

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291328** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.08.29

(51) Int. Cl. *C12N 5/079* (2010.01)
A61K 35/12 (2015.01)
G01N 33/48 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.28

(54) **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ**

(31) **62/928,125**

(32) **2019.10.30**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/057654**

(87) **WO 2021/086911 2021.05.06**

(71) Заявитель:

**АСТЕЛЛАС ИНСТИТЮТ ФОР
РИДЖЕНЕРЭЙТИВ МЕДСИН (US)**

(72) Изобретатель:

**Такаги Ясухиро, Ши Мэн-цзяджо, Чан
Ми Соок, Климанская Ирина (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к усовершенствованному способу получения в высокой степени чистых клеток пигментного эпителия сетчатки (RPE) путем дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток.

A1

202291328

202291328

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573999EA/042

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ

Родственные заявки

[1] В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/928125, поданной 30 октября 2019 г., которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

Предпосылки создания изобретения

[2] Пигментный эпителий сетчатки (RPE) представляет собой слой пигментированных клеток, расположенный непосредственно за нейросенсорной сетчаткой. Этот слой клеток питает зрительные клетки сетчатки и прикрепляется к подлежащей сосудистой оболочке (к слою кровеносных сосудов, расположенных ниже сетчатки) и к вышележащим зрительным клеткам сетчатки. RPE действует как фильтр, определяющий, какие питательные вещества достигают сетчатки из сосудистой оболочки глаза. Кроме того, RPE обеспечивает изолированное пространство между сетчаткой и сосудистой оболочкой глаза. Разрушение RPE нарушает метаболизм сетчатки, вызывая ее истончение. Истончение сетчатки может иметь серьезные последствия. Так, например, истончение сетчатки может вызвать «сухую» дегенерацию желтого пятна, а также может приводить к неправильному образованию кровеносных сосудов, что может вызвать «мокрую» дегенерацию желтого пятна.

[3] Учитывая важное значение RPE для поддержания хорошего зрения и правильного функционирования сетчатки, были предприняты значительные усилия по изучению RPE и разработке методологий получения клеток RPE *in vitro*. Клетки RPE, полученные *in vitro*, могут быть использованы для изучения развития RPE в целях выявления факторов, вызывающих разрушение RPE, или для идентификации агентов, которые могут быть использованы для стимуляции восстановления эндогенных клеток RPE. Кроме того, клетки RPE, полученные *in vitro*, могут сами по себе использоваться в качестве терапии для замены или восстановления всех или части поврежденных клеток RPE пациента. При таком применении, на основе клеток RPE может быть разработан подход к лечению дегенерации желтого пятна, а также других заболеваний и состояний, полностью или частично вызываемых повреждением RPE.

[4] Специалистам известны способы получения *in vitro* клеток пигментного эпителия сетчатки (RPE) путем индуцирования дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в присутствии фактора, индуцирующего дифференцировку в культуральной среде (см., например, Kuroda et al., PLoS One. 2012; 7(5): e37342). Однако, эти методы требуют проведения нескольких стадий, включающих культивирование адгезивных и плавающих клеток для получения высококонцентрированной популяции клеток RPE. Эти известные способы также требуют проведения стадии очистки.

[5] Кроме того, при применении общеизвестных методов, если клетки RPE происходят от плюрипотентных стволовых клеток, то клетки, отличающиеся от клеток-

мишеней, обычно получают одновременно. Следовательно, с применением этих методов можно получить только часть клеток RPE, индуцированных в контейнере для культивирования. Кроме того, на чистоту полученных клеток RPE в значительной степени влияет техника экспериментатора, что делает эти методы непригодными для получения чистой популяции клеток RPE за короткий промежуток времени.

[6] В соответствии с этим, необходимо разработать простой и эффективный способ получения в высокой степени чистых клеток RPE из плюрипотентных стволовых клеток.

Сущность изобретения

[7] Настоящее изобретение относится к усовершенствованному способу получения пигментного эпителия сетчатки (RPE) из плюрипотентных стволовых клеток, таких как стволовые клетки человеческого эмбриона (hES). В частности, настоящее изобретение основано на обнаружении стадий дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в клетки RPE, когда предшественники RPE могут быть выделены, частично очищены, а затем дифференцированы в зрелые клетки RPE с минимальным отбором клеток вручную или без него. Как описано в настоящей заявке, после инициации дифференцировки плюрипотентных клеток, авторами настоящего изобретения были определены моменты времени в процессе культивирования, когда имеется высокий процент кластеров клеток-предшественников RPE (например, идентифицированных как PAX6/MITF-позитивные клетки), которые сохраняются вместе с этими клетками. Таким образом, описанные здесь способы включают обработку кластеров клеток-предшественников RPE реагентом для диссоциации, таким как коллагеназа или диспаза, которые вызывают отсоединение клеток в кластерах, с последующим фракционированием кластеров по размеру и последующим субкультивированием клеток для получения клеток RPE. Способы согласно изобретению являются одновременно простыми и эффективными и позволяют получить культуры клеток RPE, которые в некоторых вариантах осуществления изобретения, являются по существу чистыми.

[8] В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), где указанный способ включает: (i) получение клеточных кластеров PAX6⁺/MITF⁺-клеток-предшественников RPE и диссоциацию клеточных кластеров на отдельные клетки; (ii) культивирование отдельных клеток в среде для дифференцировки так, чтобы клетки дифференцировались в клетки RPE; и (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii); и тем самым получение популяции клеток RPE.

[9] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), где указанный способ включает: (i) получение клеточных кластеров PAX6⁺/MITF⁺-клеток-предшественников RPE; (ii) культивирование клеточных кластеров в среде для дифференцировки, так чтобы клетки дифференцировались в клетки RPE; и (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii); и тем самым получение популяции клеток RPE. В любом из вариантов осуществления изобретения, PAX6⁺/MITF⁺-клетки-предшественники RPE могут быть получены из популяции плюрипотентных стволовых клеток.

[10] В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), где указанный способ включает: (i) культивирование популяции плюрипотентных стволовых клеток в первой среде для дифференцировки так, чтобы клетки дифференцировались в клетки-предшественники RPE; (ii) диссоциацию клеток-предшественников RPE, фракционирование клеток для сбора кластеров клеток-предшественников RPE; диссоциацию кластеров клеток-предшественников RPE на отдельные клетки и субкультивирование отдельных клеток во второй среде для дифференцировки так, чтобы клетки дифференцировались в клетки RPE; и (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii) и тем самым получение популяции клеток RPE. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), где указанный способ включает: (i) культивирование популяции плюрипотентных стволовых клеток в первой среде для дифференцировки так, чтобы клетки дифференцировались в клетки-предшественники RPE; (ii) диссоциацию клеток-предшественников RPE, фракционирование клеток для сбора кластеров клеток-предшественников RPE; и субкультивирование собранных кластеров клеток-предшественников RPE во второй среде для дифференцировки, так, чтобы эти клетки дифференцировались в клетки RPE; и (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii), с получением популяции клеток RPE. В одном из вариантов осуществления изобретения, клетки-предшественники RPE являются позитивными по PAX6/MITF. В другом варианте осуществления изобретения, перед стадией (i), плюрипотентные стволовые клетки культивируют на фидерных клетках в среде, поддерживающей плюрипотентность. В другом варианте осуществления изобретения, перед стадией (i), плюрипотентные стволовые клетки культивируют без фидеров в среде, поддерживающей плюрипотентность. В одном варианте осуществления изобретения, в среду, поддерживающую плюрипотентность, добавляют bFGF.

[11] Эти способы могут дополнительно включать сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii) в любом из описанных здесь способов, путем диссоциации клеток RPE, фракционирования клеток RPE для сбора кластеров клеток RPE, диссоциации кластеров клеток RPE на отдельные клетки RPE и культивирования отдельных клеток RPE. В другом варианте осуществления изобретения, этот способ может дополнительно включать сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii) в любом из описанных здесь способов, путем диссоциации клеток RPE, сбора кластеров клеток RPE и селективного отбора кластеров клеток RPE. Этот способ может дополнительно включать диссоциацию селективно отобранных кластеров клеток RPE на отдельные клетки RPE и культивирование отдельных клеток RPE.

[12] В любом из вариантов осуществления изобретения, способ может дополнительно включать размножение клеток RPE. Клетки RPE могут быть размножены путем культивирования клеток в поддерживающей среде с добавлением FGF. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE культивируют в поддерживающей среде, содержащей FGF, в течение первых 1, 2 или 3 дней пролиферации RPE при каждом

пассаже с последующим культивированием клеток RPE в поддерживающей среде, не содержащей FGF. В одном варианте осуществления изобретения, FGF добавляют до слияния клеток RPE. В другом варианте осуществления изобретения, клетки RPE пассируют до двух раз.

[13] В любом из вариантов осуществления изобретения, любую из стадий диссоциации осуществляют путем обработки клеток реагентом для диссоциации. В одном варианте осуществления изобретения, реагент для диссоциации выбирают из группы, состоящей из коллагеназы (такой как коллагеназа I или коллагеназа IV), аккутазы, хелатообразующего агента (например, раствора для диссоциации на основе EDTA), трипсина, диспазы или любых их комбинаций.

[14] В любом из вариантов осуществления изобретения, плюрипотентные стволовые клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки человека или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека. В любом из вариантов осуществления изобретения, популяция плюрипотентных стволовых клеток представляет собой эмбрионидные тельца. В любом из вариантов осуществления изобретения, клетки культивируют на фидерных клетках. В еще одном варианте осуществления изобретения, клетки культивируют в условиях отсутствия фидеров. В другом варианте осуществления изобретения, клетки культивируют в неадгезивной культуре. В другом варианте осуществления изобретения, клетки культивируют в адгезивной культуре.

[15] В одном варианте осуществления изобретения, средой для дифференцировки является EBDM. В другом варианте осуществления изобретения, среда для дифференцировки содержит один или более агентов для дифференцировки, выбранных из группы, состоящей из никотинамида, суперсемейства трансформирующего фактора- β (TGF β) (например, активина A, активина B и активина AB), нодального фактора, фактора, направленного против мюллеровского гормона (AMH), белков остеогенеза (BMP) (например, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 и BMP7, факторов роста и дифференцировки (GDF)), ингибитора пути WNT (например, SKI-7, DKK1), ингибитора пути TGF (например, LDN193189, Noggin), ингибитора пути BMP (например, SB431542), ингибитора сигнала «звуковой еж», ингибитора bFGF и ингибитора MEK (например, PD0325901). В другом варианте осуществления изобретения, среда для дифференцировки содержит никотинамид. В еще одном варианте осуществления изобретения, среда для дифференцировки содержит активин. В одном варианте осуществления изобретения, первая и вторая среды для дифференцировки являются одинаковыми. В другом варианте осуществления изобретения, первая и вторая среда для дифференцировки отличаются друг от друга. В еще одном варианте осуществления изобретения, первая и вторая среды для дифференцировки представляют собой EBDM. В одном варианте осуществления изобретения, первая среда для дифференцировки содержит один или более агентов для дифференцировки, выбранных из группы, состоящей из никотинамида, суперсемейства трансформирующего фактора- β (TGF β) (например, активина A, активина B и активина AB), нодального фактора, фактора, направленного против мюллеровского гормона

(AMH), белков остеогенеза (BMP) (например, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 и BMP7, факторов роста и дифференцировки (GDF)), ингибитора пути WNT (например, SKI-7, DKK1), ингибитора пути TGF (например, LDN193189, Noggin), ингибитора пути BMP (например, SB431542), ингибитора сигнала «звуковой еж», ингибитора bFGF и ингибитора MEK (например, PD0325901). В одном варианте осуществления изобретения, вторая среда для дифференцировки содержит один или более агентов для дифференцировки, выбранных из группы, состоящей из никотинамида, суперсемейства трансформирующего фактора- β (TGF β) (например, активина А, активина В и активина АВ), нодального фактора, фактора, направленного против мюллеровского гормона (AMH), белков остеогенеза (BMP) (например, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 и BMP7, факторов роста и дифференцировки (GDF)), ингибитора пути WNT (например, SKI-7, DKK1), ингибитора пути TGF (например, LDN193189, Noggin), ингибитора пути BMP (например, SB431542), ингибитора сигнала «звуковой еж», ингибитора bFGF и ингибитора MEK (например, PD0325901). В другом варианте осуществления изобретения, первая среда для дифференцировки содержит никотинамид. В другом варианте осуществления изобретения, вторая среда для дифференцировки содержит активин. В любом из вариантов осуществления изобретения, среда для дифференцировки может дополнительно содержать гепарин и/или ингибитор ROCK.

[16] В любом из вариантов осуществления изобретения, кластеры клеток-предшественников RPE имеют размер от приблизительно 40 мкм до приблизительно 200 мкм. В другом варианте осуществления изобретения, кластеры клеток-предшественников RPE имеют размер от приблизительно 40 мкм до приблизительно 100 мкм.

[17] В любом из вариантов осуществления изобретения, на стадии (ii), клетки культивируют на внеклеточном матриксе, выбранном из группы, включающей ламинин или его фрагмент, фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген и желатин. В одном варианте осуществления изобретения, внеклеточный матрикс представляет собой ламинин или его фрагмент. В другом варианте осуществления изобретения, ламинин выбран из ламинина-521 и ламинина-511. В другом варианте осуществления изобретения, ламинин представляет собой iMatrix511.

[18] В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, продолжительность стадии культивирования популяции плюрипотентных стволовых клеток в первой среде для дифференцировки составляет от приблизительно 1 недели до приблизительно 12 недель. В другом варианте осуществления изобретения, продолжительность стадии культивирования популяции плюрипотентных стволовых клеток в первой среде для дифференцировки составляет по меньшей мере приблизительно 3 недели. В другом варианте осуществления изобретения, продолжительность стадии культивирования популяции плюрипотентных стволовых клеток в первой среде для дифференцировки составляет от приблизительно 6 до приблизительно 10 недель. В любом из вариантов осуществления изобретения, продолжительность культивирования на стадии (ii) составляет от приблизительно 1 недели до приблизительно 8 недель. В другом

варианте осуществления изобретения, продолжительность культивирования на стадии (ii) составляет по меньшей мере приблизительно 3 недели. В еще одном варианте осуществления изобретения, продолжительность культивирования на стадии (ii) составляет приблизительно 6 недель.

[19] В любом из вариантов осуществления изобретения, кластеры клеток-предшественников RPE или отдельные клетки-предшественники RPE субкультивируют на внеклеточном матриксе, выбранном из группы, включающей ламинин, фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген и желатин. В одном варианте осуществления изобретения, внеклеточный матрикс содержит ламинин или его фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения, ламинин или его фрагмент выбирают из ламинина-521 и ламинина-511.

[20] В любом из вариантов осуществления изобретения, отдельные клетки RPE культивируют в среде, которая поддерживает рост или дифференцировку RPE. В другом варианте осуществления изобретения, отдельные клетки RPE культивируют на внеклеточном матриксе, выбранном из группы, включающей ламинин или его фрагмент, фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген и желатин. В одном варианте осуществления изобретения, внеклеточный матрикс представляет собой желатин. В еще одном варианте осуществления изобретения, внеклеточный матрикс представляет собой ламинин или его фрагмент.

[21] В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция клеток RPE включает по существу очищенную популяцию клеток RPE. Так, например, композиция клеток RPE может содержать менее, чем 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее 1% клеток, отличающихся от клеток RPE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по существу очищенная популяция клеток RPE представляет собой популяцию, в которой клетки RPE составляют по меньшей мере приблизительно 75% клеток в популяции. В других вариантах осуществления изобретения, по существу очищенная популяция клеток RPE представляет собой популяцию, в которой клетки RPE составляют по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97,5%, 98%, 99% или даже более 99% клеток в популяции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, уровни пигментации клеток RPE в клеточной культуре являются однородными. В других вариантах осуществления изобретения, пигментация клеток RPE в клеточной культуре является гетерогенной. Клеточная культура согласно изобретению может содержать по меньшей мере приблизительно 10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или по меньшей мере приблизительно 10^{10} клеток RPE. В любом из вариантов осуществления изобретения, клетки RPE представляют собой клетки RPE человека.

[22] В любом из вариантов осуществления изобретения, кластеры клеток RPE имеют размер от приблизительно 40 мкм до 200 мкм. В другом варианте осуществления изобретения, кластеры клеток RPE имеют размер от приблизительно 40 мкм до 100 мкм.

[23] В любом из вариантов осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют

(на уровне мРНК и/или белка) один или несколько (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11) следующих генов: RPE65, CRALBP, PEDF, бестрофина (BEST1), MITF, OTX2, PAX2, PAX6, премеланосомного белка (PMEL или gp-100), тирозиназы и ZO1. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют бестрофин, PMEL, CRALBP, MITF, PAX6 и ZO1. В другом варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют бестрофин, PAX6, MITF и RPE65. В другом варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют MITF и по меньшей мере один ген, выбранный из бестрофина и PAX6. В некоторых вариантах осуществления, экспрессию гена оценивают по экспрессии мРНК. В других вариантах осуществления изобретения, экспрессию гена оценивают по экспрессии белка.

[24] В любом из вариантов осуществления изобретения, в клетках RPE в основном не наблюдаются экспрессия одного или нескольких маркеров стволовых клеток. Маркеры стволовых клеток могут быть выбраны из группы, состоящей из OCT4, NANOG, REX1, щелочной фосфатазы, SOX2, TDGF-1, DPPA-2, DPPA-4, стадийспецифического эмбрионального антигена (SSEA)-3 и SSEA-4, антигена отторжения опухоли (TRA)-1-60 и TRA-1-80. В одном варианте осуществления изобретения, в клетках RPE в основном отсутствует экспрессия OCT4, SSEA4, TRA-1-81 и щелочной фосфатазы. В другом варианте осуществления изобретения, в клетках RPE в основном отсутствует экспрессия OCT4, NANOG и SOX2.

[25] В любом из вариантов осуществления изобретения, клетки RPE подвергают криоконсервации после сбора. В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих аспектов изобретения, клетки RPE замораживают для хранения. Клетки могут быть заморожены любым подходящим способом, известным специалистам в данной области, например, посредством криогенного замораживания, и могут быть заморожены при любой температуре, подходящей для хранения клеток. В одном варианте осуществления изобретения, криоконсервированная композиция содержит клетки RPE и криоконсервант. При этом, может быть использован любой криоконсервант, известный специалистам в данной области, и он может включать один или более из ДМСО (диметилсульфоксида), этиленгликоля, глицерина, 2-метил-2-4-пентандиола (MPD), пропиленгликоля и сахарозы. В одном варианте осуществления изобретения, криоконсервант содержит от приблизительно 5% до приблизительно 50% ДМСО и от приблизительно 30% до приблизительно 95% сыворотки, где сыворотка может представлять собой, но необязательно, фетальную бычью сыворотку (FBS). В конкретном варианте осуществления изобретения, криоконсервант содержит приблизительно 90% FBS и приблизительно 10% ДМСО. В другом варианте осуществления изобретения, криоконсервант содержит от приблизительно 2% до приблизительно 5% ДМСО. В одном варианте осуществления изобретения, клетки могут быть заморожены приблизительно при температуре от -20°C до -196°C или при любой другой температуре, подходящей для хранения клеток. В одном варианте осуществления изобретения, клетки замораживают приблизительно при -80°C или приблизительно при -196°C. В другом варианте

осуществления изобретения, клетки замораживают при температуре приблизительно от -135°C до приблизительно -196°C . В конкретном варианте осуществления изобретения, клетки замораживают приблизительно при -135°C . В другом варианте осуществления изобретения, клетки могут быть заморожены в соответствии с протоколом автоматизированной медленной заморозки, при которой клетки охлаждаются постадийно под управлением компьютера до заданной температуры. Криогенно замороженные клетки хранят в соответствующих контейнерах так, чтобы снизить риск повреждения клеток и максимально увеличить вероятность того, что клетки выживут при оттаивании. В других вариантах осуществления изобретения, клетки RPE поддерживаются или транспортируются при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 37°C . В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE хранят или транспортируют при комнатной температуре, от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C , приблизительно при 4°C или приблизительно при 37°C .

[26] В некоторых вариантах осуществления любого из описанных выше способов, такой способ осуществляют в соответствии с действующей стандартной фармацевтической практикой (cGMP). В некоторых вариантах осуществления любого из описанных выше способов, плюрипотентные стволовые клетки, из которых дифференцируются клетки RPE, были получены в соответствии с действующей стандартной фармацевтической практикой (cGMP).

[27] Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей популяцию клеток RPE, полученных любым из описанных здесь способов. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных выше способов, этот способ применяют для получения композиции, содержащей по меньшей мере 10 клеток RPE, по меньшей мере 100 клеток RPE, по меньшей мере 1000 клеток RPE, по меньшей мере 1×10^4 клеток RPE, по меньшей мере 1×10^5 клеток RPE, по меньшей мере 5×10^5 клеток RPE, по меньшей мере 1×10^6 клеток RPE, по меньшей мере 5×10^6 клеток RPE, по меньшей мере 1×10^7 клеток RPE, по меньшей мере 2×10^7 клеток RPE, по меньшей мере 3×10^7 клеток RPE, по меньшей мере 4×10^7 клеток RPE, по меньшей мере 5×10^7 клеток RPE, по меньшей мере 6×10^7 клеток RPE по меньшей мере 7×10^7 клеток RPE, по меньшей мере 8×10^7 клеток RPE, по меньшей мере 9×10^7 клеток RPE, по меньшей мере 1×10^8 клеток RPE, по меньшей мере 2×10^8 клеток RPE, по меньшей мере 5×10^8 клеток RPE, по меньшей мере 7×10^8 клеток RPE, по меньшей мере 1×10^9 клеток RPE, по меньшей мере 1×10^{10} клеток RPE, по меньшей мере 1×10^{11} клеток RPE или по меньшей мере 1×10^{12} клеток RPE. В одном варианте осуществления изобретения, композиция содержит от приблизительно 1×10^8 до 1×10^{12} клеток RPE, от приблизительно 1×10^9 до 1×10^{11} клеток RPE или от приблизительно 5×10^9 до 1×10^{10} клеток RPE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество клеток RPE в композиции включает клетки RPE на различных уровнях зрелости. В других вариантах осуществления изобретения, количество клеток RPE в композиции означает количество зрелых клеток RPE.

[28] Настоящее изобретение также относится к способу лечения пациента с

заболеванием сетчатки или с риском заболевания сетчатки, где указанный способ включает введение эффективного количества композиции, содержащей популяцию клеток RPE, полученных любым из описанных здесь способов, или фармацевтической композиции, содержащей популяцию клеток RPE, полученную любым из описанных здесь способов, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте осуществления изобретения, заболевание сетчатки выбрано из группы, включающей дегенерацию сетчатки, хориоидеремию, диабетическую ретинопатию, возрастную дегенерацию желтого пятна (сухую или мокрую), отслоение сетчатки, пигментный ретинит, болезнь Штаргардта, ангиоидные полосы, миопическую дегенерацию желтого пятна и глаукому. В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанный способ также включает приготовление клеток RPE для получения композиции клеток RPE, подходящей для трансплантации.

[29] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики состояния, характеризующегося дегенерацией сетчатки, где указанный способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества композиции, содержащей клетки RPE, где указанные клетки RPE были получены из человеческих эмбриональных стволовых клеток или других плюрипотентных стволовых клеток. Состояния, характеризующиеся дегенерацией сетчатки, включают, например, дистрофию желтого пятна Штаргардта, возрастную дегенерацию желтого пятна (сухую или мокрую), диабетическую ретинопатию и пигментный ретинит. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки RPE получают из плюрипотентных стволовых клеток человека с применением одного или более описанных здесь способов.

[30] В некоторых вариантах осуществления изобретения, препарат предварительно подвергают криоконсервации и размораживают перед трансплантацией.

[31] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ лечения дополнительно включает введение одного или более иммунодепрессантов. В одном варианте осуществления изобретения, иммунодепрессант может содержать одно или более из: поликлонального антитела против лимфоцитарного глобулина (ALG), поликлонального антитела против тимоцитарного глобулина (ATG), азатиоприна, BASILIXIMAB® (антитела против рецептора IL-2Ra), циклоспорина (циклоспорина А), DACLIZUMAB® (антитела против рецептора IL-2Ra), эверолимуса, микофеноловой кислоты, RITUXIMAB® (антитела против CD20), сиролимуса, такролимуса и микофенолята мофетила (MMF). При использовании иммунодепрессантов, они могут быть введены системно или местно, и они могут быть введены до, во время или после введения клеток RPE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммуносупрессорную терапию проводят в течение нескольких недель, месяцев, лет или в течение неопределенного периода времени после введения клеток RPE. В других вариантах осуществления изобретения, способ лечения не требует введения иммунодепрессантов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ лечения включает введение однократной дозы клеток RPE. В других вариантах осуществления

изобретения, способ лечения включает курс терапии, при котором клетки RPE вводят несколько раз в течение некоторого периода времени. Репрезентативные курсы лечения могут включать еженедельное, двухнедельное, ежемесячное, ежеквартальное, двухгодичное или ежегодное лечение. В качестве альтернативы, лечение может проходить поэтапно, при этом сначала требуется введение дробных доз (например, ежедневно в течение первой недели), а затем требуется введение меньшего количества доз и с меньшей частотой. При этом, рассматривается множество схем лечения.

