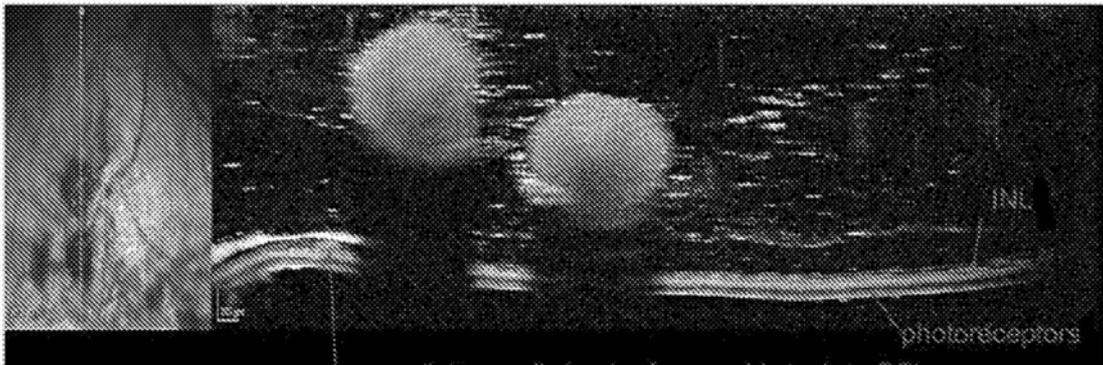


图31G

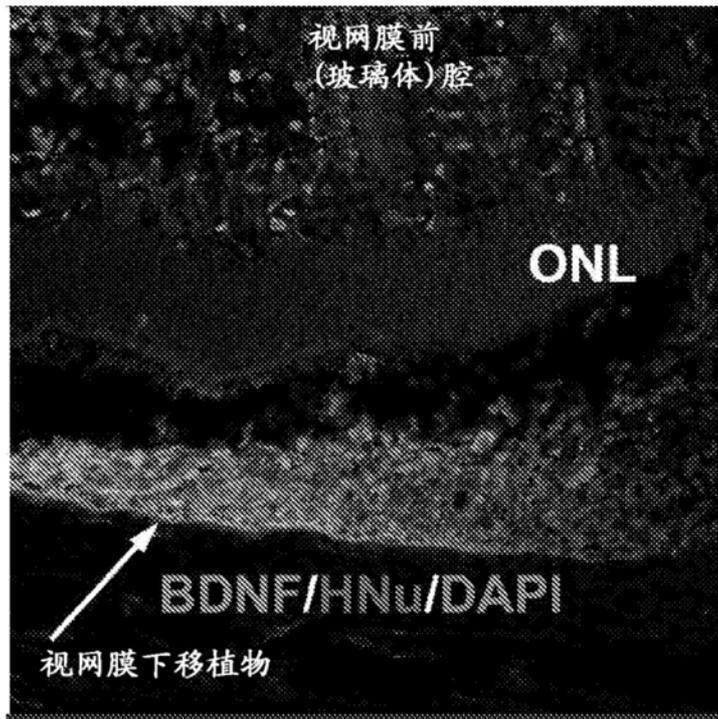


图32