[32] В некоторых вариантах осуществления изобретения, композицию, содержащую клетки RPE, трансплантируют в виде суспензии, матрикса или субстрата. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композицию вводят путем инъекции в субретинальное пространство глаза. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидууму вводят от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^6 клеток RPE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ дополнительно включает стадию мониторинга эффективности лечения или профилактики путем оценки ответов на электроретинограмме, порога остроты или порога яркости зрения у индивидуума. Этот способ может также включать мониторинг эффективности лечения или профилактики путем мониторинга иммуногенности клеток или миграции клеток в глазах. В других вариантах осуществления изобретения, эффективность лечения может быть оценена путем одной или более визуальной оценки результата лечения, проводимой по биомикроскопической фотографии под щелевой лампой, фотографии глазного дна, 1VFA и SD-OCT, а также по максимально скорректированной остроте зрения (BCVA). Этот способ позволяет улучшить скорректированную остроту зрения (BCVA) и/или увеличить число букв, читаемых на диаграмме оценки остроты зрения, такой как диаграмма для исследования диабетической ретинопатии на ранней стадии лечения (ETDRS).

[33] В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения или профилактики состояния, характеризующегося дегенерацией сетчатки, где указанная композиция содержит эффективное количество клеток RPE, где клетки RPE происходят от эмбриональных стволовых клеток человека или других плюрипотентных стволовых клеток. Фармацевтическая композиция может быть приготовлена в фармацевтически приемлемом носителе в зависимости от способа введения. Так, например, препарат может быть приготовлен для введения в субретинальное пространство глаза. Композиция может содержать по меньшей мере 10^3 , 10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 или 10^7 клеток RPE. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция может содержать по меньшей мере 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , $1,5 \times 10^5$, 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 клеток RPE.

[34] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки RPE готовят в фармацевтической композиции, содержащей клетки RPE и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к фармацевтическому препарату, содержащему

человеческие клетки RPE, происходящие от человеческих эмбриональных стволовых клеток или других плюрипотентных стволовых клеток. Фармацевтические препараты могут содержать по меньшей мере приблизительно 10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , $1,5 \times 10^5$, 2×10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или приблизительно 10^{10} клеток hRPE.

[35] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу скрининга для идентификации агентов, которые модулируют выживаемость клеток RPE. Так, например, клетки RPE, полученные из эмбриональных стволовых клеток человека, могут быть использованы для скрининга агентов, способствующих выживанию RPE. Идентифицированные агенты могут быть использованы отдельно или в комбинации с клетками RPE как часть схемы лечения. Альтернативно, идентифицированные агенты могут быть использованы как часть способа культивирования для повышения выживаемости клеток RPE, дифференцированных *in vitro*.

[36] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу скрининга для идентификации агентов, которые модулируют зрелость клеток RPE. Так, например, клетки RPE, полученные из человеческих ES-клеток, могут быть использованы для скрининга агентов, способствующих созреванию RPE.

Краткое описание чертежей

[37] На фиг. 1 показана динамика экспрессии мРНК PAX6 и MITF, оцененная с помощью кол.ПЦР в клетках-предшественниках RPE относительно нормализованной экспрессии мРНК GAPDH.

[38] На фиг. 2 показана динамика экспрессии PAX6 и MITF, оцененная с помощью иммунофлуоресцентного анализа (IFA) различных клеточных фракций, полученных после инициации дифференцировки в клетки RPE.

[39] На фиг. 3 показаны схематические диаграммы способа субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE (фиг. 3А) и способа субкультивирования кластера клеток-предшественников RPE (фиг. 3В).

[40] На фиг. 4 показана репрезентативная рабочая диаграмма способа субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE и способа субкультивирования кластера клеток-предшественников RPE.

[41] На фиг. 5 показаны характеристики клеток RPE, полученных способами субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE и способами субкультивирования кластера клеток-предшественников RPE в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

Подробное описание

[42] Настоящее изобретение относится к усовершенствованным способам получения клеток пигментного эпителия сетчатки (RPE) из плюрипотентных стволовых клеток, таких как стволовые клетки человеческого эмбриона (hES), клетки, происходящие от эмбриона и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS-клетки). В частности, настоящее изобретение основано на обнаружении стадий дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток, когда предшественники RPE могут быть выделены,

частично очищены, а затем дифференцированы в зрелые клетки RPE с минимальным отбором клеток вручную или без него. В частности, как описано в настоящей заявке, после инициации дифференцировки плюрипотентных клеток, авторами изобретения были определены моменты времени в процессе культивирования, когда имеется достаточно высокий процент кластеров клеток-предшественников RPE (например, идентифицированных как PAX6/MITF-позитивные клетки), которые сохраняются вместе с этими клетками, если культуру диссоциирует с использованием реагента для диссоциации, такого как коллагеназа и диспаза. Эти культуры не являются перезрелыми, а поэтому большинство клеток, не относящихся к RPE в культуре или клеток, прилипших к таким кластерам клеток-предшественников RPE, могут быть элиминированы как отдельные клетки. Кроме того, крупные кластеры не-RPE клеток, а также кластеры, содержащие смесь RPE и не-RPE, могут быть удалены путем фракционирования по размеру, что позволяет повысить чистоту. Таким образом, описанные здесь способы включают обработку кластеров клеток-предшественников RPE реагентом для диссоциации, таким как коллагеназа или диспаза, с последующим фракционированием по размеру для выделения кластеров клеток-предшественников RPE определенного размера и субкультивированием клеток-предшественников RPE в виде отдельных клеток или в виде клеточных кластеров для получения клеток RPE.

[43] В одном из вариантов осуществления изобретения, способы согласно изобретению включают выделение кластеров клеток-предшественников RPE, размер которых составляет от приблизительно 40 до приблизительно 200 мкм или от приблизительно 40 до приблизительно 100 мкм. В одном варианте осуществления изобретения, кластеры клеток-предшественников RPE собирают с использованием клеточного фильтра или ряда клеточных фильтров, и отбирают кластеры клеток, имеющие нужный размер. Так, например, для получения кластеров клеток от приблизительно 40 до приблизительно 200 мкм или от приблизительно 40 до приблизительно 100 мкм могут быть использованы клеточные фильтры размером 40 мкм, 70 мкм, 100 мкм, 200 мкм или фильтры любого другого размера, которые позволяли бы получить кластер клеток нужного размера. Способы согласно изобретению являются простыми и эффективными. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы согласно изобретению позволяют получить практически чистые культуры клеток RPE. В основном очищенная популяция клеток RPE представляет собой популяцию, в которой клетки RPE составляют по меньшей мере приблизительно 75% клеток в популяции. В других вариантах осуществления изобретения, по существу очищенная популяция клеток RPE представляет собой популяцию, в которой клетки RPE составляют по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% или даже более 99% клеток в популяции.

[44] Настоящее изобретение имеет несколько преимуществ по сравнению с известными методами получения клеток RPE, включая, например, значительно более высокий выход клеток RPE, значительно более высокую чистоту клеток RPE, более

простое выделение клеток RPE вручную, возможность автоматизированного отбора клеток RPE, отсутствие необходимости в какой-либо дальнейшей очистке путем ручного или автоматизированного отбора и использование простых компонентов, что делает возможным крупномасштабное коммерческое производство таких клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы согласно изобретению позволяют увеличивать выход RPE, например, более чем в 50-90 раз по сравнению с клетками, полученными традиционным способом производства, включая сбор вручную, и получить клетки RPE с высокой степенью чистоты, то есть, свыше 98% - 99%.

[45] Для лучшего понимания описанного здесь изобретения ниже представлено более подробное его описание. Далее подробно описаны различные варианты осуществления изобретения, которые могут быть дополнительно проиллюстрированы приведенными здесь примерами. Все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, если это не оговорено особо, имеют свое общепринятое значение, понятное для специалистов в области, к которой относится изобретение.

Определения

[46] Если это не оговорено особо, то каждый из нижеследующих терминов имеет значение, указанное в данном разделе.

[47] Неопределенные артикли «а» и «an» относятся по меньшей мере к одному существительному, и являются синонимами терминам «по меньшей мере один» и «один или более».

[48] Союзы «или» и «и/или» используются как синонимы и как не исключающие дизъюнкции.

[49] Используемые здесь термины «**пигментная эпителиальная клетка сетчатки**» или «**клетка RPE**» являются синонимами и означают эпителиальную клетку, составляющую пигментный эпителий сетчатки. Этот термин используется в основном для обозначения дифференцированных клеток RPE, независимо от уровня зрелости клеток, и, таким образом, может охватывать клетки RPE различных уровней зрелости. Клетки RPE можно визуально распознавать по их морфологии, напоминающей «булыжник» и по первоначальному появлению пигмента. Клетки RPE могут быть также идентифицированы на молекулярном уровне по значительному отсутствию экспрессии маркеров эмбриональных стволовых клеток, таких как OCT4 и NANOG, а также по экспрессии маркеров RPE, таких как RPE65, PEDF, CRALBP и/или бестрофин (BEST1). В одном варианте осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия одного или нескольких маркеров эмбриональных стволовых клеток, включая, но не ограничиваясь ими, OCT4, NANOG, REX1, щелочную фосфатазу, SOX2, TDGF-1, DPPA-2, DPPA-4, стадиеспецифический эмбриональный антиген (SSEA)-3 и SSEA-4, антиген отторжения опухоли (TRA)-1-60 и/или TRA-1-80. В другом варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют один или более клеточных маркеров RPE, включая, но не ограничиваясь ими, RPE65, CRALBP, PEDF, бестрофин, MITF, OTX2, PAX2, PAX6, премеланосомный белок (PMEL или gp-100) и/или тирозиназу. В другом

варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют ZO1. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют MITF и по меньшей мере один маркер, выбранный из бестрофина и PAX6. Следует отметить, что когда упоминаются другие RPE-подобные клетки, то их обычно называют зрелыми RPE, фетальными RPE, первичными культурами зрелых или фетальных RPE и иммортализованными клеточными линиями RPE, такими как клетки APRE19. Таким образом, если это не оговорено особо, то используемые здесь клетки RPE представляют собой клетки RPE, полученные из плюрипотентных стволовых клеток (PSC-RPE), и могут представлять собой клетки RPE, полученные из плюрипотентных стволовых клеток человека (hRPE).

[50] Пигментация клеток RPE может варьироваться в зависимости от плотности клеток в культуре и степени зрелости клеток RPE. Однако, если клетки называют пигментированными, то под этим термином подразумеваются любые и все уровни пигментации. Таким образом, настоящее изобретение относится к клеткам RPE с различной степенью пигментации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пигментация RPE является такой же, как средняя пигментация других RPE-подобных клеток, таких как зрелые RPE, фетальные RPE, первичные культуры зрелых или фетальных RPE или иммортализованные клеточные линии RPE, такие как ARPE19. В некоторых вариантах осуществления изобретения, степень пигментации RPE выше, чем средняя пигментация других RPE-подобных клеток, таких как зрелые RPE, фетальные RPE, первичные культуры зрелых или фетальных RPE или иммортализованные клеточные линии RPE, такие как ARPE19. В некоторых других вариантах осуществления изобретения, степень пигментации RPE ниже, чем средняя пигментация других RPE-подобных клеток, таких как зрелые RPE, фетальные RPE, первичные культуры зрелых или фетальных RPE или иммортализованные клеточные линии RPE, такие как ARPE19.

[51] Функциональная оценка клеток RPE может быть подтверждена с использованием, например, секретиремости, фагоцитарной способности и т.п. цитокина (VEGF или PEDF и т.п.), фагоцитоза слушенных сегментов палочек и колбочек (или фагоцитоза другого субстрата, такого как полистироловые шарики), поглощения рассеянного света, метаболизма витамина А, регенерации ретиноидов, трансэпителиальной резистентности, полярности клеток и восстановления тканей. Оценка может быть также проведена путем тестирования функции *in vivo* после имплантации клеток RPE подходящему животному-хозяину (например, человеку или животному, не являющемуся человеком, и страдающему естественным или индуцированным состоянием дегенерации сетчатки), например, с помощью поведенческих тестов, флуоресцентной ангиографии, гистологии, проводимости плотных контактов или оценки с помощью электронной микроскопии. Эти процедуры функциональной оценки и подтверждения могут быть осуществлены специалистами в данной области. Используемые здесь клетки RPE включают клетки RPE человека (hRPE).

[52] Используемые здесь термины «**предшественник клетки RPE**» или «**клетка-предшественник RPE**» являются синонимами и означают клетку, индуцированную так,

чтобы она дифференцировалась в клетку сетчатки. В одном варианте осуществления изобретения, термин «клетка-предшественник RPE» может использоваться для обозначения любой клетки, направленной на дифференцировку в клетку сетчатки вплоть до сбора клеток RPE (например, для посева на P0, как описано в настоящей заявке). Следует отметить, что на последних стадиях дифференцировки, дифференцированная культура может содержать смесь клеток-предшественников RPE и клеток RPE. В одном варианте осуществления изобретения, клетка-предшественник экспрессирует MITF (пигментная эпителиальная клетка, клетка-предшественник), PAX6 (клетка-предшественник), Rx (клетка-предшественник сетчатки), Srx (клетка-предшественник фоторецептора) и/или Chx10 (биполярная клетка) и т.д.) и т.п. В одном варианте осуществления изобретения, клетка-предшественник RPE экспрессирует PAX6 и MITF.

[53] Используемые здесь термины «зрелая клетка RPE» и «зрелая дифференцированная клетка RPE» являются синонимами и означают изменения, происходящие после начальной дифференцировки клеток RPE. В частности, хотя клетки RPE могут частично распознаваться по первоначальному появлению пигмента, однако, после дифференцировки, зрелые клетки RPE могут распознаваться по усиленной пигментации. Пигментация после дифференцировки может не свидетельствовать об изменении состояния клеток RPE (например, клеток, которые все еще являются дифференцированными клетками RPE). Изменения пигментации после дифференцировки могут соответствовать плотности, при которой культивируются и поддерживаются клетки RPE. Зрелые клетки RPE могут иметь повышенную пигментацию, которая усиливается после начальной дифференцировки. Зрелые клетки RPE могут быть более пигментированными, чем незрелые клетки RPE, и могут появляться после прекращения пролиферации RPE, например, из-за высокой плотности клеток в чашке для культивирования. Зрелые клетки RPE могут быть субкультивированы при более низкой плотности, что будет обеспечивать пролиферацию зрелых клеток RPE. Пролиферация зрелых RPE в культуре может сопровождаться отсутствием дифференцировки, то есть, потерей пигмента и эпителиальной морфологии, которые восстанавливаются после того, как клетки образуют монослой и становятся неподвижными. В этом случае, зрелые клетки RPE могут быть культивированы для получения клеток RPE. Такие клетки RPE по-прежнему являются дифференцированными клетками RPE, экспрессирующими маркеры RPE. Таким образом, в отличие от начального появления пигментации, которое происходит, когда начинают появляться клетки RPE, изменения пигментации после дифференцировки носят феноменологический характер и не отражают дедифференцировку клеток независимо от конечных функций RPE. Изменения пигментации после дифференцировки могут также коррелировать с изменениями экспрессии одного или более из PAX2, PAX6, тирозиназы, маркеров нервных клеток, таких как тубулин бета III, бестрофина, RPE65 и CRALBP. В одном варианте осуществления изобретения, изменения пигментации после дифференцировки демонстрируют обратную корреляцию с одним или несколькими PAX6 и маркерами

нервных клеток (такими как тубулин бета III). В другом варианте осуществления изобретения, изменения пигментации после дифференцировки демонстрируют прямую корреляцию с RPE65 и CRALBP.

[54] Используемый здесь термин «**плюрипотентные стволовые клетки**», «**PS-клетки**» или «**PSC**» включает эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и плюрипотентные стволовые клетки эмбрионального происхождения, независимо от метода получения плюрипотентных стволовых клеток. Плюрипотентные стволовые клетки функционально определяются как стволовые клетки, которые: (a) способны индуцировать тератомы при их трансплантации мышам с иммунодефицитом (SCID); (b) способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых слоев (например, они могут дифференцироваться в эктодермальные, мезодермальные и эндодермальные типы клеток); (c) экспрессируют один или несколько маркеров эмбриональных стволовых клеток (например, экспрессируют OCT4, щелочную фосфатазу, поверхностный антиген SSEA-3, поверхностный антиген SSEA-4, NANOG, TRA-1-60, TRA-1-81, SOX2, REX1 и т.п.); и (d) способны к самообновлению. Термин «плюрипотентный» относится к способности клетки образовывать все линии дифференцировки или сомы (то есть, собственно эмбрионы). Так, например, эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки представляют собой тип плюрипотентных стволовых клеток, которые способны образовывать клетки из каждого из трех зародышевых слоев: эктодермы, мезодермы и эндодермы. Плюрипотентность представляет собой непрерывный потенциал развития, варьирующийся от неполной или частично плюрипотентной клетки, которая не может дать начало полноценному организму, до более примитивной, более плюрипотентной клетки, которая способна дать начало полноценному организму (например, эмбриональной стволовой клетки). Репрезентативные плюрипотентные стволовые клетки могут быть получены с применением, например, методов, известных специалистам в данной области. Примеры плюрипотентных стволовых клеток включают, но не ограничиваются ими, эмбриональные стволовые клетки, происходящие от ICM эмбрионов на стадии бластоцистов; эмбриональные стволовые клетки, происходящие от одного или нескольких бластомеров эмбриона на стадии дробления или стадии морулы (необязательно без разрушения остатка эмбриона); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные путем перепрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние; и плюрипотентные клетки, полученные из эмбриональных зародышевых (EG) клеток (например, путем культивирования в присутствии FGF-2, LIF и SCF). Такие эмбриональные стволовые клетки могут быть получены из эмбрионального материала, продуцируемого в процессе оплодотворения или бесполом путем, включая перенос ядер соматических клеток (SCNT), партеногенез и андрогенез.

[55] В одном варианте осуществления изобретения, плюрипотентные стволовые клетки могут быть генетически сконструированы или иным образом модифицированы, например, для увеличения продолжительности жизни, активности, хоминга, для

предотвращения или ослабления иммунных ответов или для доставки желаемого фактора в клетки, полученные из таких плюрипотентных клеток (например, RPE). Так, например, плюрипотентная стволовая клетка и, следовательно, клетка, образовавшаяся в результате дифференцировки, могут быть сконструирована или иным образом модифицированы так, чтобы в них отсутствовала или наблюдалась пониженная экспрессия генов бета-2-микроглобулина, HLA-A, HLA-B, HLA-C, TAP1, TAP2, тапасина, STPA, RFX5, TRAC или TRAB. Плюрипотентная стволовая клетка и полученная дифференцированная клетка могут быть сконструированы или иным образом модифицированы для повышения уровня экспрессии гена. Существует множество методов конструирования клеток для модуляции экспрессии одного или нескольких генов (или белков), включая использование вирусных векторов, таких как векторы AAV, нуклеаз «цинковые пальцы» (ZFN), эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN) и методов геномной инженерии на основе CRISPR/Cas, а также использование ингибиторов транскрипции и трансляции, таких как антисмысловая РНК и РНК-интерференция (что может быть достигнуто с использованием стабильно интегрированных векторов и эписомных векторов).

[56] Термин **«эмбрион»** или **«эмбриональный»** означает развивающуюся клеточную массу, которая не была имплантирована в оболочку матки. **«Эмбриональная клетка»** представляет собой клетку, выделенную из эмбриона или содержащуюся в нем. Этот термин также включает бластомеры, полученные уже на двухклеточной стадии, или агрегированные бластомеры после экстракции.

[57] Используемый здесь термин **«клетки эмбрионального происхождения»** (EDC) в широком смысле относится к клеткам, происходящим от морулы, к клеткам, происходящим из бластоцистов, включая клетки внутренней клеточной массы, эмбрионального щитка или эпибласта, или к другим плюрипотентным стволовым клеткам раннего эмбриона, включая примитивную эндодерму, эктодерму и мезодерму и их производные. «EDC» также включает бластомеры и клеточные массы из агрегированных одиночных бластомеров или эмбрионов на различных стадиях развития, но не включает эмбриональные стволовые клетки человека, которые были пассированы как клеточные линии.

[58] Используемые здесь термины **«эмбриональные стволовые клетки»**, **«ES-клетки»** или **«ESC»** в широком смысле относятся к клеткам, выделенным из внутренней клеточной массы бластоцистов или морулы и последовательно пассированным как клеточные линии. Этот термин также включает клетки, выделенные из одного или нескольких бластомеров эмбриона, предпочтительно без разрушения остальной части эмбриона (см., например, Chung et al., Cell Stem Cell. 2008 Feb 7;2(2): 113-7; публикацию США № 20060206953; и публикацию США № 2008/0057041, каждая из которых в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки). ES-клетки могут быть получены в результате оплодотворения яйцеклетки спермой или ДНК, переноса ядра, партеногенеза или любыми способами получения ES-клеток с гомозиготностью в области HLA. ES-клетки могут также представлять собой клетки, происходящие от зиготы,

бластомеров или эмбрионов млекопитающих на стадии бластоцистов, полученных путем слияния сперматозоида и яйцеклетки, переноса ядра, партеногенеза или перепрограммирования хроматина и последующего включения перепрограммированного хроматина в плазматическую мембрану для образования клетки. В одном варианте осуществления изобретения, эмбриональная стволовая клетка может представлять собой эмбриональную стволовую клетку человека (или «hES-клетку»). В другом варианте осуществления изобретения, эмбриональные стволовые клетки человека не получают из эмбрионов старше 14 дней после оплодотворения. В другом варианте осуществления изобретения, эмбриональные стволовые клетки человека не происходят из эмбрионов, которые развились *in vivo*. В другом варианте осуществления изобретения, эмбриональные стволовые клетки человека получают из предимплантированных эмбрионов, полученных путем оплодотворения *in vitro*.

[59] Используемые здесь термины «**индуцированные плюрипотентные стволовые клетки**» или «**iPS-клетки**» по существу означают плюрипотентные стволовые клетки, полученные путем перепрограммирования соматической клетки. iPS-клетка может быть получена путем экспрессии или индуцирования экспрессии комбинации факторов («факторов перепрограммирования»), например, OCT4 (иногда называемого OCT 3/4), SOX2, MYC (например, c-MYC или любого варианта MYC), NANOG, LIN28 и KLF4 в соматической клетке. В одном варианте осуществления изобретения, факторы перепрограммирования включают OCT4, SOX2, c-MYC и KLF4. В другом варианте осуществления изобретения, факторы перепрограммирования включают OCT4, SOX2, NANOG и LIN28. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере два фактора перепрограммирования экспрессируют в соматической клетке для успешного перепрограммирования соматической клетки. В других вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере три фактора перепрограммирования экспрессируют в соматической клетке для успешного перепрограммирования соматической клетки. В других вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере четыре фактора перепрограммирования экспрессируют в соматической клетке для успешного перепрограммирования соматической клетки. В другом варианте осуществления изобретения, по меньшей мере пять факторов перепрограммирования экспрессируют в соматической клетке для успешного перепрограммирования соматической клетки. В еще одном варианте осуществления изобретения, в соматической клетке экспрессируют по меньшей мере шесть факторов перепрограммирования, например, OCT4, SOX2, c-MYC, NANOG, LIN28 и KLF4. В других вариантах осуществления изобретения, идентифицируют дополнительные факторы перепрограммирования и используют их отдельно или в сочетании с одним или несколькими известными факторами перепрограммирования для перепрограммирования соматической клетки в плюрипотентную стволовую клетку.

[60] iPS-клетки могут быть получены с использованием соматических клеток плода, постнатальных клеток, клеток новорожденных, ювенильных клеток или зрелых

клеток. Соматические клетки могут включать, но не ограничиваются ими, фибробласты, кератиноциты, адипоциты, мышечные клетки, клетки органов и тканей и различные клетки крови, включая, но не ограничиваясь ими, гемопоэтические клетки (например, гемопоэтические стволовые клетки). В одном варианте осуществления изобретения, соматические клетки представляют собой фибробласты, такие как кожный фибробласт, синовиальный фибробласт или легочный фибробласт, или нефибробластную соматическую клетку.

[61] iPS-клетки могут быть получены из банка клеток. В качестве альтернативы, iPS-клетки могут быть вновь получены способами, известными специалистам в данной области. iPS-клетки могут быть специально созданы с использованием материала, взятого у конкретного пациента или соответствующего донора в целях получения клеток, соответствующих тканям. В одном варианте осуществления изобретения, iPS-клетки могут быть универсальными донорскими клетками, которые по существу не являются иммуногенными.

[62] Индуцированная плюрипотентная стволовая клетка может быть получена путем экспрессии или индуцирования экспрессии одного или нескольких факторов перепрограммирования в соматической клетке. Факторы перепрограммирования могут быть экспрессированы в соматической клетке путем инфицирования с использованием вирусного вектора, такого как ретровирусный вектор, или с применением других технологий редактирования генов, таких как CRISPR, Talen, нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN). Кроме того, факторы перепрограммирования могут быть экспрессированы в соматической клетке с использованием неинтегрирующегося вектора, такого как эписомная плаزمиды, или РНК, такой как синтетическая мРНК, или посредством РНК-вируса, такого как вирус Сендай. Если факторы перепрограммирования экспрессируют с использованием неинтегрирующихся векторов, то эти факторы могут быть экспрессированы в клетках посредством электропорации, трансфекции или трансформации соматических клеток векторами. Так, например, в клетках мышей, экспрессия четырех факторов (OCT3/4, SOX2, c-MYC и KLF4) с использованием неинтегрирующихся вирусных векторов является достаточной для перепрограммирования соматической клетки. В клетках человека, экспрессия четырех факторов (OCT3/4, SOX2, NANOG и LIN28) с использованием неинтегрирующихся вирусных векторов является достаточной для перепрограммирования соматической клетки.

[63] Экспрессия факторов перепрограммирования может быть индуцирована контактированием соматических клеток по меньшей мере с одним агентом, таким как низкомолекулярные агенты, которые индуцируют экспрессию факторов перепрограммирования.

[64] Соматическая клетка также может быть перепрограммирована с использованием комбинаторного подхода, при котором экспрессируют фактор перепрограммирования (например, с использованием вирусного вектора, плазмиды и т.п.) и индуцируют экспрессию фактора перепрограммирования (например, с использованием

небольшой органической молекулы).

[65] После экспрессии факторов репрограммирования или их индуцирования в клетках, эти клетки могут быть культивированы. Со временем, в чашке для культивирования появляются клетки со свойствами ES-клеток. Клетки могут быть отобраны и субкультивированы на основе, например, морфологии ES-клеток или на основе экспрессии селективного или детектируемого маркера. Клетки могут быть культивированы для получения культуры клеток, напоминающих ES-клетки.

[66] Для подтверждения плюрипотентности iPS-клеток, клетки могут быть протестированы в одном или нескольких анализах на плюрипотентность. Так, например, клетки могут быть протестированы на экспрессию маркеров ES-клеток; клетки могут быть оценены на способность продуцировать тератомы при трансплантации мышам SCID; клетки могут быть оценены на способность дифференцироваться с образованием клеток всех трех зародышевых слоев.

[67] iPS-клетками могут быть клетки любого вида. Эти iPS-клетки были успешно получены с использованием мышиных и человеческих клеток. Кроме того, iPS-клетки были успешно получены с использованием тканей эмбриона, плода, новорожденного и взрослого человека. Соответственно, можно легко получить iPS-клетки с использованием донорской клетки любого вида. Таким образом, можно получить iPS-клетки любого вида, включая, но не ограничиваясь ими, клетки человека, приматов, не являющихся человеком, грызунов (мышей, крыс), копытных (коров, овец и т.п.), собак (домашних и диких), кошек (домашних и диких кошек, таких как львы, тигры, гепарды), кроликов, хомяков, коз, слонов, панд (включая большую панду), свиней, енотов, лошадей, зебр, морских млекопитающих (дельфинов, китов и т.д.) и т.п.

[68] Используемый здесь термин «**дифференцировка**» означает процесс, посредством которого неспециализированная («некоммитированная») или менее специализированная клетка приобретает черты специализированной клетки, такой как, например, клетка RPE. Дифференцированная клетка представляет собой клетку, которая занимает более специализированное положение в клеточном клоне. Так, например, hES-клетка может быть дифференцирована в различные более дифференцированные типы клеток, включая клетку RPE.

[69] Используемый здесь термин «**культивированный**» или «**культивирование**» относится к помещению клеток в среду, содержащую, среди прочих питательных веществ, необходимых для поддержания жизнеспособности культивируемых клеток, любые указанные добавленные вещества. Клетки культивируют «в присутствии» определенного вещества, если среда, в которой содержатся такие клетки, включает такое указанное вещество. Культивирование может быть проведено в любом сосуде или в устройстве, в котором клетки могут подвергаться воздействию среды, включая, помимо прочего, чашки Петри, чашки для культивирования, пакеты для сбора крови, роллер-флаконы, колбы, пробирки для тестирования, лунки для микротитрования, картриджи с полыми волокнами или любые другие устройства, известные специалистам.

[70] Используемый здесь термин «**субкультивирование**» или «**пассирование**» относится к переносу некоторых или всех клеток из предыдущей культуры в свежую среду для выращивания и/или высевания на новую чашку для культивирования и к дальнейшему культивированию клеток. Так, например, субкультивирование может быть проведено для продления жизнеспособности, обогащения желаемой клеточной популяцией и/или увеличения количества клеток в культуре. Так, например, этот термин включает перенос, культивирование или посев некоторых или всех клеток в новый сосуд для культивирования при более низкой плотности клеток для обеспечения пролиферации клеток.

[71] Используемый здесь термин «**селективный сбор**» или «**селективный отбор**» относится к механическому сбору или отделению субпопуляции клеток от более крупной популяции на основе визуальной или другой фенотипической характеристики. Селективный отбор может быть проведен вручную или с помощью автоматизированной системы, а также с помощью микроскопа, системы компьютерной визуализации или других средств для идентификации клеток, подлежащих сбору.

[72] Используемый здесь термин «**реагент для диссоциации**» означает ферментный или неферментный реагент, который способствует диссоциации или отделению клеток в клеточных агрегатах с получением отдельных клеток. Примеры реагентов для диссоциации включают, но не ограничиваются ими, коллагеназу (такую как коллагеназа I или коллагеназа IV), акутазу, хелатообразующий агент (например, раствор для диссоциации на основе EDTA), трипсин, диспазу или любые их комбинации.

[73] Используемый здесь термин «**внеклеточный матрикс**» означает любое вещество, к которому клетки могут прикрепляться в культуре, и которое обычно содержит внеклеточные компоненты, к которым клетки могут прикрепляться, что обеспечивает получение подходящего культурального субстрата. Компонентами, подходящими для использования в настоящем изобретении, являются компоненты внеклеточного матрикса, полученные из базальной мембраны, или компоненты внеклеточного матрикса, которые образуют часть связей рецептора-лиганда с адгезивной молекулой. Примеры внеклеточного матрикса включают, но не ограничиваются ими, ламинин или его фрагмент, например, ламинин 521, ламинин 511 или iMatrix511, фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген, желатин, протеогликан, энтактин, сульфат гепарина и т.п., отдельно или в различных комбинациях.

[74] Используемый здесь термин «**ламинин**» означает гетеротримерную молекулу, состоящую из α -, β -, γ -цепей или их фрагментов, которые представляет собой белок внеклеточного матрикса, содержащий изоформы с различным составом субъединичных цепей. В частности, ламинин имеет приблизительно 15 видов изоформ, включая гетеротримеры из комбинаций 5 видов α -цепей, 4 видов β -цепей и 3 видов γ -цепей. Все α -цепи ($\alpha 1$ - $\alpha 5$), β -цепи ($\beta 1$ - $\beta 4$) и γ -цепи ($\gamma 1$ - $\gamma 3$) объединяются в общий термин «ламинин». Так, например, ламинин, состоящий из комбинации $\alpha 1$ -цепи, $\beta 1$ -цепи, $\gamma 1$ -цепи, называется ламинином-111; ламинин, состоящий из комбинации $\alpha 5$ -цепи, $\beta 1$ -цепи, $\gamma 1$ -цепи,

называется ламинином-511; а ламинин, состоящий из комбинация $\alpha 5$ -цепи, $\beta 2$ -цепи, $\gamma 1$ -цепи, называется ламинином-521. Ламинин, выделенный у млекопитающего, может быть использован в способах согласно изобретению. Примерами млекопитающих являются мыши, крысы, морские свинки, хомяки, кролики, кошки, собаки, овцы, свиньи, крупный рогатый скот, лошади, козы, обезьяны и человек. Человеческий ламинин предпочтительно используют при получении клеток RPE. В одном варианте осуществления изобретения, ламинин представляет собой рекомбинантный ламинин. В настоящее время известно, что человеческий ламинин включает 15 видов изоформ.

[75] В настоящем изобретении может быть использован любой фрагмент ламинина, при условии, что он сохраняет функцию каждого соответствующего ламинина. То есть, «фрагмент ламинина», используемый в настоящем изобретении, не ограничивается длиной каждой цепи, при условии, что он представляет собой молекулу, имеющую α -цепь, β -цепь и γ -цепь ламинина, составляющие гетеротример, сохраняющие активность связывания с интегрином и поддерживающие активность клеточной адгезии. Фрагмент ламинина обладает специфичностью связывания с интегрином, которая отличается от специфичности исходной изоформы ламинина, и может обладать активностью адгезии к клетке, которая экспрессирует соответствующий интегрин. В одном варианте осуществления изобретения, ламинин представляет собой рекомбинантный фрагмент E8 ламинина-511 (например, iMatrix-511 (Takara Bio)).

[76] Используемые здесь термины «**введение**», «**вводить**» и их варианты относятся к введению композиции или агента индивидууму и включают одновременное и последовательное введение композиции или агента. «Введение» может относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским методам, плацебо-методам и экспериментальным методам. «Введение» также включает лечение *in vitro* и *ex vivo*. Термин «введение» включает введение самим пациентом и введение другим лицом. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом. Подходящий способ введения обеспечивает осуществление нужной функции композиции или агента. Так, например, если подходящим способом является внутривенное введение, то композицию или агент вводят в вену индивидуума.

[77] Используемые здесь термины «**субъект**», «**индивидуум**», «**хозяин**» и «**пациент**» являются синонимами и относятся к любому индивидууму-млекопитающему, который нуждается в диагностике, лечении или терапии, в частности, к человеку. Описанные здесь способы применимы как в медицине, так и в ветеринарии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуум представляет собой млекопитающее, а в конкретных вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является человек.

[78] Используемые здесь термины «**терапевтическое количество**», «**терапевтически эффективное количество**», «**эффективное количество**» или «**фармацевтически эффективное количество**» активного агента (например, клетки RPE) являются синонимами и означают количество, достаточное для обеспечения

предполагаемого эффекта от лечения. Однако, уровни доз зависят от ряда факторов, включая тип травмы, возраст, массу тела, пол, состояние здоровья пациента, тяжесть состояния, способ введения, ожидаемое приживление клеток, долгосрочную выживаемость, и/или конкретное используемое активное вещество. Таким образом, схема введения доз может варьироваться в широких пределах, но обычно, она устанавливается врачом в обычном порядке с применением стандартных методов. Кроме того, термины «терапевтическое количество», «терапевтически эффективные количества» и «фармацевтически эффективные количества» включают количества композиций согласно изобретению, используемые в профилактических или превентивных целях. При профилактических или превентивных применениях согласно изобретению, фармацевтические композиции или лекарственные средства вводят пациенту, страдающему заболеванием, расстройством или состоянием или подверженному риску развития таких заболеваний, расстройств или состояний, в количестве, достаточном для устранения или снижения риска, уменьшения тяжести или отсрочки начала заболевания, расстройства или состояния, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, расстройства или состояния, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, проявляющиеся во время развития заболевания, расстройства или состояния. Обычно предпочтительно использовать максимальную дозу, то есть, самую высокую безопасную дозу в соответствии с некоторыми медицинскими показаниями. Используемые здесь термины «доза» и «дозировка» являются синонимами.

[79] Используемый здесь термин «**терапевтический эффект**» относится к результатам лечения, которые считаются желательными и полезными. Терапевтический эффект может включать, непосредственно или косвенно, купирование, уменьшение или устранение проявления заболевания. Терапевтический эффект может также включать, непосредственно или косвенно, прекращение, снижение или устранение прогрессирования заболевания.

[80] Для терапевтических средств, описанных в настоящей заявке (например, клеток RPE), терапевтически эффективное количество может быть сначала определено в предварительных исследованиях *in vitro* и/или на животных-моделях. Терапевтически эффективная доза также может быть определена на основе информации о пациенте. Вводимая доза может быть скорректирована в зависимости от относительной биодоступности и эффективности вводимого соединения. Коррекция дозы для достижения максимальной эффективности на основе способов, описанных выше, и других хорошо известных способов находится в пределах компетенции специалиста в данной области.

[81] Фармакокинетические принципы обеспечивают основу для изменения схемы введения доз для достижения желаемой степени терапевтической эффективности с минимальным риском развития нежелательных побочных эффектов. В случаях, когда концентрация агента в плазме может быть оценена и соотнесена с терапевтическим окном,

можно обратиться за дополнительными рекомендациями по изменению схемы введения доз.

[82] Используемые здесь термины «лечить», «лечение» и/или «терапия» включают прекращение, значительное ингибирование, замедление или предотвращение прогрессирования состояния, существенное облегчение клинических симптомов состояния или значительное предотвращение появления клинических симптомов состояния, и достижение полезных или желаемых клинических результатов. Лечение также означает выполнение одного или более из следующих действий: (a) снижение тяжести расстройства; (b) ограничение развития симптомов, характерных для подлежащего(их) лечению расстройства (расстройств); (c) предотвращение ухудшения симптомов, характерных для расстройства (расстройств), подлежащего(их) лечению; (d) предотвращение рецидива расстройства (расстройств) у пациентов, которые ранее страдали данным расстройством (данными расстройствами); и (e) предотвращение рецидива симптомов у пациентов, у которых ранее такие симптомы не наблюдались.

[83] Благоприятные или желаемые клинические результаты, такие как фармакологические и/или физиологические эффекты, включают, но не ограничиваются ими, профилактику возникновения заболевания, расстройства или состояния у индивидуума, который может быть предрасположен к развитию такого заболевания, расстройства или состояния, но у которого не еще не наблюдались или не проявлялись симптомы заболевания (профилактическое лечение), ослабление симптомов заболевания, расстройства или состояния, уменьшение степени заболевания, расстройства или состояния, стабилизацию (то есть, отсутствие ухудшения) заболевания, расстройства или состояния, предотвращение распространения заболевания, расстройства или состояния, отсрочка или замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, облегчение или паллиативное облегчение заболевания, расстройства или состояния и их комбинации, а также увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в случае отсутствия лечения.

I. Способы изобретения

[84] Настоящее изобретение основано на обнаружении стадий дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в клетки RPE, когда клетки-предшественники RPE могут быть выделены, частично очищены, а затем дифференцированы в зрелые клетки RPE с минимальным отбором клеток RPE вручную или без него. При этом, может быть применен любой метод дифференцировки плюрипотентных клеток в клетки RPE. Так, например, клетки RPE могут быть получены путем дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток с применением метода на основе монослоя, как описано в настоящей заявке, а также как описано в WO 2005/070011, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. Другие способы включают получение эмбрионидных телец из плюрипотентных стволовых клеток и дифференцировки эмбрионидных телец в клетки RPE, также описанные в WO 2005/070011, а также в WO 2014/121077, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством

ссылки. В другом примере, плюрипотентные стволовые клетки могут быть дифференцированы в линию клеток RPE с использованием первого агента для дифференцировки, а затем дополнительно дифференцированы в клетки RPE с использованием члена суперсемейства трансформирующего фактора- β (TGF β), а также гомологичных лигандов, включая активин (например, активин А, активин В и активин АВ), нодальный фактор, фактор против мюллеровского гормона (AMH), белки остеогенеза (BMP) (например, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 и BMP7, а также факторы роста и дифференцировки (GDF)), как описано, например, в WO 2019130061, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE могут быть получены путем (а) культивирования плюрипотентных стволовых клеток в среде, содержащей первый агент для дифференцировки (например, никотинамид), и (b) культивирования клеток, полученных на стадии (а), в среде, содержащей член суперсемейства TGF β (например, активин А) и первый агент для дифференцировки (например, никотинамид), как описано в WO 2019130061. В еще одном примере, моноклеточная суспензия плюрипотентных стволовых клеток может быть использована для дифференцировки в RPE, как описано в WO 2017/044488, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. Соответственно, RPE могут быть получены из плюрипотентных стволовых клеток, где плюрипотентные стволовые клетки дифференцируются за одну или более стадий в одной или нескольких средах для дифференцировки, которые могут содержать факторы дифференцировки, такие как один или более ингибиторов пути WNT (например, SKI-7, DKK1), ингибиторов пути TGF (например, LDN193189), ингибиторов пути BMP (например, SB431542), ингибиторов MEK (например, PD0325901), члена суперсемейства трансформирующего фактора- β (TGF β) и гомологичных лигандов, таких как активин. Кроме того, клетки RPE могут быть получены из неадгезивных или адгезивных культур, а также из фидерных культур или культур без фидеров.

[85] Во время процесса дифференцировки, когда имеется достаточное количество кластеров клеток-предшественников RPE (например, идентифицированных как PAX6/MITF-позитивные клетки), которые сохраняются вместе с этими клетками, кластеры клеток-предшественников RPE могут быть обработаны реагентом для диссоциации с последующим фракционированием кластеров по размеру и последующим субкультивированием клеток-предшественников RPE в виде отдельных клеток или клеточных кластеров с получением клеток RPE. Способы согласно изобретению являются одновременно простыми и эффективными и позволяют получить культуры клеток RPE, которые, в некоторых вариантах осуществления изобретения, являются по существу чистыми.

[86] В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), включающему: (i) получение клеточных кластеров PAX6⁺/MITF⁺-клеток-предшественников RPE и диссоциацию клеточных кластеров на отдельные клетки; (ii) культивирование отдельных клеток в среде для

дифференцировки так, чтобы клетки дифференцировались в клетки RPE; и (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii); и тем самым получение популяции клеток RPE. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), где указанный способ включает: (i) получение клеточных кластеров PAX6⁺/MITF⁺-клеток-предшественников RPE; (ii) культивирование клеточных кластеров в среде для дифференцировки, так, чтобы клетки дифференцировались в клетки RPE; и (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii); и тем самым получение популяции клеток RPE. В любом из вариантов осуществления изобретения, PAX6⁺/MITF⁺-клетки-предшественники RPE могут быть получены из популяции плюрипотентных стволовых клеток.

[87] В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), где указанный способ включает: (i) культивирование популяции плюрипотентных стволовых клеток в первой среде для дифференцировки так, чтобы клетки дифференцировались в клетки-предшественники RPE; (ii) диссоциацию клеток-предшественников RPE, фракционирование клеток для сбора кластеров клеток-предшественников RPE; диссоциацию кластеров клеток-предшественников RPE на отдельные клетки и субкультивирование отдельных клеток во второй среде для дифференцировки так, чтобы эти клетки дифференцировались в клетки RPE; и (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii) и тем самым получение популяции клеток RPE. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), где указанный способ включает: (i) культивирование популяции плюрипотентных стволовых клеток в первой среде для дифференцировки так, чтобы клетки дифференцировались в клетки-предшественники RPE; (ii) диссоциацию клеток-предшественников RPE, фракционирование клеток для сбора кластеров клеток-предшественников RPE; и субкультивирование собранных кластеров клеток-предшественников RPE во второй среде для дифференцировки, так, чтобы клетки дифференцировались в клетки RPE; и (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii), и тем самым получение популяции клеток RPE. В одном из вариантов осуществления изобретения, клетки-предшественники RPE являются позитивными по PAX6/MITF. В другом варианте осуществления изобретения, перед стадией (i), плюрипотентные стволовые клетки культивируют на фидерных клетках в среде, поддерживающей плюрипотентность. В другом варианте осуществления изобретения, перед стадией (i), плюрипотентные стволовые клетки культивируют без фидеров в среде, поддерживающей плюрипотентность. В одном варианте осуществления изобретения, в среду, поддерживающую плюрипотентность, добавляют bFGF.

[88] Эти способы могут дополнительно включать сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii), путем диссоциации клеток RPE, фракционирования клеток RPE для сбора кластеров клеток RPE, диссоциации кластеров клеток RPE на отдельные клетки RPE, и культивирования отдельных клеток RPE. В другом варианте осуществления изобретения, этот способ может дополнительно включать сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii),

путем диссоциации клеток RPE, сбора кластеров клеток RPE и селективного отбора кластеров клеток RPE. Этот способ может дополнительно включать диссоциацию селективно отобранных кластеров клеток RPE на отдельные клетки RPE и культивирование отдельных клеток RPE.

[89] В одном варианте осуществления изобретения, плюрипотентные стволовые клетки представляют собой плюрипотентные стволовые клетки человека, а клетки RPE представляют собой человеческие клетки RPE. Любая из этих стадий может быть осуществлена в неадгезивных или адгезивных культурах, а также в условиях присутствия или отсутствия фидеров.

[90] В одном варианте осуществления изобретения, кластеры клеток-предшественников RPE и/или кластеры клеток RPE имеют размер от приблизительно 40 до приблизительно 200 мкм, от приблизительно 40 до приблизительно 100 мкм, от приблизительно 40 мкм до приблизительно 70 мкм, от приблизительно 70 мкм до приблизительно 100 мкм, от приблизительно 70 мкм до приблизительно 200 мкм или от приблизительно 100 мкм до приблизительно 200 мкм.

[91] В некоторых вариантах осуществления изобретения, плюрипотентные стволовые клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки человека. В других вариантах осуществления изобретения, плюрипотентные стволовые клетки представляют собой iPS-клетки человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки RPE дополнительно размножают после сбора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы согласно изобретению позволяют получить практически чистые культуры клеток RPE. По существу очищенная популяция клеток RPE представляет собой популяцию, в которой клетки RPE составляют по меньшей мере приблизительно 75% клеток в популяции. В других вариантах осуществления изобретения, по существу очищенная популяция клеток RPE представляет собой популяцию, в которой клетки RPE составляют по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97,5%, 98%, 99% или даже более 99% клеток в популяции. В любом из вариантов осуществления изобретения, клетки RPE представляют собой клетки RPE человека.

[92] В любом из вариантов осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют один или несколько маркеров, выбранных из группы, состоящей из RPE65, CRALBP, PEDF, бестрофина (BEST1), MITF, OTX2, PAX2, PAX6, премеланосомного белка (PMEL или gr-100), тирозиназы и ZO1. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют бестрофин, PMEL, CRALBP, MITF, PAX6 и ZO1. В другом варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют бестрофин, PAX6, MITF и RPE65. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют MITF и по меньшей мере один маркер, выбранный из бестрофина и PAX6.

[93] В любом из вариантов осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия одного или нескольких маркеров стволовых клеток, выбранных из группы, состоящей из OCT4, NANOG, REX1, щелочной фосфатазы, SOX2, TDGF-1,

DPPA-2, DPPA-4, стадийспецифического эмбрионального антигена (SSEA)-3 и SSEA-4, антигена отторжения опухоли (TRA)-1-60 и TRA-1-80. В одном варианте осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия OCT4, SSEA4, TRA-1-81 и щелочной фосфатазы. В другом варианте осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия OCT4, NANOG и SOX2.

Культивирование плюрипотентных стволовых клеток

[94] Плюрипотентные стволовые клетки, например, эмбриональные стволовые (ES) клетки или iPS-клетки, могут представлять собой исходный материал для раскрытого здесь способа. В любом из вариантов осуществления изобретения, плюрипотентные стволовые клетки могут представлять собой плюрипотентные стволовые клетки человека (hPSC). Плюрипотентные стволовые клетки (PSC) могут быть культивированы любым способом, известным специалистам в данной области, например, в присутствии или в отсутствие фидерных клеток. Кроме того, PSC, полученные любым способом, могут быть использованы в качестве исходного материала для получения клеток RPE. Так, например, hES-клетки могут быть получены из эмбрионов на стадии бластоцистов, которые представляют собой продукт оплодотворения яйцеклетки и спермы *in vitro*. В качестве альтернативы, клетки hES могут быть получены из одного или нескольких бластомеров, удаленных из эмбриона на ранней стадии дробления, необязательно без разрушения остатка эмбриона. В других вариантах осуществления изобретения, hES-клетки могут быть получены посредством переноса ядра. В дополнительном варианте осуществления изобретения, могут быть использованы iPSC. В качестве исходного материала могут быть использованы ранее криоконсервированные PSC. В другом варианте осуществления изобретения могут быть использованы PSC, которые никогда не подвергались криоконсервации.

[95] В одном аспекте настоящего изобретения, PSC высевают на внеклеточный матрикс в присутствии или отсутствии фидеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный матрикс представляет собой ламинин с е-кадгерином или без него. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ламинин может быть выбран из группы, включающей ламинин 521, ламинин 511 или iMatrix511. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фидерные клетки представляют собой дермальные фибробласты человека (HDF). В других вариантах осуществления изобретения, фидерные клетки представляют собой эмбриональные мышечные фибробласты (MEF).

[96] В некоторых вариантах осуществления изобретения, среда, используемая при культивировании PSC, может быть выбрана из любых сред, подходящих для культивирования PSC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, можно использовать любую среду, способную поддерживать культуры PSC. Так, например, специалист в данной области может самостоятельно выбрать коммерчески доступную или патентованную среду. В дополнительных вариантах осуществления изобретения, PSC могут быть культивированы на внеклеточном матриксе, включая, но не ограничиваясь ими, ламинин, фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген или желатин, в

среде, поддерживающей плюрипотентность.

[97] Среда, поддерживающая плюрипотентность, может представлять собой любую среду, известную специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, среда, поддерживающая плюрипотентность, представляет собой Nutristem™. В некоторых вариантах осуществления изобретения, среда, поддерживающая плюрипотентность, представляет собой TeSR™. В некоторых вариантах осуществления изобретения, среда, поддерживающая плюрипотентность, представляет собой StemFit™. В других вариантах осуществления изобретения, среда, поддерживающая плюрипотентность, представляет собой Knockout™ DMEM (Gibco), которая может быть дополнена заменителем сыворотки Knockout™ (Gibco), LIF, bFGF или любыми другими факторами. Каждая из этих репрезентативных сред известна специалистам в данной области и является коммерчески доступной. В дополнительных вариантах осуществления изобретения, среда, поддерживающая плюрипотентность, может быть дополнена bFGF или любыми другими факторами. В одном варианте осуществления изобретения, bFGF может быть добавлен в низкой концентрации (например, 4 нг/мл). В другом варианте осуществления изобретения, bFGF может быть добавлен в более высокой концентрации (например, 100 нг/мл), что может стимулировать дифференцировку PSC.

[98] Концентрация PSC, используемая в способе получения согласно изобретению, не имеет конкретных ограничений. Так, например, при использовании чашки диаметром 10 см используют 1×10^4 - 1×10^8 клеток на чашку, предпочтительно 5×10^4 - 5×10^6 клеток на чашку, а более предпочтительно 1×10^5 - 1×10^7 клеток на чашку.

[99] В некоторых вариантах осуществления изобретения, PSC высевают при плотности клеток приблизительно 1000-100000 клеток/см². В некоторых вариантах осуществления изобретения, PSC высевают при плотности клеток приблизительно 5000-100000 клеток/см², приблизительно 5000-50000 клеток/см² или приблизительно 5000-15000 клеток/см². В других вариантах осуществления изобретения, PSC высевают при плотности приблизительно 10000 клеток/см².

[100] В некоторых вариантах осуществления изобретения, среду, которая поддерживает плюрипотентность, например, StemFit™ или другую подобную среду, заменяют средой для дифференцировки (например, средой без факторов, поддерживающих плюрипотентность, таких как bFGF) для дифференцировки клеток в клетки RPE. В одном варианте осуществления изобретения, эмбрионные тельца (EB) образуются из PSC, и эти EB дополнительно дифференцируются в клетки RPE.

[101] В некоторых вариантах осуществления изобретения, замена среды, поддерживающей плюрипотентность, на среду для дифференцировки, может быть проведена в различные моменты времени во время культивирования клеток PSC, и это также может зависеть от исходной плотности посева PSC. В некоторых вариантах осуществления изобретения, замена среды может быть проведена через 3-14 дней после культивирования PSC в среде для поддержания плюрипотентности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, замена среды может быть проведена на 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 день.

Дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток

[102] Дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток в клетки RPE иницируют после замены среды, поддерживающей плюрипотентность, одной или несколькими средами для дифференцировки, например, EBDM. В некоторых вариантах осуществления изобретения, плюрипотентные стволовые клетки спонтанно дифференцируются в клетки RPE в отсутствие факторов, индуцирующих дифференцировку. В других вариантах осуществления изобретения, для дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в клетки RPE могут быть использованы индуцирующие дифференцировку факторы, такие как активин, ингибитор нодального сигнала, ингибитор сигнала Wnt или ингибитор сигнала «звуковой еж».

[103] В некоторых вариантах осуществления изобретения, среда для дифференцировки представляет собой среду для дифференцировки EB (EBDM). EBDM включает среду DMEM Knockout™ (Gibco) с заменой сыворотки KnockOut™, не содержащей Xeno (XF-KSR) (Gibco), бета-меркаптоэтанол, NEAA и глутамин. При этом, может быть использована любая другая среда для дифференцировки, известная специалистам в данной области. В другом варианте осуществления изобретения, среда для дифференцировки может содержать один или несколько агентов для дифференцировки, таких как никотинамид, член суперсемейства трансформирующего фактора-β (TGFβ) (например, активин А, активин В и активин АВ), нодальный фактор, фактор, направленный против мюллеровского гормона (AMH), белок остеогенеза (BMP) (например, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 и BMP7, фактор роста и дифференцировки (GDF)), ингибитор пути WNT (например, SKI-7, DKK1), ингибитор пути TGF (например, LDN193189, Noggin), ингибитор пути BMP (например, SB431542), ингибитор сигнала «звуковой еж», ингибитор bFGF и/или ингибитор MEK (например, PD0325901). В одном варианте осуществления изобретения, плюрипотентные стволовые клетки могут быть дифференцированы в линию клеток RPE в первой среде для дифференцировки, содержащей первый агент для дифференцировки, а затем дополнительно дифференцированы в клетки RPE во второй среде для дифференцировки, содержащей второй агент для дифференцировки. В одном варианте осуществления изобретения, первая среда для дифференцировки содержит никотинамид, а вторая среда для дифференцировки содержит активин (например, активин А). Кроме того, клетки RPE могут быть получены из неадгезивных или адгезивных культур, а также в условиях в присутствии или в отсутствии фидеров.

[104] В одном варианте осуществления изобретения, среда для дифференцировки может быть заменена каждый день во время дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, среду для дифференцировки впоследствии заменяют через каждые 2-3 дня во время дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки культивируют в среде для дифференцировки в течение приблизительно 3-12 недель, например, 6-10 недель, 2-8 недель или 3-6 недель.

[105] В одном варианте осуществления изобретения, после замены среды, поддерживающей плюрипотентность, на среду для дифференцировки, могут быть детектированы молекулярные маркеры и морфологические признаки для определения дифференцировки плюрипотентных клеток и идентификации клеток-предшественников RPE в культуре. О том, является ли клетка клеткой RPE или предшественником RPE, можно судить по изменениям в морфологии клеток (например, по внутриклеточному отложению пигмента меланина, морфологии полигональных и плоских клеток, образованию полигонального актинового пучка и т.п.) в качестве показателя с использованием оптического или электронного микроскопа. Обнаружение молекулярных, морфологических и других признаков RPE описано, например, в патенте США No. № 7794704; в патенте США № 7736896; в заявках WO 2009/051671; WO 2012/012803; WO 2013/074681; WO 2011/063005; и WO 2016/154357, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, после замены среды, поддерживающей плюрипотентность, на среду для дифференцировки, дифференцировку плюрипотентных клеток наблюдают путем идентификации морфологических признаков клеток-предшественников RPE в культуре.

[106] В дополнительных вариантах осуществления изобретения, после замены среды, поддерживающей плюрипотентность, на среду для дифференцировки, дифференцировку плюрипотентных клеток идентифицируют путем наблюдения за изменениями экспрессии генов молекулярных маркеров дифференцированных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекулярные маркеры дифференцированных клеток являются активированными. В дополнительных вариантах осуществления изобретения, молекулярные маркеры плюрипотентности ингибируются. В некоторых вариантах осуществления изобретения, изменения в экспрессии генов молекулярных маркеров дифференцированных клеток могут быть подтверждены с помощью кол.ПЦР/оценочной карты и/или иммунологического окрашивания. В некоторых вариантах осуществления изобретения, изменения экспрессии генов молекулярных маркеров дифференцированных клеток наблюдают приблизительно через три недели после дифференцировки.

[107] В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекулярным маркером линии сетчатки является PAX6, а маркером пигментированных клеток является MITF. Следовательно, популяция клеток, экспрессирующих PAX6 и/или MITF, указывает на то, что присутствуют предшественники клеток линии сетчатки/RPE и эти клетки могут быть выделены из культуры.

[108] В других вариантах осуществления изобретения может не потребоваться определение дифференцировки плюрипотентных клеток и идентификация клеток-предшественников RPE, если известны условия культивирования для получения клеток-предшественников RPE. Таким образом, PAX6- и MITF-позитивные кластеры могут быть выделены без необходимости проведения анализа на PAX6/MITF.

Выделение и субкультивирование клеток-предшественников RPE

[109] Клетки эпителиальной морфологии удерживаются вместе в культуре за счет образования плотных контактов и образуют кластеры клеток одинакового типа во время дифференцировки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, для выделения желаемой популяции клеток-предшественников RPE, дифференцирующуюся культуру гидролизуют или диссоциируют, например, под действием ферментного или неферментного реагента для диссоциации, например, коллагеназы или диспазы, с образованием суспензии, содержащей клеточные кластеры, включающие клетки-предшественники RPE и отдельные клетки. Отдельные клетки и неэпителиальные клетки могут быть отделены и удалены, как описано ниже. Кроме того, большие скопления клеток, отличающихся от RPE, а также кластеры, содержащие смесь RPE и не-RPE, могут быть удалены путем фракционирования по размеру, как описано ниже, что позволяет повысить чистоту.

[110] В некоторых вариантах осуществления изобретения, для выделения нужной популяции клеток-предшественников RPE, дифференцирующая культура может быть гидролизована под действием реагента для диссоциации, что позволит выделить свободно плавающие кластеры клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, реагент для диссоциации представляет собой коллагеназу. В других вариантах осуществления изобретения, реагент для диссоциации представляет собой диспазу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, диссоциацию с помощью реагента для диссоциации проводят в течение ночи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, диссоциацию с помощью реагента для диссоциации проводят в течение приблизительно 2-30 часов. В одном варианте осуществления изобретения, диссоциацию с помощью реагента для диссоциации проводят в течение приблизительно 3-10 часов или приблизительно 3-6 часов. В одном варианте осуществления изобретения, диссоциацию с помощью реагента для диссоциации проводят в течение приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 часов.

[111] В некоторых вариантах осуществления изобретения, диссоциацию осуществляют приблизительно через 2-12 недель после начала дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, диссоциацию осуществляют приблизительно через 2 недели, приблизительно через 3 недели, через 4 недели, приблизительно через 5 недель, приблизительно через 6 недель, приблизительно через 7 недель, приблизительно через 8 недель, приблизительно через 9 недель, приблизительно через 10 недель, приблизительно через 11 недель или приблизительно через 12 недель после начала дифференцировки. В дополнительных вариантах осуществления изобретения, диссоциацию осуществляют на кластерах эпителиальной морфологии, позитивных по PAX6 и MITF.

[112] В другом аспекте раскрытых здесь способов, для выделения кластеров клеток-предшественников RPE фракционируют суспензию, содержащую кластеры клеток и отдельные клетки. При этом, может быть применен любой способ сбора нужных

кластеров клеток-предшественников RPE. В одном варианте осуществления изобретения, отдельные клетки и другие нежелательные клетки могут быть пропущены через клеточный фильтр или ряд клеточных фильтров, и нужные популяции кластеров клеток могут быть собраны путем сбора клеток, оставшихся на фильтре для клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кластеры клеток, собранные для дальнейшей обработки, включают кластеры клеток размером от приблизительно 40 мкм до приблизительно 100 мкм. В других вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером от приблизительно 40 мкм до приблизительно 200 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 40 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 50 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 60 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 70 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 80 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 90 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 110 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 120 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 130 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 140 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 150 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 160 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 170 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 180 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 190 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток содержат кластеры клеток размером приблизительно 200 мкм.

[113] В некоторых вариантах осуществления изобретения, отдельные клетки и клеточные культуры, не соответствующие требуемому размеру, отбрасывают. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для сбора кластеров клеток требуемого

размера может быть использована серия клеточных фильтров. Так, например, первый клеточный фильтр может иметь небольшой размер сита (например, 40 мкм), что позволяет отбирать популяцию кластеров клеток, которая остается на первом клеточном фильтре. Собранная популяция клеточных кластеров может быть затем помещена на второй клеточный фильтр с большим размером сита (например, 200 мкм, 100 мкм), а популяцию клеточных кластеров, прошедших через второй клеточный фильтр, может быть собрана для получения нужного размера (например, 40 мкм - 200 мкм или 40 мкм - 100 мкм). Альтернативно, первый клеточный фильтр может представлять собой первый клеточный фильтр с большим размером сита (например, 200 мкм, 100 мкм), так, чтобы популяция кластеров клеток, проходящих через клеточный фильтр, задерживалась, а более крупные кластеры клеток, оставшиеся на первом клеточном фильтре, удалялись. Затем пропущенные клетки могут быть помещены на второй клеточный фильтр, имеющий меньший размер сита (например, 40 мкм), так, чтобы кластеры клеток, оставшиеся на втором клеточном фильтре, были собраны и имели требуемый размер (например, 40 мкм - 200 мкм или 40 мкм - 100 мкм).

[114] Собранные клетки-предшественники RPE могут быть субкультивированы в виде кластеров или отдельных клеток для получения пролиферирующих и зрелых клеток RPE в соответствии со способами, описанными ниже.

Способ субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE для получения клеток RPE

[115] В способе субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE, кластеры клеток-предшественников RPE, полученные, как описано выше, могут быть диссоциированы с использованием реагента для диссоциации с получением отдельных клеток, а популяцию отдельных клеток-предшественников RPE субкультивируют в среду для дифференцировки до тех пор, пока не будут получены клетки RPE. В одном варианте осуществления изобретения, клетки субкультивируют на ламинине, например, на ламинине 521, ламинине 511 или iMatrix511, или на другом внеклеточном матриксе, таком как фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген или желатин. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки субкультивируют в течение приблизительно от 1 до 8 недель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки субкультивируют в течение приблизительно 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель или 8 недель. В других вариантах осуществления изобретения, клетки субкультивируют в течение по меньшей мере 8 недель. В одном варианте осуществления изобретения, клетки могут быть субкультивированы в условиях адгезии, например, в чашке для культивирования с адгезией. В другом варианте осуществления изобретения, клетки могут быть субкультивированы в условиях отсутствия адгезии и в присутствии или отсутствии фидеров.

[116] Затем клетки RPE могут быть собраны, например, с помощью реагента для диссоциации с получением кластеров клеток RPE. Кластеры клеток RPE могут быть получены путем сбора клеток RPE и удаления отдельных клеток любым способом,

известным специалистам в данной области. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE могут быть собраны и пропущены через фильтр или ряд фильтров, как описано выше, для получения кластеров клеток RPE. При этом, может быть использован любой клеточный фильтр любого размера, например, 40 мкм, 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм или 200 мкм или их комбинации. Полученные кластеры клеток RPE могут иметь размер по меньшей мере 40 мкм, 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм или 200 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кластеры клеток RPE, собранные для дальнейшей обработки, содержат кластеры клеток размером приблизительно 40 мкм и приблизительно 100 мкм. В других вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток RPE содержат кластеры клеток размером приблизительно 40 мкм и приблизительно 200 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток RPE содержат кластеры клеток размером приблизительно 40 мкм, 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм или 200 мкм.

[117] В одном варианте осуществления изобретения, полученные кластеры клеток RPE могут быть диссоциированы на отдельные клетки с помощью ферментного или неферментного реагента для диссоциации и культивированы для размножения клеток RPE, как описано ниже.

[118] В альтернативном варианте осуществления изобретения, островки пигментированных клеток могут быть селективно отобраны из полученных кластеров клеток RPE. Этот селективный/минимальный процесс отбора значительно упрощается, если желаемая клеточная популяция была сконцентрирована на предшествующей стадии субкультивирования, что позволяет получить RPE с высокой чистотой. RPE могут быть селективно отобраны вручную, например, механически с помощью стеклянного капилляра, с помощью оптического микроскопа и т.п. или с помощью автоматизированной системы, способной отличать клетки RPE от клеток других типов. Затем выбранные кластеры RPE могут быть диссоциированы для получения отдельных клеток RPE. Отдельные клетки RPE могут быть культивированы для размножения клеток RPE, как дополнительно описано ниже.

[119] В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, клетки RPE экспрессируют один или несколько маркеров, выбранных из группы, состоящей из RPE65, CRALBP, PEDF, бестрофина, MITF, OTX2, PAX2, PAX6, премеланосомного белка (PMEL или gr-100), тирозиназы и ZO1. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют бестрофин, PMEL, CRALBP, MITF, PAX6 и ZO1. В другом варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют бестрофин, PAX6, MITF и RPE65. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют MITF и по меньшей мере один маркер, выбранный из бестрофина и PAX6. В любом из вариантов

осуществления настоящего изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия одного или нескольких маркеров стволовых клеток, выбранных из группы, состоящей из OCT4, NANOG, REX1, щелочной фосфатазы, SOX2, TDGF-1, DPPA-2, DPPA-4, стадийспецифического эмбрионального антигена (SSEA)-3 и SSEA-4, антигена отторжения опухоли (TRA)-1-60 и TRA-1-80. В одном варианте осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия OCT4, SSEA4, TRA-1-81 и щелочной фосфатазы. В другом варианте осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия OCT4, NANOG и SOX2.

[120] В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец полученных клеток RPE может быть протестирован на желаемый профиль молекулярного маркера, а затем отобран. В других вариантах осуществления изобретения, проведение теста клеток RPE на наличие молекулярных маркеров перед сбором может быть необязательным, если известно, что условия культивирования позволяют продуцировать клетки RPE. Таким образом, клетки RPE могут быть собраны без проведения теста на молекулярные маркеры.

Способ субкультивирования кластера клеток-предшественников RPE для получения клеток RPE

[121] В способе субкультивирования кластеров клеток-предшественников RPE, кластеры клеток-предшественников RPE, полученные после фракционирования по размеру, как описано выше, субкультивируют в среде для дифференцировки в виде кластеров клеток до тех пор, пока не будут получены клетки RPE. В одном варианте осуществления изобретения, кластеры клеток-предшественников RPE субкультивируют на ламинине, например, на ламинине 521, ламинине 511 или iMatrix511, или на другом внеклеточном матриксе, таком как фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген или желатин. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки субкультивируют в течение приблизительно от 1 до 8 недель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки субкультивируют в течение приблизительно 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель или 8 недель. В других вариантах осуществления изобретения, клетки субкультивируют в течение по меньшей мере 8 недель. В одном варианте осуществления изобретения, кластеры клеток могут быть субкультивированы в отсутствие адгезии. В другом варианте осуществления изобретения, кластеры клеток могут быть субкультивированы в условиях адгезии. В другом варианте осуществления изобретения, кластеры клеток могут быть субкультивированы в присутствии или отсутствии фидеров.

[122] Затем клетки RPE могут быть собраны, например, с помощью реагента для диссоциации с получением кластеров клеток RPE. Кластеры клеток RPE могут быть получены путем сбора клеток RPE и удаления отдельных клеток любым способом, известным специалистам в данной области. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE могут быть собраны и пропущены через фильтр или ряд фильтров, как описано выше, для получения кластеров клеток RPE. При этом, может быть использован любой клеточный фильтр любого размера, например, 40 мкм, 50 мкм, 60 мкм,

70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм или 200 мкм или их комбинации. Полученные кластеры клеток RPE могут иметь размер по меньшей мере 40 мкм, 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм или 200 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кластеры клеток RPE, собранные для дальнейшей обработки, содержат кластеры клеток размером приблизительно 40 мкм и приблизительно 100 мкм. В других вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток RPE содержат кластеры клеток размером приблизительно 40 мкм и приблизительно 200 мкм. В некоторых вариантах осуществления изобретения, собранные кластеры клеток RPE содержат кластеры клеток размером приблизительно 40 мкм, 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм или 200 мкм.

[123] В одном варианте осуществления изобретения, полученные кластеры клеток RPE могут быть диссоциированы на отдельные клетки с помощью ферментного или неферментного реагента для диссоциации и культивированы для размножения клеток RPE, как описано ниже.

[124] В альтернативном варианте осуществления изобретения, островки пигментированных клеток могут быть селективно отобраны из полученных кластеров клеток RPE. Этот селективный/минимальный процесс отбора значительно упрощается, если желаемая клеточная популяция была сконцентрирована в предшествующей стадии субкультивирования, что позволяет получить RPE с высокой чистотой. RPE могут быть селективно отобраны вручную, например, механически с помощью стеклянного капилляра, с помощью оптического микроскопа и т.п. или с помощью автоматизированной системы, способной отличать клетки RPE от клеток других типов. Затем выбранные кластеры RPE могут быть диссоциированы для получения отдельных клеток RPE. Отдельные клетки RPE могут быть культивированы для размножения клеток RPE, как дополнительно описано ниже.

[125] В любом из вариантов осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют один или несколько маркеров, выбранных из группы, состоящей из RPE65, CRALBP, PEDF, бестрофина, MITF, OTX2, PAX2, PAX6, премеланосомного белка (PMEL или gr-100), тирозиназы и ZO1. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют бестрофин, PMEL, CRALBP, MITF, PAX6 и ZO1. В другом варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют бестрофин, PAX6, MITF и RPE65. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют MITF и по меньшей мере один маркер, выбранный из бестрофина и PAX6. В любом из вариантов осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия одного или нескольких маркеров стволовых клеток, выбранных из группы, состоящей из OCT4, NANOG, REX1, щелочной фосфатазы, SOX2, TDGF-1, DPPA-2, DPPA-4, стадийспецифического эмбрионального антигена (SSEA)-3 и SSEA-4, антигена

отторжения опухоли (TRA)-1-60 и TRA-1-80. В одном варианте осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия OCT4, SSEA4, TRA-1-81 и щелочной фосфатазы. В другом варианте осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия OCT4, NANOG и SOX2.

[126] В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец полученных клеток RPE может быть протестирован на нужный профиль молекулярного маркера, а затем отобран. В других вариантах осуществления изобретения, проведение теста клеток RPE на наличие молекулярных маркеров перед сбором может быть необязательным, если известно, что условия культивирования позволяют продуцировать клетки RPE. Таким образом, клетки RPE могут быть собраны без тестирования на молекулярные маркеры.

Размножение клеток RPE

[127] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки RPE, полученные способом субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE или кластера клеток-предшественников RPE, могут быть культивированы на внеклеточном матриксе, таком как ламинин, фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген или желатин, в среде, которая поддерживает рост или пролиферацию RPE для увеличения популяции клеток RPE.

[128] Популяция клеток RPE, впервые культивированная на этой стадии, обозначается здесь как «P0». В одном варианте осуществления изобретения, внеклеточный матрикс выбран из группы, состоящей из ламинина, фибронектина, витронектина, матригеля, CellStart, коллагена и желатина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, внеклеточный матрикс представляет собой ламинин. В одном варианте осуществления изобретения, ламинин выбран из ламинина 521, ламинина 511 или iMatrix511. В дополнительных вариантах осуществления изобретения, ламинин содержит е-кадгерин. В другом варианте осуществления изобретения, внеклеточный матрикс представляет собой желатин. В некоторых вариантах осуществления изобретения, среда представляет собой среду RPE-MM (также называемую RPEGMMM, MM или поддерживающей средой и содержащую DMEM/KO-DMEM с KSR и FBS, бета-меркаптоэтанолом, NEAA и глутамином), StemFit, EGM2 или EBDM. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в среду RPE-MM был добавлен FGF (MM/FGF). В других вариантах осуществления изобретения может быть использована и другая известная среда, которая поддерживает рост и размножение RPE. Любая такая среда может содержать или не содержать FBS и/или bFGF, или любые другие факторы, такие как гепарин, гидрокортизон, фактор роста сосудистого эндотелия, рекомбинантный инсулиноподобный фактор роста, аскорбиновая кислота или эпидермальный человеческий фактор роста. См., например, заявку WO 2013074681A, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

[129] В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE могут быть пассированы и культивированы до тех пор, пока не будет получено достаточное количество клеток RPE. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE

пассируют неограниченное количество раз. В другом варианте осуществления изобретения, клетки RPE пассируют по меньшей мере от одного раза («P1») до 20 раз («P20»). В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE пассируют по меньшей мере от двух раз («P2») до 8 раз («P8»). В другом варианте осуществления изобретения, клетки RPE пассируют два раза («P2»), три раза («P3»), четыре раза («P4»), пять раз («P5»), шесть раз («P6»), семь раз («P7») или восемь раз («P8»). Клетки RPE могут быть подвергнуты криоконсервации до их последующего использования. В одном варианте осуществления изобретения, продолжительность каждой фазы размножения может варьироваться от нескольких дней, недель и до нескольких месяцев. В одном варианте осуществления изобретения, продолжительность фазы размножения составляет приблизительно от 2 до 90 дней. В другом варианте осуществления изобретения, продолжительность фазы размножения составляет приблизительно 2-60 дней, 3-50 дней, 3-40 дней, 3-30 дней, 3-25 дней, 8-25 дней, 10-25 дней, или 2-14 дней или 2-10 дней. Во время фазы размножения, свежая среда может быть добавлена через определенные промежутки времени, например, каждые 1-2 дня. В одном варианте осуществления изобретения, bFGF добавляют в концентрации приблизительно 1-100 нг/мл в среду для культивирования клеток RPE в течение первых 1-5 дней, 1-4 дней, 1-3 дней, 1-2 дней, 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней или 5 дней размножения RPE при каждом пассаже (например, P0, P1, P2), а затем удаляют до последующего пассажа. В одном варианте осуществления изобретения, концентрация bFGF составляет приблизительно 1-50 нг/мл, приблизительно 2-40 нг/мл, приблизительно 3-30 нг/мл, приблизительно 4-20 нг/мл или приблизительно 4-10 нг/мл. В конкретном варианте осуществления изобретения, концентрация bFGF составляет приблизительно 4 нг/мл, 5 нг/мл, 6 нг/мл, 7 нг/мл, 8 нг/мл, 9 нг/мл или 10 нг/мл.

[130] В любом из вариантов осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют один или несколько маркеров, выбранных из группы, состоящей из RPE65, CRALBP, PEDF, бестрофина, MITF, OTX2, PAX2, PAX6, премеланосомного белка (PMEL или gr-100), тирозиназы и ZO1. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют бестрофин, PMEL, CRALBP, MITF, PAX6 и ZO1. В другом варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют бестрофин, PAX6, MITF и RPE65. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE экспрессируют MITF и по меньшей мере один маркер, выбранный из бестрофина и PAX6. В любом из вариантов осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия одного или нескольких маркеров стволовых клеток, выбранных из группы, состоящей из OCT4, NANOG, REX1, щелочной фосфатазы, SOX2, TDGF-1, DPPA-2, DPPA-4, стадиеспецифического эмбрионального антигена (SSEA)-3 и SSEA-4, антигена отторжения опухоли (TRA)-1-60 и TRA-1-80. В одном варианте осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия OCT4, SSEA4, TRA-1-81 и щелочной фосфатазы. В другом варианте осуществления изобретения, в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия OCT4, NANOG и SOX2.

[131] В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец полученных клеток RPE может быть протестирован на желаемый профиль молекулярного маркера, а затем отобран. В других вариантах осуществления изобретения, проведение теста клеток RPE на наличие молекулярных маркеров перед сбором может быть необязательным, если известно, что условия культивирования позволяют продуцировать клетки RPE. Таким образом, клетки RPE могут быть собраны без тестирования на молекулярные маркеры.

Культуры на основе фидеров и без них

Мышиные фидерные слои

[132] PSC, раскрытые в настоящей заявке, могут быть культивированы на мышинных эмбриональных фибробластах (MEF) в качестве фидерных клеток (см., например, Thomson J A, Itkovitz-Eldor J, Shapiro S S, Waknitz MA, Swiergiel J J, Marshall V S, Jones J M. (1998); Science 282: 1145-7; Reubinoff B E, Pera M F, Fong C, Trounson A, Bongso A. (2000); Reubinoff et al., 2000, Nat. Biotechnol. 18: 399-404). Клетки MEF могут быть получены из 12-13-дневных мышинных эмбрионов в среде с добавлением фетальной бычьей сыворотки.

[133] PSC могут быть культивированы на MEF в бессывороточных условиях путем замены сыворотки с добавлением основного фактора роста фибробластов (bFGF) (см., например, Amit M, Carpenter M K, Inokuma M S, Chiu C P, Harris C P, Waknitz M A, Itskovitz-Eldor J, Thomson J A. (2000)). Клонально полученные линии эмбриональных стволовых клеток человека сохраняют плюрипотентность и пролиферативный потенциал в течение длительных периодов культивирования (см., например, Dev. Biol. 227: 271-8). Кроме того, после 6-месячного культивирования с заменой сыворотки, PSC могут все еще сохранять свою плюрипотентность при культивировании в условиях, способствующих поддержанию плюрипотентного состояния. На плюрипотентность PSC может указывать их способность образовывать тератомы, содержащие все три эмбриональных зародышевых слоя. Кроме того, дифференцировка PSC в RPE может быть осуществлена в присутствии мышинных фидерных клеток. Соответственно, PSC, используемые в описанных здесь способах, могут быть культивированы на мышинных фидерных клетках.

Человеческие фидерные клетки

[134] PSC могут быть культивированы, сохранены или дифференцированы на человеческих фидерных клетках, как описано, например, в публикации PCT № WO2009048675. PSC могут поддерживаться в недифференцированном состоянии посредством нескольких последовательных пассажей PSC на фидерных клетках человека (см., например, Richards et al., 2002, Nat. Biotechnol. 20: 933-6). PSC также могут быть дифференцированы в RPE в присутствии фидерных клеток человека. Соответственно, PSC, используемые в описанных здесь способах, могут быть культивированы на фидерных клетках человека.

Культуры без фидеров

[135] PSC могут быть культивированы в системе без фидеров на твердой поверхности, такой как внеклеточный матрикс (например, Matrigel® или ламинин), в

присутствии культуральной среды. Специалистам в данной области известны различные способы дифференцировки PSC *ex vivo* в клетки RPE, как описано в публикации Rowland et al., *Journal Cell Physiology*, 227:457-466, 2012, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. Соответственно, PSC, используемые в описанных здесь способах, могут быть культивированы на культурах без фидеров.

Применение FGF/bFGF и ингибиторов ROCK

[136] В развитии млекопитающих, RPE имеют общего предшественника с клетками нервной части сетчатки, нейроэпителием глазного пузырька. При определенных условиях, RPE может трансдифференцироваться в клетки-предшественники нейронов (Opas and Dziak, 1994, *Dev Biol.* 161(2):440-54), нейроны (Chen et al., 2003, *J. Neurochem.* 84(5):972-81). Vinores et al., 1995, *Exp Eye Res.* 60(6):607-19) и эпителий хрусталика (Eguchi, 1986). Одним из факторов, который может стимулировать превращение RPE в нейроны, является bFGF (Opas and Dziak, 1994, *Dev Biol.* 161(2):440-54), и такой процесс ассоциируется с экспрессией активаторов транскрипции, обычно необходимых для развития глаза, включая *rx/rax*, *chx10/vsx-2/alx*, *ots-1*, *otx-2*, *six3/optx*, *six6/optx2*, *mitf* и *PAX6/pax2* (Fischer and Reh, 2001, *Dev Neurosci.* 23(4-5):268-76; Baumer et al., 2003, *Development*;130(13):2903-15). Было показано, что края сетчатки кур содержат нервные стволовые клетки (Fischer and Reh, 2000; *Dev Biol.* 15;220(2):197-210), и что пигментированные клетки в этой области, которые экспрессируют *PAX6/mitf*, могут образовывать нейроны в ответ на FGF (Fischer and Reh, 2001, *Dev Neurosci.* 23(4-5):268-76).

[137] В некоторых вариантах осуществления изобретения, PSC согласно изобретению могут поддерживаться в плюрипотентном состоянии в культуральной среде, содержащей 1-200 нг/мл bFGF. В одном варианте осуществления изобретения, концентрация bFGF составляет приблизительно 1-100 нг/мл, приблизительно 2-100 нг/мл, приблизительно 3-100 нг/мл или приблизительно 4-100 нг/мл. В конкретном варианте осуществления изобретения, концентрация bFGF составляет приблизительно 100 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения, PSC могут быть дифференцированы в клетки RPE в присутствии bFGF. В других вариантах осуществления изобретения, как обсуждалось ранее и в настоящей заявке, клетки RPE могут размножаться в присутствии bFGF.

[138] Во время образования RPE, плюрипотентные клетки могут быть культивированы в присутствии ингибитора rho-ассоциированной протеинкиназы (ROCK). Ингибиторы ROCK означают любое вещество, которое ингибирует или снижает функцию Rho-ассоциированной киназы или ее сигнального пути в клетке, такой как небольшая молекула, кРНК, мРНК, антисмысловая РНК или т.п. Используемый здесь термин «путь передачи сигнала ROCK» может включать любые сигнальные процессоры, участвующие в ROCK-ассоциированном пути передачи сигнала, таком как путь передачи сигнала Rho-ROCK-миозина II, его предшествующий путь передачи сигнала или его нисходящий путь передачи сигнала в клетке. Типичным ингибитором ROCK, который может быть

использован, является молекула Stemolecule Y-27632 Стемгента (см. публикации Watanabe et al., Nat Biotechnol. 2007 Jun;25(6):68 1-6). Другими ингибиторами ROCK являются, например, H-1152, Y-30141, Wf-536, HA-1077, гидроксил-НА-1077, GSK269962A и SB-772077-B, см. публикации Doe et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 32:89-98, 2007; Ishizaki, et al, Mol. Pharmacol., 57:976-983, 2000; Nakajima et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 52:3 1 9-324, 2003; and Sasaki et al., Pharmacol. Ther., 93:225-232, 2002, каждая из которых в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки, как если бы каждая из них была изложена полностью. Ингибиторы ROCK могут быть использованы в концентрациях и/или в условиях культивирования, известных специалистам в данной области, например, как описано в публикации заявки США № 2012/0276063, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. Так, например, ингибитор ROCK может иметь концентрацию от приблизительно 0,05 до приблизительно 50 мкМ, например, по меньшей мере или приблизительно 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 0,8, 1, 1,5, 2, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мкМ, включая любые интервалы в пределах указанных значений, или любую концентрацию, эффективную для стимуляции роста или выживания клеток. В дополнительных вариантах осуществления изобретения, культура для размножения RPE может быть дополнена ингибиторами ROCK и/или bFGF, как описано в публикации РСТ № WO2013074681A1, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

Адгезивная и неадгезивная культура

[139] Используемый здесь термин «адгезивная культура» означает культуру в состоянии, при котором представляющие интерес клетки прикреплены к сосуду для культивирования тканей посредством субстрата для культивирования клеток, например, ламинина. Клетки могут также прилипать к пластику, обработанному для прилипания клеток («обработанному тканевой культурой») без какого-либо дополнительного покрытия субстрата.

[140] В некоторых вариантах осуществления изобретения, дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток в клетки RPE осуществляют с помощью адгезивной культуры. Адгезивное культивирование может быть осуществлено с использованием сосуда для клеточно-адгезивной культуры. Хотя сосуд для культивирования адгезивных клеток не имеет конкретных ограничений при условии, что поверхность сосуда для культивирования будет обработана для улучшения адгезии клеток, однако, может быть использован, например, сосуд для культивирования, имеющий слой покрытия, содержащий внеклеточный матрикс, синтетический полимер и т.п. Слой покрытия может состоять из компонентов одного или более видов, либо он может быть образован одним или несколькими слоями. Хотя внеклеточный матрикс не имеет конкретных ограничений, при условии, что он может образовывать слой покрытия, обладающий адгезивностью к плюрипотентной стволовой клетке, однако, могут быть использованы, например, коллаген, желатин, ламинин, фибронектин и т.п., как отдельно, так и в комбинации. В качестве коммерчески доступного продукта, содержащего внеклеточные матриксы

несколько видов, могут быть использованы Matrigel (BD), CELLStart (Invitrogen) и т.п. В качестве синтетического полимера могут быть использованы полимеры, полученные биологическим или химическим способом. Так, например, предпочтительно использовать катионные полимеры, такие как полилизин (поли-D-лизин, поли-L-лизин), полиорнитинполиэтиленмин (PEI), поли-N-пропилакриламид (PAAm) и т.п. Внеклеточный матрикс или синтетический полимер могут быть получены биологическим способом с использованием бактерий, клеток и т.п. и внесением необходимых генетических модификаций, либо они могут быть синтезированы химическим способом. В других вариантах осуществления изобретения, клетки могут связываться с внеклеточным матриксом посредством пептидов RGD, которые связываются с интегриновыми рецепторами адгезии, обнаруженными во многих внеклеточных матриксах.

[141] В некоторых вариантах осуществления изобретения, адгезивное культивирование может быть проведено на сосуде для культивирования тканей, который не был обработан каким-либо субстратом для культивирования клеток или для клеточной адгезии. Так, например, компоненты среды, такие как FBS, фибронектин или витронектин, могут абсорбироваться на сосуде для культивирования тканей и могут служить субстратами для клеточной адгезии. В других вариантах осуществления изобретения, клетки в сосудах для культивирования ткани могут секретировать внеклеточные матриксы, который могут также служить субстратами для клеточной адгезии.

[142] Используемый здесь термин «неадгезивная культура» означает культуру в состоянии, при котором представляющие интерес клетки не прикрепляются или практически не прикрепляются к сосуду для культивирования тканей. Соответственно, отдельные клетки или кластеры клеток в неадгезивной культуре могут плавать в культуре и могут присутствовать в виде суспензии. Отдельные клетки в неадгезивной культуре могут образовывать кластеры или агрегаты при соответствующих условиях. В одном варианте осуществления изобретения, поверхность сосуда для культивирования может быть покрыта гидрофильным нейтрально заряженным покрытием, которое ковалентно связано с поверхностью сосуда из полистирола, например с покрытием, таким, как покрытие Corning®, имеющее сверхнизкую степень связывания с поверхностью. Несвязывающая поверхность ингибирует специфическую и неспецифическую иммобилизацию, что стимулирует переход клеток в суспендированное состояние. Клетки могут быть также культивированы во вращающейся колбе (Corning) для культивирования клеток в суспензии. Специалистам известны и другие методы культивирования клеток в неадгезивной культуре, и эти методы могут быть использованы в способах согласно изобретению.

II. Способы применения клеток пигментного эпителия сетчатки

[143] Клетки RPE и фармацевтические композиции, содержащие клетки RPE, полученные описанными здесь способами, могут быть применены для лечения с использованием клеток RPE, которые необходимы для такого лечения или могут его улучшить. Способы применения клеток RPE, описанных в настоящей заявке, для лечения

различных состояний, которое может оказаться эффективным путем проведения терапии на основе клеток RPE, описаны в настоящей заявке и, например, в патенте США № 10077424, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. Конкретная схема лечения, способ введения и любая адъювантная терапия будут адаптированы в зависимости от конкретного состояния, тяжести состояния и общего состояния здоровья пациента. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления изобретения, введение клеток RPE может быть эффективным для полного восстановления любой потери зрения или устранения других симптомов. В других вариантах осуществления изобретения, введение клеток RPE может быть эффективным для снижения тяжести симптомов и/или предотвращения дальнейшего ухудшения состояния пациента. В настоящем изобретении предусматривается, что введение композиции, содержащей клетки RPE, может быть осуществлено для лечения (включая снижение тяжести симптомов полностью или частично) любого из описанных здесь состояний. Кроме того, введение клеток RPE может быть осуществлено для лечения симптомов любого повреждения эндогенного слоя RPE.

[144] В настоящем изобретении предусматривается, что клетки RPE, включая композиции, содержащие клетки RPE, полученные любыми из описанных здесь способов, могут быть использованы для лечения любого из заболеваний, описанных в настоящей заявке. Кроме того, в настоящем изобретении предусматривается, что любая из описанных здесь композиций, содержащих клетки RPE, может быть использована для лечения любого из описанных здесь заболеваний. В другом варианте осуществления изобретения, клетки RPE согласно изобретению могут быть введены вместе с другими терапевтическими клетками или агентами. Клетки RPE могут быть введены одновременно в виде комбинированного или отдельного препарата, либо они могут быть введены последовательно.

[145] В одном своем варианте, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или расстройства сетчатки. В одном варианте осуществления изобретения, заболевание или расстройство сетчатки включает, например, дегенерацию сетчатки, такую как хориоидеремия, диабетическая ретинопатия, возрастная дегенерация желтого пятна (сухая или мокрая), отслоение сетчатки, пигментный ретинит, болезнь Штаргардта, ангиоидные полоски или миопическая дегенерация желтого пятна или глаукома. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки RPE согласно изобретению могут быть использованы для лечения заболеваний центральной нервной системы, таких как болезнь Паркинсона.

[146] Пигментный ретинит представляет собой наследственное заболевание, при котором зрительные рецепторы постепенно разрушаются в результате аномального генетического программирования. Некоторые формы вызывают полную слепоту в относительно молодом возрасте, тогда как другие формы демонстрируют характерные изменения сетчатки в виде «костных шипов» с небольшим ухудшением зрения. Это заболевание поражает приблизительно 1,5 миллиона человек во всем мире. Некоторые

генные дефекты, вызывающие аутосомно-рецессивный пигментный ретинит, были обнаружены в генах, экспрессирующихся исключительно в RPE. Один из них связан с белком RPE, участвующим в метаболизме витамина А (белком, связывающимся с цис-ретиальдегидом (CRLBP)). Другой дефект ассоциируется с белком, уникальным для RPE, RPE65. Мутации в протоонкогене MER, в гене тирозинкиназы (MERTK), также были связаны с нарушением пути фагоцитоза RPE и возникновением аутосомно-рецессивного пигментного ретинита. Известны и другие генные дефекты и формы пигментного ретинита, ассоциированные с RPE. См., например, Verbakel et al., *Progress in Retinal and Eye Research* 66:157-186 (2018). Настоящее изобретение относится к способам и к композициям для лечения любой или всех форм пигментного ретинита, ассоциированного с RPE, путем введения клеток RPE.

[147] Животные с моделью пигментного ретинита, которые могут быть подвергнуты лечению или могут быть использованы для оценки эффективности клеток RPE, полученных с применением описанных здесь способов, включают грызунов (мышей rd, мышей с нокаутом RPE-65, мышей с бочкообразной формой клеток, мышей LRAT, крыс RCS), кошек (абиссинских кошек) и собак (собак с колбочковой дегенерацией «cd», собак с прогрессирующей палочко-колбочковой дегенерацией «prcd», собак с ранней дегенерацией сетчатки «erd», собак с дисплазией палочек-колбочек 1, 2 и 3 «rcd1, rcd2 & rcd3», собак с фоторецепторной дисплазией «rd» и собак породы Бриар «RPE-65»).

[148] В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к способам и к композициям для лечения расстройств, ассоциированных с дегенерацией сетчатки, включая дегенерацию желтого пятна.

[149] Еще одним аспектом настоящего изобретения является применение клеток RPE для лечения глазных болезней, включая наследственные и приобретенные глазные болезни. Примерами приобретенных или наследственных глазных болезней являются возрастная дегенерация желтого пятна, глаукома и диабетическая ретинопатия.

[150] Возрастная дегенерация желтого пятна (ВДЖП) является наиболее распространенной причиной практической слепоты в западных странах. Атрофия субмакулярного пигментного эпителия сетчатки и развитие хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ) впоследствии приводят к потере центральной остроты зрения. Для большинства пациентов с субфовеальной ХНВ и региональной атрофией в настоящее время не существует какого-либо лечения, позволяющего предотвратить потерю центральной остроты зрения. Ранними признаками ВДЖП являются отложения (друзы) между пигментным эпителием сетчатки и мембраной Бруха. При этом заболевании наблюдается прорастание сосудов сосудистой оболочки в субретиальное пространство желтого пятна. Это приводит к потере центрального зрения и способности читать.

[151] Глаукома представляет собой группу заболеваний, при которых наблюдается аномальное увеличение глазного давления. Это приводит к сужению поля зрения и общему снижению способности видеть. Наиболее распространенной формой является первичная глаукома, при этом, выделяют две ее формы: хроническую тупоугольную

глаукому и остроугольную закрытоугольную глаукому. Вторичная глаукома может быть вызвана инфекциями, опухолями или травмами. Третий тип, то есть, наследственная глаукома, обычно возникает в результате нарушений развития во время беременности. Водянистая влага в глазном яблоке находится под определенным давлением, которое необходимо для достижения оптических свойств глаза. Это внутриглазное давление обычно составляет от 15 до 20 миллиметров ртутного столба и регулируется равновесием между образованием и оттоком водянистой влаги. При глаукоме блокируется отток водянистой влаги в углу передней камеры, что приводит к повышению внутриглазного давления. Глаукома обычно развивается в среднем или в пожилом возрасте, но наследственные формы и заболевания нередки у детей и подростков. Хотя внутриглазное давление обычно повышено лишь незначительно и, кроме того, отсутствуют явные симптомы, однако, происходит постепенное повреждение, особенно сужение поля зрения. Острое контрастное закрытие угла вызывает боли, покраснение, увеличение зрачка и серьезные нарушения зрения. Затем роговица становится мутной и сильно повышается внутриглазное давление. По мере прогрессирования заболевания, поле зрения становится все более узким, что легко обнаруживается по периметру с помощью офтальмологического инструмента. Хроническая глаукома обычно хорошо поддается местному введению лекарственных средств, которые усиливают отток водянистой влаги. Для уменьшения образования водянистой жидкости иногда назначаются активные вещества системного действия. Однако, медикаментозное лечение не всегда бывает успешным. Если медикаментозная терапия не помогает, то применяют лазеротерапию или обычные операции, чтобы создать новый отток водянистой влаги. Острая глаукома требует неотложной медицинской помощи. Если внутриглазное давление не снижается в течение 24 часов, то происходят необратимые повреждения.

[152] Диабетическая ретинопатия возникает при сахарном диабете. Сахарный диабет может приводить к утолщению базальной мембраны эндотелиальных клеток сосудов в результате гликозилирования белков. Такое гликозилирование белков является причиной раннего склероза сосудов и образования капиллярных аневризм. Эти сосудистые изменения в течение многих лет приводят к диабетической ретинопатии. Сосудистые изменения вызывают гипоперфузию капиллярных областей. Это приводит к отложениям липидов (твердых экссудатов) и вазопролиферации. Клиническое течение у больных сахарным диабетом происходит по различным механизмам. При возрастном диабете (диабета типа II) сначала появляются капиллярные аневризмы. В дальнейшем, из-за нарушения капиллярной перфузии появляются твердые и мягкие экссудаты и точечные кровоизлияния в паренхиме сетчатки. На более поздних стадиях диабетической ретинопатии, жировые отложения располагаются в виде короны вокруг желтого пятна (кольцевой ретинит). Эти изменения часто сопровождаются отеком заднего полюса глаза. Если отек затрагивает желтое пятно, то наблюдается острое и серьезное ухудшение зрения. Основной проблемой при сахарном диабете типа I является разрастание сосудов в области глазного дна. Стандартной терапией является лазеркоагуляция пораженных

участков глазного дна. Лазеркоагуляцию сначала проводят на очаговом уровне на пораженных участках сетчатки. При сохранении экссудата, площадь лазеркоагуляции расширяют. Центр сетчатки с местом наиболее острого зрения, то есть, желтого пятна и папилломакулярного пучка, не может быть коагулирован, поскольку такая процедура будет приводить к разрушению частей сетчатки, наиболее важных для зрения. Если пролиферация уже произошла, то часто бывает необходимо очень плотно прижать очаги на участке пролиферации. Это влечет за собой разрушение участков сетчатки. Результатом является соответствующая потеря поля зрения. При диабете типа I, своевременная лазерная коагуляция зачастую является единственным шансом спасти пациентов от слепоты.

[153] Другим вариантом осуществления изобретения является способ получения клеток RPE или предшественников клеток RPE, обладающих повышенной способностью предотвращать неоваскуляризацию. В качестве альтернативы, такие клетки могут быть генетически модифицированы экзогенными генами, которые ингибируют неоваскуляризацию.

[154] В настоящем изобретении предусматривается, что композиции клеток RPE, полученные из плюрипотентных стволовых клеток человека (например, эмбриональных стволовых клеток человека или других плюрипотентных стволовых клеток), могут быть использованы для лечения любого из вышеперечисленных заболеваний или состояний, а также повреждений эндогенного слоя RPE. Эти заболевания можно лечить с использованием композиций клеток RPE, содержащих клетки RPE различной степени зрелости, а также композиций клеток RPE, обогащенных зрелыми клетками RPE.

III. Способы введения клеток пигментного эпителия сетчатки

[155] Клетки RPE согласно изобретению могут быть введены любым способом, подходящим для лечения заболевания или расстройства. В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE согласно изобретению могут быть введены местно, системно или, например, путем инъекции (например, путем субретинальной инъекции) или в составе устройства или имплантата (например, имплантата с замедленным высвобождением). Так, например, клетки RPE согласно изобретению могут быть трансплантированы в субретинальное пространство с помощью операции витрэктомии при лечении пациента с нарушением или заболеванием сетчатки, таким как дегенерация желтого пятна, болезнь Штаргардта и пигментный ретинит. В другом примере, клетки RPE согласно изобретению могут быть трансплантированы системно или локально при лечении пациента с расстройством ЦНС, таким как болезнь Паркинсона. Специалист в данной области может самостоятельно определить способ введения для лечения заболевания или расстройства.

[156] Клетки RPE согласно изобретению могут быть доставлены в виде фармацевтически приемлемого офтальмологического состава путем внутриглазной инъекции, а более конкретно, субретинально. Концентрации для инъекций могут представлять собой любое количество, которое является эффективным и нетоксичным в

зависимости от описанных здесь факторов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки RPE для лечения пациента получают в дозах от приблизительно 5 клеток/150 мкл до 1×10^7 клеток/150 мкл, от 50 клеток/150 мкл до 1×10^6 клеток/150 мкл или от 50 клеток/150 мкл до 5×10^5 клеток/150 мкл. В других вариантах осуществления изобретения, клетки RPE для лечения пациента приготавливают в дозах приблизительно 10, 50, 100, 500, 5000, 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 или 1×10^6 клеток/150 мкл. В одном варианте осуществления изобретения, пациенту может быть введено приблизительно 50000-500000 клеток. В конкретном варианте осуществления изобретения, пациенту может быть введено приблизительно 50000, 100000, 150000, 200000, 250000, 300000, 350000, 400000, 450000 или 500000 клеток RPE.

[157] Клетки RPE могут быть приготовлены для доставки в фармацевтически приемлемом офтальмологическом носителе, так, чтобы композиция оставалась в контакте с поверхностью глаза в течение периода времени, достаточного для проникновения клеток в пораженные участки глаза, такие как, например, передняя камера, задняя камера, стекловидное тело, водянистая влага, жидкая часть стекловидного тела, роговица, радужка/ресница, хрусталик, сосудистая оболочка, сетчатка, склера, надхориоидальное пространство, конъюнктив, субконъюнктивальное пространство, эписклеральное пространство, интракорнеальное пространство, эпикорнеальное пространство, ресничный кружок, хирургически индуцированные аваскулярные области или желтое пятно. Продукты и системы, такие как носители для доставки, содержащие агенты согласно изобретению, особенно агенты, которые были приготовлены в виде фармацевтических композиций, а также наборы, содержащие такие носители и/или системы для доставки, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

[158] В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтический способ согласно изобретению включает стадию введения клеток RPE согласно изобретению с помощью имплантата или устройства. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство представляет собой биоразлагаемый имплантат для лечения глазных болезней, содержащий активный агент, диспергированный в биоразлагаемой полимерной матрице, где по меньшей мере приблизительно 75% частиц активного агента имеют диаметр менее чем приблизительно 10 мкм. Размер биоразлагаемого имплантата позволяет имплантировать его в глазную область. Глазная область может представлять собой любую одну или более из таких областей, как передняя камера, задняя камера, полость стекловидного тела, сосудистая оболочка, надхориоидальное пространство, конъюнктив, субконъюнктивальное пространство, эписклеральное пространство, интракорнеальное пространство, эпикорнеальное пространство, склера, ресничный кружок, хирургически индуцированные аваскулярные области, желтое пятно и сетчатка. Биоразлагаемый полимер может представлять собой, например, сополимер молочной и гликолевой кислоты (PLGA). В некоторых вариантах осуществления изобретения, соотношение мономеров молочной и гликолевой кислот в полимере составляет приблизительно 25/75, 40/60, 50/50, 60/40, 75/25 масс.%, а более предпочтительно

приблизительно 50/50. Кроме того, сополимер PLGA может составлять от приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 до приблизительно 90 процентов по массе биоразлагаемого имплантата. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, сополимер PLGA может составлять от приблизительно 30 до приблизительно 50 процентов по массе, а предпочтительно приблизительно 40 процентов по массе биоразлагаемого имплантата.

[159] Объем композиции, вводимой в соответствии с описанными здесь способами, также зависит от таких факторов, как способ введения, количество клеток RPE, возраст пациента, а также тип и тяжесть заболевания, подвергаемого лечению. При введении путем инъекции, объем жидкости, содержащей композицию согласно изобретению, может составлять от приблизительно 5,0 микролитров до приблизительно 50 микролитров, от приблизительно 50 микролитров до приблизительно 250 микролитров, от приблизительно 250 микролитров до приблизительно 1 миллилитра. В одном варианте осуществления изобретения, объем инъекции может составлять приблизительно 150 микролитров.

[160] При введении путем внутриглазной инъекции, клетки RPE могут периодически доставляться один или несколько раз на протяжении всей жизни пациента. Так, например, клетки RPE могут быть введены один раз в год, один раз через каждые 6-12 месяцев, один раз через каждые 3-6 месяцев, один раз через каждые 1-3 месяца или один раз через каждые 1-4 недели. Альтернативно, при определенных состояниях или расстройствах может оказаться желательным более частое введение. При введении с помощью имплантата или устройства, клетки RPE могут быть введены один раз или один или несколько раз периодически в течение жизни пациента, если это необходимо для лечения заболевания или состояния у конкретного пациента. Аналогичным образом рассматривается схема терапии, которая может изменяться с течением времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациентам также назначают иммуносупрессорную терапию до, во время или после введения клеток RPE. Иммуносупрессорная терапия может быть необходима на протяжении всей жизни пациента или в течение более короткого периода времени. Примеры иммуносупрессорной терапии включают, но не ограничиваются ими, введение одного или более из: поликлонального антитела против лимфоцитарного глобулина (ALG), поликлонального антитела против тимоцитарного глобулина (ATG), азатиоприна, BASILIXIMAB® (антитела против рецептора IL-2Ra), циклоспорина (циклоспорина А), DACLIZUMAB® (антитела против рецептора IL-2Ra), эверолимуса, микофеноловой кислоты, RITUXIMAB® (антитела против CD20), сиролимуса, такролимуса (Prograf™) и микофемолата мофетила (MMF).

[161] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки RPE согласно изобретению приготавливают вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Так, например, клетки RPE могут быть введены отдельно или как компонент фармацевтического препарата. Рассматриваемые соединения могут быть приготовлены для введения любым удобным способом, применяемым в медицине. В некоторых

вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать клетки RPE в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или безводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые могут быть разведены с получением стерильных растворов или дисперсий для инъекций непосредственно перед использованием, и которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, которые придают составу изотоничность с кровью конкретного реципиента, или суспендирующие или загущающие агенты. Примеры подходящих водных и безводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях согласно изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования материалов для нанесения покрытия, таких как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и за счет использования поверхностно-активных веществ.

[162] В одном варианте осуществления изобретения, клетки RPE согласно изобретению готовят в виде препарата GS2, описанного в заявке WO 2017/031312, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

[163] Содержание, раскрытое в любой публикации, цитируемой в настоящем описании, включая патенты и патентные заявки, в полном объеме вводится в настоящее описание посредством ссылки так, как если бы оно было раскрыто в настоящей заявке.

Примеры

[164] Нижеследующие примеры носят исключительно иллюстративный характер и никоим образом не должны рассматриваться как ограничение объема или сущности изобретения.

[165] Пример 1: Динамика экспрессии PAX6/MITF в клетках-предшественниках RPE

[166] Клетки J1 hES высевали на планшеты, покрытые ламинином 521/e-кадгерином с добавлением HDF, инактивированного митомицином C, и содержащие EBDM для инициации дифференцировки клеток J1. Клетки в культуре собирали приблизительно через 1, 2, 3, 4, 6 и 8 недель после начала культивирования в EBDM и оценивали экспрессию PAX6 и MITF с помощью кол.ПЦР. Как показано на фиг. 1, клетки-предшественники PAX6⁺/MITF⁺-RPE начинают появляться приблизительно через 3-4 недели в культуре, а экспрессия мРНК PAX6 и MITF в культуре со временем увеличивается (см., например, недели 6-8).

[167] В другом эксперименте, клетки hES J1 высевали на планшеты, покрытые ламинином 521/e-кадгерином, с добавлением HDF, инактивированного митомицином C, и содержащие среду Nutristem (Stemgent) на 4 дня, а затем в TeSR2 (STEMCELL Technologies) на 8 дней. Затем среду заменяли на EBDM для инициации

дифференцировки клеток J1. Приблизительно через 5,5 недель, 9 недель и 10 недель после начала культивирования в EBDM, клетки обрабатывали коллагеназой, и полученный гидролизованный материал пропускали через колонку с фильтрами, состоящую из 100-микронного фильтра, установленного поверх 40-микронного фильтра, закрепленного на пробирке для сбора. Клетки, прошедшие через 40-микронный фильтр (клетки размером менее 40 мкм), клетки, оставшиеся на 100-микронном фильтре (клетки размером >100 мкм), и кластеры, оставшиеся на 40-микронном фильтре (клетки размером приблизительно 40-100 мкм) извлекали, и каждую фракцию высевали в лунки, покрытые LN521, в EBDM на три дня, после чего клетки фиксировали и окрашивали на PAX6/MITF. Как показано на фиг. 2, клетки размером <40 мкм практически не окрашивались на PAX6/MITF даже через 5,5, 9 и 10 недель после начала дифференцировки. Через 9-10 недель после начала дифференцировки, клетки, полученные из фракции 40-100 мкм, показали сильное окрашивание на PAX6/MITF по сравнению с фракцией >100 мкм.

[168] Исходя из этих результатов были определены сроки сбора клеток-предшественников PAX6⁺/MITF⁺-RPE для субкультивирования. Типичные способы получения клеток RPE в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения были систематизированы на фиг. 3. Подробное описание стадий вариантов осуществления этих репрезентативных способов приводится ниже.

[169] Пример 2: Получение клеток пигментного эпителия сетчатки (RPE) способом субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE

[170] В первом эксперименте, клетки HDF, обработанные митомицином-С, высевали на лунки, покрытые ламинином 521/Е-кадгеринном. hESC J1 высевали в лунки и культивировали в течение приблизительно 4 дней в NutriStem (Stemgent), а затем в TeSR2 (STEMCELL Technologies) в течение 4 дней. Затем среду заменяли на EBDM для стимуляции образования RPE, и EBDM меняли каждый день в течение 7 дней, а затем каждые 2-3 дня.

[171] После выдерживания в течение 83 дней (приблизительно 12 недель) в EBDM, клетки обрабатывали коллагеназой в течение ночи. Полученный гидролизованный материал пропускали через колонку фильтров, состоящую из 100-микронного фильтра, установленного поверх 40-микронного фильтра, закрепленного на пробирке для сбора. Кластеры, оставшиеся на 40-микронном фильтре, извлекали и диссоциировали на отдельные клетки путем обработки трипсином в течение 15 минут. Отдельные клетки высевали в лунки, покрытые LN521, в EBDM, и EBDM меняли каждые 2-3 дня. После повторного посева клеток через 30 дней (приблизительно 4 недели) в EBDM, клетки обрабатывали коллагеназой в течение приблизительно 6 часов. Полученный гидролизованный материал пропускали через колонку фильтров, состоящую из 100-микронного фильтра, установленного поверх 40-микронного фильтра, закрепленного на пробирке для сбора. Кластеры, оставшиеся на 40-микронном фильтре, извлекали и диссоциировали на отдельные клетки путем 10-кратной обработки TrypLE (Thermo Fisher) в течение 15 минут. Отдельные клетки высевали как клетки RPE пассажа 0 («P0») в

покрытые желатином лунки в среде MM/FGF (DMEM; добавка GlutaMAX™-I (100x), жидкость, 200 mM; FBS; KnockOut DMEM; заменимые аминокислоты; 2-меркаптоэтанол; заменитель сыворотки KnockOut [KSR] + bFGF). Среду MM/FGF меняли каждый день до приблизительно >90% конfluence, а затем меняли на среду MM [вышеупомянутая среда MM/FGF без bFGF] и подпитывали каждые 2 дня до сбора. Клетки RPE P0 культивировали в течение 16 дней. Клетки P0 собирали путем 10-кратной обработки TrypLE в течение 15 минут, и отдельные клетки снова высевали в виде клеток RPE 1-го пассажа («P1») в лунки, покрытые желатином, со средой MM/FGF. Метод культивирования повторяли, как описано выше, для клеток RPE P0, сначала путем культивирования в среде MM/FGF, а затем в среде MM. Клетки RPE P1 культивировали в течение 14 дней. Клетки RPE P1 собирали и повторно высевали как клетки RPE 2-го пассажа («P2»), как описано выше, сначала путем культивирования в среде MM/FGF, а затем в среде MM. Клетки RPE P2 культивировали в течение 14 дней и собирали путем 10-кратной обработки TrypLE в течение 15 минут, а затем подвергали криоконсервации. Затем клетки размораживали, приготавливали в виде GS2 и подвергали анализу контроля качества. Результаты представлены в Таблице 1.

[172] Во втором эксперименте, клетки с HDF, инактивированным митомицином-C, высевали на лунку, покрытую iMatrix511 (Takara Bio). Затем hES-клетки J1 высевали в лунку с iMatrix511-HDF и культивировали в течение 8 дней в среде StemFit (Ajinomoto). Затем среду заменяли на EBDM для стимуляции образования RPE. EBDM меняли каждый день в течение 7 дней, а затем каждые 2-3 дня.

[173] После выдерживания в течение 47 дней (приблизительно 7 недель) в EBDM, клетки обрабатывали коллагеназой в течение шести часов. Полученный гидролизованный материал пропускали через колонку фильтров, состоящую из 100-микронного фильтра, установленного поверх 40-микронного фильтра, закрепленного на пробирке для сбора. Кластеры, оставшиеся на 40-микронном фильтре, извлекали и диссоциировали на отдельные клетки путем 10-кратной обработки TrypLE в течение 15 минут. Отдельные клетки высевали в лунки, покрытые iMatrix511, в EBDM, и EBDM меняли каждые 2-3 дня. После повторного посева клеток через 39 дней (приблизительно 5 недель) в EBDM, клетки обрабатывали коллагеназой в течение ночи. Полученный гидролизованный материал пропускали через колонку фильтров, состоящую из 100-микронного фильтра, установленного поверх 40-микронного фильтра, закрепленного на пробирке для сбора. Кластеры, оставшиеся на 40-микронном фильтре, извлекали и диссоциировали на отдельные клетки путем 10-кратной обработки TrypLE (Thermo Fisher) в течение 15 минут. Отдельные клетки высевали как клетки RPE пассажа 0 («P0») в покрытые желатином лунки в среде MM/FGF. Среду MM/FGF меняли каждый день до приблизительно >90% конfluence, а затем меняли на среду MM через каждые 2 дня до сбора. Клетки RPE P0 культивировали в течение 16 дней. Клетки P0 собирали путем 10-кратной обработки TrypLE в течение 15 минут, и отдельные клетки снова высевали в виде клеток RPE 1-го пассажа («P1») в лунки, покрытые желатином, со средой MM/FGF.

Метод культивирования повторяли, как описано выше, для клеток RPE P0, сначала путем культивирования в среде MM/FGF, а затем в среде MM. Клетки P1 RPE культивировали в течение 14 дней. Клетки RPE P1 собирали и повторно высевали как клетки RPE 2-го пассажа («P2»), как описано выше, сначала путем культивирования в среде MM/FGF, а затем в среде MM. Клетки RPE P2 культивировали в течение 14 дней и собирали путем 10-кратной обработки TrypLE в течение 15 минут, а затем подвергали криоконсервации. Затем клетки размораживали, приготавливали в виде GS2 и культивировали на желатине (для определенных анализов) и подвергали анализу контроля качества. Результаты представлены в Таблице 2.

[174] Оценку качества проводили, в основном как описано в публикации заявки США № 2015/0366915, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. Так, например, чистоту (MITF/PAX6), уровни бестрофина и ZO1 определяли с помощью иммунофлуоресцентного анализа (IFA). Анализ на фагоцитоз/активность проводили как описано в заявке WO 2016/154357, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

Таблица 1.

Испытание (дни культивирования на желатине после оттаивания и приготовления в GS2)	RPE, партия TD1018
Восстановление (день 0)	31,1%
Жизнеспособность (день 0)	91,4%
FISH (Chr12/Chr17) (день 8)	Нормальный
Кариотип (3-й день)	Нормальный
Чистота, MITF и/или PAX6 (день 2)	100%
Активность (день 4)	88,0%
Бестрофин (день 28)	60%
ZO1 (день 28)	97%

Таблица 2.

Тест (дни культивирования на желатине после оттаивания и приготовления в GS2)	RPE, партия TD2418
Восстановление (день 0)	22,1%
Жизнеспособность (день 0)	94,1%
FISH (Chr12/Chr17) (день 8)	Нормальный
Кариотип (3-й день)	Нормальный
Чистота, MITF и/или PAX6 (день 2)	100%
Активность (день 4)	94,2%
кол.ПЦР на мРНК hRPE (день 0):	Тест пройден

BEST1, PAX6, MITF, RPE65: повышение как минимум на 1 log10 по сравнению с hESC в соответствии с кол.ПЦР на мРНК hESC (день 0): ингибирование по сравнению с hESC (log10): OCT4: $\leq -2,13$ SOX2: $\leq -0,63$ NANOG: $\leq -1,95$	
Бестрофин (день 28)	83%
ZO1 (день 28)	100%

Пример 3. Клетки RPE, полученные с применением способа субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE и способа субкультивирования кластера клеток-предшественников RPE

[175] В первом эксперименте, клетки RPE получали способом субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE и способом субкультивирования кластеров клеток-предшественников RPE, как показано на фиг. 4. Вкратце, клетки с HDF, инактивированным митомицином C, высевали в лунки, покрытые iMatrix511. Затем, hESC J1 высевали в лунки iMatrix511-HDF и культивировали в среде StemFit в течение 8 дней. Затем среда была заменена на EBDM для стимуляции продуцирования RPE. После хранения в течение 69 дней (приблизительно 10 недель) в EBDM, клетки обрабатывали коллагеназой в течение ночи. Полученный гидролизованный материал пропускали через колонку фильтров, состоящую из 100-микронного фильтра, установленного поверх 40-микронного фильтра, закрепленного на пробирке для сбора. Кластеры, оставшиеся на 40-микронном фильтре, выделяли. Для проведения процедуры субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE, кластеры диссоциировали с помощью 10× TrypLE на отдельные клетки и культивировали в EBDM на iMatrix511. Для проведения процедуры субкультивирования кластеров клеток-предшественников RPE, кластеры, полученные после обработки коллагеназой и фракционирования на фильтре, высевали в интактном виде в EBDM на iMatrix511. Во всех засеянных лунках, среду EBDM заменяли через день или через каждые три дня.

[176] Приблизительно через 24 дня (приблизительно через 4 недели) после повторного посева в EBDM, лунки в процессе субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE подвергали такой же обработке коллагеназой и фракционированию на фильтре, как описано выше, и кластеры диссоциировали на отдельные клетки RPE. Лунки в процессе субкультивирования кластеров клеток-предшественников RPE обрабатывали коллагеназой, фильтровали для удаления отдельных клеток и подвергали негативному и позитивному отбору путем визуального осмотра и манипуляций вручную. Выделенные «пэтчи» диссоциировали путем 10-кратной обработки TrypLE на отдельные клетки RPE. Отдельные клетки RPE, полученные после субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE и кластеров клеток-предшественников RPE, высевали отдельно в виде клеток RPE P0 в лунки, покрытые

желатином или iMatrix511 и содержащие MM/FGF. Среду MM/FGF заменяли каждый день приблизительно до >90% конfluence (приблизительно 3 дней), а затем меняли на среду MM через каждые 2 дня до сбора. Этот процесс повторяли до тех пор, пока не были получены клетки RPE P2, которые затем подвергали криоконсервации. Затем клетки размораживали, приготавливали в виде GS2, культивировали на желатине (при необходимости) и подвергали анализу для оценки качества. Оценку качества проводили, в основном как описано в публикации заявки США № 2015/0366915, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. Так, например, чистоту (MITF/PAX6), уровни бестрофина и ZO1 определяли с помощью иммуофлуоресцентного анализа (IFA). Анализ на фагоцитоз/активность проводили как описано в заявке WO 2016/154357, которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки. Результаты представлены на фиг. 5.

[177] Пример 4. Оценка двух схем иммуносупрессорной терапии в качестве профилактики отторжения трансплантата после субретинальной трансплантации клеток RPE и подтверждения концепции для клеток RPE, используемых для лечения атрофии, вызываемой возрастной дегенерацией желтого пятна, у пациентов с нарушением зрения от умеренной до тяжелой степени

[178] Клетки пигментного эпителия сетчатки, полученные из человеческих плюрипотентных стволовых клеток (hPSC RPE) согласно изобретению, могут быть использованы для субретинальной трансплантации в качестве лечения атрофии, вызываемой возрастной дегенерацией желтого пятна у пациентов с нарушением зрения от умеренной до тяжелой степени. В этом исследовании оценивали эффективность, безопасность и переносимость двух схем краткосрочной низкодозовой системной иммуносупрессорной терапии (ИМТ) для профилактики отторжения трансплантата после введения клеток hPSC RPE (часть 1). Это исследование также продемонстрировало эффективность клеток hPSC RPE для лечения атрофии, вызываемой возрастной дегенерацией желтого пятна у пациентов с нарушением зрения от умеренной до тяжелой степени (часть 2).

[179] В Части 1 данного исследования проводили последовательную оценку клеток hPSC RPE в 1 из 2 схем иммуносупрессорной терапии у 15 индивидуумов для каждой схемы лечения. Обнаружение недостаточности приживления или отторжения трансплантата в Части 1 исследования определяет схему иммуносупрессорной терапии для последующих индивидуумов, получавших лечение в Части 2 данного исследования. Часть 2 исследования является проверкой концепции исследования, в котором участвуют индивидуумы, проходившие выбранную иммуносупрессорную терапию или более длительную схему иммуносупрессорной терапии Части 1.

Дозы и введение

[180] Однократную дозу клеток hPSC RPE и разбавителя GS (необязательного) вводят путем субретинальной инъекции в исследуемый глаз. Дозу клеток hPSC RPE определяют перед лечением первого индивидуума в этом исследовании исходя из

результатов отдельного исследования с повышением доз, в котором индивидууму вводят 50000, 150000 и 500000 клеток hPSC RPE.

[181] Препарат для иммуносупрессорной терапии включает капсулы Prograf® по 0,5 мг, капсулы Prograf® по 1 мг и таблетки микофенолята мофетила (MMF) по 500 мг, которые вводят перорально. Prograf® вводят в начальной дозе 0,05 мг/кг в день, разделенной на 2 суточных дозы и корректируемой для достижения целевого минимального уровня от 3 до 5 нг/мл. Начальная доза Prograf® может быть скорректирована для индивидуумов, принимающих ингибиторы CYP3A4 (кроме ингибиторов протеазы, ингибиторов фактора Ха прямого действия, ингибиторов тромбина прямого действия или эритромицина), такие как азоловые противогрибковые препараты (например, вариконазол, кетоконазол) или антибиотики (например, кларитромицин, хлорамфеникол). MMF вводят в дозе 1,0 г перорально 2 раза в день. Существует 2 схемы введения ИМТ; во время проведения схемы 1, Prograf® и MMF начинают вводить за 1 неделю до дня трансплантации клеток hPSC RPE. Оба препарата ИМТ продолжают вводить в течение 6 недель после трансплантации. Во время проведения схемы 2, Prograf® и MMF вводят за 1 неделю до дня трансплантации, а затем введение прерывают.

[182] Клетки hPSC RPE вводят в исследуемый глаз путем субретинальной инъекции после стандартной 3-портовой витрэктомии в ресничный кружок глаза. После трансплантации, индивидуумы остаются лежать на спине по меньшей мере 6 часов. Участок инъекции клеточного трансплантата был рекомендован в соответствии с SSC. Дозу для клеток RPE hPSC определяют в отдельном исследовании с повышением дозы, в котором индивидууму вводят 50000, 150000 и 500000 клеток RPE hPSC.

[183] После трансплантации, все индивидуумы, получавшие лечение клетками RPE hPSC, были обследованы на безопасность и эффективность лечения исследуемого глаза в 1-й день, еженедельно с 1-й по 4-ю неделю (без визита на 3-ю неделю для 1-недельной схемы иммуносупрессорной терапии), каждые 2 недели с 6 по 14 неделю, на 20, 26, 52 и 78 неделе и затем ежегодно до конца 5 года. Контрольных индивидуумов, не проходивших лечение, обследовали на функцию исследуемого глаза в день начала исследования 0 и на 4, 8, 12, 20, 26 и 52 недели. Неделя 52 является окончанием исследования (EoS) для контрольной группы.

[184] Все побочные эффекты (ПЭ) фиксируют начиная с визита для обследования и вплоть до 52-й недели. После этого, фиксируют только ПЭ, представляющие особый интерес, включая все глазные и иммуноопосредованные побочные эффекты.

[185] Специалисты Центра считывания изображений оценивали результаты по фотографиям глазного дна, аутофлуоресценции глазного дна, спектральной оптической когерентной томографии (SD OCT), оптической когерентной томографии-ангиографии (OCT-A), оценки адаптации зрения (АО) и флуоресцентной ангиографии (FA). Также использовались данные, полученные специалистами Центра сбора данных микропериметрии и Центральной лаборатории. Насколько это возможно, специалисты по оценке зрительных функций и Центра оценки чтения букв проводят тесты для лечебной

группы вслепую.

Оценка иммуносупрессорной терапии

[186] Индивидуумам, впервые включенным в исследование и произвольно распределенным по группам лечения клетками hPSC RPE, последовательно назначали 1 из 2 нижеописанных схем низкодозовой комбинированной иммуносупрессорной терапии (Prograf® и микофенолятом Мофетилом) и профилактики инфекции:

[187] Группа 1/Схема 1 иммуносупрессорной терапии: 7-недельная иммуносупрессорная терапия и профилактическая медикаментозная терапия, начиная с 1 недели до дня трансплантации.

[188] Группа 2/Схема 2 иммуносупрессорной терапии: 1-недельная иммуносупрессорная терапия и профилактическая медикаментозная терапия, начиная с 1 недели до дня трансплантации.

[189] При проведении индивидууму иммуносупрессорной терапии, врач, проводящий иммуносупрессорную терапию, наблюдал за индивидуумом на предмет безопасности.

[190] Каждая группа состоит из 15 индивидуумов, получавших лечение клетками hPSC RPE. Если в группе 1 имеется 1 случай отсутствия приживления или отторжения трансплантата или такие случаи отсутствуют, то распределение по группам лечения в Группе 2 начинают после того, как Группа 1 будет полностью сформирована, и последний индивидуум, получающий лечение, завершал визит на 14-й неделе.

[191] Если более чем у 1 индивидуума в группе или между группами имеются признаки отсутствия приживления или отторжения трансплантата, то схему иммуносупрессорной терапии для индивидуумов, которые проходили лечение, и индивидуумов, которым еще предстояло лечение, изменяли.

[192] Если не были выявлены какие-либо другие причины, то отсутствие приживления или отторжения трансплантата может иметь следующие причины:

Признаки непредвиденного и стойкого или нарастающего неинфекционного воспаления глаз (например, васкулита, ретинита, хориоидита, витрита, воспаления ресничного кружка (pars planitis) или воспаления/увеита переднего сегмента глаза);

Появление после трансплантации, а затем исчезновение пигментных пятен на фотографиях глазного дна или гиперрефлективного материала над мембраной Бруха на SD-OCT;

В течение первых 52 недель исследования, если улучшение читаемости ≥ 10 букв подтверждается повторным тестам или при следующем запланированном посещении, то последующая подтвержденная потеря читаемости ≥ 10 букв, которую нельзя объяснить другой причиной, может считаться свидетельством отсутствия приживления или отторжения трансплантата;

Другие глазные признаки или симптомы, которые, по мнению исследователя и/или Совета по мониторингу данных и оценки безопасности (DSMB), могут быть связаны с отсутствием приживления или отторжением трансплантата. Окончательное решение,

является ли отчет о «других глазных признаках или симптомах» подтверждением отсутствия приживления или отторжения трансплантата, принимает Спонсор на основании указаний DSMB.

Эффективность

[193] Серия первичных анализов включает серию всех анализов, которые будут проведены для всех произвольно распределенных по группам индивидуумов, получавших лечение в соответствии с выбранной схемой ИМТ или более продолжительной схемой ИМТ для групп hPSC RPE, и для произвольно распределенных по группам индивидуумов, достигших дня 0, из контрольной группы, не проходившей лечение (в обеих частях исследования). Для оценки статистической значимости во всех анализах используют двусторонний 5% уровень значимости.

[194] Первичной конечной точкой является изменение по сравнению с исходным уровнем общей площади атрофии на 52-й неделе. Анализ первичной конечной точки проводят на основе данных анализа повторных измерений с использованием смешанной модели (MMRM) на изменение по сравнению с исходным уровнем в каждую неделю (недели 4, 8, 12, 20, 26 и 52). Модель включает следующие фиксированные эффекты: эффекты для исследуемой группы (hPSC RPE-группы или группы, не прошедшей лечение), эффекты для группы стратификации исходной области DDAF (2 уровня) и hyperAF вокруг области DDAF в исследуемом глазу (2 уровня), эффекты в данном участке (объединенные при необходимости), время (неделя исследования) и действие лекарственного средства в зависимости от времени, а также ковариата исходного уровня. Параметры оценивают по максимальному правдоподобию при ограниченной информации, а степени свободы оценивают с использованием аппроксимации Кенворда-Роджера. Неупорядоченная структура дисперсии-ковариации используется для оценки ошибок между индивидуумами в группе-модели. Если подгонка неупорядоченной структуры ковариации не сойдется, то будет использоваться другая структура дисперсии-ковариации вплоть до сходимости. Отсутствующие данные в этом анализе не учитываются.

[195] Для недель 4, 8, 12, 20, 26 и 52 показаны средние значения, полученные методом наименьших квадратов (со стандартными ошибками) для обеих исследуемых групп, и различия в исследуемой группе RPE hPSC по сравнению с необработанным контролем (также с 95% доверительным интервалом).

[196] В анализе вторичной конечной точки «реакция зрительной функции индивидуума, определяемая как подтвержденное улучшение читаемости ≥ 15 букв (в пределах окна посещения) в исследуемом глазу» (изменение от исходного уровня до 52-й недели) используют критерий хи-квадрат для сравнения экспериментальных групп. Если в любой ячейке Таблицы 2×2 меньше 5 индивидуумов, то вместо этого критерия используется точный критерий Фишера. Доля индивидуумов с улучшением читаемости ≥ 15 букв показана для обследуемых групп и различий между обследуемыми группами (с доверительным интервалом 95%). В дополнение к анализу наблюдаемых данных, индивидуумы с отсутствующими значениями будут оцениваться как индивидуумы, от

которых не было получено данных.

[197] Анализ вторичных конечных точек: «изменение по сравнению с исходным уровнем площади атрофии в индексном квадранте», «изменение по сравнению с исходным уровнем средней микропериметрической чувствительности контрольных точек рядом с участком поражения на неделе 52», «изменение по сравнению с исходным уровнем логарифмической контрастной чувствительности на неделе 52» и «изменение BCVA по сравнению с исходным уровнем на 52-й неделе» будет проведен с использованием такой же модели MMRM, которая была описана выше для первичной конечной точки. Включенные временные точки для области атрофии составляют 4, 8, 12, 20, 26 и 52 недели, для BCVA, они составляют 4, 8, 12, 20, 26 и 52 недели (временные точки, общие как для групп, обработанных клетками RPE, так и для необработанных групп), для микропериметрической чувствительности, они составляют 4, 12, 20, 26 и 52 недели, а для контрастной чувствительности они составляют 4, 12, 26 и 52 недели.

[198] Анализ «изменения по сравнению с исходным уровнем» для суммарной оценки, представляющей все пункты анкеты «Опросника по нарушению зрения» (IVI) на 52-й неделе, включает использование модели ковариационного анализа (ANCOVA), которая включает параметры для исследуемой группы (ASP7317 или группы без лечения), групп стратификации исходной площади DDAF (2 уровня) и hyperAF вокруг области DDAF в исследуемом глазу (2 уровня), и в исследуемом участке (объединенные при необходимости).

[199] Первичные и вторичные конечные точки также анализируют отдельно для групп с тяжелыми (исходная BCVA от 20/320 до < 20/200) и умеренными (исходная BCVA от 20/200 до 20/80) нарушениями зрения (при условии проведения достаточного количества исследований индивидуумов в каждой исследуемой подгруппе).

[200] Временную точку 52 недели/ЕТ анализируют для всех конечных точек, описанных выше, с использованием ANCOVA, как описано выше, за исключением «ответа индивидуума, определяемого как подтвержденное улучшение читаемости ≥ 15 букв исследуемым глазом», где все эти анализы проводят с использованием критерия хи-квадрат, как описано выше.

[201]

Пример 5: Сравнение продуцирования клеток RPE с помощью обычного метода селективного отбора без субкультивирования, метода субкультивирования кластера клеток-предшественников RPE путем селективного отбора и метода субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE без селективного отбора

[201] Было проведено сравнение продуцирования клеток RPE, полученных 1) обычным методом продуцирования клеток RPE, включающим трудоемкий селективный отбор без субкультивирования, 2) методом субкультивирования кластера клеток-предшественников RPE путем селективного отбора, описанного в настоящей заявке, и 3) методом субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE без селективного

отбора, описанного в настоящей заявке. Обычный способ получения клеток RPE осуществляли, в основном, как описано в WO 2005/070011, с применением метода, в котором использовали адгезивный монослой hES. Вкратце, клетки hES J1 дифференцировали на HDF в EBDM в течение 90-100 дней до образования пигментных пятен с полигональной морфологией, напоминающей булыжник, и с коричневым пигментом в цитоплазме. Эти пигментированные полигональные клетки гидролизовали, а пигментированные островки селективно собирали вручную. Собранные пигментированные кластеры диссоциировали на отдельные клетки, подсчитывали и высевали как клетки RPE P0. Клетки RPE, полученные методом субкультивирования кластера клеток-предшественников RPE путем селективного отбора и методом субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE без селективного сбора, аналогичным образом подсчитывали перед посевом как клетки RPE P0.

[202] В Таблице 3 показаны клетки RPE, полученные способами, включающими селективный отбор, то есть, обычным способом селективного сбора без субкультивирования и способом субкультивирования кластера клеток-предшественников RPE с селективным отбором согласно изобретению. В Таблице 3 показано, что метод субкультивирования кластеров клеток-предшественников RPE с селективным отбором может давать большее количество клеток на партию по сравнению с обычным методом, но, что более важно, этот метод субкультивирования кластеров клеток-предшественников RPE с селективным отбором дает большее среднее количество клеток за час ручного труда, необходимого для селективного отбора клеток RPE, по сравнению с обычным методом. Кроме того, поскольку традиционный метод не включал стадию субкультивирования, в которой концентрируют предшественники RPE, то селективный отбор из менее чистых популяций традиционным методом приводил к получению меньшего количества клеток, большей изменчивости морфологии и к увеличению времени, необходимого для селективного отбора RPE.

[204] В Таблице 4 показаны клетки RPE, полученные методом субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE, который не включает селективный отбор клеток RPE вручную. Метод субкультивирования отдельных клеток-предшественников RPE позволяет получить значительно больше клеток RPE, чем традиционный метод или метод субкультивирования кластера клеток-предшественников RPE с селективным отбором. Более того, общее количество клеток, полученных за час и взятых для выделения клеток RPE P0, было также значительно выше.

[205] Способы согласно изобретению обеспечивают значительные улучшения по сравнению с обычным методом, который требует селективного отбора клеток RPE вручную из менее чистой популяции. Отбор вручную требует физических и умственных усилий и нескольких часов непрерывной работы с предельной точностью и безраздельным вниманием в течение нескольких дней, чтобы собрать одну партию большого размера. Обучение новых операторов традиционному методу также представляет собой сложную задачу, поскольку оно требует как точных механических

операций под микроскопом, так и опыта работы с клеточной морфологией, поскольку небольшое количество загрязняющих клеток, если они будут приняты по ошибке, могут увеличить количество RPE, что приведет к получению ошибочной партии. Каждый выбранный кластер должен быть оценен оператором на морфологию, прежде чем он будет принят или отклонен. Некоторые кластеры могут иметь неидеальную морфологию RPE, и оператору необходимо принять индивидуальное решение, принять или забраковать этот кластер. После оценки каждого кластера, его необходимо быстро переместить. Эта процедура необходима повторить 2-3 раза, чтобы исключить отдельные клетки и обеспечить качество выбранных кластеров. Низкая скорость работы оператора может привести к очень низкому выходу, а ошибки в принятии решений могут привести к низкой чистоте и браковке партии. Таким образом, квалифицированный оператор должен иметь опыт проведения асептических процедур, мастерство микроманипуляций под микроскопом в стерильной среде, опыт, позволяющий относительно быстро перемещать выбранные и отбракованные кластеры, и опыт работы с морфологией клеток, позволяющий быстро принимать решения по каждому оцениваемому кластеру. Способы согласно изобретению позволяют применять стандартные способы культивирования клеток, которые могут быть проведены персоналом с минимальным опытом культивирования клеток, что будет значительно повышать выход клеток.

[206] Таблица 3.

Метод	Партия #	Всего клеток на партию	Среднее количество клеток в час селективного отбора клеток RPE P0 на партию	Чистота Pax6 ⁺ или MITF ⁺ -клеток RPE P0
Обычный селективный отбор без субкультивирования	1	9626	3209	N/A
	2, 3, 4	282241 (среднее для 3 партий)	6135 (среднее для 3 партий)	N/A
Метод субкультивирования кластера клеток-предшественников RPE с селективным отбором	5	51775	26551	N/A
	6	107000	35666	99%
	7	333000	111000	100%
	8	107000	23000	98%
	9	72000	14400	100%
	10	142000	28000	N/A
			39770	

[207] Таблица 4.

Метод	Партия* #	Среднее общее число клеток на партию	Среднее число клеток в час, необходимое для выделения клеток RPE P0	Среднее число часов для выделения клеток RPE P0

Метод субкультивирования отдельных клеток- предшественников RPE без селективного отбора	11, 12, 13, 14	48222500	8037083	6 часов
--	-------------------	----------	---------	---------

* Для клеток RPE P0, IFA не проводили. Однако, все четыре партии прошли контроль качества с чистотой >95% на P1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), включающий:
 - (i) получение клеточных кластеров PAX6⁺/MITF⁺-клеток-предшественников RPE и диссоциацию клеточных кластеров на отдельные клетки;
 - (ii) культивирование отдельных клеток в среде для дифференцировки так, чтобы клетки дифференцировались в клетки RPE; и
 - (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii); и тем самым получение популяции клеток RPE.
2. Способ получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), включающий:
 - (i) получение кластеров PAX6⁺/MITF⁺-клеток-предшественников RPE;
 - (ii) культивирование клеточных кластеров в среде для дифференцировки, так, чтобы клетки дифференцировались в клетки RPE; и
 - (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii); и тем самым получение популяции клеток RPE.
3. Способ по п. 1 или 2, дополнительно включающий сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii), путем диссоциации клеток RPE, фракционирования клеток RPE, сбора кластеров клеток RPE, диссоциации кластеров клеток RPE на отдельные клетки RPE и культивирования отдельных клеток RPE.
4. Способ по п. 1 или 2, дополнительно включающий сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii), путем диссоциации клеток RPE, сбора кластеров клеток RPE и селективного отбора кластеров клеток RPE.
5. Способ по п. 4, дополнительно включающий диссоциацию селективно отобранных кластеров клеток RPE на отдельные клетки RPE и культивирование отдельных клеток RPE.
6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где PAX6⁺/MITF⁺-клетки-предшественники RPE получают из популяции плюрипотентных стволовых клеток.
7. Способ по п. 6, где плюрипотентные стволовые клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки человека или человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.
8. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий размножение клеток RPE.
9. Способ по п. 8, где клетки RPE размножают путем культивирования клеток в поддерживающей среде с добавлением FGF.
10. Способ по п. 9, где поддерживающая среда содержит FGF в течение первых 1, 2 или 3 дней пролиферации RPE при каждом пассаже с последующим культивированием клеток RPE в поддерживающей среде, не содержащей FGF.
11. Способ по п. 9 или 10, где FGF добавляют до конfluence.
12. Способ по любому из предшествующих пунктов, где среда для дифференцировки дополнительно содержит гепарин и/или ингибитор ROCK.
13. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клетки RPE пассируют до

двух раз.

14. Способ по любому из пп. 1 и 3-13, где любую из стадий диссоциации проводят путем обработки клеток реагентом для диссоциации.

15. Способ по п. 14, где реагент для диссоциации выбран из группы, включающей коллагеназу (такую как коллагеназа I или коллагеназа IV), аккутазу, хелатообразующий агент (например, раствор для диссоциации на основе EDTA), трипсин, диспазу или любые их комбинации.

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клетки RPE подвергают криоконсервации после сбора.

17. Способ по п. 16, где клетки подвергают криоконсервации в среде, содержащей один или несколько криоконсервантов, выбранных из группы, включающей ДМСО (диметилсульфоксид), этиленгликоль, глицерин, 2-метил-2-4-пентандиол (MPD), пропиленгликоль и сахарозу.

18. Способ по любому из пп. 6-17, где популяция плюрипотентных стволовых клеток представляет собой эмбрионидные тельца.

19. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клетки культивируют на фидерных клетках.

20. Способ по любому из пп. 1-18, где клетки культивируют в условиях отсутствия фидеров.

21. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клетки культивируют в неадгезивной культуре.

22. Способ по любому из пп. 1-20, где клетки культивируют в адгезивной культуре.

23. Способ по любому из предшествующих пунктов, где среда для дифференцировки представляет собой EBDM.

24. Способ по любому из пп. 1-22, где среда для дифференцировки содержит один или более агентов для дифференцировки, выбранных из группы, состоящей из никотинамида, суперсемейства трансформирующего фактора- β (TGF β) (например, активина А, активина В и активина АВ), нодального фактора, фактора, направленного против мюллеровского гормона (AMH), белков остеогенеза (BMP) (например, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 и BMP7, факторов роста и дифференцировки (GDF)), ингибитора пути WNT (например, SKI-7, DKK1), ингибитора пути TGF (например, LDN193189, Noggin), ингибитора пути BMP (например, SB431542), ингибитора сигнала «звуковой еж», ингибитора bFGF и ингибитора MEK (например, PD0325901).

25. Способ по п. 24, где среда для дифференцировки содержит никотинамид.

26. Способ по пп. 24 или 25, где среда для дифференцировки содержит активин.

27. Способ по любому из предшествующих пунктов, где кластеры PAX6⁺/MITF⁺-клеток-предшественников RPE имеют размер от приблизительно 40 мкм до приблизительно 200 мкм.

28. Способ по любому из предшествующих пунктов, где кластеры PAX6⁺/MITF⁺-клеток-предшественников RPE имеют размер от приблизительно 40 мкм до

приблизительно 100 мкм.

29. Способ по любому из предшествующих пунктов, где на стадии (ii), клетки культивируют на внеклеточном матриксе, выбранном из группы, включающей ламинин или его фрагмент, фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген и желатин.

30. Способ по п. 29, где внеклеточный матрикс представляет собой ламинин или его фрагмент.

31. Способ по п. 30, где ламинин выбран из ламинина-521 и ламинина-511.

32. Способ по п. 31, где ламинин представляет собой iMatrix511.

33. Способ по любому из предшествующих пунктов, где продолжительность культивирования на стадии (ii) составляет от приблизительно 1 недели до приблизительно 8 недель.

34. Способ по любому из предшествующих пунктов, где продолжительность культивирования на стадии (ii) составляет по меньшей мере приблизительно 3 недели.

35. Способ по любому из предшествующих пунктов, где продолжительность культивирования на стадии (ii) составляет приблизительно 6 недель.

36. Способ по любому из пп. 3-35, где кластеры клеток RPE имеют размер от приблизительно 40 мкм до 200 мкм.

37. Способ по п. 36, где кластеры клеток RPE имеют размер от приблизительно 40 мкм до 100 мкм.

38. Способ по любому из пп. 3-37, где отдельные клетки RPE культивируют в среде, которая поддерживает рост или дифференцировку RPE.

39. Способ по п. 38, где отдельные клетки RPE культивируют на внеклеточном матриксе, выбранном из группы, включающей ламинин или его фрагмент, фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген и желатин.

40. Способ по п. 39, где внеклеточный матрикс представляет собой желатин.

41. Способ по п. 39, где внеклеточный матрикс представляет собой ламинин или его фрагмент.

42. Способ по любому из предшествующих пунктов, где популяция клеток RPE имеет чистоту по меньшей мере 75%, чистоту по меньшей мере 80%, чистоту по меньшей мере 90%, чистоту по меньшей мере 95%, чистоту по меньшей мере 96%, чистоту по меньшей мере 97%, чистоту по меньшей мере 98% или чистоту по меньшей мере 99%.

43. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клетки RPE представляют собой клетки RPE человека.

44. Способ получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), включающий:

(i) культивирование популяции плюрипотентных стволовых клеток в первой среде для дифференцировки, так, чтобы эти клетки дифференцировались в клетки-предшественники RPE;

(ii) диссоциацию клеток-предшественников RPE, фракционирование клеток для сбора клеточных кластеров, диссоциацию клеточных кластеров на отдельные клетки и субкультивирование отдельных клеток во второй среде для дифференцировки так, чтобы

эти клетки дифференцировались в клетки RPE; и

- (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii); и тем самым получение популяции клеток RPE.

45. Способ получения популяции клеток эпителия сетчатки (RPE), включающий:

(i) культивирование популяции плюрипотентных стволовых клеток в первой среде для дифференцировки, так, чтобы эти клетки дифференцировались в клетки-предшественники RPE;

(ii) диссоциацию клеток-предшественников RPE, фракционирование клеток для сбора клеточных кластеров, и субкультивирование собранных клеточных кластеров во второй среде для дифференцировки так, чтобы эти клетки дифференцировались в клетки RPE; и

- (iii) сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii); и тем самым получение популяции клеток RPE.

46. Способ по п. 44 или 45, дополнительно включающий сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii), путем диссоциации клеток RPE, фракционирования клеток RPE для сбора кластеров клеток RPE, диссоциации кластеров клеток RPE на отдельные клетки RPE и культивирования отдельных клеток RPE.

47. Способ по п. 44 или 45, дополнительно включающий сбор клеток RPE, полученных на стадии (ii), путем диссоциации клеток RPE, сбора кластеров клеток RPE и селективного отбора кластеров клеток RPE.

48. Способ по п. 47, дополнительно включающий диссоциацию селективно отобранных кластеров клеток RPE на отдельные клетки RPE и культивирование отдельных клеток RPE.

49. Способ по любому из пп. 44-48, где клетки-предшественники RPE являются позитивными по PAX6/MITF.

50. Способ по любому из пп. 44-49, дополнительно включающий размножение клеток RPE.

51. Способ по п. 50, где клетки RPE размножают путем культивирования клеток в поддерживающей среде с добавлением FGF.

52. Способ по п. 51, где поддерживающая среда содержит FGF в течение первых 1, 2 или 3 дней пролиферации RPE при каждом пассаже с последующим культивированием клеток RPE в поддерживающей среде, не содержащей FGF.

53. Способ по п. 51 или 52, где FGF добавляют до конfluence.

54. Способ по любому из пп. 44-53, где первая и/или вторая среда для дифференцировки дополнительно содержит гепарин и/или ингибитор ROCK.

55. Способ по любому из пп. 44-54, где клетки RPE пассируют до двух раз.

56. Способ по любому из пп. 44-55, где любую из стадий диссоциации проводят путем обработки клеток реагентом для диссоциации.

57. Способ по п. 56, где реагент для диссоциации выбран из группы, включающей коллагеназу (такую как коллагеназа I или коллагеназа IV), аккутазу, хелатообразующий

агент (например, раствор для диссоциации на основе EDTA), трипсин, диспазу или любые их комбинации.

58. Способ по любому из пп. 44-57, где клетки RPE подвергают криоконсервации после сбора.

59. Способ по п. 58, где клетки подвергают криоконсервации в среде, содержащей один или несколько криоконсервантов, выбранных из группы, включающей ДМСО (диметилсульфоксид), этиленгликоль, глицерин, 2-метил-2-4-пентандиол (MPD), пропиленгликоль и сахарозу.

60. Способ по любому из пп. 44-59, где плюрипотентные стволовые клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки человека.

61. Способ по любому из пп. 44-59, где плюрипотентные стволовые клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека.

62. Способ по любому из пп. 44-61, где популяция плюрипотентных стволовых клеток представляет собой эмбрионидные тельца.

63. Способ по любому из пп. 44-62, где перед стадией (i), плюрипотентные стволовые клетки культивируют на фидерных клетках в среде, поддерживающей плюрипотентность.

64. Способ по любому из пп. 44-62, где перед стадией (i), плюрипотентные стволовые клетки культивируют без фидеров в среде, которая поддерживает плюрипотентность.

65. Способ по п. 63 или 64, где в среду, поддерживающую плюрипотентность, добавляют bFGF.

66. Способ по любому из пп. 44-65, где стадии (i), (ii) и/или (iii) проводят в неадгезивной культуре.

67. Способ по любому из пп. 44-65, где стадии (i), (ii) и/или (iii) проводят в адгезивной культуре.

68. Способ по любому из пп. 44-67, где первая и вторая среды для дифференцировки являются одинаковыми.

69. Способ по любому из пп. 44-67, где первая и вторая среды для дифференцировки отличаются друг от друга.

70. Способ по любому из пп. 44-68, где первая и вторая среды для дифференцировки представляют собой EBDM.

71. Способ по любому из пп. 44-69, где первая среда для дифференцировки содержит один или более агентов для дифференцировки, выбранных из группы, состоящей из никотинамида, суперсемейства трансформирующего фактора- β (TGF β) (например, активина А, активина В и активина АВ), нодального фактора, фактора, направленного против мюллеровского гормона (AMH), белков остеогенеза (BMP) (например, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 и BMP7, факторов роста и дифференцировки (GDF)), ингибитора пути WNT (например, SKI-7, DKK1), ингибитора пути TGF (например, LDN193189, Noggin), ингибитора пути BMP (например, SB431542),

ингибитора сигнала «звуковой еж», ингибитора bFGF и ингибитора MEK (например, PD0325901).

72. Способ по любому из пп. 44-69, где вторая среда для дифференцировки содержит один или более агентов для дифференцировки, выбранных из группы, состоящей из никотинамида, суперсемейства трансформирующего фактора- β (TGF β) (например, активина А, активина В и активина АВ), нодального фактора, фактора, направленного против мюллеровского гормона (AMH), белков остеогенеза (BMP) (например, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 и BMP7, факторов роста и дифференцировки (GDF)), ингибитора пути WNT (например, SKI-7, DKK1), ингибитора пути TGF (например, LDN193189, Noggin), ингибитора пути BMP (например, SB431542), ингибитора сигнала «звуковой еж», ингибитора bFGF и ингибитора MEK (например, PD0325901).

73. Способ по п. 71 или 72, где первая среда для дифференцировки содержит никотинамид.

74. Способ по любому из пп. 71-73, где вторая среда для дифференцировки содержит активин.

75. Способ по любому из пп. 44-74, где продолжительность культивирования на стадии (i) составляет от приблизительно 1 недели до приблизительно 12 недель.

76. Способ по любому из пп. 44-75, где продолжительность культивирования на стадии (i) составляет по меньшей мере приблизительно 3 недели.

77. Способ по любому из пп. 44-76, где продолжительность культивирования на стадии (i) составляет от приблизительно 6 до приблизительно 10 недель.

78. Способ по любому из пп. 44-77, где кластеры клеток, собранные на стадии (ii), имеют размер от приблизительно 40 мкм до приблизительно 200 мкм.

79. Способ по любому из пп. 44-78, где кластеры клеток, собранные на стадии (ii), имеют размер от приблизительно 40 мкм до приблизительно 100 мкм.

80. Способ по любому из пп. 44-79, где на стадии (ii), клетки субкультивируют на внеклеточном матриксе, выбранном из группы, включающей ламинин, фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген и желатин.

81. Способ по п. 80, где внеклеточный матрикс содержит ламинин или его фрагмент.

82. Способ по п. 81, где ламинин или его фрагмент выбирают из ламинина-521 и ламинина-511.

83. Способ по любому из пп. 44-82, где продолжительность субкультивирования на стадии (ii) составляет от приблизительно 1 недели до приблизительно 8 недель.

84. Способ по любому из пп. 44-83, где продолжительность субкультивирования на стадии (ii) составляет по меньшей мере приблизительно 3 недели.

85. Способ по любому из пп. 44-84, где продолжительность субкультивирования на стадии (ii) составляет приблизительно 6 недель.

86. Способ по любому из пп. 46 и 48-85, где кластеры клеток RPE имеют размер

приблизительно от 40 мкм до 200 мкм.

87. Способ по п. 86, где кластеры клеток RPE имеют размер приблизительно от 40 мкм до 100 мкм.

88. Способ по любому из пп. 46 и 48-87, где отдельные клетки RPE культивируют в среде, которая поддерживает рост или дифференцировку RPE.

89. Способ по п. 88, где отдельные клетки RPE культивируют на внеклеточном матриксе, выбранном из группы, включающей ламинин или его фрагмент, фибронектин, витронектин, матригель, CellStart, коллаген и желатин.

90. Способ по п. 89, где внеклеточный матрикс представляет собой желатин.

91. Способ по п. 89, где внеклеточный матрикс представляет собой ламинин или его фрагмент.

92. Способ по любому из пп. 44-91, где популяция клеток RPE имеет чистоту по меньшей мере 75%, чистоту по меньшей мере 80%, чистоту по меньшей мере 90%, чистоту по меньшей мере 95%, чистоту по меньшей мере 96%, чистоту по меньшей мере 97%, чистоту по меньшей мере 98% или чистоту по меньшей мере 99%.

93. Способ по любому из пп. 44-92, где клетки RPE представляют собой клетки RPE человека.

94. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клетки RPE экспрессируют один или несколько маркеров, выбранных из группы, включающей RPE65, CRALBP, PEDF, бестрофин, MITF, OTX2, PAX2, PAX6, премеланосомный белок (PMEL или gp-100), тирозиназу и ZO1.

95. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клетки RPE экспрессируют бестрофин, PMEL, CRALBP, MITF, PAX6 и ZO1.

96. Способ по любому из пп. 1-94, где клетки RPE экспрессируют бестрофин, PAX6, MITF и RPE65.

97. Способ по любому из пп. 1-94, где клетки RPE экспрессируют MITF и по меньшей мере один маркер, выбранный из бестрофина и PAX6.

98. Способ по любому из предшествующих пунктов, где в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия одного или нескольких маркеров стволовых клеток, выбранных из группы, состоящей из OCT4, NANOG, Rex-1, щелочной фосфатазы, SOX2, TDGF-1, DPPA-2, DPPA-4, стадияспецифического эмбрионального антигена (SSEA)-3 и SSEA-4, антигена отторжения опухоли (TRA)-1-60 и TRA-1-80.

99. Способ по любому из предшествующих пунктов, где в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия OCT4, SSEA4, TRA-1-81 и щелочной фосфатазы.

100. Способ по любому из пп. 1-98, где в клетках RPE по существу отсутствует экспрессия OCT4, NANOG и SOX2.

101. Композиция, содержащая популяцию клеток RPE, полученную способом по любому из предшествующих пунктов.

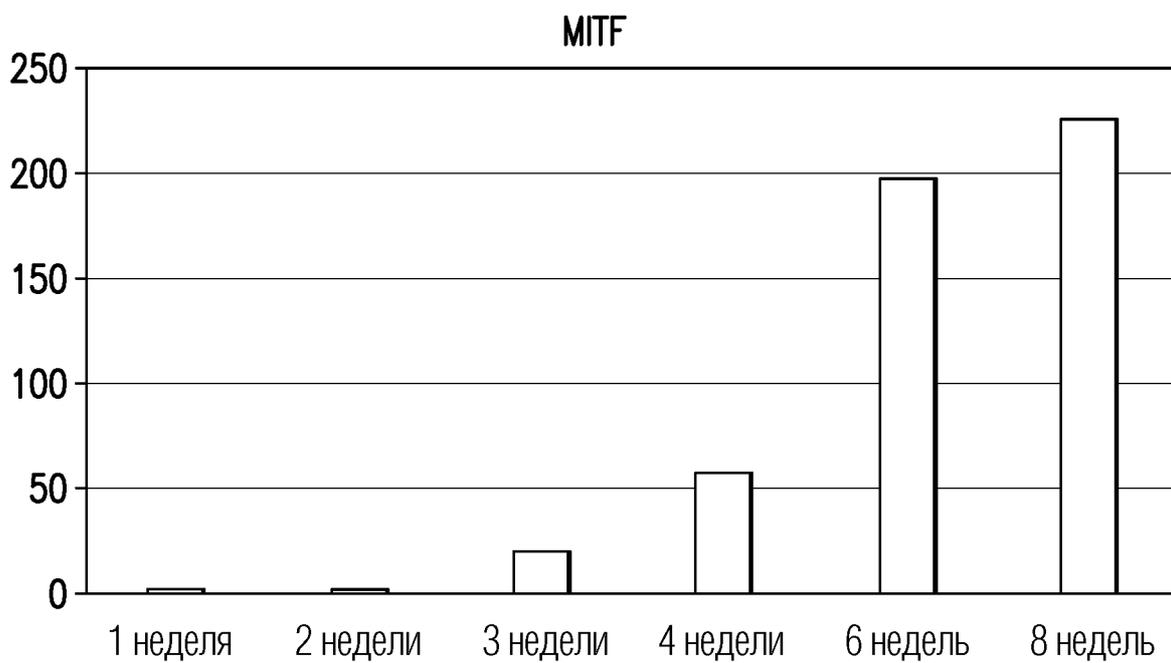
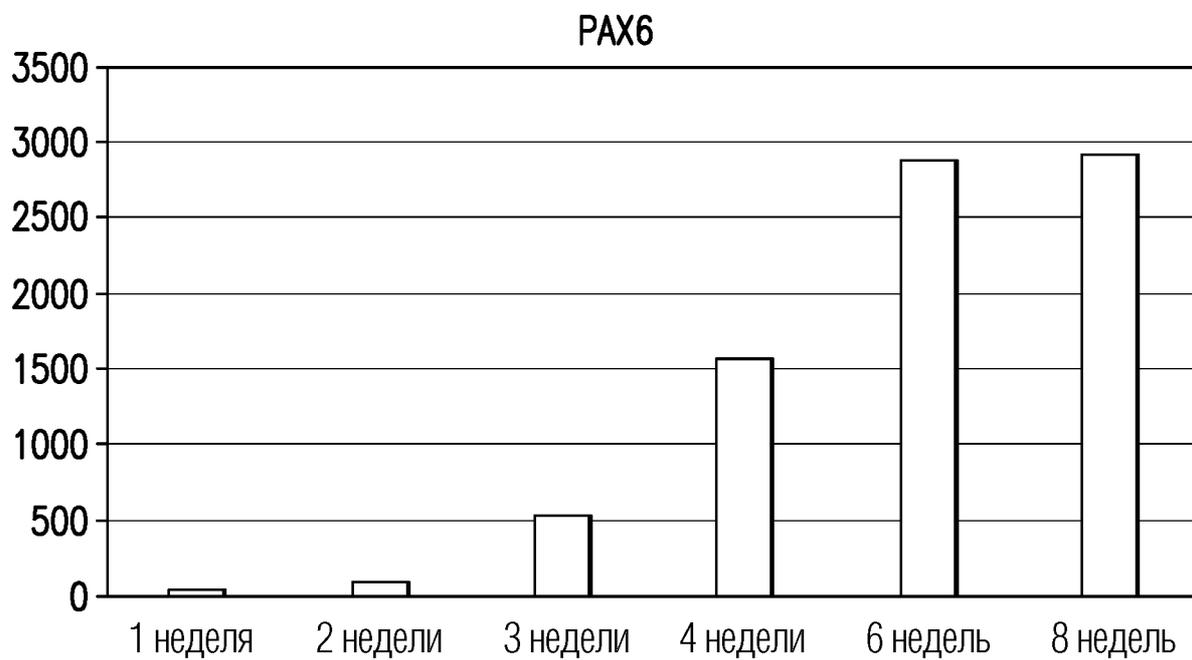
102. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток RPE, полученную способом по любому из пп. 1-100, и фармацевтически приемлемый носитель.

103. Способ лечения пациента с заболеванием сетчатки или с риском заболевания сетчатки, где указанный способ включает введение эффективного количества композиции по п. 101 или фармацевтической композиции по п. 102.

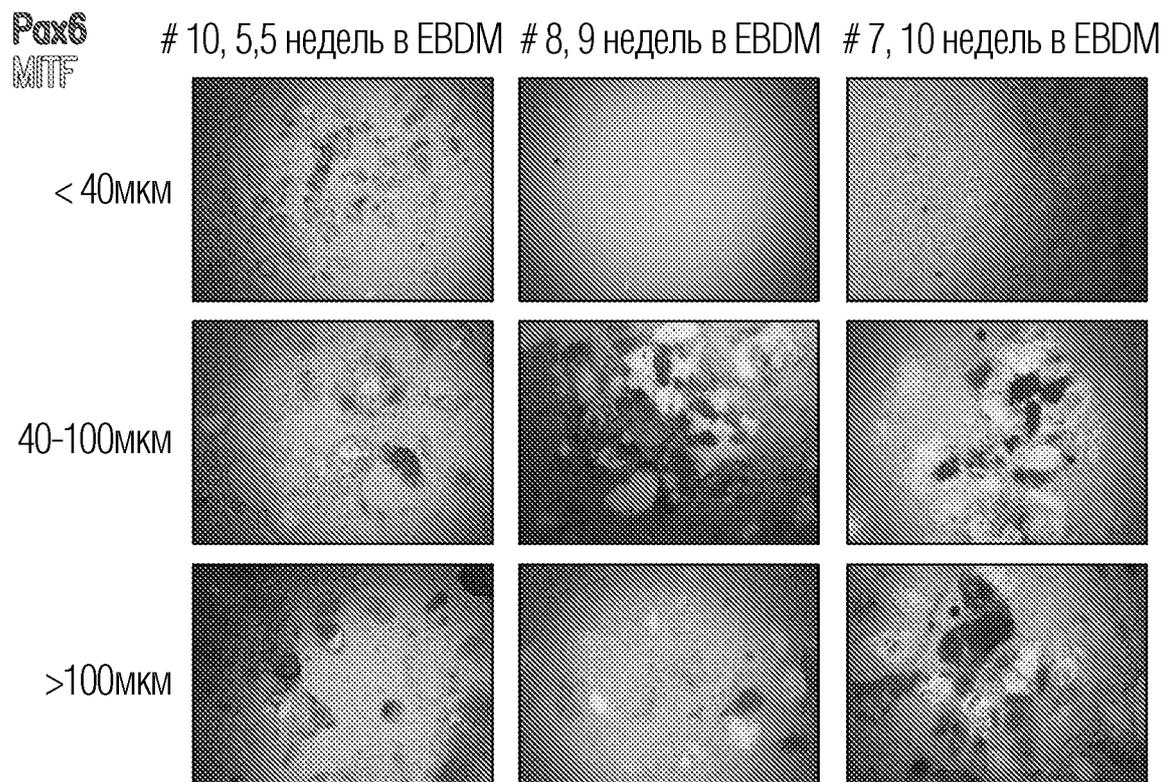
104. Способ по п. 103, где заболевание сетчатки выбрано из группы, включающей дегенерацию сетчатки, хориодеремию, диабетическую ретинопатию, возрастную дегенерацию желтого пятна (сухую или мокрую), отслоение сетчатки, пигментный ретинит, болезнь Штаргардта, ангиоидные полосы, миопическую дегенерацию желтого пятна и глаукому.

По доверенности

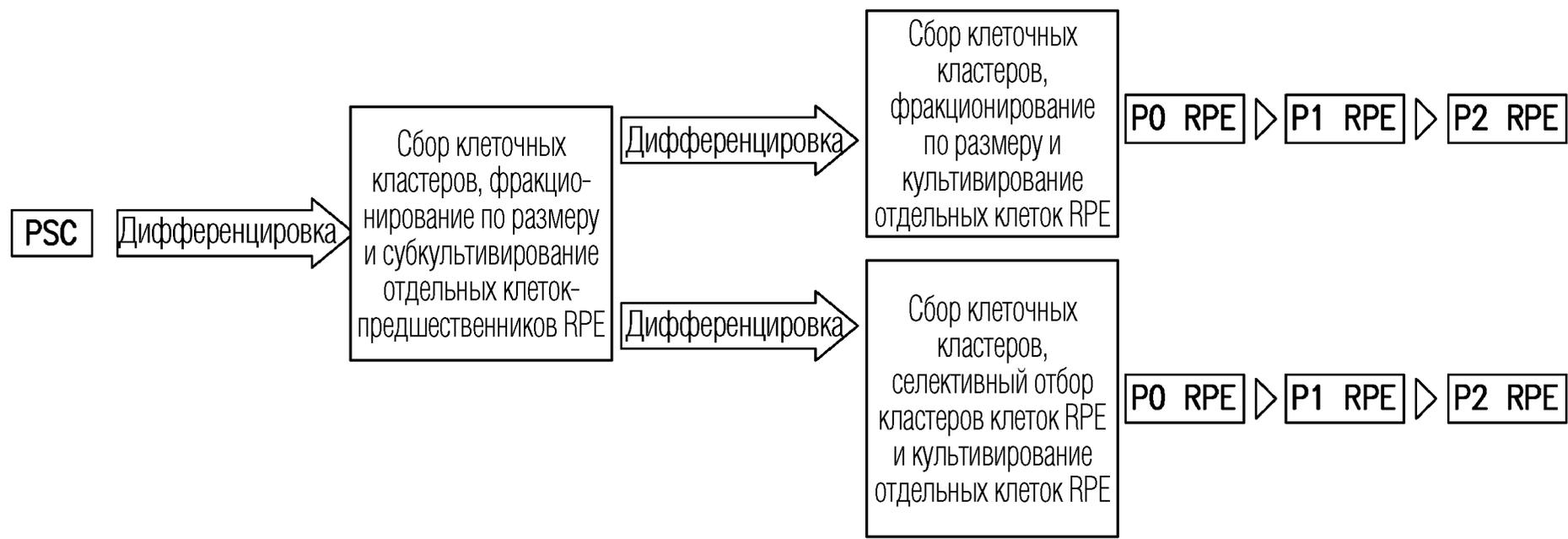
1/7



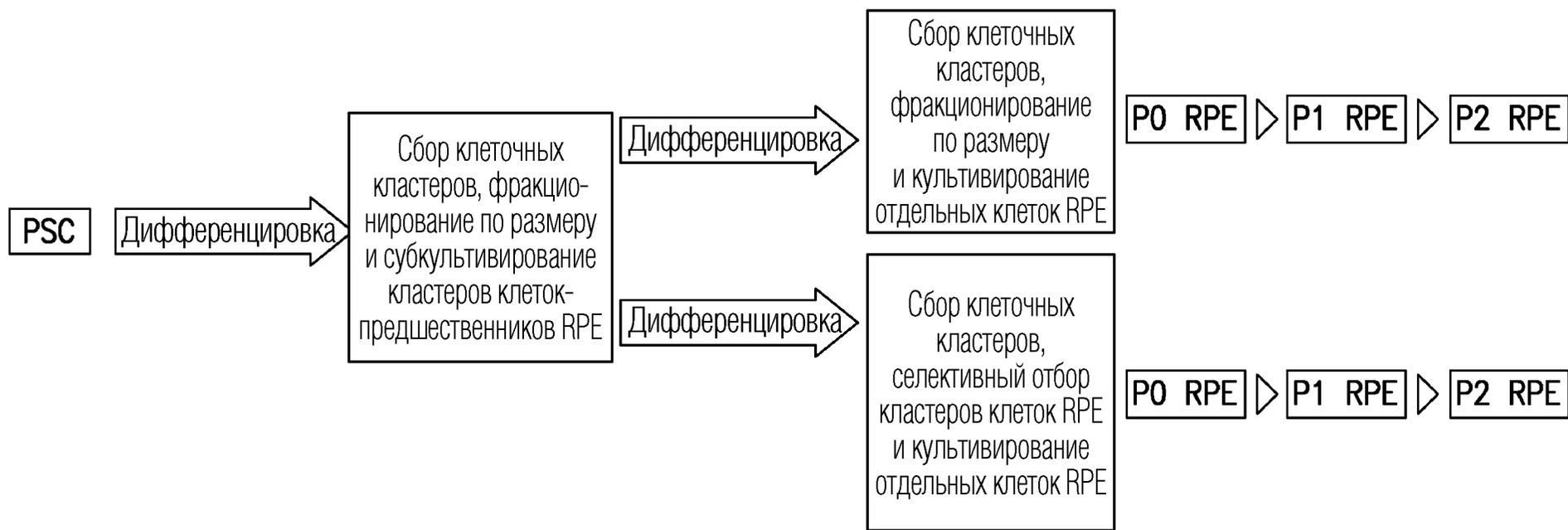
ФИГ. 1



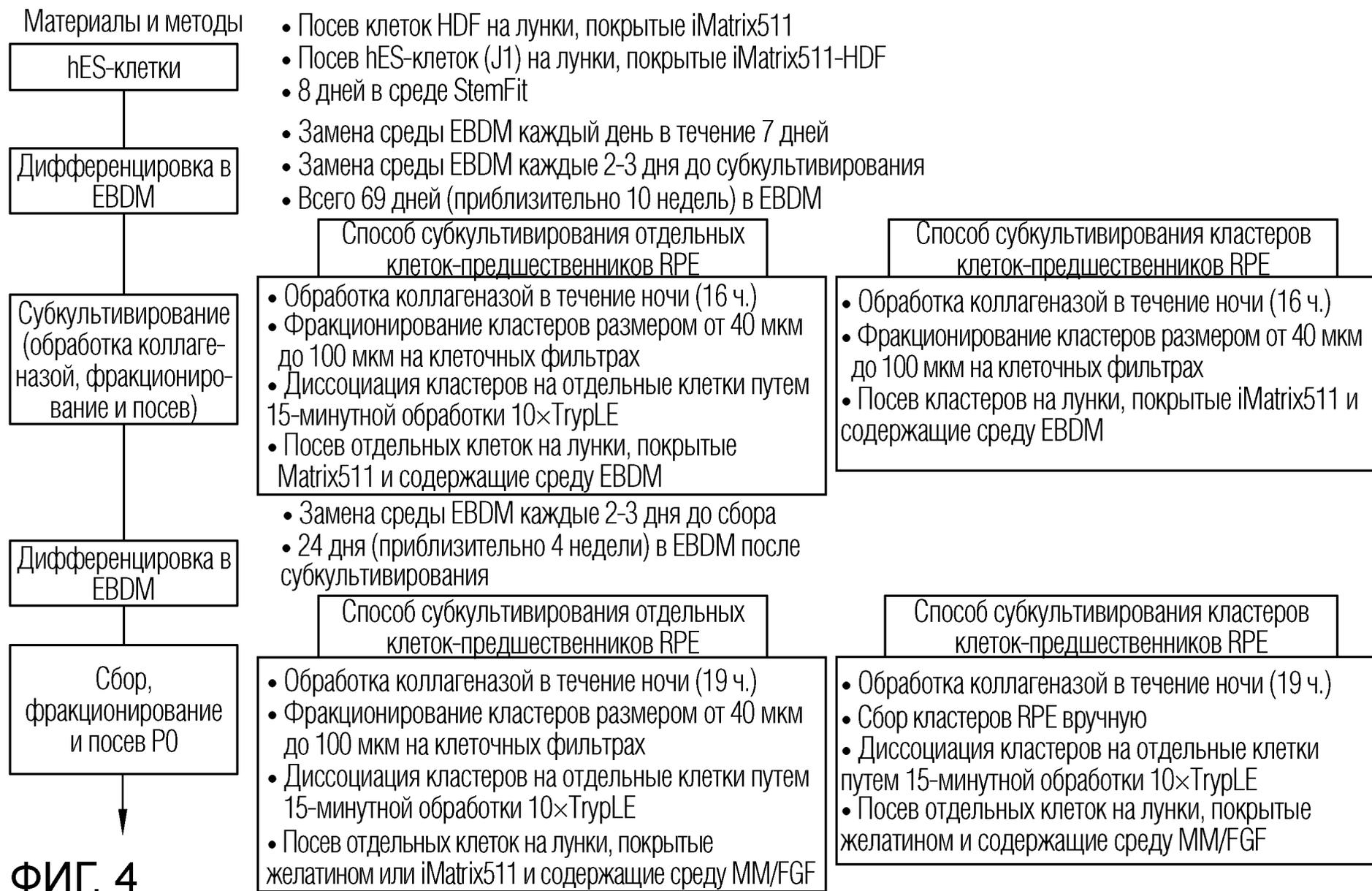
ФИГ. 2

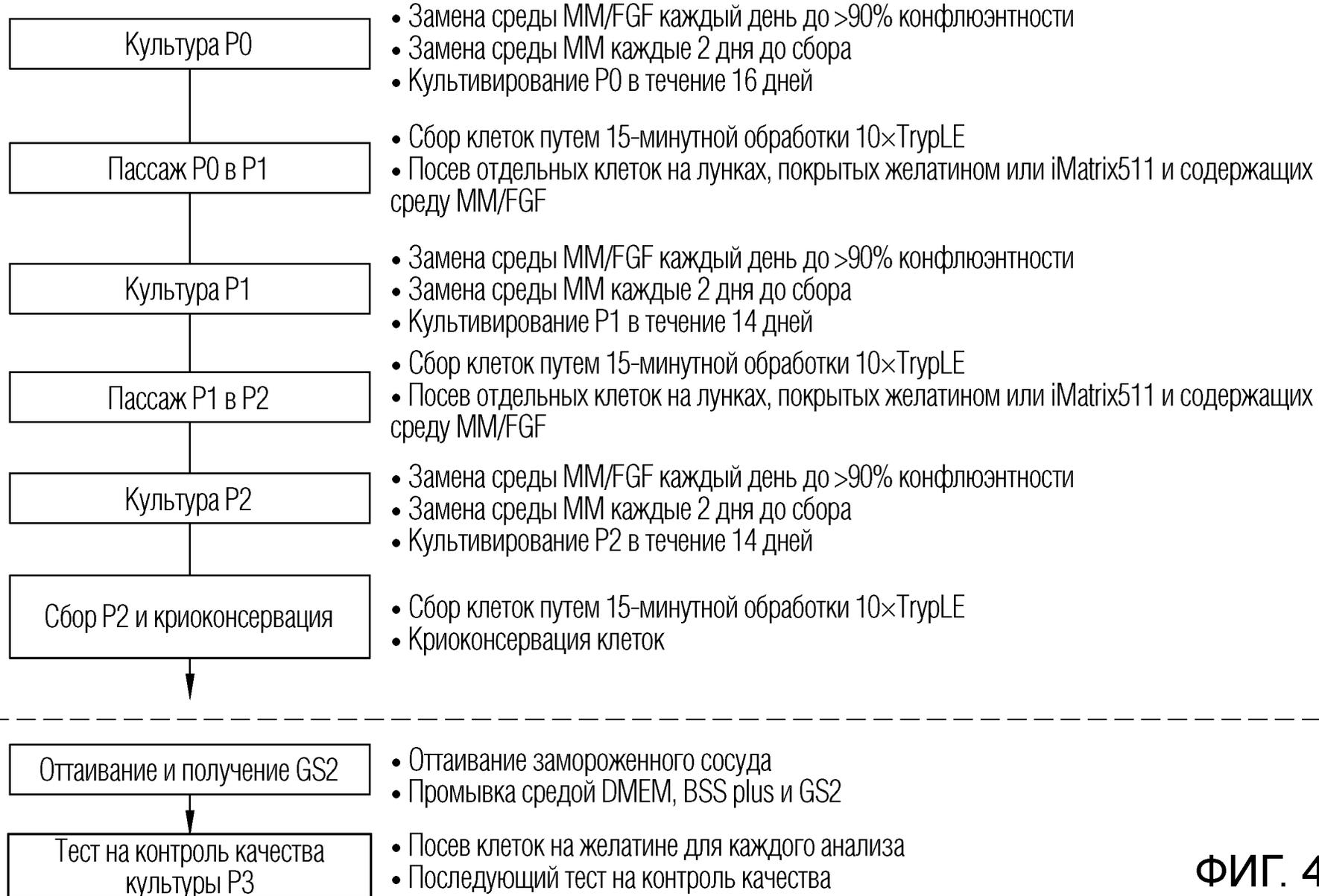


ФИГ. 3А



ФИГ. 3В





ФИГ. 4-1

Тест (дни культивирования после оттаивания и приготовления в GS2)	RPE, партия TD1918	RPE, партия TD2018	RPE, партия TD2118
Способ	Субкультивирование кластера клеток-предшественников RPE	Субкультивирование отдельных клеток-предшественников RPE	Субкультивирование отдельных клеток-предшественников RPE
Размножение RPE	Желатин	Желатин	iMatrix511
Выделение (день 0)	17.4%	19.6%	15.9%
Жизнеспособность (день 0)	94.8%	97.0%	94.1%
FISH (Chr12/Chr17) (день 8)	Норма	Норма	Норма
Кариотип (3-й день)	Норма	Норма	Норма
Чистота, MITF и/или PAX6 (день 2)	100%	100%	100%
Активность (день 4)	85.9%	91.3%	82.8%
кол.ПЦР на мРНК hRPE (день 0): BEST1, PAX6, MITF, RPE65: повышение как минимум на 1 log10 по сравнению с hESC в соответствии с кол.ПЦР на мРНК hESC (день 0): ингибирование по сравнению с hESC (log10): OCT4: $\leq -2,13$ SOX2: $\leq -0,63$ NANOG: $\leq -1,95$	Тест пройден	Тест пройден	Тест пройден
Бестрофин (день 28)	78%	72%	77%
ZO-1 (день 28)	99%	100%	99%

ФИГ. 5